ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΑΣΚΑΛΑΚΗ ΑΚΡΙΒΗ-ΔΗΜΗΤΡΑ, ΑΜ:1463

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΒΕΝΥΧΑΚΗ ΜΑΡΙΑ
ΥΠΕΥΘΥΝΟ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ: ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας στη σχολή Ιατρικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια μου, κ. Βενυχάκη Μαρία, η οποία με εμπιστεύτηκε και πραγματοποίησα την εργασία μου στο εργαστήριο της. Με τις γνώσεις, την εμπειρία αλλά και την υποστήριξή της με βοήθησε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας, παρέχοντας μου παράλληλα γερά θεμέλια και αρχές για την μετέπειτα πορεία μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα με τα οποία συνεργάστηκα στα πλαίσια του εργαστηρίου αλλά και που μου πρόσφεραν ψυχολογική υποστήριξη στις «δύσκολες στιγμές».. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Όλγα Ρασούλη και την Έφη Καραγιάννη για τη βοήθεια και την καθοδόγηση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις δύο νέες φίλες που απέκτησα την Άττικα Παυλίδου και τη Σμαράγδα Πουλάκη, οι οποίες πέρα από βοήθεια μου παρείχαν πολλές όμορφες στιγμές.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου με τους οποίους πέρασα τέσσερα υπέροχα χρόνια και ελπίζω να τα πολλαπλασιάσουμε.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Δασκαλάκη Αντώνη, Παπαχριστοπούλου Χρυσούλα και την αδερφή μου Δασκαλάκη Ιωάννα, οι οποίοι πάντα αποτελούν πρότυπο δύναμης και ανθρωπιάς. Με την τεράστια υποστήριξή τους και την αγάπη τους έχω κατακτήσει τους μέχρι τώρα στόχους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη	5
Εισαγωγή	7
Σκοπός εργασίας	29
Υλικά και Μέθοδοι	31
Αποτελέσματα	51
Συζήτηση-Συμπεράσματα	67
Βιβλιογραφία	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δερματική τραυματική επούλωση είναι μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, η οποία προϋποθέτει τη συνεργασία πολλών κυτταρικών πληθυσμών και παραγόντων. Η διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης χωρίζεται σε τρεις διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες φάσεις. Ονομαστικά είναι οι εξής: 1.φλεγμονή, 2. Επαναθηλιοποίηση, 3. Αναδόμηση.

Παρόλο που η πλήρης αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού είναι σπάνια σε ενηλίκους, η τραυματική επούλωση του δέρματος είναι συνήθως ολοκληρωμένη σε υγιή άτομα. Όμως, πολλά ασθενείς δεν εμφανίζουν ικανοποιητικό βαθμό τραυματικής επούλωσης, όπως συμβαίνει σε άτομα μεγάλης ηλικίας, διαβητικά και παχύσαρκα. Συγκεκριμένα, μεταβολικά προβλήματα που σχετίζονται με τη διατροφική παχυσαρκία (diet-induced obesity, DIO) όπως είναι η ανοχή στην ινσουλίνη, η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή (Chronic low grade systemic inflammation, CLGSI) και ο ο διαβήτης καταλήγει σε καθυστερημένη επούλωση. Για το λόγο αυτό η μελέτη του ρόλου της διατροφικής παχυσαρκίας στην δερματική τραυματική επούλωση θεωρείται ένα πολύ ενδιαφέρον και επίκαιρο θέμα, ιδιαίτερα όταν αυτή συνδυάζεται με στρεσογόνους παράγοντες.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να διευκρινιστεί ο ρόλος της επαγόμενης από διατροφή παχυσαρκίας και της συνεπαγόμενης χρόνιας χαμηλού βαθμού φλεγμονής (DIO-CLGSI) στη δερματική τραυματική επούλωση, in vivo, σε φυσιολογικές καταστάσεις και σε καταστάσεις μειωμένου στρες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μας ποντίκια αγρίου τύπου (wt) αλλά και ποντίκια τα οποία, είχαν έλλειψη του γονιδίου της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοστερόνης (*Crh-/-*), τα οποία είχαν μηδαμινή απόκριση στο στρες. Αρσενικά ζώα 8 εβδομάδων από τους δύο γονότυπους τρέφονταν με τροφή πλούσια σε υψηλά λιπαρά (high fat diet, HFD) για 15 εβδομάδες. Ζώα ελέγχου (control) τρέφονταν με κανονική τροφή για τρωκτικά. Μετά το τέλος των 15 εβδομάδων, πραγματοποίηθηκε εκτίμηση της παχυσαρκίας και της τραυματικής επούλωσης και στους δύο γονοτύπους.

Τα αποτελέσματα της εργασίας συνοψίζονται παρακάτω. Τα ζώα αγρίου τύπου που τρέφονταν με την HFD εμφάνισαν υψηλά επίπεδα γλυκόζης και αυξημένη ανοχή στην ινσουλίνη, καθώς επίσης και σημαντικά καθυστερημένη τραυματική επούλωση. Αντίθετα ηχορήγηση HFD δεν επηρέασε την τραυματική επούλωση στα *Crh-/-*. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν για πρώτη φορά τα αποτελέσματα των συστεμικών διαφορών που παρατηρούνται κατά τη DIO στα στάδια της δερματικής τραυματικής επούλωσης σε καταστάσεις μειωμένου στρες. Η κατανόηση αυτών των αποτελεσμάτων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων για τη βελτίωση της διαδικασίας της επούλωσης σε παχύσαρκα άτομα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η παχυσαρκία είναι το αποτέλεσμα τόσο περιβαλλοντικών όσο και γενετικών παραγόντων (περίπου 60% με 70% της διακύμανσης στο BMI μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και 30% - 40% της διακύμανσης σε γενετικούς). Η συνεισφορά των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιολογία της παχυσαρκίας είναι πολύ καλά γνωστή. Διατροφικές επιλογές κοινωνικοοικονομική κατάσταση και συμπεριφορικοί παράγοντες όπως αδράνεια είναι σημαντικοί παράγοντες στους παχύσαρκους ανθρώπους και κατά συνέπεια η χρόνια ανισορροπία μεταξύ πρόσληψης τροφής και δαπάνη ενέργειας οδηγεί σε παχυσαρκία.
Η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων είναι επίσης σημαντική. Πολλά άτομα είναι γενετικώς προκαθορισμένα να γίνουν παχύσαρκα αλλά παρόλα αυτά ο συγκεκριμένος γονότυπος μπορεί να εκφρασθεί μόνο υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στις δυτικές χώρες έκθεση σε δίαιτα πλούσια σε λιπίδια και στατικό τρόπο ζωής είναι συνηθισμένο φαινόμενο και συνεπώς η αναλογία του πληθυσμού που εκφράζει το γονότυπο της παχυσαρκίας έχει αυξηθεί (1).

Οι πλέων καταστροφικές παρενέργειες της παχυσαρκίας οφείλονται στην ύπαρξη της μεταβολικής φλεγμονής που άρχεται στο σπλαχνικό μεγάλο λευκό λιποκύτταρο του παχύσαρκου, επεκτείνεται στον υπόλοιπο σπλαχνικό λιπώδη ιστό και γενικεύεται σε όλο τον οργανισμό. Η φλεγμονή αυτή οφείλεται σε αμιγώς μεταβολικά αίτια και καλείται μεταβολική. Η μεταβολική φλεγμονή προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη (όπως αυτό φαίνεται στο πιο κάτω καρτούν) που με την σειρά της προκαλεί ανάπτυξη ινσουλινοάντοχου σακχαρώδους διαβήτη και καρδιαγγειακή νόσο. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι κυρίως η σπλαχνική παχυσαρκία (αύξηση ενδοκοιλιακού και περικαρδιακού λίπους) (παχυσαρκία τύπου μήλου) σχετίζεται με την ανάπτυξη χρόνιας μεταβολικής φλεγμονής ενώ η υποδόρια παχυσαρκία σε πολύ λιγότερο βαθμό (παχυσαρκία τύπου αχλαδιού) (2). Μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται από τέτοιου είδους αδιποκύτταρα επάγουν τα τοπικά ευρισκόμενα μακροφάγα να παράγουν υψηλά επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) ο οποίος επάγει τα αδιποκύτταρα με παρακρινικό τρόπο να παράγουν περισσότερα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες πρωτεΐνες οξείας φάσης και χημειοκίνες (όπως τη CCL2 ή τη MCP-1) τα οποία προσελκύουν περισσότερα μονοκύτταρα/μακροφάγα μέσα στο λιπώδη ιστό (3, 4). Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ του υπερπλαστικού αδιποκυττάρου του λευκού λιπώδους ιστού και των τοπικών μακροφάγων καταλήγει στην ανάπτυξη φλεγμονής στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό όπως επίσης και σε χαμηλού βαθμού συστηματική φλεγμονή η οποία επηρεάζει πολλαπλούς ιστούς.

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η διατροφική παχυσαρκία έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για τη συσσώρευση του λιπώδους ιστού. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (≥30% της ενέργειας να προέρχεται από λιπαρά) μπορεί να προκαλέσει παχυσαρκία (5, 6). Επιδημιολογικές μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε χώρες όπως είναι η Κίνα, ο Καναδάς και οι ΗΠΑ έχουν δείξει οτι όσο η ποσότητα των λιπών στη διατροφή αυξάνεται, η πιθανότητα για παχυσαρκία επίσης αυξάνεται (7-9).

Αυτό δεν παρατηρείται μόνο στους ανθρώπους αλλά και σε άλλα ζώα. Στους αρουραίους αλλά και στα ποντίκια έχει βρεθεί μία σχέση μεταξύ των επιπέδων των λιπών στη διατροφή με το σωματικό βάρος ή την αύξησή του. Στη βιβλιογραφία είχε αρχικά βρεθεί οτι αρουραίοι, οι οποίοι κατανάλωνουν τροφή με υψηλές αναλογίες σε λίπη πάχαιναν πιο γρήγορα σε σχέση με άλλους που η διατροφή τους ήταν πιο φτωχή σε λίπη (10).

Για το λόγο αυτό διάφοροι μοντέλα-οργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή πειραμάτων για τη διατροφική παχυσαρκία. Συνήθως χρησιμοποιούνται τροφές με περιεκτικότητα 30-78% της ενέργειας να προέρχεται από τα λίπη (11)- είτε προσθέτοντας συγκεκριμένη τροφή στο διαιτολόγιο του ζώου είτε χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό από τροφή πλούσια σε λιπαρά και σάκχαρα- για τη μελέτη της παχυσαρκίας σε απουραίους. Η χρήση τροφής πλούσια σε υδατάνθρακες έχει φανεί όχι δεν προκαλεί κάποια διαφορά σε σχέση με αυτή που είναι φτωχή (12).

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι μπορεί να συμβάλλουν στην εμφάνιση της διατροφικής παχυσαρκίας είναι η αποτυχία της πραγματοποίησης οξειδωσής του λίπους από το επιπλέον που περιέχεται στην τροφή, αύξηση της δράσης της λιποπρωτεινικής λιπάσης του λιπώδους ιστού, αύξηση της ποσότητας του γεύματος και μείωση της συχνότητας των γευμάτων. Δημοσιεύσεις σε θέματα διατροφικής παχυσαρκίας περιγράφουν πιθανούς μηχανισμούς ρύθμισης του σωματικού βάρους και της πρόσληψης φαγητού που περιέχονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδίως στον υποθάλαμο, δηλαδή νευροπεπτίδια όπως είναι η γκρελίνη και το νευροπεπτίδιο Υ και ορμόνες όπως είναι η ινσουλίνη και η λεπτίνη(13).

ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η παχυσαρκία προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ των περιβαλλοντικών και κληρονομικών παραγόντων, όπως έχει φανεί από πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες έχουν γίνει σε διάφορους πληθυσμούς(14). Η παχυσαρκία από άποψη φυσιολογίας αλλά και κλινικά είναι μία ετερογενής ασθένεια. Πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι 30-80% των μεταβολών του βάρους εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες(15, 16).

Η συνεισφορά των γενετικών παραγόνταν στην παχυσαρκία μπορεί να συνοψιστεί παρακάτω:

1. Σπάνιες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια μπορούνα να επεξηγήσουν πλήρως την ανάπτυξη της παχυσαρκίας (μονογενική παχυσαρκία). Αυτές οι μορφές είναι σπάνιες, αρκετά σοβαρές και συνήθως ξεκινάνε στην παιδική ηλικία (17).
2. Πολλά γενετικά ανάλογα μπορούν να αντιδράσουν με ένα «επικίνδυνο περιβάλλον» (πολυγενετική παχυσαρκία). Στην περίπτωση αυτή κάθε μεμονωμένο γονίδιο θα είχε ένα μικρό αποτέλεσμα στο βάρος και η επίπτωση αυτών των γονιδίων θα μπορούσε να γίνει σημαντική με επίδραση

περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτή η υπόθεση συνδεέται με τη συνήθη παχυσαρκία.

Και οι δύο μορφές παχυσαρκίας συνδέονται με γονίδια , τα οποία εκφράζονται στον υποθάλαμο, που θεωρείται το κύριο τμήμα του εγκεφάλου που συνδέεται με την μεταβολή του βάρους.

ΔΕΡΜΑ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

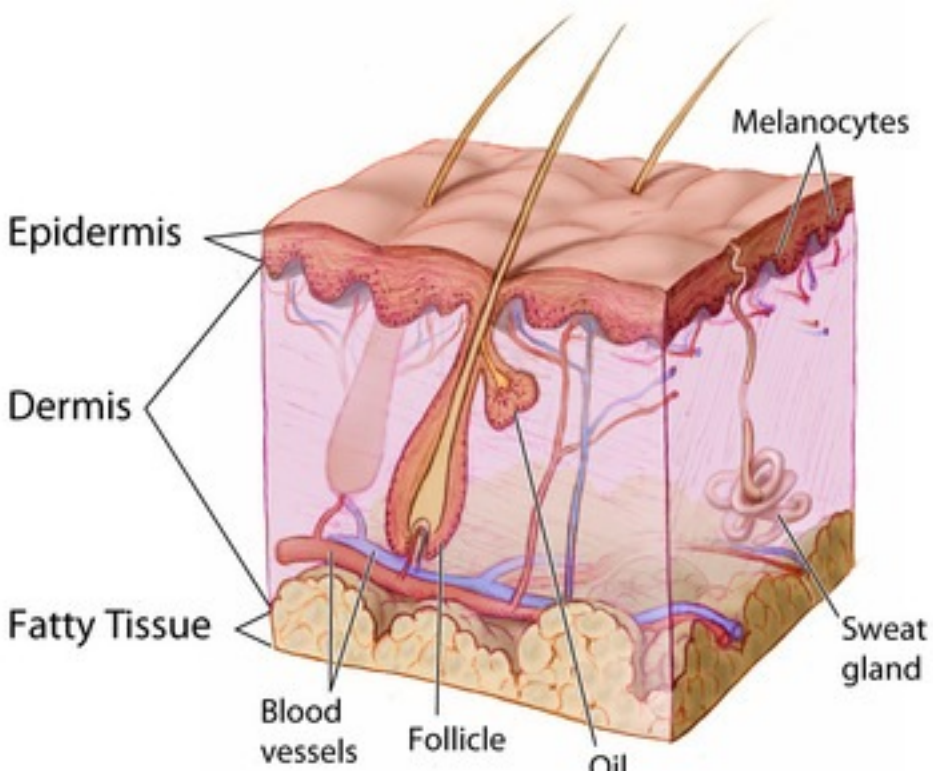
Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο στο ανθρώπινο σώμα και λειτουργεί ως ένας βιολογικά μεταβολικός ενεργός φραγμός που διαχωρίζει την εσωτερική ομοιόσταση από το εξωτερικό περιβάλλον.

Το δέρμα αποτελείται από δύο βασικά τμήματα: την επιδερμίδα με εξαρτηματικές επιθηλιακές δομές και τη δερμίδα με μη επιθηλιακά στοιχεία. Ακόμα και αν δεν θεωρείται ακριβώς μέρος του δέρματος, πολλοί θεωρούν ότι και το υποδόριο λίπος είναι πολύ σχετικό με το δέρμα ανατομικά αλλά και λειτουργικά.

Η δομή και το πάχος της επιδερμίδας και της δερμίδας ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική τοποθεσία.

Το φυσιολογικό δέρμα όπως φαίνεται και παρακάτω διαγραμματικά περιλαμβάνει την επιδερμίδα, τη θυλώδες και δικτυωτή δερμίδα και το υποδόριο λίπος.

Το ανοσολογικό σύστημα του δέρματος αποτελείται από τοπικούς, προσλαμβάνοντες και ανακυκλοφορούντες πληθυσμούς. Οι τοπικοί πληθυσμοί αντιπροσωπεύονται από κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, αγγειακά και λεμφατικά ενδοθηλιακά κύτταρα, μαστοκύτταρα, ιστικά μακροφάγα, Τ λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Οι προσλαμβάνοντες πληθυσμοί περιλαμβάνουν μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλακαι ιωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, όπως επίσης μαστικά κύτταρα και Τ και Β λεμφοκύτταρα. Οι ανακυκλοφορούντες πληθυσμοί περιλαμβάνουν δενδριτικά κύτταρα, φυσικά κύτταρα δολοφόνους και Τ λεμφοκύτταρα. Οι προσλαμβάνοντες και οι ανακυκλοφορούντες πληθυσμοί φτάνουν στο δέρμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (18, 19).



- ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

Η επιδερμίδα αποτελείται από επίπεδα τα οποία ονομάζονται κοκκώδες, πλακώδες και βασικοκυτταρικό. Το πιο επιφανειακό από αυτά είναι η κεράτινη στιβάδα, η οποία στο δέρμα του αντιβραχίου αποτελείται από αλλεπάλληλες στρώσεις και χαλαρά προσκολλημένα στρώματα από απύρηνα κερατινοκύτταρα. Το κοκκώδες επίπεδο αποτελείται από 2 με 3 στενά προσδεδεμένα κυτταρικά επίπεδα που περιέχουν λεπτά, βαθια μπλέ χρωματισμένους κόκκους κερατοϋαλίνης.

Το πλακώδες στρώμα απαρτίζεται από 5 με 7 επίπεδα πολύεδρων κυττάρων συνδεδεμένων μεταξύ τους με μεσοκυττάριες γέφυρες που περιέχουν δεσμοσώματα. Αυτά τα πολυεδρικά κύτταρα περιέχουν διακριτό πυρήνα και έναν ή περισσότερους μικρούς πυρινίσκους.

Τα βασικά κύτταρα περιέχουν συσσωματώματα κόκκων μελανίνης που εμφανίζονται με πράσινο χρώμα. Μπορεί να είναι ακανόνιστα διασκορπισμένα μέσα στο κύτταρο ή να σχηματίζουν συσσωματώματα πάνω από τον πυρήνα. Αυτοί οι κόκκοι είναι πιθανόν να εμφανίζονται στα κύτταρα και του πλακώδους επιπέδου αλλά σε μειωμένο αριθμό.

Η επιδερμίδα δεν διαθέτει αγγεία, αλλά τρέφεται μέσω διάχυσης από τη δερμίδα.(20)

Η ανθρώπινη επιδερμίδα χωρίζεται σε 4 ή 5 στιβάδες, ανάλογα με την ανατομική θέση του δέρματος(20). Σε αντίθεση με την ανθρώπινη επιδερμίδα, η επιδερμίδα ενός ενήλικου μυός περιλαμβάνει μόνο δύο στιβάδες(21).

- ΔΕΡΜΙΔΑ

Η θυλώδης δερμίδα βρίσκεται μεταξύ της ζώνης του επιδερμικού υπογείου και της δικτυωτής δερμίδας. Αποτελείται από ίνες κολλαγόνου που είναι τυχαία διασκορπισμένες αλλά όχι περιπλεγμένες. Παρόμοιο κολλαγόνο με αυτό που υπάρχει στη θηλώδη δερμίδα εμφανίζεται γύρω από υποφύσεις και αιμοφόρα αγγεία.

Η δικτυωτή δερμίδα αποτελείται από διαφόρου μεγέθους δέσμες ινών κολλαγόνου που συμπεριπλέκεται ακανόνιστα, ιδιαίτερα στο χαμηλότερο ένα τέταρτο της δικτυωτής δερμίδας όπου πολλές ίνες τρέχουν παράλληλα με τον μακρύ άξονα του δέρματος. Υπάρχουν ποικίλοι αριθμοί ινοβλαστών μεταξύ των δεσμών αυτών.

