



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΥΟΪΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΣΤΗΝ  
ΙΝΩΤΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΡΥΓΙΑΝΝΑΚΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΑΣ &  
ΗΠΑΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΙΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΔΑΣΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΙΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΔΑΣΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΚΗΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΟΤΑΣ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ

# 1 ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας & Ηπατολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα τον διευθυντή του εν λόγω εργαστηρίου και της Γαστρεντερολογικής κλινικής καθηγητή Ηλία Κουρούμαλη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να μνηθώ στη γοητεία της έρευνας και την εμπιστοσύνη του. Οι εύστοχες παρατηρήσεις του και το ανήσυχο πνεύμα του αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την πρόοδό μου ως ερευνητή.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον συνεπιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Γεώργιο Κολιό, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος, με την πολύχρονη πείρα, τις γνώσεις και το ένστικτό του, καθοδήγησε την ερευνητική ομάδα βήμα προς βήμα προς την ολοκλήρωση του συγκεκριμένου πονήματος. Η συμβολή του στη διαμόρφωση του θέματος, στη διδασκαλία ορθών εργαστηριακών πρακτικών, στη συγγραφή των δημοσιεύσεων και ανακοινώσεων που προήλθαν από αυτή ήταν ανεκτίμητη. Δαπάνησε αφειδώς χρόνο για την αξιολόγηση δεδομένων και το σχεδιασμό πειραμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα καθηγητή Βιοχημείας Δημήτριο Καρδάση, μέλος της τριμελούς επιτροπής, του οποίου η εργατικότητα και η προσήλωση στη συστηματική έρευνα αποτέλεσαν για εμένα πρότυπο. Ιδιαίτερα βοηθητικό ερέθισμα για διατύπωση ερευνητικών ερωτημάτων υπήρξε η μελέτη της συνεισφοράς του στη διεθνή βιβλιογραφία.

Ευχαριστώ θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Βασίλειο Βαλάτα για την αποδοτική καθοδήγησή του τόσο στα πειραματικά βήματα όσο και στην κοπιώδη συγγραφή της παρούσας διατριβής και των αντίστοιχων δημοσιεύσεων και ανακοινώσεων. Το θαυμαστό βάθος γνώσης της βιβλιογραφίας και η κριτική αλλά και αιρετική ταυτόχρονα σκέψη του, πέρα από την πρακτική χρησιμότητά τους, αποτελούν για εμένα σημεία αναφοράς. Η συνεισφορά του στις συναντήσεις της ερευνητικής ομάδας έδινε διαρκώς ώθηση στη σκέψη όλων μας. Χωρίς τη συμβολή του θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση του πονήματος.

Ευχαριστώ τον δρ Λεωνίδα Μπουρίκα για τη συμμετοχή του στην ερευνητική ομάδα και τις χρήσιμες και οξυδερκείς παρατηρήσεις του και τη δρ Ουρανία Σφακιανάκη, μία