- ΑΓΓΕΙΑΚΟ-ΝΕΥΡΙΚΟ-ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Η αγγείωση του δέρματος χωρίζεται στο υποθηλώδες πλέγμα, που βρίσκεται στην πάνω δικτυωτή δερμίδα και στο εν τω βάθη πλέγμα, που συναντιέται στην κάτω δικτυωτή δερμίδα. Τα δύο πλέγματα συνδέονται με επικοινωνούντα αγγεία, που είναι περισσότερα στην άνω δερμίδα και γύρω από τις θύλακο-ιδρωτοποιές και εξωκρινείς μονάδες. Ένα λεμφικό δίκτυο, συνυπάρχει με το αγγειακό στρώμα, αν και αποτελεί ξεχωριστή μονάδα (19).

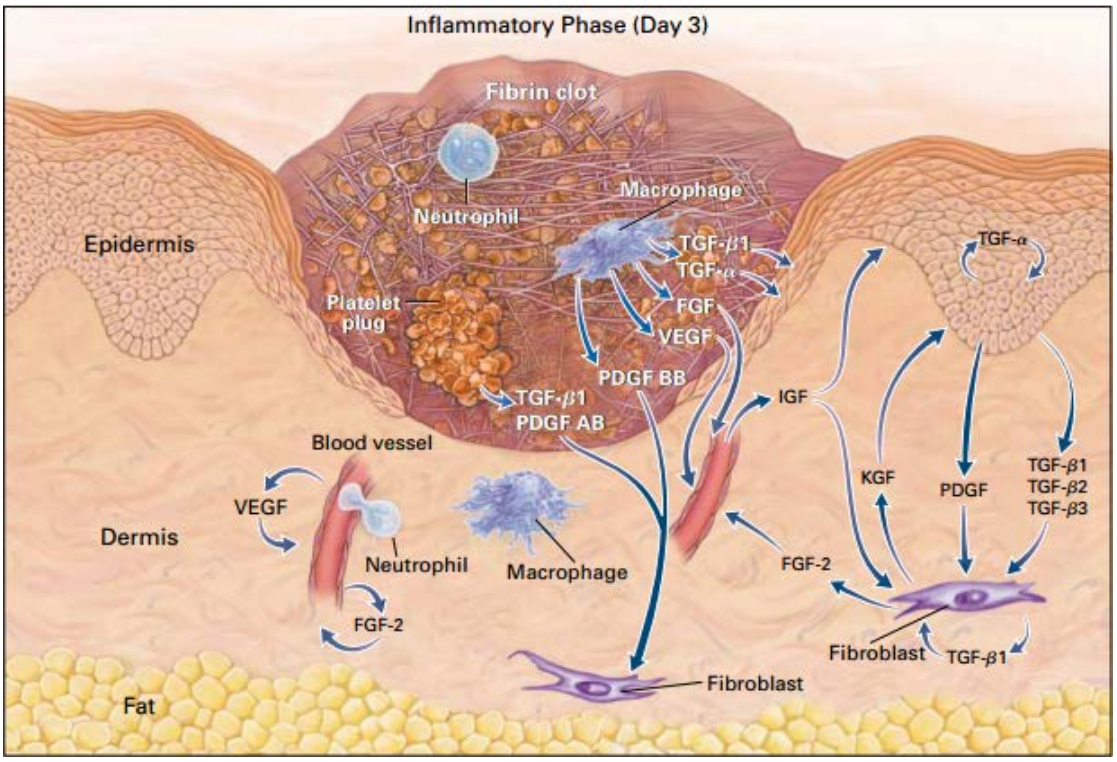
Το ΚΝΣ συνδέεται είτε άμεσα (δια μέσου απαγωγών νεύρων ή διαμεσολαβητών προερχόμενων από το ΚΝΣ) είτε έμμεσα (δια μέσου των επινεφριδίων ή των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος) με το δέρμα. Τα νεύρα που βρίσκονται στο δέρμα, ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα προερχόμενα από την κυκλοφορία του αίματος και σε συναισθηματικά ερεθίσματα. Τόσο τα αισθητικά όσο και τα αυτόνομα νεύρα επηρεάζουν μια πληθώρα φυσιολογικών (εμβρυογένεση, αγγειοσυστολή, αγγειοδιαστολή, θερμοκρασία του σώματος, λειτουργία φραγμού, έκκριση, διαφοροποίηση, ανάπτυξη, θρέψη κυττάρων, ανάπτυξη νεύρων) και παθολογικών (φλεγμονή, ανοσολογική άμυνα, απόπτωση, πολλαπλασιασμός και τραυματική επούλωση) καταστάσεων (22).

ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

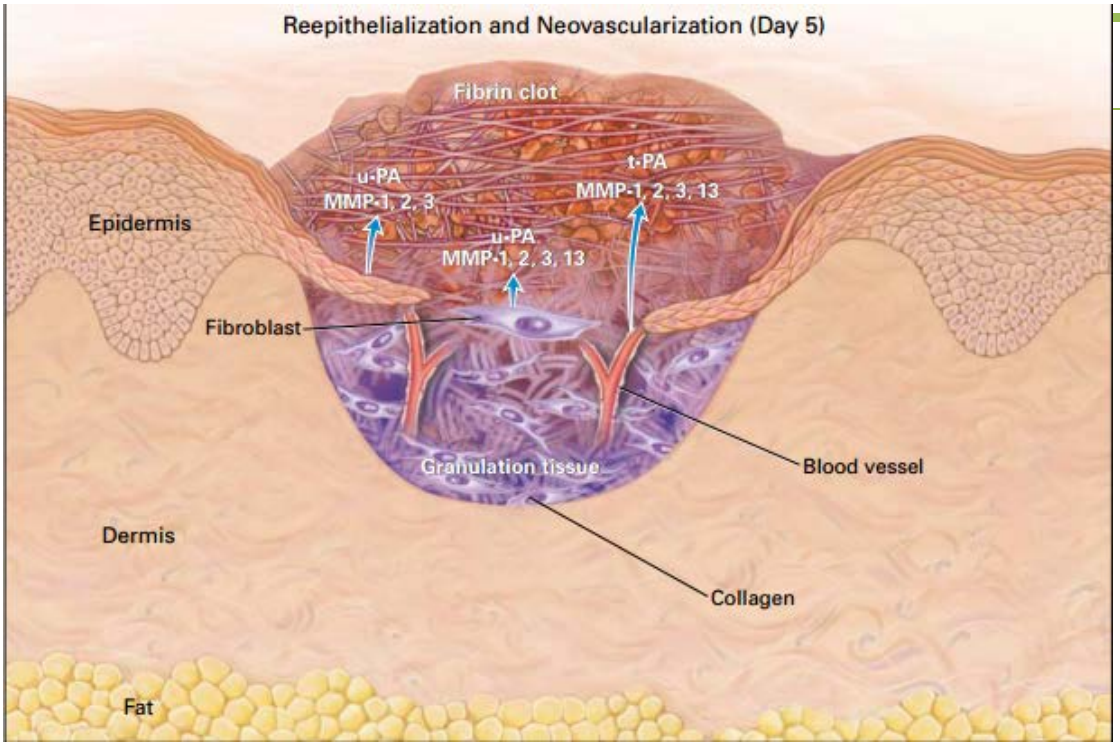
Η αποκατάσταση των τραυμάτων είναι μία πό τις πιο περίπλοκες βιολογικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου. Μετά το τραύμα, πολλαπλά βιολογικά μονοπάτια ενεργοποιούνται αμέσως και συγχρονίζονται για απόκριση. Στους ενήλικες ανθρώπους, η τραυματική επούλωση συνήθως οδηγεί σε μία μη λειτουργική μάζα ινώδους ιστού, γνωστή ως ουλή. Σε αντίθεση, στα αρχικά στάδια της κύησης, οι τραυματισμένοι ιστοί των εμβρύων μπορούν να ξανασχηματισθούν πλήρως, χωρίς ίνωση με μία διαδικασία η οποία μοιάζει με αναγέννηση. Κάποιοι οργανισμοί βέβαια, διατηρούν αυτήν την ικανότητα να αναγεννούν τον ιστό και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής τους. Μελέτες σε πληγές εμβρύων, με επούλωση

χωρίς ουλή έχουν δείξει διαφορές στα προφίλ των αυξητικών παραγόντων σε σχέση με τις πληγές των ενηλίκων. (23)

Λίγα λεπτά μετά το τραύμα ενδοκυτταρικοί και εξωκυτταρικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται αμέσως για την διατήρηση της ομοιόσταστης του δέρματος μέσω της αποκατάστασης του ιστού. Κυτταρικά συσταστικά του ανοσοποιητικού συστήματος, της διαδικασίας πήξης του αίματος και τα μονοπάτια της φλεγμονής ενεργοποιούνται. Πολλοί κυτταρικοί τύποι -ανοσολογικά κύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα), ενδοθηλιακά κύτταρα, κερτινοκύτταρα και ινοβλάστες- υποβάλλονται σε αλλαγές στην εκφραση του γονιδίου τους και στο φαινότυπο, οδηγώντας σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και μετανάστευση.(24, 25)



Εικόνα 1: δερματική τραυματική επούλωση ημέρα 3.



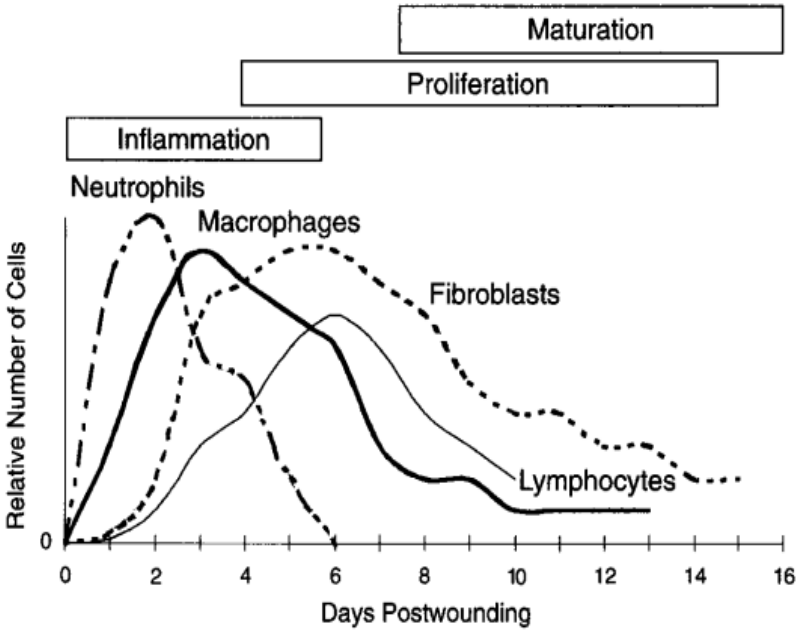
Εικόνα 2: δερματική τραυματική επούλωση ημέρα 5

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Σε όλους τους οργανισμούς, η τραυματική επούλωση πραγματοποιείται σε τρία επικαλυπτόμενα αλλά διακριτά στάδια: τη φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό και την αναδόμηση.

ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η πρώτη φάση της επανόρθωσης του τραυματισμένου δέρματος ξεκινά αμέσως μετά την ιστική καταστροφή και πραγματοποιείται με τη συνέργεια παραγόντων πήξης, φλεγμονωδών μονοπατιών και του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία συνεργάζονται για να εμποδίσουν τη συνεχιζόμενη απώλεια αίματος και υγρών, να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και να παρεμποδίσουν τυχόν επιμόλυνση. Η αιμόσταση επιτυγχάνεται σύντομα



Εικόνα 3: Εμφάνιση των διάφορων κυτταρικών τύπων στην τραυματική επούλωση με χρονική σειρά

μετά τον τραυματισμό με τη συμβολή των αιμοπεταλίων και της φιβρίνης. Τα αιμοπετάλια εκτός από την αιμόσταση είναι απαραίτητα και για τη φλεγμονώδη απόκριση. Περιέχουν κοκκία τα οποία είναι πλούσια σε παράγοντες όπως τον αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF), τον αυξητικό παράγοντα μεταλλαγής (transforming growth factor beta,TGFβ) και τον παράγοντα πήξης IV. Αυτοί οι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της αλληλουχίας των γεγονότων της τραυματικής επούλωσης δεδομένου ότι προσελκύουν ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα στην πληγή.

Η φλεγμονώδης φάση η οποία ακολουθεί τη δημιουργία του θρόμβου και την αιμόσταση μπορεί να χωριστεί στην πρόωρη και την καθυστερημένη φλεγμονώδης απόκριση (26). Ο κύριος τύπος κυττάρων είναι τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (PMN) τα οποία προσελκύονται στην πληγή από παράγοντες του συμπληρώματος όπως τον C5a και τον TGF-β και πεπτιδικά προϊόντα προερχόμενα από βακτήρια και τα οποία εισέρχονται στην πληγή μέσα στις πρώτες 24 ώρες. Η κύρια λειτουργία των PMNs είναι να εμποδίσουν τυχόν μόλυνση και να απομακρύνουν τα υπολείμματα της διάσπασης με την απελευθέρωση πρωτεϊνασών και άλλων ένζυμων μέσα στην πληγή. Παρά αυτές τις σπουδαίες λειτουργίες τα ουδετερόφιλα δεν είναι εντελώς απαραίτητα καθώς αφαίρεση αυτών δεν επηρεάζει σημαντικά τη επούλωση του τραύματος. Η καθυστερημένη φλεγμονώδης απόκριση ξεκινά περίπου 48-72 ώρες μετά τον τραυματισμό. Ο κύριος τύπος κυττάρων της φάσης αυτής είναι τα μακροφάγα τα οποία προσελκύονται στην πληγή από χημειοτακτικούς παράγοντες όπως τον TGF-β και τον PDGF και διαφορά άλλα συστατικά του συμπληρώματος. Τα μακροφάγα του τραύματος διαδραματίζουν σπουδαίους ρόλους στην τραυματική επούλωση με τον κυριότερο να αποτελεί η έκκριση αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β, ο PDGF, ο προσομοίαζαν με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας 1 (insulin-like growth o factor 1,IGF-1), ο TGF-α και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την παραγωγή και οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας από τους ινοβλάστες και το πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία είναι απαραίτητα για την αγγειογένεση (Riches, D.W.H. (1996) Macrophage involvement in wound repair, remodeling, and fibrosis. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair (Vol. xxii) (Clark, R.A.F., ed.), pp. 95-141, Plenum Press, New York).

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Η δεύτερη φάση της τραυματικής επούλωσης–φάση πολλαπλασιασμού, επιθηλιοποίησης, αγγειογένεσης και δημιουργίας προσωρινού νέου ιστού- συμβαίνει 2-10 ημέρες μετά τον τραυματισμό και χαρακτηρίζεται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση διαφόρων κυτταρικών τύπων. Το πρώτο γεγονός είναι η μετανάστευση των κερατινοκυττάρων στην τραυματισμένη δερμίδα. Ακολουθεί ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) και τα νέα τριχοειδή που είναι συνδεδεμένα με τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα αντικαθιστούν τη μήτρα φιβρίνης με κοκκώδη ιστό, ο οποίος σχηματίζει ένα νέο υπόστρωμα για τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων σε αργότερες φάσεις της τραυματικής επούλωσης. Τα κερατινοκύτταρα τα οποία βρίσκονται πίσω από την αιχμή του τραύματος πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν και τελικώς αποκαθιστούν τη λειτουργία του φραγμού του επιθηλίου. Το ερέθισμα για τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και τη χημειοταξία τους είναι ο EGF και TGF-β που παράγονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και μακροφάγα (27). Στη συνέχεια οι

ινοβλάστες συνθέτουν και εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα των κερατινοκύτταρων (KGF)-1, KGF-2, και ιντερλευκίνη-6 (IL-6), παράγοντες οι οποίοι διεγείρουν τα γειτνιάζοντα κερατινοκύτταρα να μεταναστεύσουν στην περιοχή της πληγής να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν στη επιδερμίδα (28). Οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα είναι τα κυριότερα κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγονται από VEGF (ο οποίος παράγεται από κερατινοκύτταρα στις άκρες της πληγής αλλά και από μακροφάγα, ινοβλάστες αιμοπετάλια και άλλα ενδοθηλιακά κύτταρα) και ξεκινούν να δημιουργούν νέα αγγεία. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι τα κερατινοκύτταρα μπορούν να διεγερθούν για να παράγουν VEGF από IL-1, TNF-α, TGF-β1, and KGF. Οι ινοβλάστες μεταναστεύουν στην πληγή και από τον περιβάλλοντα ιστό ή από το μυελό των οστών, ενεργοποιούνται από μακροφάγα και ξεκινούν να συνθέτουν κολλαγόνο και να πολλαπλασιάζονται. Οι PDGF και EGF είναι τα κυριότερα σήματα για τους ινοβλάστες και παράγονται από αιμοπετάλια και μακροφάγα. Οι ινοβλάστες παράγουν κολλαγόνο κυρίως τύπου III μεταμορφώνονται σε μυοινοβλαστες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για στη σύσπαση της πληγής η οποία επάγεται από τον παραγόμενο από μακροφάγα TGF-β1. Οι μυοινοβλάστες είναι συσταλτά κύτταρα τα οποία έχουν ως σκοπό να φέρνουν τις άκρες των πληγών κοντά με την πάροδο του χρόνου.

ΑΝΑΔΟΜΗΣΗ

Κλινικά η ωρίμανση και η αναδιαμόρφωση του τραυματισμένου δέρματος είναι η πιο σημαντική. Η φάση αυτή της επούλωσης του τραύματος -αναδιαμόρφωση- ξεκινά 2-3 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό και διαρκεί για ένα χρόνο ή και περισσότερο. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής όλες οι διαδικασίες οι οποίες είχαν ενεργοποιηθεί με τον τραυματισμό μειώνονται και τελικά σταματούν. Τα περισσότερα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και οι μυοινοβλάστες αποπίπτουν ή εξέρχονται της πληγής αφήνοντας μια μάζα η οποία περιέχει λίγα κύτταρα και αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Οι αλληλεπιδράσεις επιθηλιακών-μεσεγχυματικών κυττάρων που συμβαίνουν κατά τη φάση αυτή συνεχώς ρυθμίζουν την ακεραιότητα του δέρματος και την ομοιοστασία του. Και πρέπει να υπάρχουν και επιπρόσθετοι μηχανισμοί ανάδρασης προκειμένου να διατηρούνται οι άλλοι τύποι κυττάρων στο δέρμα. Επιπροσθέτως, κατά τη διάρκεια των 6-12 μηνών η κυτταρική ουσία ενεργά αναδιαμορφώνεται από κυρίως τύπου III κολλαγόνο σε εκείνη που κυρίως αποτελείται από τύπο I κολλαγόνου (29). Η διαδικασία αυτή επιτελείται από μεταλλοπρωτεινάσες οι οποίες εκκρίνονται από ινοβλάστες μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα και ενδυναμώνει το αναπλαθώμενο ιστό. Παρόλα αυτά ο ιστός ποτέ δεν αποκτά τις ιδιότητες του ανέπαφου ιστού (30).

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι επιπροσθέτως των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που διενεργούνται σε όλες τις φάσεις της κυτταρικής επούλωσης, η διαδικασία αυτή ελέγχεται από ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών (31, 32). Παρόλα

αυτά ο ρόλος των ενδογενών αυξητικών παραγόντων στη διαδικασία της επούλωσης έχει μερικώς μόνο διασαφηνιστεί.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

Στην τραυματική επούλωση, η έκφραση της IL-6 και TNF-α βρέθηκαν να ρυθμίζονται θετικά κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα και τα μακροφάγα έχουν βρεθεί οτι είναι κύριες πηγές κυτοκινών, αλλά η έκφραση τους παρατηρήθηκε και στους τοπικούς κυτταρικούς τύπους. Ο συγχρονισμός της έκφρασης αυτών των κυτοκινών είναι πολύ πιθανό να είναι σημαντικός για τη φυσιολογική επούλωση.

- TNF-a

Ο TNF-a ανήκει στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ο TNF-a ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η φλεγμονή και ο μεταβολισμός της ενέργειας.(33, 34) (35)Εμφανίζεται στα αρχικά στάδια κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, με μέγιστη δράση την τρίτη ημέρα μετά το τραύμα.(36) Τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται γρήγορα μετά το τραύμα παρόλη την παρατεταμένη ύπαρξη του mRNA, προτείνοντας ένα μετα-μεταγραφικό ρυθμιστικό μηχανισμό(37). Η κύρια πηγή του TNF-a είναι τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα. Έχει βρεθέι οτι μπορεί να αυξήσει ή αντίστοιχα να μειώσει τη σύνθεση του κολλαγόνου στους ινοβλάστες. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να απελευθερώνει άλλα κυτταρικά ενδιάμεσα που μπορεί να έχουν ανταγωνιστικά αποτελέσματα.(38)

- IL-6

Με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια τα οποία είχαν έλλειψη του γονιδίου της ιντερλευκίνης 6 βρέθηκε οτι στα ζώα αυτά η επούλωση των πληγών συνέβαινε τρεις φορές πιο αργά σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Οι πληγές στα συγκεκριμένα ζώα εμφάνιζαν δραματική καθυστέρηση στη φάση της επαναεπιθηλιοποίησης. Επιπλέον, ο σχηματισμός του κοκκιώδους ιστού καθυστερούσε. Η IL-6 θεωρείται πολύ σημαντική για για την εκκίνηση της τραυματικής επούλωσης με δύο τρόπους: αρχικά μέσω μιτογονικών επιδράσεων στα ακραία κερατινοκύτταρα της πληγής ή μέσω χημειοπροσελκυστικών επιδράσεων στα ουδετερόφιλα.

Αντίθετα, η παντελής έλλειψη IL-6 προκαλεί καθυστερημένη τραυματική επούλωση , υψηλά επίπεδα της είναι συνδεδεμένα με την δερματική ουλή. Η αύξηση της IL-6 μετά το τραύμα είναι μόνο παροδική στις εμβρυϊκές πληγές αλλά είναι παρατεταμένη στους ενηλίκους. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν οτι μόνο η παροδική θετική ρύθμιση των προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η IL-6 όπως επίσης και διάφορες χημοκίνες σε εμβρυϊκές πληγές σε σύγκριση με αυτές στους ενήλικες μπορούν εν μέρει να δικαιολογήσουν την διαφορετική ουλώδη απόκριση των εμβρών σε σχέση με τα ενήλικα θηλαστικά(39).

Παχυσαρκία και φυσιολογία δέρματος

Η παχυσαρκία και η συνοδεύουσα μεταβολική φλεγμονή είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι σχετίζονται με και έχουν ένα μεγάλο αριθμό δράσεων και επιδράσεων που αφορούν τη φυσιολογία του δέρματος συμπεριλαμβανομένων δράσεων στη λειτουργία του φραγμού του δέρματος, των σμηγματογόνων αδένων και της παραγωγής σμήγματος, των ιδρωτοποιών αδένων, της δομής και λειτουργίας του κολλαγόνου, της τραυματικής επούλωσης της μκροκυκλοφορίας και της μακροκυκλοφορίας και του υποδόριου ιστού (40). Η επούλωση των τραυμάτων στους πάσχοντας από μεταβολικό σύνδρομο (παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη, ινσουλινοάντοχο διαβήτη, αρτηριοσκλήρωση) είναι προβληματική. Παράδειγμα, τα διαβητικά άτονα έλκη στα δάχτυλα των κάτω άκρων και στην πελματιαία επιφάνεια. Είναι επίσης γνωστό ότι ο λιπώδης ιστός αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης κατακλίσεων και άτονων ελκών σε χρονίως κλινήρεις ασθενείς (41).

ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ ΚΑΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

Η παχυσαρκία είναι ένα πολύ σημαντικό και συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος θέμα για την υγεία. Συνδέεται με πλήθος προβλημάτων που περιλαμβάνουν την καθυστερημένη τραυματική επούλωση, την ολική αποτυχία του τραύματος και τη διάνοιξη περιτονίας (42).

Ο λιπώδης ιστός είναι μία ξεχωριστή οντότητα που συχνά θεωρείται ως άσηπτη (43, 44). Από ανατομική πλευρά ο λιπώδης ιστός χωρίζεται σε υποκατηγορίες, οι οποίες έχουν τη μορφή λοβών, ο κάθε ένας από τους οποίους περιέχει χιλιάδες κύτταρα, τα οποία διαχωρίζονται με ινώδη διαφράγματα τα οποία διαθέτουν μεγάλα αγγεία και νευρώνες(45).

Καθώς η υπέρμετρη λιπαρότητα προκαλεί μία αυξημένη απαίτηση για κυκλοφορία, ο λιπώδης ιστός ξεκινά να αναπτύσσει ένα δικό του αγγειακό σύστημα. Οι αγγειακές ανεπάρκειες αυξάνονται στην περίπτωση της παχυσαρκίας γιατί η πυκνότητα των κοιλοτήτων δεν αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του λιπώδους ιστού. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, ένας από τους οποίους είναι η μείωση στην ελαστίνη και η αύξηση στο κολλαγόνο V και VI γύρω από μεγάλα αγγεία στον λιπώδη ιστό, καταλήγοντας σε ένα ινωτικό περιβάλλον. Αυτές οι αλλαγές στην εξωκυτταρική μήτρα συνεισφέρουν στην ίνωση και σε ακαμψία του λιπώδους ιστού, εμποδίζοντας την έκταση μεμονωμένων λιποκυττάρων. Αυτό μπορεί να περιορίσει σε μεγάλο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κοιλοτήτων, οδηγώντας σε επιβραδυνόμενη αγγειογένεση. Συμπληρωματικά με τα παραπάνω είναι και ο μεγαλύτερος αριθμός μεγάλων αιμοφόρων αγγείων στα παχύσαρκα άτομα. Τα μεγαλύτερα αγγεία έχουν μεγαλύτερο φραγμό διαχύσεως και έτσι δεν μεταφέρουν οξυγόνο τόσο αποτελεσματικά όσο οι κοιλότητες. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε μειωμένη αιμάτωση του λιπώδους ιστού και το εκθέτουν από νωρίς σε υποξικό περιβάλλον. Αυτό μπορεί να λειτουργεί δυσμενώς για την διαδικασία της τραυματικής

επούλωσης, η οποία χρειάζεται την αγγειακή αναγέννηση και τη διάχυση του οξυγόνου.(42)

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η δερματική τραυματική επούλωση σε συνδυασμό με την παχυσαρκία αποτελεί ένα τύπο στρες. Για το λόγο αυτό στη διεξαγωγή του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν μάζι με τα ζώα αγρίου τύπου και ζώα με έλλειψη του γόνιδίου της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοστερόνης (CRH), η οποία αποτελεί τον βασικό ρυθμιστή του κύριο άξονα του στρες, σηλαδή του υποθαλαμικού-υποφυσιακού- επινεφριδιακού άξονα (HPA axis).

Crh -/- μύες

Η δημιουργία και η χρήση μυών που φέρουν γενετικές μεταλλάξεις ή στους οποίους απουσιάζουν ειδικά γονίδια αποτελεί σπουδαίο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου και της λειτουργικότητας πολλών γονιδίων in vivo και τη σύνδεσή τους με διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Οι μύες με ανεπάρκεια στη CRH (*Crh-/-)* δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο του Dr Joseph A. Majzoub. Η δημιουργία τους βασίστηκε στη στοχευμένη διαταραχή των εμβρυικών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού(46).

Ενώ οι *Crh-/-* μύες που προέρχονται από ετερόζυγη διασταύρωση επιβιώνουν φυσιολογικά, για την επιβίωση των απογόνων *Crh-/-* που προέρχονται από *Crh-/-* μητέρες απαιτείται η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (κορτικοστερόνης) (μέσω του πόσιμου νερού στις μητέρες) κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ζωής και μέχρι τον πλήρη απογαλακτισμό(47). Ανεπαρκής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στο θάνατο των απογόνων τις πρώτες ώρες της ζωής τους που οφείλεται στη μη φυσιολογική ανάπτυξη των πνευμόνων τους.

Οι *Crh-/-* μύες δεν παρουσιάζουν διαφορές στα χαρακτηριστικά όσον αφορά το μέγεθος, τη δραστηριότητα και τη γενική συμπεριφορά με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ζώα. Επιπλέον, δεν διαφέρουν στη διάρκεια ζωής τους. Εντούτοις, η απουσία της CRH επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη όσο και τη λειτουργία των επινεφριδίων στους *Crh-/-* (υποπλασία επινεφριδίων, μειωμένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και καθυστέρηση στην παραγωγή επινεφρίνης). Παρά τα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο αίμα και τα υψηλά επίπεδα έκφραση βασοπρεσίνης (vasopressin) στον υποθάλαμο, οι *Crh-/-* μύες παρουσιάζουν φυσιολογική έκφραση POMC και πρωτεϊνικό περιεχόμενο ACTH στην υπόφυση και φυσιολογική συγκέντρωση ACTH στο πλάσμα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ζώα. Όσο αφορά τον κιρκάδιο ρυθμό παραγωγής της κορτικοστερόνης είναι απών στους αρσενικούς και ελαττωμένος στους θηλυκούς *Crh-/-* μύες (48).

Καθώς η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής του HPA άξονα, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (π.χ. απομόνωση, νηστεία, αιμορραγία, υπογλυκαιμία) όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα(49). Η μικρή ενεργοποίηση του άξονα στα

Crh-/- θηλυκά ποντίκια σε αντίθεση με την απουσία ενεργοποίησης στα αρσενικά μετά από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα υποδηλώνει την παρουσία άλλων παραγόντων που καθορίζουν τη διαφορετική απόκριση μεταξύ των φύλων. Παρά την υπολειπόμενη ενεργοποίηση του HPA, τα *Crh-/-* παρουσιάζουν φυσιολογική συμπεριφορά απόκρισης στο ψυχολογικό στρες(50). Φαίνεται ότι άλλα πεπτίδια, όπως η UCN1 υποκαθιστούν τη CRH στις περιπτώσεις που εκείνη απουσιάζει (51).

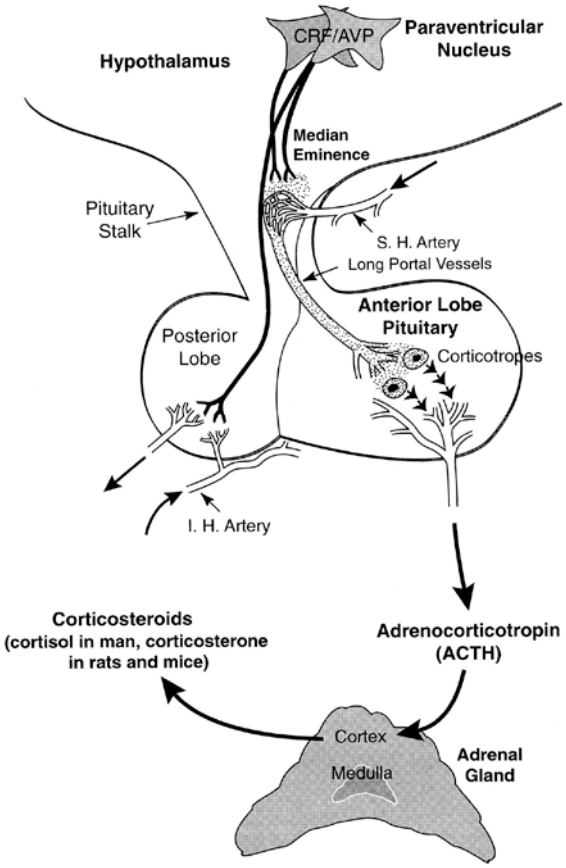
ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΟΣ-ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΟΣ –ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ

Ο HPA άξονας είναι ο κυριότερος ενδοκρινικός άξονας υπεύθυνος για την απόκριση του οργανισμού στο στρες. Οι κύριοι σταθμοί ελέγχου του στρες εντοπίζονται στον υποθάλαμο και στο στέλεχος του εγκεφάλου και περιλαμβάνουν την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) .

Ένας στρεσογόνος παράγοντας αρχικά, ενεργοποιεί τους νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου που συνθέτουν και εκλύουν την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Αυτή με τη σειρά της μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας εισέρχεται στα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης και διεγείρει την έκφραση του γονιδίου της προπιομελανοκορτίνης (POMC) και τελικά την απελευθέρωση αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH)(52).

Όταν η ACTH εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, παράλληλα με αυτήν εκκρίνονται και διάφορες άλλες ορμόνες που έχουν παρόμοια χημική δομή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μόριο του RNA προκαλεί την παραγωγή ενός σημαντικά μεγαλύτερου πρωτεϊνικού μορίου, μιας προορμόνης της προπιομελανοκορτίνης (POMC), όπως αναφέρουμε παραπάνω. Αυτή είναι η πρόδρομη ορμόνη της ACTH όπως και αρκετών άλλων πεπτιδίων, όπως η μελανοτροπίνη (MSH), η β-λιποτροπίνη και η β-ενδορφίνη.

Ο HPA άξονας και η CRH είναι ένα από τα πρώτα ενδοκρινικά συστήματα που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, ίσως γιατί η έκκριση γλυκοκορτικοειδών είναι απαραίτητη για την ωρίμανση πολλών βασικών εμβρυϊκών οργάνων. Αυτό



Εικόνα 5: Τρόπος ενεργοποίησης HPA άξονα έπειτα από δράση ενός στρεσογόνου παράγοντα. (https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/lebenswissenschaften/2012/bartlang/)

αποδεικνύεται από πειράματα κατά τα οποία νεογέννητα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της κορτικοστερόνης *Crh -/-* τα οποία προέρχονται από *Crh -/-* μητέρες πεθαίνουν λόγω ανωμαλιών κατά το σχηματισμό των πνευμόνων.

ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Η ACTH είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι τα τελικά προϊόντα του HPA άξονα, τα οποία συμμετέχουν στον έλεγχο της ομοιόστασης ολόκληρου του σώματος και στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Παίζουν ένα βασικό ρόλο στη ρύθμιση του HPA άξονα και στον τερματισμό της απόκρισης στο στρες δρώντας σε εξωϋποθαλαμιακά κέντρα, στον υποθάλαμο και στην πρόσθια υπόφυση. Η ανατροφοδοτική αναστολή των γλυκοκορτικοειδών στην εκκριτική απόκριση της ACTH δρα με σκοπό τον περιορισμό της διάρκειας της έκθεσης των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των καταβολικών και ανοσοκατασταλτικών αποτελεσμάτων αυτών των ορμονών (53) .

ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH)

Ένα από τα βασικά μέλη του άξονα του στρες είναι η CRH. Το 1981, η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης CRH ή CRF ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων απομονώθηκε από τον υποθάλαμο του προβάτου(54, 55).

Η κεντρική CRH μέσω των γλυκοκορτικοειδών και των κατεχολαμινών, αναστέλλει τη φλεγμονώδη δράση, ενώ όταν εκκρίνεται από περιφερικά νεύρα η CRH τονώνει την τοπική φλεγμονή.

Σε μη στρεσογόνες καταστάσεις εκκρίνεται από την πυλαία κυκλοφορία με ένα κιρκαδικό, παλμικό μοτίβο. Σε καταστάσεις χαλάρωσης το πλάτος των παλμών της CRH αυξάνεται τις πρωινές ώρες και καταλήγει σε μεγάλη έκκριση ACTH και κατά συνέπεια κορτιζόλης. Η κορτιζόλη είναι το κύριο γλυκοκορτικοειδές που παράγεται από τον άξονα του στρες. Για τα τρωκτικά η αντίστοιχη ένωση ονομάζεται κορτικοστερόνη. Αυτός ο ρυθμός δράσης της CRH μπορεί να τροποποιηθεί από μεταβολές στη φωτεινότητα, το διατροφικό πρόγραμμα, τη δραστηριότητα και να διακοπεί από το στρες.

Κατά τη διάρκεια οξέος στρες, η έκκριση της CRH αυξάνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της ACTH και ακολούθως της κορτιζόλης. Ανάλογα με το είδος του στρες και άλλοι παράγοντες όπως είναι η AVP, η αγγειοτενσίνη II και διάφορα άλλα λιπιδικά ενδιάμεσα φλεγμονής εκκρίνονται και δρουν σε διάφορες περιοχές του HPA άξονα (υποθάλαμος, πρόσθια υπόφυση, επινεφρίδια) με σκοπό την ενίσχυση της δραστηριότητάς του(53, 56).

Έχει βρεθεί οτι, εκλυτική ορμόνη της κορτοκοτροπίνης δεν θεωρείται απαραίτητη για την έκκριση της ACTH, αλλά θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης και

λειτουργίας των επινεφριδίων. Είναι ένας κύριως ρυθμιστής του HPA άξονα, αλλά δεν θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση του από ανοσοποιητικά ερεθίσματα.

ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Η CRH προκαλεί άγχος, διαταραχές στον ύπνο και δυσμενείς αλλαγές στις καρδιοαγγειακές, μεταβολικές και ανοσολογικές λειτουργίες. Επιπλέον, η CRH έχει συσχετισθεί με την παθοφυσιολογία διάφορων ψυχιατρικών, νευροενδοκρινικών και νευρολογικών ασθενειών. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αποδείξεις που συνδέουν τις ανωμαλίες στο σύστημα της CRH με χρόνιες διαταραχές άγχους, εθιστική συμπεριφορά, οξύ και χρόνιο νευροεκφυλισμό, μελαγχολική και άτυπη κατάθλιψη, χρόνιο πόνο και καταστάσης κόπωσης, εθιστική συμπεριφορά, αλλεργικές και αυτοάνοσες διαταραχές στη φλεγμονή, μεταβολικά σύνδρομα, γαστρεντερικές ασθένειες και πρόωρο τοκετό.

Πρόσφατα, με βάση την παρατήρηση οτι η CRH επιδρά στην αύξηση των μαστικών και των πνευμονικών καρκινικών κυττάρων και με το οτι προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από υποξία που επάγει τον κυτταρικό θάνατο πρατάθηκε ο ρόλος της CRH στην κυτταρική αύξηση και επιβίωση(57).

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ CRH

Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στον συντονισμό της συμπεριφορικής, ενδοκρινικής, αυτόνομης και ανοσοποιητικής απόκρισης στο στρες. Η CRH και τα CRH συγγενή πεπτίδια και οι υποδοχείς τους είναι παρόντες στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε ένα ένα μεγάλο εύρος περιφερειακών ιστών, περιλαμβάνοντας το ανοσοποιητικό, το καρδιοαγγειακό και το αναπαραγωγικό σύστημα και έχουν συσχετισθεί με την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών.(58)
Για τη δράση της η CRH χρησιμοποιεί ως ενδιάμεσα 7 ειδικές διαμεμβρανικές (7TMD) G-πρωτεΐνες συζευγμένες με τους υποδοχείς (GPCRs). Η σύνδεση ενός αγωνιστή προκαλεί αλλαγή στη δομή αυτών των υποδοχέων οδηγώντας στη μεταγωγή σήματος διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της ενεργοποίησης των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών.(59)

ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Οι υποδοχείς της CRH ανήκουν στην οικογένεια II των G-πρωτεϊνών συζευγμένων υποδοχέων, οι οποίοι περιέχουν υποδοχείς για την παραθυροειδική ορμόνη (PTH), την καλσιτονίνη, το γλυκογόνο, τη σεκρετίνη κλπ.

- CRF1

Ο υποδοχές τύπου 1α είναι μία πρωτεΐνη 415 αμινιξέων που περιέχει 7 υδροφοβικές α-έλικες που προβλέπουν το σπάσιμο της πλασματικής μεμβράνης. Ο υποδοχέας είναι διασκορπισμένος τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και στην περιφέρεια. Διάφορες παραλλαγές ματίσματος του mRNA από αυτόν τον υποδοχέα

έχουν ταυτοποιηθεί, που ίσως να κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές, όπως R1β, R1c, R1d, R1e, R1g και R1h. Ο υποδοχέας αυτός έχει βρεθεί οτι είνια απαραίτητος για την ανάπτυξη των επινεφριδίων και για τη φυσιολογική ενδοκρινική απόκριση του οργανισμού στο στρες. Ο υποδοχέας R1 εκφράζεται σε πολλές περιοχές στον εγκέφαλο των τρωκτικών, όπως επίσης στην υπόφυση, στις γονάδες και στο δέρμα

- CRF2

Ένα ξεχωριστό γονίδιο κωδικοποιεί τη δεύτερη οικογένεια υποδοχέων της CRH τον υποδοχέα CRH-R2, ο οποίος είναι ένα πολυπεπτίδιο 397 αμινοξέων. Αυτό το γονίδιο έχει τρεις παραλλαγές ματίσματος κωδικοποιώντας τους τύπους υποδοχέων R2α, R2β και R2γ Στα τρωκτικά , μία παραλλαγή ματίσματος του υποδοχέα R2, η CRH-R2a εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, ενώ μία άλλη παραλλαγή η CRH-R2β, δεν εμφανίζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αλλά στον καρδιακό και σκελετικό μυ, στην επιδιδυμίδα και στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Η δομική σύγκριση των τύπων CRH-R2 έδειξε οτι τα τελευταία 377 αμινοξέα στο C τελικό άκρο είναι ταυτόσημα και διαφέρουν μόνο στο N τελικό άκρο.

Τα δύο είδη υποδοχέων έιναι ομόλογα κατά το 70% της αλληλουχίας των αμινοξέων τους. (60)

ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Στους περισσότερους, αλλά όχι σε όλους τους ιστούς η ενεργοποίηση των CRF1 ή του CRF2 από τη CRH και συγγενή πεπτίδια της CRH προκαλεί την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και αυξάνει το επίπεδο της cAMP. Οι υποδοχείς της CRH είναι κυρίως συνδεδεμένοι με το σηματοδοτικό μονοπάτι Gs-αδενυλικής κυκλάσης. Σε συγκεκριμένους ιστούς η CRH δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει αυτό το μονοπάτι, αλλά μπορεί να ενεργοποιεί εναλλακτικούς σηματοδοτικούς καταρράκτες.(61, 62) Για παράδειγμα σε ορισμένους ιστούς οι υποδοχείς της CRH ξεκινούν την υδρόλυση της φωσφοϊνοσιτόλης.(58)

Οι υποδοχείς της CRH ρυθμίζουν μία πληθώρα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών κινασών (PKs), όπως είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η πρωτεϊνική κινάση B (PKB)/Akt και τις p44 και p38 ενεργοποιημένες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs), όπως επίσης και άλλα σημαντικά σηματοδοτικά μόρια, όπως είναι το Ca^{2+} , τη συνθάση του νιτρικού οξέος (NOS) κλπ (58). Το μονοπάτι της cAMP προκαλείται από τη CRH σε διαφορετικές νευρωνικές κυτταρικές σειρές, καλλιέργειες και οργανοτυπικές διαδικασίες, όπου η PKA λειτουργεί ως ενδιάμεσο στη δράση της CRH σε νευρωνική απόφυση και νευροπροστασία.

Η υπερέκφραση της CRH αυξάνει το στρες στον οργανισμό, ενώ η έλλειψη του CRF1 υποδοχέα μειώνει τη συμπεριφορά αυτή. Η έκκριση της ACTH στα ώριμα ζώα

κάτω από τις βασικές συνθήκες πραγματοποιείται κανονικά παρόλη την ελλειψη του υποδοχέα CRF1.(63)

ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CRH ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η CRH που προέρχεται από τον υποθάλαμο δρα ως ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας μέσα από την έκκριση επινεφριδιακών γλυκοκορτικοειδών. Επιπλέον αναφέραμε ήδη οτι η CRH, η οποία παράγεται πέρα από το κεντρικό νευρικό σύστημα, δηλαδή στο ανοσοποιητικό και φλεγμένοντες ιστούς δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας. Με διάφορα in vivo πειράματα με τη χρήση καραγινίνης διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση CRH ή του ανταγωνιστή του CRH μειώνει την οξεία φλεγμονή.(64) (52)

Το ανοσοποιητικό σύστημα και το ενδοκρινικό επικοινωνούν μέσω μίας μεγάλης ποικιλίας νευροδιαβιβαστών, ορμονών και κυτοκινών. Ένα τέτοιο μονοπάτι για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συτήματος εξαρτάται κατά ένα μέρος από τις κυτοκίνες και κατά ένα άλλο από το ερέθισμα από το οποίο ενεργοποιείται ο HPA άξονας και κατά συνέπεια η CRH και η ACTH. Το mRNA της CRH και των υπολοίπων πεπτιδίων ταυτοποιήθηκαν σε ανοσοποιητικούς ιστούς προτείνοντας το ρόλο της CRH στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος.(65)

Με τη χορήγηση λιποπολυσακχαριτών (LPS), μιας βακτηριακής ενδοτοξίνης, προκαλείται έκκριση κυτοκινών όπως είναι ο TNF-a, IL-1 και η IL-6. Η LPS είναι παράλληλα και ενεργοποιητής του HPA άξονα. Η δράση αυτή αποτελεί έναν ανατροφοδοτικό μηχανισμό για την παραγωγή των κυτοκινών και της ανοσοποιητικής απόκρισης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η δερματική τραυματική επούλωση είναι μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, άρρηκτα συνδεδεμένη με την ταυτόχρονη συνεργασία πολλών κυττάρων και άλλων παραγόντων. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του υποθαλαμικού-υποφυσιακού άξονα (HPA άξονα), τελικό προϊόν του οποίου είναι τα γλυκοκορτικοειδή. Οι ορμόνες αυτές λειτουργούν ανασταλτικά στην τραυματική επούλωση. Η CRH λειτουργεί κυρίως μέσω δύο υποδοχέων, του CRF1 και του CRF2. Οι υποδοχείς αυτοί έχει βρεθεί οτι έχουν δράση σε πολλούς ιστούς, όπως είναι για παράδειγμα το δέρμα, το οποίο είναι το αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία.

Σε προηγούμενα πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί είχε βρεθεί ότι η τραυματική επούλωση επιταχύνεται σε *Crh -/-* ζώα, η οποία συνοδευόταν από ταχύτερη εξέλιξη της φλεγμονής και της επαναεπιθηλιοποίησης από τη δεύτερη έως την πέμπτη μέρα.

Με δεδομένο την ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι στα παχύσαρκα ζώα η τραυματική επούλωση επιβραδύνεται σημαντικά, ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της επαγόμενης από διατροφή παχυσαρκίας στη δερματική τραυματική επούλωση σε φυσιολογικά ζώα καθώς επίσης και σε ζώα τα οποία έχουν μειωμένο στρες αλλά εμφανίζουν επιταχυνόμενη τραυματική επούλωση.

Για το λόγο αυτό μελετήθηκε τόσο η πορεία της τραυματικής επούλωσης ύστερα από την επαγωγή παχυσαρκίας όσο και οι παράγοντες οι οποίοι συνδέονται με τις δύο αυτές διαδικασίες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξείς βιολογικά υλικά: 1.Τεμάχια ουράς ποντικού για τη πραγματοποίηση γονοτύπησης, 2. Βιοψίες φυσιολογικού και τραυματισμένου δέρματος, 3. Λιπώδης ιστός, 4. Αίμα.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΖΩΑ

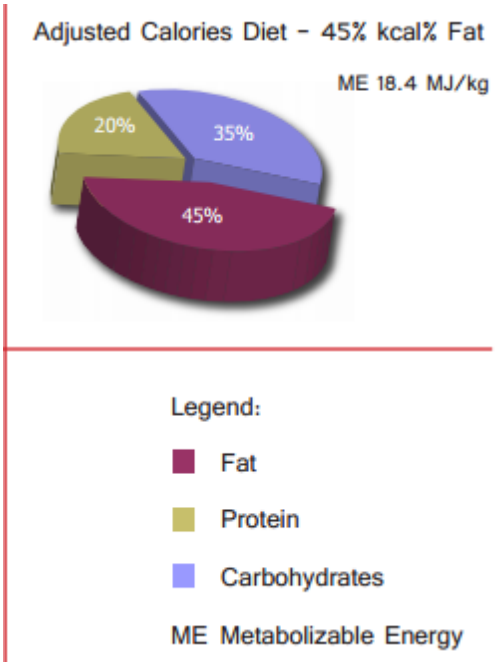
- *Φροντίδα ζώων-Συνθήκες πειράματος*

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων διατηρούνταν σε χώρους με ειδικούς κλωβούς και με ελεγχόμενες συνθήκες φωτός, υπήρχε δηλαδή εναλλαγή φωτός-σκοτους ανά 12 ώρες με αλλαγή στις 7:00πμ και 7:00μμ, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία ελεγχόταν με θερμόμετρα που υπήρχαν στο χώρο με σκοπό να παραμένει σταθερή στους 22±2°C. Τέλος, εβδομαδιαία ελέγχονταν και ανανεωνόταν η ποσότητα του φαγητού και η ποσότητα του νερού στα μπουκάλια των ζώων και πραγματοποιούνταν καθαρισμός των κλωβών.

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 9-11 π.μ. και είχαν εγκριθεί από την Επιτροπή Ζωικών Πειραματικών Πρωτοκόλλων του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς επίσης και από το Αρμόδιο τμήμα της Κτηνιατρικής υπηρεσίας της Περιφέρειας Κρήτης. Τα ποντίκια χωρίστηκαν αρχικά σε ομάδες ανάλογα με το γονότυπο και το είδος της τροφής που λάμβαναν, και τοποθετήθηκαν στους κλωβούς με μέγιστο αριθμό δύο ποντικών ανά κλωβό. Δύο εβδομάδες πριν την ολοκλήρωση του πειράματος κάθε ποντίκι τοποθετήθηκε σε ανεξάρτητο κλωβό. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί έτσι επιτυγχάνεται ο εγκλιματισμός του ζώου και αποφεύγεται η αύξηση των επιπέδων κορτικοστερόνης, που θα μπορούσε να προέλθει από το στρες λόγω έκθεσης στο νέο περιβάλλον.

- *Γονότυποι*

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της μελέτης μας ήταν τριών διαφορετικών γονοτυπων: αγρίου τύπου (wildtype, wt *Crh*+/+, *Il-6*+/+), ανεπαρκή για τη Crh (*Crh*-/-), ανεπαρκή για την IL-6 (*Il6*-/-). Η ταυτοποίηση του γονότυπου πραγματοποιήθηκε, με ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR analysis) του DNA που απομονώθηκε από τις ουρές τους.



- *Τροφή*

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων επαγωγής διατροφικής παχυσαρκίας χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών τροφές, η κοινή ή συνήθης τροφή τρωκτικών (standard chaw, sc) καθώς επίσης και τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (high fat diet, HFD), οι οποίες χορηγήθηκαν σε διαφορετικές ομάδες ζώων (για συντομία θα αναφέρονται ως control (ctrl) και high fat diet (HFD)). Παρακάτω παρατίθεται η χημική σύσταση και η θρεπτική αξία και των δύο τροφών που χρησιμοποιήθηκαν.

- *Συνήθης τροφή*

ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΗΣ

Ολικές λιπαρές ουσίες		5,50%	
Ολικές πρωτεΐνες		18,50%	
Τέφρα	6%	**Φώσφορος**	0,6%
Υγρασία	12%	**Χλωρ. Νάτριο**	1%
Κυτταρίνες	4,50%	**Ασβέστιο**	1%

ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ/KG		ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΙΧΝ/ΧΕΙΩΝ/KG	
Βιτ.A	15000IU	Μαγνήσιο	150mg
Βιτ. D3	3000IU	Μαγγάνιο	100mg
Βιτ. E	30mg	Σίδηρος	100mg
Βιτ. B1	9.80mg	Σελήνιο	0.2mg
Βιτ. B2	12mg	Ψευδάργυρος	75mg
Βιτ. B6	11.50mg	Χαλκός	10mg
Βιτ. B12	0.08mg	Ιώσιο	1.5mg
Βιτ. K3	30mg	Κοβάλτιο	1mg
Νιασίνη	27mg	Αντιοξειδωτικό	150mg

- *Υψηλών λιπαρών τροφή*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΡΟΣΤΗΘΕΜΕΝΟ ΑΝΑ KG		
Σκόνη καζεΐνης	**Βιταμίνες**:		
Σουκρόζη	Βιτ. A	I.U.	7600
Λαρδί	Βιτ. D3	I.U.	1900
Μαλτοδεξτρίνη	Βιτ. E	Mg	142.50
Άμυλο καλαμποκιού	Χολίνη	Mg	1500
Κυτταρίνη σε σκόνη			
Σογιέλαιο	**Μέταλλα**:		
Ανθρακικό ασβέστιο	Cu	Mg	7.40
Κάλιο	Se	Mg	0.19
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο			
L-κυστίνη	**Ανάλυση**	**%**	
Όξινο φωσφορικό ασβέστιο	Πρωτεΐνες	21,00	
Κιτρικό κάλιο	Λίπος	*23,00*	
Χλωριούχο νάτριο	Ίνες	4,50	
Θειϊκό κάλιο	Στάχτη	5,00	
Οξείδιο μαγνησίου			
Κόκκινη βαφή E			
Διατηρείται σε ψυχρό μέρος (+4°C ± 1°C)			
Ακατέργαστα λιπαρά οξέα		**45,00**	
Πρωτεΐνες		**20,00**	

- *Εβδομαδιαίος Έλεγχος*

Μία φορά την εβδομάδα πραγματοποιούνταν μέτρηση του σωματικού βάρους των ζώων καθώς και της ποσότητας της απομένουσας τροφής. Οι μετρήσεις αυτές διήρκησαν 15 εβδομάδες .

ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

- *Υλικά και συσκευές*

Ηπαρινισμένοι τριχοειδείς σωλήνες: Micro Haematocrit Tubes, Soda lime glass, Na-Heparinized, 80μl/ml (Vitrex, ModulohmA/S, Δανία)

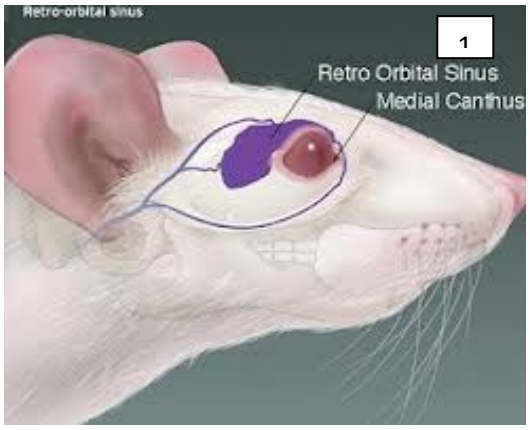
Η συλλογή του αίματος πραγματοποιήθηκε από την οπισθιο-οφθαλμική φλέβα. Ο τρόπος λήψης αυτός θεωρήθηκε ο πιο κατάλληλος λόγω των τριών παρακάτω παραγόντων:

1. Η συλλογή γίνεται πολύ γρήγορα (σε 20 δευτερόλεπτα από την ακινητοποίηση του ζώου). Το αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η ενεργοποίηση του άξονα του στρες είναι μειωμένη με συνέπεια, τα επίπεδα της κορτικοστερόνης να είναι πιο κοντά στα φυσιολογικά

2. Με τη μέθοδο αυτή συλλέγεται μεγαλύτερη ποσότητα αίματος συγκριτικά με άλλες

3. Οι συνθήκες είναι ασηπτικές.

Η συλλογή αίματος τις προγραμματισμένες μέρες γινόταν 1-2 ώρες μετά την έναρξη των φώτων στο δωμάτιο των ζώων για να αποφευχθεί η διακύμανση στη μέτρηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης εξαιτίας του κιρκάδιου ρυθμού. Μετά τη λήψη, το αίμα φυγοκεντρούνταν στις 3000rpm για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C και το υπερκείμενο (ορός) χωρίζονταν σε σωλήνες και φυλάσσονταν στους -80°C. Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες ενδεικτικές της λήψης του αίματος από τη συγκεκριμένη περιοχή.



Εικόνα 1: σήμανση οπισθοφθαλμικής φλέβας (http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html),
Εικόνα 2: τρόπος λήψης αίματος από τη φλέβα (http://www.medipoint.com/html/mouse_phlebotomy.html)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Α) Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού

Υλικά και συσκευές:

- Διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών: Protein Precipitation Solution (Qiagen, ΗΠΑ)
- Πρωτεϊνάση Κ: Proteinase K Fungal (Invitrogen, ΗΠΑ)

Διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ουράς (tail lysis buffer)

ΥΛΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Tris	50mN, pH8
EDTA	100mM
NaCl	100mM
SDS	1%

Μετά την ανάμειξη των επιμέρους διαλυμάτων, το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση προστίθενται 10mg/ml πρωτεϊνάσης Κ σε τελική συγκέντρωση 5μl/ml διαλύματος λύσης.

- Διάλυμα πρωτεϊνάσης Κ 10mg/ml:

Tris και χλωριούχο νάτριο διαλύονται σε απεσταγμένο νερό (dH_2O) σε τελική συγκέντρωση 10mM και 20mM, αντίστοιχα και το pH ρυθμίζεται στο 8. Αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης (τελικό ποσοστό στο διάλυμα 50% w/w), 10mg πρωτεϊνάσης Κ διαλύονται σε 1ml του διαλύματος αυτού και το υλικό χωρίζεται σε σωληνάρια και φυλάσσεται στους -20°C.

Μέθοδος

Η απομόνωση του DNA από την ουρά ποντικού βασίζεται στη μέθοδο διάρρηξης (disruption method), η οποία χρησιμοποιεί διάλυμα λύσεως που περιέχει SDS και πρωτεϊνάση Κ.

Λύση ουράς

Τμήμα της ουράς μήκους περίπου 5mm τοποθετείται σε σωλήνα τύπου eppendorf με 400 μl, καθώς και 5μl/ml πρωτεϊνάσης Κ. Το σωληνάριο αυτό τοποθετείται στους 55°C σε υδατόλουτρο. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 12-16 ώρες μέχρι την πλήρη λύση της ουράς. Το τελικό διάλυμα διατηρείται στους 4°C ως και μία εβδομάδα.

Απομόνωση DNA

Στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύεται έντονα (vortex). Αφού το διάλυμα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 200μl Protein Precipitation Solution (Qiagen) με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο διάλυμα. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 15-20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000rpm και το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέα σωληνάρια όπου περιέχονται 600μl ισοπροπανόλης ανά δείγμα. Το μίγμα ανακινείται και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 1ml αιθανόλης 75% και επαναφυγοκεντρείται για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει. Το ίζημα τέλος επαναδιαλύεται σε 30-50μl στείρου νερού. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στους 55-65°C για 5-10 λεπτά. Τελικά τα δείγματα τοποθετούνται για διατήρηση στους -20°C ή χρησιμοποιούνται άμεσα.

Β) Απομόνωση RNA από ιστούς

Υλικά και συσκευές

- Διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης: TRIzolReagent (Invitrogen, ΗΠΑ)
- Ομογενοποιητής: Turrax 25 T-25 (IKA® Werke GmbH & Co. KG,Γερμανία)

Μέθοδος

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη χρήση της ισοθειακυανικής γουανιδίνης, της φαινόλης και του χλωροφορμίου. Συγκεκριμένα το θειακυανικό άλας της γουανιδίνης προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των ριβονουκλεοπρωτεασών (RNases), οι οποίες καταλύουν την διάσπαση του RNA σε μικρότερα τμήματα και απομακρύνοντας το ριβοσωμικό RNA από τα ριβοσώματα, δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε ολόκληρο του RNA που έχει προκύψει από τη μεταγραφή.

Ομογενοποίηση ιστών

Οι ιστοί που είχαν απομονωθει φυλάσσονταν στους -80°C. Οι ιστοί ομογενοποιούνταν σε 500 μl TRIzol.

Διαδικασία Απομόνωσης RNA

Υλικά

- Πάγος
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη (75%)
- Eppendorfs, water for injection, filter tips

Μέθοδος

Αρχικά στο ομογενοποίημα προστίθενται 200μl χλωροφορμίου ανά 1ml TRIzol και ανακινείται για 15sec (ή Vortex). Στη συνέχεια τα δείγματα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργούνται τρεις φάσεις: Η ανώτερη φάση, η οποία περιέχει το RNA, η μεσαία φάση η οποία περιέχει το DNA και η κατώτερη φάση η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες. Η ανώτερη φάση συλλέγεται και τοποθετείται σε νέα σωληνάρια. Σε αυτήν προστίθενται 500μl ισοπροπανόλης ανά 1ml TRIzol. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στους -80° C. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15-20 λεπτά στις 12000rpm στους 4°C. Στο ίζημα προστίθεται 1ml παγωμένης 75% αιθανόλης.
Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες αλλά για 10 λεπτά. Η έκπλυση αυτή αλλά και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνονται. Μετά το στάδιο αυτό τα σωληνάρια αφήνονται για εξάτμιση της αιθανόλης. Το RNA στη συνέχεια επαναδιαλύεται στην κατάλληλη ποσότητα στείρου νερού και θερμαίνεται στους 65oC για να αποδιαταχθεί. Τέλος, ακολουθεί φωτομέτρηση για τη μέτρηση της ποσότητας του RNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα σε μηχάνημα NanoDrop. Στην περίπτωση που η φωτομέτρηση δεν πραγματοποιηθεί την ίδια μέρα, τα δείγματα μπορούν να φυλαχτούν στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA) ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ RNA

Υλικά και συσκευές

- Ολικό ώριμο RNA
- Takara (Invitrogen) κιτ το οποίο περιέχει:
    - Τυχαία εξαμερή : random hexamers
    - Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H_2O)
    - Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5xbuffer
    - Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων : dNTPs
    - Αναστολείς RNασών: RNase inhibitors
    - Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης : RNase

Μέθοδος

Η μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (RT-PCR, Reverse Transcription PCR) αποτελεί μέθοδο ενίσχυσης, απομόνωσης ή αναγνώρισης μιας γνωστής αλληλουχίας κυτταρικού ή RNA ιστού. Η αντίδραση PCR ακολουθεί την αντίδραση σχηματισμού συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση θερμοάντοχης αντίστροφης μεταγραφάσης. Η διαδικασία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον καθορισμό του μοτίβου έκφρασης ενός γονιδίου.

Η αντίδραση για κάθε δείγμα περιελάμβανε 1μg ολικού mRNA, 1μl τυχαίων εξαμερών, 0.5μl dNTP mix, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος, 0.25μl διαλύματος αναστολέων και 0.5μl ενζύμου. Το cDNA είτε χρησιμοποιούνταν αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσονταν στους -20°C.

ΧΡΗΣΗ DNase ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ RNA

Η DNase είναι μία ενδονουκλεάση, η οποία διασπά μη ειδικά το DNA και δίνει δι-, τρι- και ολιγονουκλεοτιδικά προϊόντα με 5’-φωσφορυλιωμένα και 3’- υδροξυλιωμένα άκρα. Η DNase I δρα σε μονόκλωνο και σε δίκλωνο DNA, χρωματίνες και DNA, δηλαδή σε υβρίδια RNA. Η DNase (Biolabs) χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του RNA από το DNA.

Μέθοδος

1) Διάλυση 10μg RNA σε 1x DNase I Reaction Buffer σε τελικό όγκο 100μl
2) Προσθήκη 2units DNase I, ανάδευση και επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
3) Προσθήκη 1μl 0.5M EDTA, το οποίο απομακρύνει ένζυμα που περιέχουν Ca και παράλληλα προστατεύει το RNA

4) Θέρμανση στους 75°C για 10 λεπτά

DNase I (RNase free)

Κατάλογος	**Μέγεθος**	**Συγκέντρωση**
MD3035	1000 units	2000 units/ml

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Υλικά και συσκευές

- Συμπληρωματικό DNA (cDNA)
    - Platinum Taq DNA polymerase κιτ (Invitrogen) το οποίοπεριέχει:
    - Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού: 10x PCR buffer
    - Χλωριούχο μαγνήσιο: 50mM $MgCl_2$
    - Ένζυμο πολυμεράσης: Platinum Taq DNA polymerase, 5 u/μl
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (Forward)(5'-3')	Αλληλουχία εκκινητή μη νοηματικού κλώνου(reverse) (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μήκος προϊόντος (ζεύγη βάσεων)	Κύκλοι
mCRH	agcccttgaatttcttgca	aacacgcggaaaaagtta	62	201	40
mCRF1	cggagtttggtcatgaggat	gccgcctacaattacttcca	60	310	40
mCRF2	atggggccctggtagatgtagtcc	atggggccctggtagatgtagtcc	60		40
mCRHIL-6	ccagaacagatttgagag	ctacatttgccgaagagc	60	252	35
mActin	tctctttgatgtcacgcacg	tcagaaggactcctatggg	55	500	25

Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων τμήματων DNA, δημιουργώντας χιλιάδες αντίγραφα μίας συγκεκριμένης

αλληλουχίας DNA. Αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Η μέθοδος βασίζεται σε κύκλους όπου ο ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια: Αρχικά την αποδιάταξη του DNA, έπειτα την προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο και τελικά την επιμήκυνση των εκκινητών. Ένας τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε μία τυπική αντίδραση το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°. Στη συνέχεια, προσαρμόζονται οι εκκινητές με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA με θέρμανση του δείγματος στους 50-60°C, ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών. Τέλος, ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητών με τη χρήση πολυμεράσης, η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συνοψίζονται παρακάτω:

- 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού
- 1.5mM $MgCl_2$
- 200 μM από κάθε dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 200nM νοηματικός εκκινητής
- 200nM αντι-νοηματικός εκκινητής
- 1 unit platinum taq πολυμεράση
- 1μg cDNA
- Ενέσιμο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 μl

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real Time PCR)

Η Real time PCR είναι μια νέα μέθοδος PCR, που αναπτύχθηκε από τους Higuchi et al. (66) και ουσιαστικά, αποτέλεσε την λύση στο κυριότερο πρόβλημα της συμβατικής PCR, την αδυναμία ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων.

Συνοπτικά, στην PCR πραγματικού χρόνου η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται ανιχνεύεται με την βοήθεια του φθορισμού, που εκλύεται από προσδεδεμένη σε αυτό χρωστική, σε κάθε κύκλο κατά την διάρκεια της αντίδρασης και όχι συνολικά στο τέλος αυτής, όπως στη συμβατική PCR. Συνεπώς η μέθοδος αυτή συνδυάζει ορισμένα πλεονεκτήματα που την κάνουν να υπερέχει έναντι της συμβατικής PCR. Είναι σχετικά σύντομης διάρκειας, καθώς τα αποτελέσματα λαμβάνονται μέσα σε 2-3 ώρες, ενώ χαρακτηρίζεται απο υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επίσης, η αυτοματοποίηση και η χρήση κλειστών κυκλωμάτων συμβάλουν στην αποφυγή των μολύνσεων. Επιπλέον, προσφέρει την δυνατότητα πραγματοποίησης πολλαπλών αντιδράσεων παράλληλα και μάλιστα με μειωμένο συνολικό όγκο αντίδρασης

Μέθοδος

Για τη διεξάγωγη των πειραμάτων με την μέθοδο της ποσοτικής real time PCR χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης της χρωστικής SYBR Green I. Στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης το μίγμα της αντίδρασης περιέχει το αποδιαταγμένο DNA, τους εκκινητές και την χρωστική που τα μη δεσμευμένα μόριά της φθορίζουν μόνο ασθενώς, δίνοντας ένα πολύ χαμηλό σήμα υποβάθρου. Αυτό το σήμα μπορεί να αφαιρεθεί έπειτα από τα υπόλοιπα σήματα, όταν αυτά περάσουν στην φάση της ανάλυσης από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στη συνέχεια, ακολουθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών και ξεκινάει η σύνθεση του δίκλωνου DNA, με αποτέλεσμα τα μόρια της χρωστικής να προσδένονται άμεσα σε όλα τα δίκλωνα μόρια εκπέμποντας έντονο φθορισμό. Έπεται το στάδιο της επέκτασης του μορίου-στόχου και έτσι, όλο και περισσότερα μόρια της χρωστικής προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο τμήμα του μορίου, οδηγόντας σε αύξηση του σήματος φθορισμού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο, αφού στο στάδιο της αποδιάταξης των δύο αλυσίδων του dsDNA όλα τα δεσμευμένα μόρια της χρωτικής απελευθερώνονται και ο φθορισμός μειώνεται. Για το λόγο αυτό άλλωστε η μέτρηση του φθορισμού γίνεται στο τέλος κάθε κύκλου επέκτασης, ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του ενισχυμένου cDNA (67) (61).

Υλικά

SYBR Green 2μl

Primer forward 0.2μl

Primer reverse 0.2μl

Rox low 0.2μl

H_2O 2.4μl

cDNA 2μl

Για κάθε δείγμα προς ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl cDNA.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Υλικά και συσκευές

- Ολικό γενωμικό DNA
- Taq PCR MasterMix Kit (Qiagen) το οποίο περιλαμβάνει:
    - 2X Taq PCR MasterMix: Μείγμα που περιέχει Taq DNA Polymerase, 2X ρυθμιστικό διάλυμα (2x QIAGEN PCR Buffer), 3mM $MgCl_2$ και 400μM από κάθε dNTP

- H_2O RNase free: νερό ελέυθερο από RNασες

- Εκκινητές (primers): παρουσιάζονται παρακάτω

Γονίδιο	Αλληλουχία νοηματικού εκκινητή (Forward)(5'-3')	Αλληλουχία μη νοηματικού εκκινητή (Reverse)(5'-3')	Θερμοκρασία Υβριδισμού	Μήκος Προϊόντος (ζεύγη βάσεων)	Κύκλοι
Crh	***(LM6)*** gagcttacacatttcgtcc	***(LM3)*** atcgccttcttgacgagttc ***(MS1)*** gctcagcaagctcacagcaa	55	Wt→400 KO→600	25
Il6-wt	ttccatccagttgccttcttgg	ttctcatttccacgatttcccag	50	174	40
Il6-ko	cttgggtggagaggctattc	aggtgagatgacaggagatc	50	280	40

Η ταυτοποίηση του γονότυπου πραγματοποίηθηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το DNA που είχε απομονωθεί από την ουρά, παρουσία εκκινητών για το γονίδιο που ελέγχεται μαζί με Taq PCR master mix προστέθηκαν σε τελική συγκέντρωση για κάθε δείγμα:

- Για το γονίδιο της *Crh*:

1xTaqPCRmastermix
600nM νοηματικού εκκινητή (LM-6)
300nM αντι-νοηματικού εκκινητή αγρίου τύπου (MS-1)
300nM αντι-νοηματικού εκκινητή μεταλλαγμένου τύπου (LM-3)
1μgDNA
Νερό χωρίς Rnασες μέχρι το δείγμα να αποκτήσει τελικό όγκο 20μl

- Για το γονίδιο της *Il6*

1xTaqPCRmastermix
200nM νοηματικός εκκινητής
200nM αντι-νοηματικός εκκινητής
1μgDNA
Νερό χωρίς RNάσες μέχρι το μείγμα να αποκτήσει τελικό όγκο 20μl

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Υλικά και συσκευές

- Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (Life Technologies, ΗΠΑ)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης : E431 (Consort, Βέλγιο)
- Αγαρόζη (Sigma, USA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma, ΗΠΑ)

- Συσκευή UV/κάμερα: Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Molecular Analyst, version 1.4.4 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Tina Scan, version 2.07d (Raytest, isotopenmessgerate, Γερμανία)

Διαλύματα

- Διάλυμα TAE 50x

ΥΛΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Tris (pH 8)	10nM
EDTA	10mM
Οξικό ασβέστιο	5nM
NaCl	10nM

Τα παραπάνω υλικά αναμειγνύονται και τοποθετούνται σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα φόρτωσης

ΥΛΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Tris (pH 8)	10nM
EDTA	60mM
Γλυκερόλη	60%(v/v)
Πορτοκαλί της ακριδίνης (OrangeG)	0,15%(w/v)

Μετά την ανάμειξη των παραπάνω το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διαλύσεως της χρωστικής. Το διάλυμα στη συνέχεια διηθείται και φυλάσσεται στους 4°C.

- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντωσης 10mg/ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση δισκίου βάρους 10mg σε 1ml απιονισμένου νερού και φυλάσσεται στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο.

- 2%(w/v) πήκτωμα αγαρόζης

Αρχικά 2gr αγαρόζης τοποθετούνται σε κωνική φιάλη, στην οποία προστίθενται 100 ml TAE 1x. Η κωνική φιάλη αναδεύεται ελαφρώς και τοποθετείται στο φούρνο

μικροκυμάτων μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης στο διάλυμα. Στο διάλυμα δεν πρέπει να επέλθει βρασμός. Στη συνέχεια η κωνική τοποθετείται στην απαγωγό εστία μέχρις ότου το διάλυμα να επανέλθει σε θερμοκρασία περίπου 50°C. Στο σημείο αυτό προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντωση 500ng/ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλο εκμαγείο (geltray) στο οποίο ενσωματώνονται χτένια για το σχηματισμό οπών-πηγαδιών. Αφήνεται να στερεοποιηθεί και στη συνέχεια όταν είναι έτοιμο το gel να τοποθετηθεί στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης τα χτένια αφαιρούνται.

Μέθοδος

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που έχουν προέλθει από την PCR, 12μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης ή δείκτη γνωστού μοριακού βάρους αναμειγνύονταν με διάλυμα φόρτωσης και τοποθετούνται στα πηγάδια του πηκτώματος αγαρόζης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό το οποίο εφαρμόζει τάση στην πηκτή με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του DNA. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel εκτίθεται σε λάμπα UV (το DNA γίνεται εμφανές λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου), φωτογραφίζεται με το πρόγραμμα Molecular Analyst και αναλύεται με το πρόγραμμα Tina Scan. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA είναι εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που ηλεκτροφορούνταν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

Υλικά και συσκευές

- Κεταμίνη: Imalgene 1000, 2-[2-chlorphenyl]-2-methylamonicyclohexanon-Hydrochloride 100mg/ml, (Rhone Merieux, Lyon, Γαλλία)
- Ξυλαζίνη: Rompun, 5,6-dihydro-2-[2,6-xylidino]-4H-1,3-thiazinhydrochloride, xylazine-hydrochloride, 20mg/ml (Bayer, Leverkusen, Γερμανία)
- Φεντανίλη: Fentanyl, 0.5mg/10ml (Janssen-Cilag, Janssen Pharmaceutica, Βέλγιο)
- Διατρητικό εργαλείο διαμέτρου 3mm για βιοψίες (Stiefel, GlaxoSmithKline, ΗΠΑ)

Μέθοδος

Όλα τα ζώα του πειράματος υποβλήθηκαν σε επαγωγή τραύματος εκτομής. Την ημέρα του πειράματος (ημέρα 0) τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με χρήση

μείγματος αναισθητικών κεταμίνης-ξυλαζίνης, στο οποίο είχε προστεθεί το αναλγητικό φεντανίλη. Η δόση καθορίστηκε ως εξής: 120mg/Kg βάρους σώματος κεταμίνη, 8mg/Kg βάρους σώματος ξυλαζίνη και 1μg/Kg βάρους σώματος φενταλίνης. Στο διάστημα που τα ζώα ήταν αναισθητοποιημένα, πραγματοποιήθηκαν δύο διαμπερείς εκτομές τριών χιλιοστών στην πλάτη τους, αφού πρώτα είχαν αποτριχωθεί και απολυμανθεί με διάλυμα αιθανόλης 70%. Τα ζώα έπειτα επιστράφηκαν στα κλουβιά τους όπου και παρακολουθούνταν μέχρι την πλήρη αφύπνιση τους.

Για την μέτρηση της περιμέτρου και του εμβαδού τα τραύματα καλύφθηκαν με ένα διαφανές πλαστικό στο οποίο σημειώθηκε η επιφάνεια του τραύματος. Επίσης για τον ίδιο σκοπό τα τραύματα φωτογραφήκαν και μετρήθηκαν σε σχέση με γνωστών διαστάσεων πρότυπο που φωτογραφήθηκε ταυτόχρονα με το τραύμα. Οι μετρήσεις από τις φωτογραφίες έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

Τα ζώα θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό τρεις ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος. Επιπλέον, την ημέρα αυτή έγινε λήψη του τραυματισμένου δέρματος. Ο ιστός ψύχθηκε ταχύτατα σε ξηρό πάγο για να διατηρηθεί. Ταυτόχρονα έγινε λήψη σπλαχνικού λιπώδους ιστού για περαιτέρω επεξεργασία.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Μέθοδος

Οι βιοψίες τραυματισμένου δέρματος που ελήφθησαν από την πλάτη τεμαχίστηκαν μεσο-εγκάρσια σε δύο τμήματα, τοποθετήθηκαν σε ουδέτερη φορμόλη για 16-24 ώρες για μονιμοποίηση. Πραγματοποιήθηκαν τομές 12 μm, οι οποίες κόπηκαν κάθετα, διαμήκως του τραύματος με τη χρήση κρυοτόμου και στη συνέχεια βάφτηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο αιμοτοξυλίνης/εωσίνης. Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται με σκοπό τη μελέτη των βασικών μορφολογικών χαρακτηριστικών του ιστού. Η αιματοξυλίνη βάφει μπλε τους πυρήνες, ενώ η εωσίνη ροζ ή κόκκινο το κυταρρόπλασμα και το συνδετικό ιστό.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Για την απομόνωση πρωτεϊνών έγινε ομογενοποίηση των ιστών (ομογενοποιητής) σε 400μl διαλύματος λύσης (lylis buffer), το οποίο περιείχε PBS και αναστολείς πρωτεασών. Έγινε συλλογή του υπερκειμένου μετά από φυγοκέντρηση, το οποίο στη συνέχεια φυλάχτηκε στους -80°C.

Υπολογισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford

Υλικά και συσκευές

- Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 : Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies)
- Μικροπλάκες 96 οπών με επίπεδο πυθμένα (Costal, ΗΠΑ)
- Φωτόμετρο για τη μέτρηση των πλακών (MicroplateReader, Model 550, Biorad)

Διαλύματα

1mg/μl αλβουμίνη βόειου ορού: διάλυση σε 10ml απιονισμένου νερού 10 mgBSA. Το μείγμα αναδεύεται και φιλτράρεται μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45 μm, χωρίζεται σε σωλήνες του 1,5ml και φυλάσσεται στους -20°C.

Μέθοδος

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι φασματομετρική αναλυτική διαδικασία, η οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Marion M. Bradford.

Η Bradford είμαι μία χρωματομετρική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην απορρόφηση της βαφής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία κάτω από όξινες συνθήκες η κόκκινη μορφή της βαφής μετατρέπεται σε μία μπλε μορφή όταν συνδέεται με την πρωτεΐνη. Αρχικά, η κόκκινη μορφή της Coomassie δίνει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στην ιονιζόμενη ομάδα της πρωτεΐνης, η οποία προκαλεί διάσπαση της πρωτεΐνης.

Η σύνδεση της πρωτεΐνης στη χρωστική προκαλεί μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 365 nm σε μήκος κύματος 595nm. Η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη της δεσμευμένης πρωτεΐνης στη χρωστική. Αυτό συνεπάγεται τον υπολογισμό της δεσμευμένης ολικής πρωτεΐνης του διαλύματος. Η εκτίμηση της ποσότητας της πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, στην οποία χρησιμοποιούνται διαλύματα BSA γνωστών συγκεντρώσεων.

ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν η ELISA τύπου sandwich. Η ένζυμο-σύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) είναι ένα τεστ, που χρησιμοποιεί αντισώματα και αλλαγή χρώματος για να προσδιορίσει μια ουσία, συνήθως κάποιο αντιγόνο, σε ένα υγρό δείγμα. Τα αντιγόνα του δείγματος συνδέονται με μια επιφάνεια. Στη συνέχεια, ένα ειδικό αντίσωμα προστίθεται πάνω στην περιοχή, ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο και στο τελικό στάδιο, μία ουσία που περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου, προστίθεται. Η επακόλουθη αντίδραση παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, που είναι συνήθως μια αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα.

Το πλεονέκτημα της ELISA sandwich είναι ότι το δείγμα δεν χρειαζεται να υποστεί κάποια επεξεργασία προηγουμένως και επιπλέον η μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη.

Η ανίχνευση γίνεται με τη χρήση της ραφανιδικής υπεροξειδάσης. Το υπόστρωμα του ενζύμου αυτού είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι συνδεδεμένη με την οξείδωση ενός δότη υδρογόνου και έτσι προκαλείται αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων (Wash Buffer)

0,05% (v/v) διαλύματος του μη ιοντικού απορρυπαντικού Tween-20 σε PBS

Το διάλυμα φυλάσσεται στους $4^{o}C$

- Διαλύτης αντιδραστηρίων (Reagent Diluent)

Διάλυμα 1% (w/v) BSA σε PBS. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2 μm και χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του.

- Διάλυμα υποστρώματος (Substrate Solution)

Διάλυμα που αποτελείται από ίσους όγκους υπεροξειδίου του υδρογόνου (Color Reagent A) και τετραμεθυλβενζιδινης (Color Reagent B). Μετά την ανάμειξη τοποθετείται σε σκοτεινό σωλήνα. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

- Διάλυμα παύσης αντίδρασης (Stop Solution)

Διάλυμα 2N θειικού οξέος. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία δωματίου.

Μέθοδος

Η διαδικασία της μεθοδόυ περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Το δείγμα με την άγνωστη ποσότητα αντιγόνου ακινητοποιείται σε ένα στερεό μέσο (συνήθως μία πλάκα μικροτιτλοδοτήσεως από πολυστερίνη) είτε μη ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) είτε ειδικότερα (μέσω δέσμευσης με δεύτερο αντίσωμα για το ίδιο αντιγόνο, σε ένα "σάντουιτς ELISA"). Μετά την ακινητοποίηση του αντιγόνου, προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ένζυμο, ή από μόνο του μπορεί να ανιχνευθεί από ένα δευτερεύον αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο μέσω βιοσύζευξης. Μεταξύ κάθε σταδίου, συνήθως η πλάκα εκπλένεται με ένα ήπιο καθαριστικό διάλυμα, για να αφαιρούνται πρωτεΐνες και αντισώματα, που δεν είναι ειδικά δεσμευμένα. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, στην πλάκα προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου, για να παραχθεί ένα ορατό σήμα, το οποίο δείχνει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος μετρήθηκε εκτιμώντας την ποσότητα του εγχρώμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου στα 450nm.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λήφθηκε από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του προς μέτρηση παράγοντα. Τα δείγματα (ορός ή πλάσμα του αίματος, υπερκείμενο κυτταρικών καλλιεργειών, ομογενοποιημένος ιστός) αραιώθηκαν κατά περίσταση ώστε οι τιμές μέτρησής τους να βρίσκονταν μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

Τρισδιάστατη πυρηνική χρώση ανοσοφθορισμού για λευκό λιπώδη ιστό

Υλικά

- Μονιμοποιητική ουσία : 10% φορμαλδεΰδη
- BSA
- Κόλλα επτανίου

- Ρυθμιστικό διάλυμα B1 (BlockingBuffer): 1% BSA, 3% φυσιολογικός ορός (FBS), 0.1% σαπονίνη σε 1xPBS, ο.45 μm φίλτρο. Το διατηρούμε σε 4°C. Για 50 ml B1:
    - 0,05 gr σαπονίνη
    - 0,5 gr BSA
    - 1.5 ml FBS
    - 48.5 ml PBS

  Για 100mlB2 (0,1 % σαπονίνη σε 1xPBS):
    - 0.1 gr σαπονίνη
    - 100ml PBS
- Σαπονίνη: Sigma 47036-50G-F
- TO-PRO-3 Iodide (642-661)- 1mM di;alyma se DMSO

Μοριακοί ανιχνευτές (Life Technologies)

- Διαλύω σε τελικό όγκο 1:1000, Emission Far Red
- Bodipy- Molecular Probes- Green. Reference: Nishimura et al, 2007. Diabetes 56: 1517-26. Ismenek, 2012

Μέθοδος

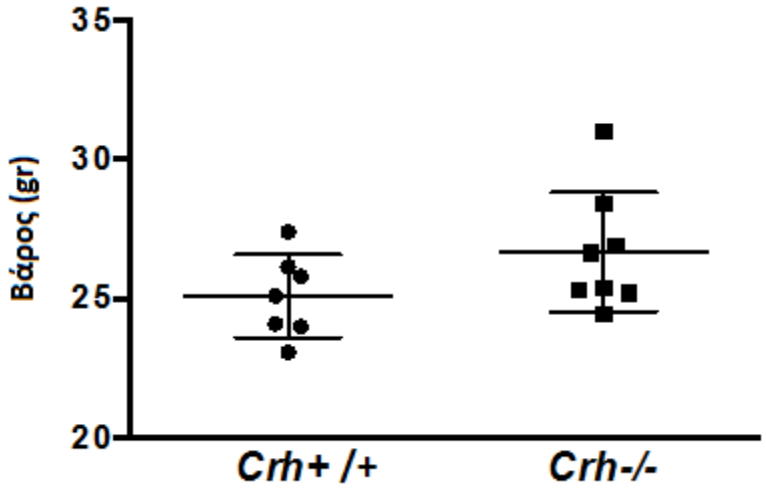
Γίνεται μεταφορά του λευκού λιπώδους ιστού σε τρυβλίο με PBS, όπου ο λιπώδης ιστός κόβεται σε μικρά κομμάτια. Προστίθεται μονιμοποιητικό μέσο και BSA. Στη συνέχεια το μονιποιητικό μέσο απομακρύνεται και προστίθεται γλυκίνη 50mM, ακολουθεί ανάδευση και απομάκρινση της γλυκίνης. Ακολουθούν πλύσεις με PBS 1x. Γίνεται σταθεροποίηση των κυττάρων και αποκλεισμός των μη ειδικών θέσεων με ρυθμιστικό διάλυμα B1 στους 4° C. Πραγματοποιούνται και πάλι εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα B2 και επώαση για 10 λεπτά. Νέα επώαση ακολουθεί με το κατάλληλο διάλυμα του δεύτερου αντισώματος σε B1 ρυθμιστικό διάλυμα και έπειτα γίνεται επίχρωση με Bopisy ή/ και Torpo για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Εκπλύσεις γίνονται για ακόμη μία φορά με διάλυμα B2 για 10 λεπτά. Τελικά, ο ορός του δείγματος τοποθετείται σε 80% γλυκερόλη/1x PBS και τοποθετείται σε παρασκευαστική διαφάνεια.

Γίνεται προσθήκη 500μl γλυκερόλης στο δείγμα, συλλογή του ιστού και φόρτωση στην πλάκα. Απομακρύνεται η επιπλέον ποσότητα γλυκερόλης και η πλάκα καλύπτεται. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της διαδικασίας γίνεται με απεικόνιση σε μικροσκόπιο confocal.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΑΡΧΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΑΡΟΥΣ

Η μέτρηση του αρχικού βάρους των ζώων πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της χορήγησης HFD. Στη συνέχεια έγινε ο διαχωρισμός τους σε κλουβιά και τα ζώα χωρίστηκαν σε ομάδες με βάση την τροφή την οποία θα λάμβαναν, (SC ή HFD).

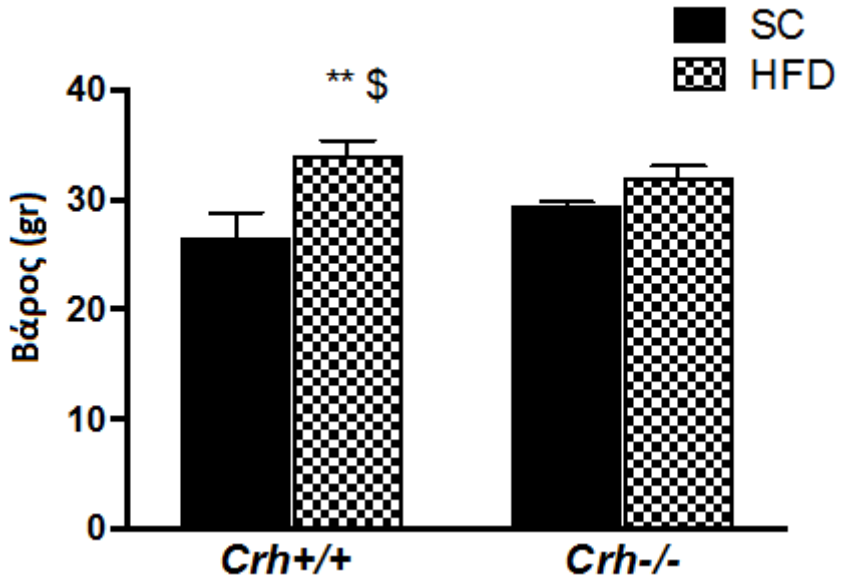


Διάγραμμα 1: Σχηματική απεικόνιση του βάρους των ζώων των δύο γονοτύπων πριν την έναρξη της χορήγησης των δύο τύπων τροφών.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων πριν την έναρξη της χορήγησης των διαφορετικών ειδών τροφής.

- ΑΥΞΗΣΗ ΒΑΡΟΥΣ

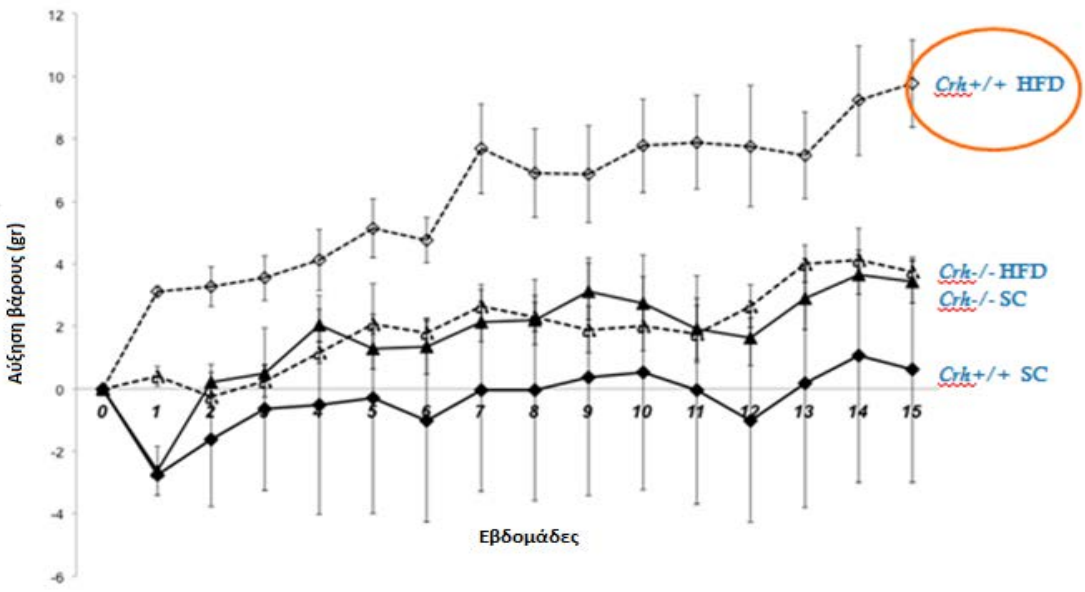
Για διάστημα 4 περίπου μηνών τα ζώα του πειράματος λάμβαναν δύο διαφορετικές τροφές ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν, όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Για να διαπιστώσουμε την επίδραση του είδους της τροφής στο βάρος των ζώων των δύο γονότυπων κάθε εβδομάδα πραγματοποιούσαμε μετρήσεις τόσο του βάρους του ζώου όσο και της τροφής ελάμβαναν.



Διάγραμμα 2: Σχηματική απεικόνιση του βάρους των πειραματοζώων μετά το πέρας των 15 εβδομάδων (: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων του ίδιου γονότυπου που υπόκεινται σε διαφορετική επίδραση και $: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων των δύο διαφορετικών γονοτύπων που υπόκεινται στην ίδια επίδραση, $p<0.05$)*

Όπως αναμενόταν, το βάρος των *Crh+/+* ζώων που λάμβαναν τροφή υψηλών λιπαρών ήταν στατιστικά υψηλότερο του βάρους των ζωων του ίδιου γονότυπου που λάμβαναν την κανονική τροφή (Διάγραμμα 2). Παραδόξως, καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στο βάρος των *Crh-/-* ζώων είτε αυτά τρέφονταν με την κανονική τροφή, ή με την HFD.

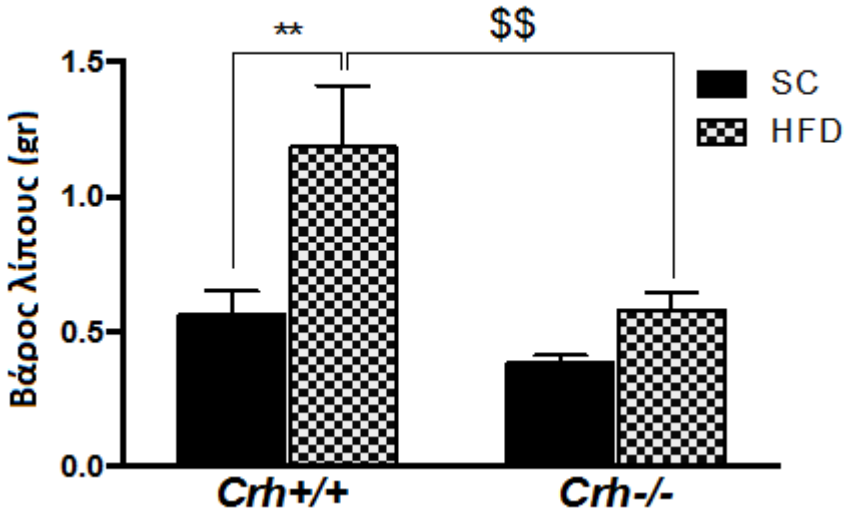
Η εβδομαδιαία πρόσληψη βάρους όλων των ομάδων παρουσιάζεται αναλυτικά στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Σχηματική απεικόνιση της εβδομαδιαίας πρόσληψης βάρους των πειραματοζώων καθόλη την περίδο των 15 εβδομάδων

- ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ

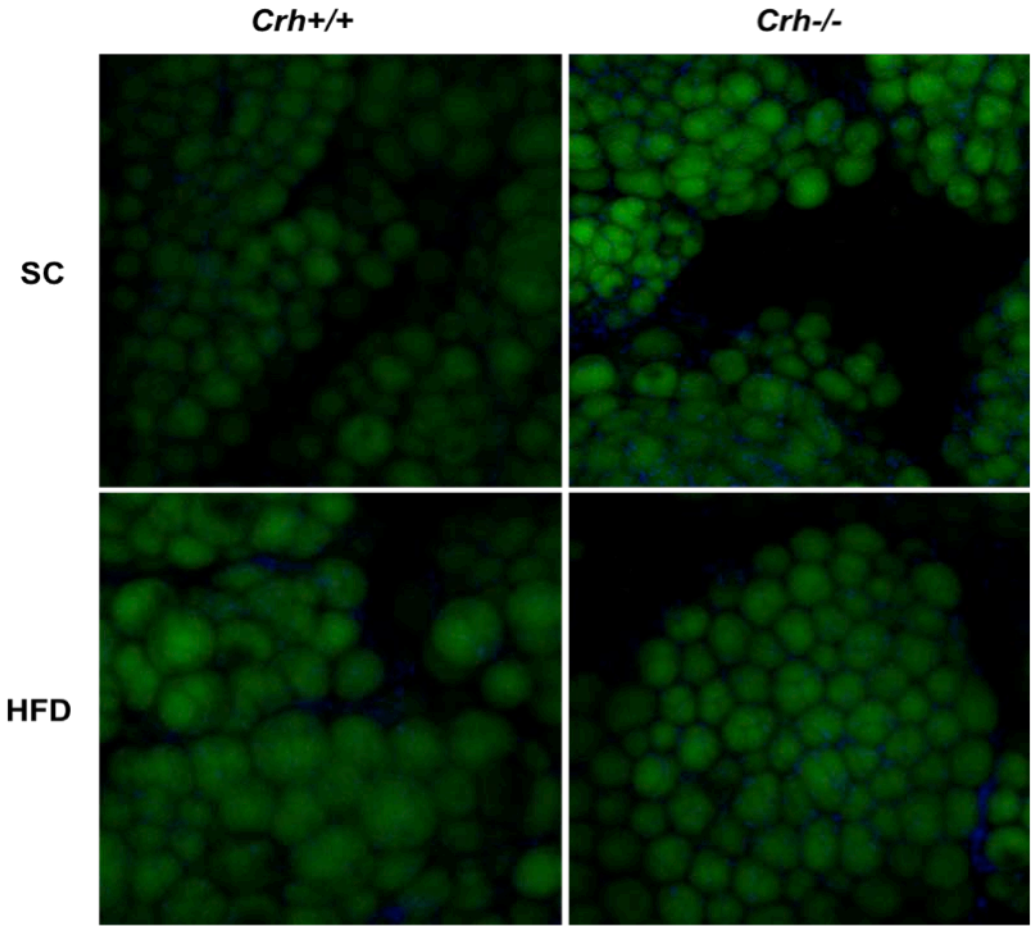
Μετά το πέρας του πειράματος, τα ζώα θανατώθηκαν και ελήφθη τμήμα του κοιλιακού λιπώδους ιστού με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά στο λιπωδη ιστό. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πρόσληψης βάρους, παρατηρήθηκε ότι στα *Crh+/+* ζώα που τρέφονταν με την τροφή πλούσια σε λιπαρά, το βάρος του λιπώδους ιστού ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο συγκριτικά με τα *Crh+/+* ζώα που τρέφονταν με την κανονική δίαιτα ή με τα *Crh-/-* ζώα που τρέφονταν με HFD. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο βάρος του λιπώδους ιστού των *Crh-/-* ζώων είτε αυτά τρέφονταν με κανονική ή με υψηλών λιπαρών δίαιτα (Διάγραμμα 4).



Όπως φαίνεται από το

Διάγραμμα 4: Μέτρηση βάρους σπλαχνικού λίπους σε Crh +/+ και Crh -/- ποντίκια μετά τη χορήγηση κανονικής δίαιτας ή διαίτας πλούσιας σε λιπαρα (: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων του ίδιου γονότυπου που υπόκεινται σε διαφορετική επίδραση και $: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων των δύο διαφορετικών γονοτύπων που υπόκεινται στην ίδια επίδραση, p<0.05).*

Σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και στη μορφολογία των λιποκυττάρων του ιστού, όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη χρήση του πρωτοκολλου της Τρισδιάστατης Πυρηνικής Χρώσης Ανοσοφθορισμού για Λευκό Λιπώδη ιστό (3D immunofluorescence nuclear staining for White Adipose Tissue) σε συνδυασμό με τη μικροσκοπία συνεστιασμού.

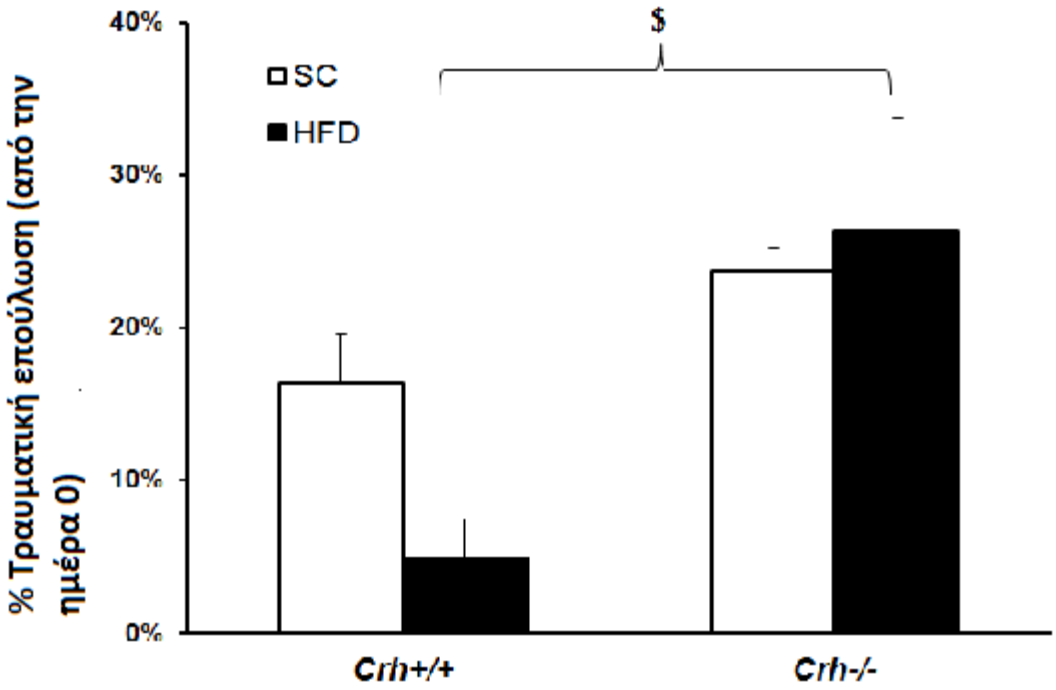


Εικόνα 1: Μορφολογική απεικόνιση κυττάρων του λιπώδους ιστού με τη χρήση μικροσκοπίου Confocal.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 1 τα λιποκύτταρα των *Crh* +/+ ποντικών τα οποία τρέφονταν με τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά εμφανίζουν μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με τα λιποκύτταρα των υπόλοιπων ομάδων.

- ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

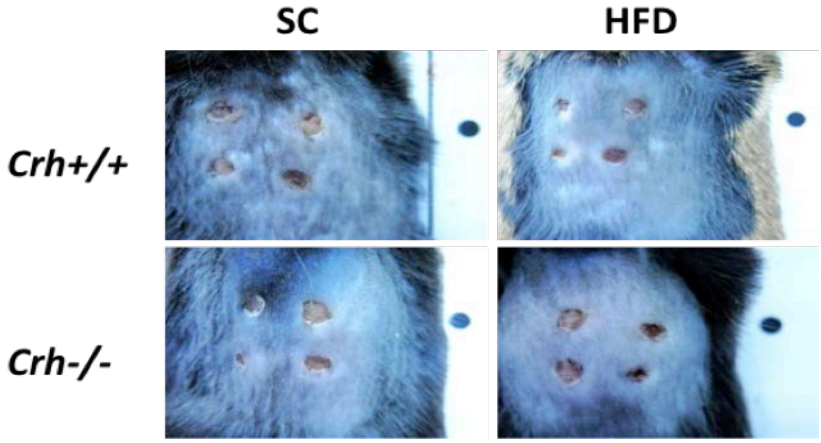
Για τη μελέτη της επίδρασης της διατροφής με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά στη δερματική τραυματική επούλωση επάχθηκε τραύμα στις πλάτες των ποντικών την τελευταία ημέρα της περιοδού των 15 εβδομάδων. Η ημέρα αυτή θεωρήθηκε ως ημέρα 0. Σε κάθε ζώο πραγμαοποιήθηκαν δύο διαμπερή τραύματα σε περιοχή της ράχης η οποία είχε αποτριχωθεί όπως αναφέρεται στα « Υλικά και Μέθοδοι». Στη συνέχεια έγιναν μετρήσεις της επιφάνειας του τραύματος με τις μεθόδους που έχουν αναφερθεί, καθημερινά για τρεις ημέρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο επόμενο διάγραμμα (Διάγραμμα 6) ενώ η μακροσκοπική απεικόνιση και η μορφολογική ανάλυση των τραυμάτων παρουσιάζονται στις Εικόνες 2 και 3, αντίστοιχα.



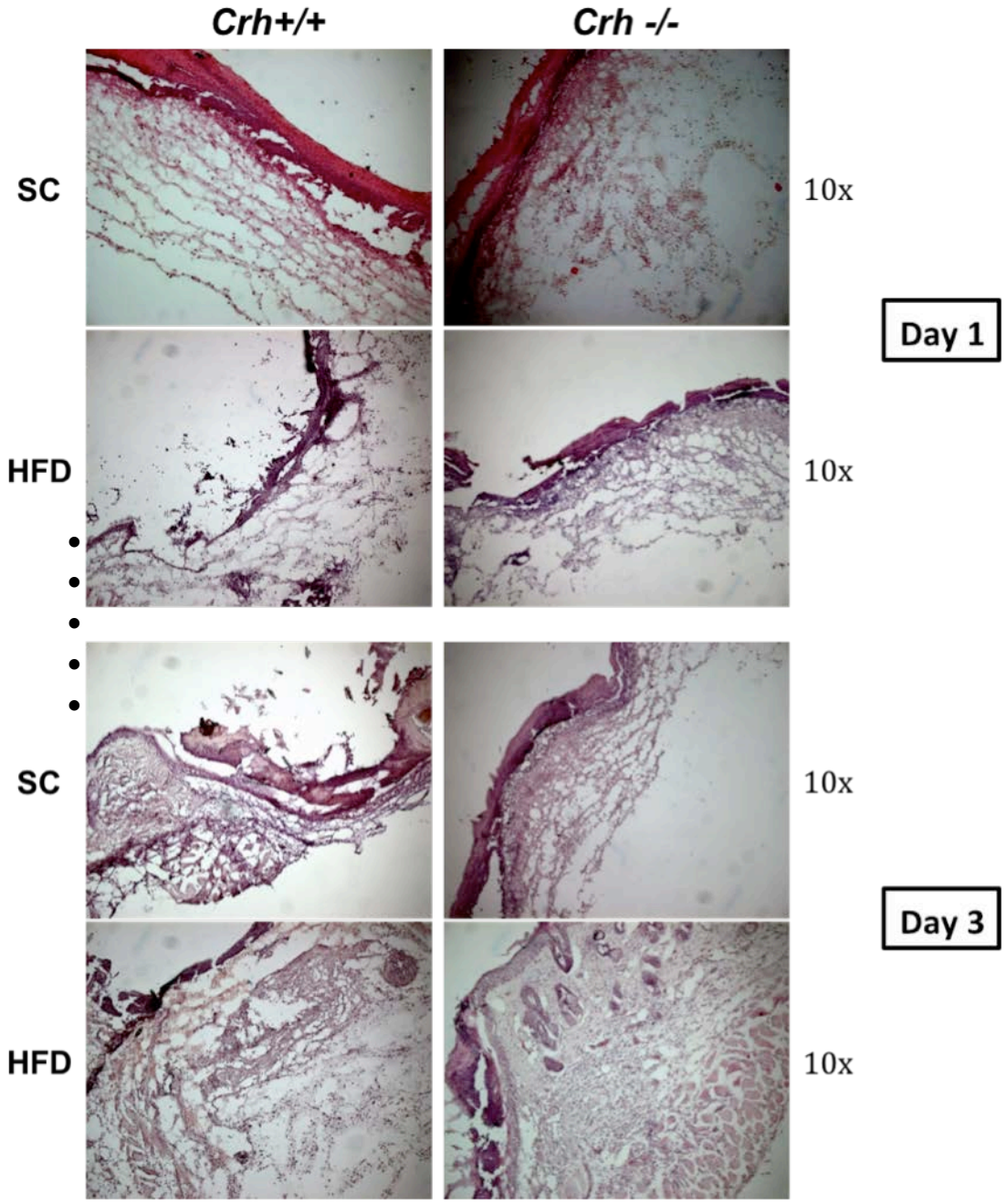
Διάγραμμα 5: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του τραύματος την τρίτη ημέρα σε σχέση με την επιφάνεια την ημέρα 0 (ημέρα επαγωγής του τραύματος). ($: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων των δύο διαφορετικών γονοτύπων που υπόκεινται στην ίδια επίδραση, p<0.05)

Όπως φαίνεται η επιφάνεια του τραύματος ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη στα ζώα τα οποία είχαν έλλειψη του γονιδίου της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης, (*Crh* -/-), γεγονός που έχει διαπιστωθεί και από προηγούμενες εργασίες.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στα *Crh*+/+ ζώα η δίαιτα με υψηλά λιπαρά επιδείνωσε την πορεία της τραυματικής επούλωσης συγκριτικά με τα ζώα του ίδιου γονότυπου που τρέφονταν με κανονική δίαιτα, ενώ στα *Crh*-/- ζώα δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην πορεία της δερματικής τραυματικής επούλωσης, ανεξάρτητα της διατροφής τους.



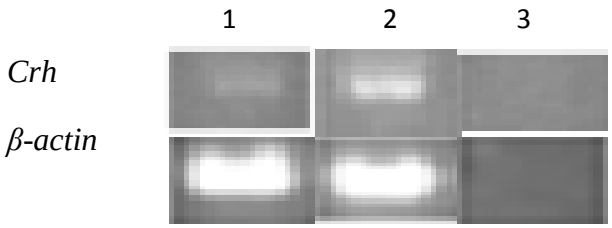
Εικόνα 2: Μορφολογική απεικόνιση τραύματος την ημέρα 3



Εικόνα 3: Ιστολογική αξιολόγηση βιοψιών που ελήφθησαν από τραυματισμένο δέρμα ποντικών ημέρα 1 και την ημέρα 3 ανάλογα με την τροφή και το γονότυπο (μεγένθυνση 10x). Δεν παρατηρείται κάποια αξιόλογη διαφορά μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων και διαφορετικών τροφών.

- ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΕ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΔΕΡΜΑ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΜΥΟΣ

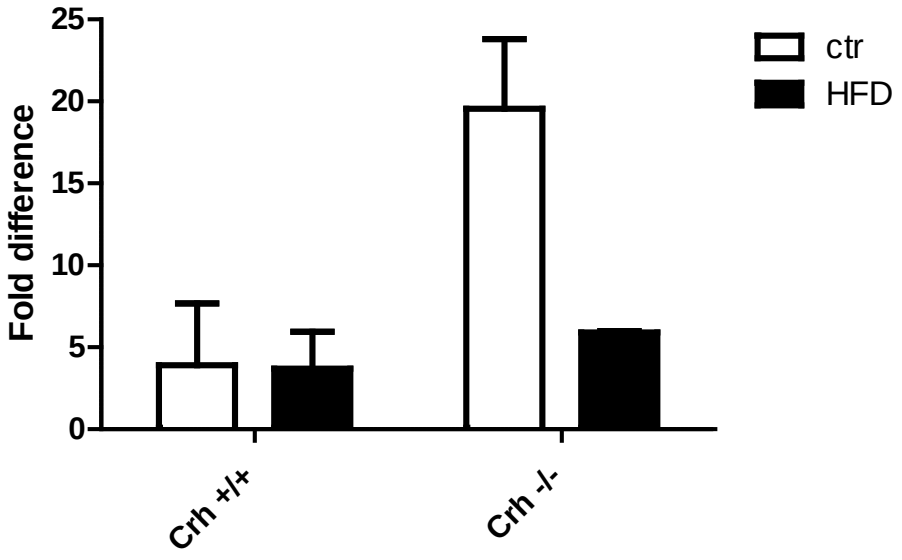
Από τις βιοψίες δέρματος που ελήφθησαν απομονώθηκε RNA και μελετήθηκε η έκφραση του mRNA της CRH καθώς επίσης και των υποδοχέων της. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του CRH mRNA στα φυσιολογικά ζώα είτε αυτά τρέφονταν με κανονική δίαιτα ή με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά (Εικόνα 5).



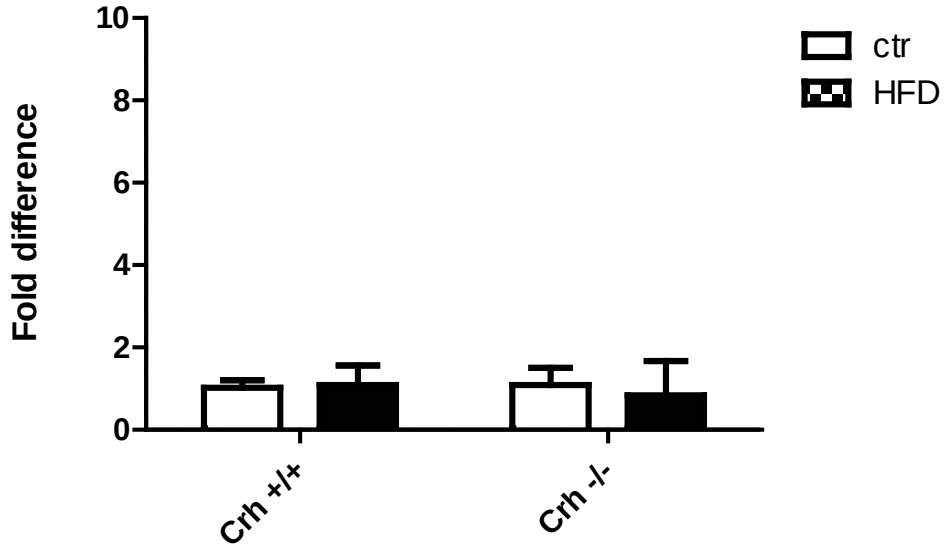
Εικόνα 4: Μελέτη της έκφρασης του mRNA της CRH σε τραυματισμένο ιστό. 1:Crh+/+ ctrl,2: Crh +/+ HFD, 3:αρνητικό δείγμα.

- ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ mRNA ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ CRH ΣΕ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΔΕΡΜΑ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΜΥΟΣ

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί στην Εισαγωγή, η CRH και τα συγγενή της πεπτίδια ασκούν τις δράσεις τους μέσω δύο κυρίως τύπων μεμβρανικών υποδοχέων, τον CRF1 και CRF2. Η έκφραση του mRNA των υποδοχέων της CRH εξετάστηκε σε τραυματισμένο δέρμα και των δύο γονοτύπων με Real Time PCR. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται και στους δύο γονότυπους ανεξαρτήτως της δίαιτας που λάμβαναν (Διαγραμμα 6 και 7). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η έκφραση του mRNA του CRF1 ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στα *Crh-/-* ζώα που λάμβαναν την κανονική δίαιτα συγκριτικά με τις άλλες ομάδες (Διάγραμμα 6). Αντίθετα, η έκφραση του mRNA του υποδοχέα CRF2 δεν παρουσιάζει καμία διαφορά σε κανένα γόνοτυπο και για τις δύο διαφορετικές δίαιτες (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 6: Μελέτη της έκφρασης του mRNA του CRF1 σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος. Τα Crh -/- ζώα που τρέφονταν με την κανονική τροφή εμφανίζουν τη μεγαλύτερη έκφραση του υποδοχέα αυτού.



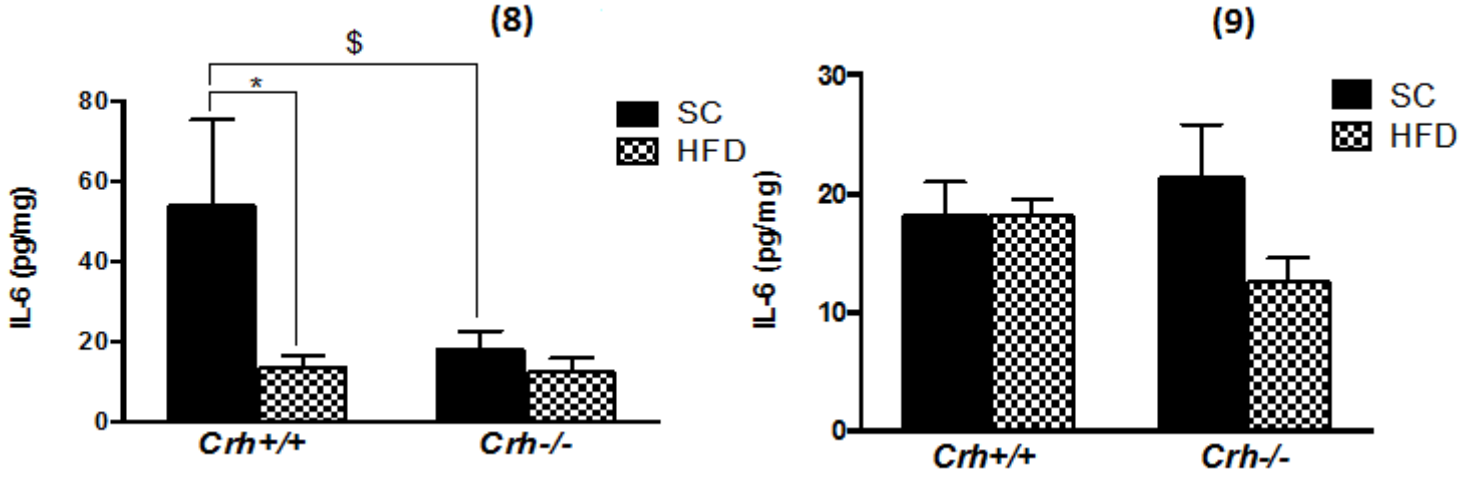
Διάγραμμα 7: Μελέτη της έκφρασης του mRNA του CRF2 σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος. Καμία διαφορά δεν παρατηρείται σε κανένα γονοτυπο.

- ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΙΣΤΟ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Οι κυτοκίνες, κυρίως IL-6 και TNFα, αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές αλλα και μεσολαβητές της διαδικασίας της δερματικής τραυματικής επούλωσης. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε η έκφραση των κυτοκινών αυτών σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος με τη μέθοδο της ELISA.

o ΕΠΙΠΕΔΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 6 ΣΕ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΙΣΤΟ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Η IL-6 είναι προφλεγμονώσης κυτοκίνη, που εκκρίνεται από μία πληθώρα κυττάρων στη περιοχή του τραύματος. Συνεπώς, μετρήσαμε την έκφρασή της και στους δύο γονότυπους (*Crh* +/+ και *Crh* -/-) υπό την επίδραση και των δύο



Διαγράμματα 8,9: Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 6 σε τραυματισμένο ιστό. (8): Επίπεδα IL-6 κατά την ημέρα 1 μετά την επαγωγή του τραύματος. (9): Επίπεδα IL-6 κατά την ημέρα 3 μετά την επαγωγή του τραύματος. (: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων του ίδιου γονότυπου που υπόκεινται σε διαφορετική επίδραση και $: δεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ζώων των δύο διαφορετικών γονοτύπων που υπόκεινται στην ίδια επίδραση, p<0.05).*

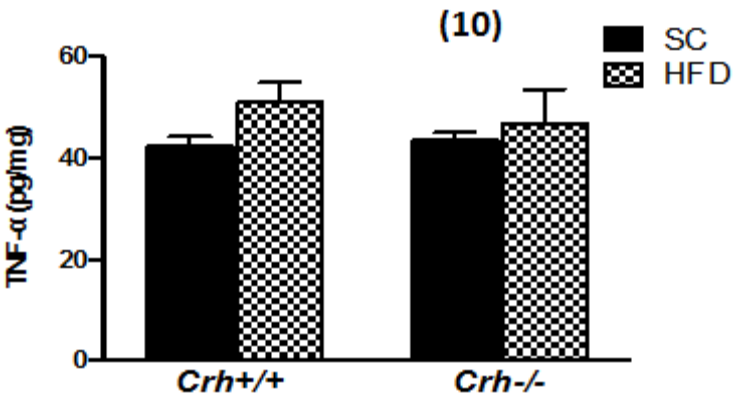
διαφορετικών τύπων δίαιτας.

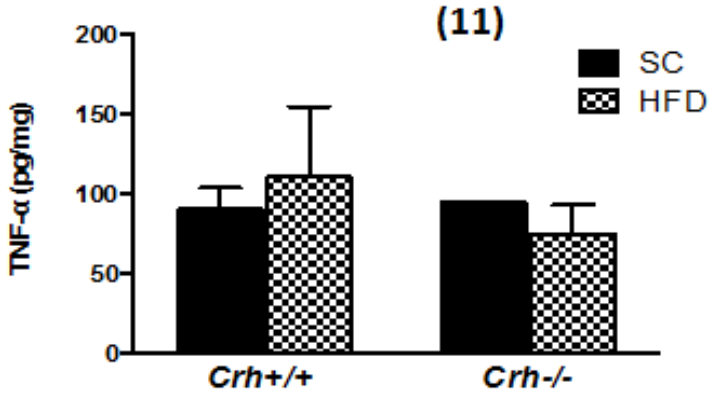
Τα επίπεδα της IL-6 στον τραυματισμένο ιστό κατά την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος ήταν σημαντικά υψηλότερα στα *Crh*+/+ ζώα που λάμβαναν κανονική δίαιτα συγκριτικά με τα ζώα του ίδιου γονότυπου που λάμβαναν δίαιτα

πλούσια σε λιπαρά και με τα *Crh-/-* ζώα που λάμβαναν επίσης HFD (Διάγραμμα 8). Αντίθετα, καμία διαφορά δεν παρουσιάστηκε σε κανένα γονότυπο και σε συνθήκη την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραυματος (Διάγραμμα 9).

- ΕΠΙΠΕΔΑ TNFα ΣΕ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΙΣΤΟ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Μία ακόμη προφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία μελετήθηκε είναι ο TNF-α. Ο παράγοντας αυτός, όπως έχει ήδη αναφερθεί εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της φλεγμονής και έχει βρεθεί ότι έχει μέγιστη δράση κατά την τρίτη ημέρα της φλεγμονής. Συνεπώς, την τρίτη ημέρα αναμένονται τα υψηλότερα επίπεδα της κυτοκίνης αυτής σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος.





Διαγράμματα 10, 11: Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του TNFα σε τραυματισμένο ιστό. (10): Επίπεδα TNFα κατά την ημέρα 1 μετά την επαγωγή του τραύματος. (11): Επίπεδα TNFα κατά την ημέρα 3 μετά την επαγωγή του τραύματος.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις των επιπέδων όπως φαίνεται στα διαγράμματα 10 και 11. Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι δεν εμφανίζεται καμία διαφορά μεταξύ γονοτύπων και διαφορετικών τύπων διαίτης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση της διατροφικής αιτιολογίας παχυσαρκία στη δερματική τραυματική επούλωση σε φυσιολογικές καταστάσεις και σε συνθήκες μειωμένου στρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια αγρίου τύπου (*Crh*+/+) καθώς και ποντίκια με γενετική έλλειψη του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (*Crh*-/-) οποίος είναι ο κύριος μεσολαβητής του υποθάλαμου-υποφυσο-επινεφριδιακού άξονα του στρες. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής στα ποντίκια χορηγήθηκε κανονική δίαιτα ή δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και προκλήθηκε τέλος τραύμα.

Η δερματική τραυματική επούλωση αποτελεί μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, η οποία συντονίζεται από μία πληθώρα κυττάρων (κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, και κύτταρα του ανοσοποιητικού) και παραγόντων, όπως κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και νευροπεπτίδια.

Η τραυματική επούλωση αποτελείται από τρία μη διακριτά, αλληλοεπικαλυπτόμενα μεταξύ τους στάδια.

1) Φλεγμονή. Περιλαμβάνει τα στάδια της αιμοστασίας ή της θρόμβωσης και τη μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο του τραύματος
2) Πολλαπλασιασμός. Εμπλέκει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων που οδηγούν στην επαναθηλιοποίηση, αγγειογένεση και δημιουργία κοκκιώδους ιστού
3) Αναδόμηση. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι η αποκατάσταση της πλήρους λειτουργικότητας και της φυσιολογικής εμφάνισης του τραυματισμένου ιστού(68).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία επιδεινώνει σημαντικά τη διαδικασία της επουλωσης. Θεωρείται πλέον σήμερα ότι η αιτιολογία των προβλημάτων επούλωσης στους παχύσαρκους δεν είναι μόνο το αποτέλεσμα της συνυπάρχουσας ισχαιμίας και νευροπάθειας αλλά και της άμεσης επίδρασης του υποδόριου λιπώδους ιστού στη διαδικασία επούλωσης.

Από τη μελέτη της τραυματικής επούλωσης φάνηκε ότι οι *Crh* -/- μύες εμφανίζουν επιταχυνόμενη τραυματική επούλωση σε σχέση με τους *Crh* +/+ , που τρέφονταν με κανονική τροφή δηλαδή υπάρχει μεγαλύτερη μείωση της περιοχής του τραύματος. Από τη μορφολογική εξέταση των βιοψιών κατά την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή

του τραύματος φαίνεται ότι οι *Crh-/-* μύες εμφάνιζαν περισσότερα φλεγμονώδη στοιχεία και κοκκιώδη ιστό σε σχέση με την ημέρα 1 όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν το ρόλο που πιθανότατα κατέχει η CRH στα αρχικά στάδια της επούλωσης (φλεγμονώδης, πολλαπλασιασμού) δερματικού τραύματος.

Από προηγούμενες εργασίες έχει βρεθεί οτι τα ζώα που τρέφονταν με HFD κατέληγαν σε αρνητική ρύθμιση του HPA άξονα, όπως προέκυπτε από τις μειωμένες συγκεντρώσεις κορτικοστερόνης. Επιπλέον, τα ζώα αυτά παρουσίασαν αύξηση τόσο στο σωματικό τους βάρος όσο και στις συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η αύξηση του βάρους, όπως αναμενόταν, στα δικά μας πειράματα ήταν πολύ μεγάλη στα *Crh+/+* ποντίκια τα οποία τρέφονταν με τροφή πλούσια σε λιπαρά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα *Crh -/-* ποντίκια, η HFD φαίνεται να μην επηρεάσε καθόλου την αύξηση του βάρους γεγονός που υποδηλώνει ότι η έλλειψη CRH δρα προστατευτικά στην επαγόμενη από διατροφή παχυσαρκία.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του βάρους σώματος, βρέθηκε επίσης ότι ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός είχε μεγαλύτερο βάρος στα *Crh +/+* ζώα που τρέφονταν με την HFD, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα *Crh-/-* ανεξαρτήτως τροφής. Όπως έχει φανεί και σε συναφείς εργασίες που έχουν γίνει σε διαφορετικά μοντέλα, όπως για παράδειγμα σε αρουραίους, αυτή η αύξηση στο βάρος του λίπους εμφανίζεται μεγαλύτερη στα HFD ζώα, ενώ είναι μικρότερη στα control ζώα. Το γεγονός αυτό δείχνει οτι όχι μόνο η υπερφαγία, αλλά και το ίδιο το λίπος που περιέχεται στη διατροφή παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην αύξηση του λιπώδους ιστού.

Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι οι πλέων καταστροφικές παρενέργειες της παχυσαρκίας οφείλονται στην ύπαρξη της μεταβολικής φλεγμονής που άρχεται στο σπλαχνικό μεγάλο λευκό λιποκύτταρο του παχύσαρκου, επεκτείνεται στον υπόλοιπο σπλαχνικό λιπώδη ιστό και γενικεύεται σε όλο τον οργανισμό. Η φλεγμονή αυτή οφείλεται σε αμιγώς μεταβολικά αίτια και καλείται μεταβολική. Η μεταβολική φλεγμονή προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη που με την σειρά της προκαλεί ανάπτυξη ινσουλινοάντοχου σακχαρώδους διαβήτη και καρδιαγγειακή νόσο. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι κυρίως η σπλαχνική παχυσαρκία (αύξηση ενδοκοιλιακού και περικαρδιακού λίπους) (παχυσαρκία τύπου μήλου) σχετίζεται με την ανάπτυξη

χρόνιας μεταβολικής φλεγμονής ενώ η υποδόρια παχυσαρκία σε πολύ λιγότερο βαθμό (παχυσαρκία τύπου αχλαδιού). Μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται από τέτοιου είδους αδιποκύτταρα επάγουν τα τοπικά ευρισκόμενα μακροφάγα να παράγουν υψηλά επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) όπως επίσης και IL-6 οι οποίες επάγουν τα αδιποκύτταρα με παρακρινικό τρόπο να παράγουν περισσότερα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες πρωτεΐνες οξείας φάσης και χημειοκίνες (όπως τη CCL2 ή τη MCP-1) τα οποία προσελκύουν περισσότερα μονοκύτταρα/μακροφάγα μέσα στο λιπώδη ιστό. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ του υπερπλαστικού αδιποκυττάρου του λευκού λιπώδους ιστού και των τοπικών μακροφάγων καταλήγει στην ανάπτυξη φλεγμονής στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό όπως επίσης και σε χαμηλού βαθμού συστηματική φλεγμονή η οποία επηρεάζει πολλαπλούς ιστούς. Με βάση τα δεδομένα αυτά αναμέναμε μια σημαντική αύξηση στα επίπεδα των IL-6 και TNFα στο ορό των *Crh*+/+ ζώων που τρέφονταν με HFD. Παρόλα αυτά καμία διαφορά δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα γονότυπο ανεξαρτήτως δίαιτας (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται). Αντίθετα παρουσιάστηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της IL-6 στον τραυματισμένο ιστό των *Crh*+/+ ζώων με HFD. Έχει δειχθεί προηγούμενα ότι η IL-6 αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή της δερματικής τραυματικής επούλωσης και ζώα με γενετική έλλειψη της παρουσιάζουν βλαμμένη επούλωση. Συνεπώς, τα χαμηλά επίπεδα της IL-6 που εμφανίζουν τοπικά τα *Crh*+/+ ζώα συμβαδίζουν με την επιβράδυνση στην τραυματική επούλωση που παρουσίαζουν τα ζώα αυτά.

Σε αντίθεση με την IL-6, καμία διαφορά δεν παρουσιάστηκε στα επίπεδα του TNFα σε κανένα γονότυπο ανεξαρτήτως δίαιτας.

Έχει επισημανθεί από βιβλιογραφικά δεδομένα ο καίριος ρόλος διαφόρων νευροπεπτιδίων στο δέρμα σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις (22). Τα νευροπεπτίδια ελευθερώνονται είτε από νευρικές απολήξεις στο δέρμα είτε από κύτταρα του τοπικού ιστού. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι τα πεπτίδια που εμπλέκονται στον HPA άξονα, τον κυριότερο ενδοκρινικό άξονα που διαμεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες όπως η CRH και οι υποδοχείς της και η προπιομελανοκορτίνη, εκφράζονται στο δέρμα διαφόρων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (69). Το τελικό προϊόν του HPA άξονα, τα γλυκοκορτικοειδή έχει βρεθεί οτι προκαλούν μη φυσιολογική επούλωση των πληγών

σε ανθρώπους και πειραματικά μοντέλα. Η κατασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται κυρίως με την αντιφλεγμονώδη δράση τους, καθώς οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι απαραίτητοι για την ομαλή μετάβαση στις όψιμες φάσεις της επούλωσης (70). Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι η CRH εκτός από το φυσιολογικό δέρμα εκφράζεται και σε τραυματισμένο ιστό. Ο φυσιολογικός ρόλος της κατά τη διάρκεια της επούλωσης βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Η CRH ασκεί τη δράση της μέσω δύο γνωστών υποδοχέων τον CRF1 και τον CRF2 οι οποίοι έχει δειχθεί ότι εκφράζονται σε φυσιολογικό δέρμα ανθρώπου και ποντικού. Από τις μελέτες μας κατά την παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των υποδοχέων αυτών στο δέρμα ποντικού και επίσης ανιχνεύτηκε το mRNA και των δύο υποδοχέων σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα του CRF1 ήταν σημαντικά αυξημένα στα *Crh-/-* που τρέφονταν με κανονική δίαιτα συγκριτικά με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Επίσης διέφεραν σημαντικα και με τα επιπεδα των ζώων του ίδιου γονότυπου που τρέφονταν με HFD. Η φυσιολογική σημασία αυτού του φαινομένου βρίσκεται υπο διερεύνηση. Αντίθετα καμία διαφορά δεν παρουσιάστηκε στα επίπεδα του CRF2 ανεξαρτήτως γονότυπου και διατροφής.

Συμπερασματικά, από τις μελέτες μας φάνηκε ότι η γενετική έλλειψη του γονιδίου του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης δρας προστατευτικά στην επαγόμενη από διατροφή παχυσαρκία καθώς επίσης και στη διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο ακούνται οι προστατευτικές δράσεις τελεί υπό μελέτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. Obes Res. 2002 Dec;10 Suppl 2:97S-104S. PubMed PMID: 12490658.
2. Margioris AN. Fatty acids and postprandial inflammation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009 Mar;12(2):129-37. PubMed PMID: 19202384. Epub 2009/02/10. eng.
3. Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):79-88. PubMed PMID: 10687854. Epub 2000/02/25. eng.
4. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 10;341(2):507-14. PubMed PMID: 16427608. Epub 2006/01/24. eng.
5. Jequier E. Pathways to obesity. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2002 Sep;26 Suppl 2:S12-7. PubMed PMID: 12174324.
6. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. The Journal of nutrition. 2000 Feb;130(2S Suppl):284S-8S. PubMed PMID: 10721889.
7. George V, Tremblay A, Despres JP, Leblanc C, Bouchard C. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. International journal of obesity. 1990 Dec;14(12):1085-94. PubMed PMID: 2086500.
8. Popkin BM, Keyou G, Zhai F, Guo X, Ma H, Zohoori N. The nutrition transition in China: a cross-sectional analysis. European journal of clinical nutrition. 1993 May;47(5):333-46. PubMed PMID: 8319669.
9. Saris WH, Astrup A, Prentice AM, Zunft HJ, Formiguera X, Verboeket-van de Venne WP, et al. Randomized controlled trial of changes in dietary carbohydrate/fat ratio and simple vs complex carbohydrates on body weight and blood lipids: the CARMEN study. The Carbohydrate Ratio Management in European National diets. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2000 Oct;24(10):1310-8. PubMed PMID: 11093293.
10. Deuel HJ, Jr., Meserve ER, et al. The effect of fat level of the diet on general nutrition; growth, reproduction and physical capacity of rats receiving diets containing various levels of cottonseed oil or margarine fat ad libitum. The Journal of nutrition. 1947 May;33(5):569-82. PubMed PMID: 20294352.
11. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity. 2007 Apr;15(4):798-808. PubMed PMID: 17426312.
12. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. Obesity research. 2002 Sep;10(9):956-63. PubMed PMID: 12226145.
13. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutrition research reviews. 2010 Dec;23(2):270-99. PubMed PMID: 20977819.
14. Stunkard AJ, Wadden TA. Restrained eating and human obesity. Nutrition reviews. 1990 Feb;48(2):78-86; discussion 114-31. PubMed PMID: 2407983.
15. Bouchard C. Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. The American journal of clinical nutrition. 1991 Jun;53(6 Suppl):1561S-5S. PubMed PMID: 2031488.
16. Carmelli D, Cardon LR, Fabsitz R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? American journal of human genetics. 1994 Sep;55(3):566-73. PubMed PMID: 8079995. Pubmed Central PMCID: 1918417.
17. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. Recent progress in hormone research. 2004;59:409-24. PubMed PMID: 14749512.

18. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. Endocrine reviews. 2000 Oct;21(5):457-87. PubMed PMID: 11041445.
19. Slominski A, Roloff B, Curry J, Dahiya M, Szczesniewski A, Wortsman J. The skin produces urocortin. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2000 Feb;85(2):815-23. PubMed PMID: 10690896.
20. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. European journal of dermatology : EJD. 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1. PubMed PMID: 12095893.
21. Ikuta S, Sekino N, Hara T, Saito Y, Chida K. Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2006 Nov;70(11):2669-75. PubMed PMID: 17090939.
22. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiological reviews. 2006 Oct;86(4):1309-79. PubMed PMID: 17015491.
23. Thomas DW, Harding KG. Wound healing. The British journal of surgery. 2002 Oct;89(10):1203-5. PubMed PMID: 12296885.
24. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. The Journal of investigative dermatology. 2003 Aug;121(2):219-30. PubMed PMID: 12880412.
25. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. Journal of cell science. 2009 Sep 15;122(Pt 18):3209-13. PubMed PMID: 19726630. Pubmed Central PMCID: 2736861.
26. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. Expert Rev Mol Med. 2003 Mar;5(8):1-22. PubMed PMID: 14987411.
27. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. Clin Dermatol. 1994 Jan-Mar;12(1):157-69. PubMed PMID: 8180938.
28. Xia YP, Zhao Y, Marcus J, Jimenez PA, Ruben SM, Moore PA, et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. J Pathol. 1999 Aug;188(4):431-8. PubMed PMID: 10440755.
29. Lovvorn HN, 3rd, Cheung DT, Nimni ME, Perelman N, Estes JM, Adzick NS. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. J Pediatr Surg. 1999 Jan;34(1):218-23. PubMed PMID: 10022176. Epub 1999/02/18. eng.
30. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, 3rd, Berard CW, Rosen H. The Healing of Rat Skin Wounds. Annals of surgery. 1965 Feb;161:293-308. PubMed PMID: 14260029. Pubmed Central PMCID: 1408940.
31. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. J Trauma. 1996 Jul;41(1):159-67. PubMed PMID: 8676414. Epub 1996/07/01. eng.
32. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. BMJ. 2002 Jan 19;324(7330):160-3. PubMed PMID: 11799036. Epub 2002/01/19. eng.
33. Kim C, Lee H, Cho YM, Kwon OJ, Kim W, Lee EK. TNFalpha-induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. FEBS letters. 2013 Oct 25. PubMed PMID: 24512849.
34. Kyriakis JM. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. Gene expression. 1999;7(4-6):217-31. PubMed PMID: 10440223.
35. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. Seminars in cell & developmental biology. 1999 Feb;10(1):19-29. PubMed PMID: 10355025.
36. Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. Archives of surgery. 1989 Dec;124(12):1422-8. PubMed PMID: 2686582.

37. Fahey TJ, 3rd, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG, 2nd, Minei JP, et al. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. Cytokine. 1990 Mar;2(2):92-9. PubMed PMID: 2104219.
38. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. The Surgical clinics of North America. 1997 Jun;77(3):509-28. PubMed PMID: 9194878.
39. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological reviews. 2003 Jul;83(3):835-70. PubMed PMID: 12843410.
40. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. J Am Acad Dermatol. 2007 Jun;56(6):901-16; quiz 17-20. PubMed PMID: 17504714.
41. Berlowitz DR, Brienza DM. Are all pressure ulcers the result of deep tissue injury? A review of the literature. Ostomy Wound Manage. 2007 Oct;53(10):34-8. PubMed PMID: 17978413.
42. Pierpont YN, Dinh TP, Salas RE, Johnson EL, Wright TG, Robson MC, et al. Obesity and surgical wound healing: a current review. ISRN obesity. 2014;2014:638936. PubMed PMID: 24701367. Pubmed Central PMCID: 3950544.
43. Groszek DM. Promoting wound healing in the obese patient. AORN journal. 1982 May;35(6):1132-8. PubMed PMID: 6179475.
44. Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, et al. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. Circulation. 2011 Jan 18;123(2):186-94. PubMed PMID: 21200001. Pubmed Central PMCID: 3334340.
45. Markman B. Anatomy and physiology of adipose tissue. Clinics in plastic surgery. 1989 Apr;16(2):235-44. PubMed PMID: 2661105.
46. Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. Nature. 1995 Feb 2;373(6513):427-32. PubMed PMID: 7830793.
47. Venihaki M, Carrigan A, Dikkes P, Majzoub JA. Circadian rise in maternal glucocorticoid prevents pulmonary dysplasia in fetal mice with adrenal insufficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000 Jun 20;97(13):7336-41. PubMed PMID: 10861000. Pubmed Central PMCID: 16546.
48. Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Karalis KP, Jeong K, Majzoub JA. The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. Peptides. 2001 May;22(5):725-31. PubMed PMID: 11337085.
49. Jacobson L, Muglia LJ, Weninger SC, Pacak K, Majzoub JA. CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors. Neuroendocrinology. 2000 Feb;71(2):79-87. PubMed PMID: 10686522.
50. Weninger SC, Peters LL, Majzoub JA. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. Endocrinology. 2000 Jan;141(1):256-63. PubMed PMID: 10614646.
51. Gysling K, Forray MI, Haeger P, Daza C, Rojas R. Corticotropin-releasing hormone and urocortin: redundant or distinctive functions? Brain research Brain research reviews. 2004 Dec;47(1-3):116-25. PubMed PMID: 15572167.
52. Venihaki M, Majzoub J. Lessons from CRH knockout mice. Neuropeptides. 2002 Apr-Jun;36(2-3):96-102. PubMed PMID: 12359501.
53. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. Journal of psychosomatic research. 2002 Oct;53(4):865-71. PubMed PMID: 12377295.
54. Hauger RL, Risbrough V, Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Dautzenberg FM. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. Annals of the New York

Academy of Sciences. 2009 Oct;1179:120-43. PubMed PMID: 19906236. Pubmed Central PMCID: 3115623.

55. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science. 1981 Sep 18;213(4514):1394-7. PubMed PMID: 6267699.

56. Lamberts SW, Verleun T, Oosterom R, de Jong F, Hackeng WH. Corticotropin-releasing factor (ovine) and vasopressin exert a synergistic effect on adrenocorticotropin release in man. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1984 Feb;58(2):298-303. PubMed PMID: 6319446.

57. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. Annals of the New York Academy of Sciences. 1999 Oct 20;885:312-28. PubMed PMID: 10816663.

58. Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2002 Dec;13(10):436-44. PubMed PMID: 12431840.

59. Arzt E, Holsboer F. CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. Trends in pharmacological sciences. 2006 Oct;27(10):531-8. PubMed PMID: 16935354.

60. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. Neuron. 1998 Jun;20(6):1093-102. PubMed PMID: 9655498.

61. Karteris E, Grammatopoulos D, Randeva H, Hillhouse EW. Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the feto-placental unit. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2000 May;85(5):1989-96. PubMed PMID: 10843186.

62. Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. The Journal of biological chemistry. 1990 Feb 5;265(4):1964-71. PubMed PMID: 2153673.

63. Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1998 Aug;83(8):2916-20. PubMed PMID: 9709969.

64. Karalis KP, Kontopoulos E, Muglia LJ, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency unmasks the proinflammatory effect of epinephrine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Jun 8;96(12):7093-7. PubMed PMID: 10359844. Pubmed Central PMCID: 22067.

65. Venihaki M, Majzoub JA. Animal models of CRH deficiency. Frontiers in neuroendocrinology. 1999 Apr;20(2):122-45. PubMed PMID: 10328987.

66. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/technology. 1992 Apr;10(4):413-7. PubMed PMID: 1368485.

67. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Molecular aspects of medicine. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. PubMed PMID: 16460794.

68. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature. 2008 May 15;453(7193):314-21. PubMed PMID: 18480812.

69. Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J. Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. Endocrinology. 2004 Feb;145(2):941-50. PubMed PMID: 14605004. Pubmed Central PMCID: 1201495. Epub 2003/11/08. eng.

70. Grose R, Werner S, Kessler D, Tuckermann J, Huggel K, Durka S, et al. A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. EMBO reports. 2002 Jun;3(6):575-82. PubMed PMID: 12034758. Pubmed Central PMCID: 1084153. Epub 2002/05/30. eng.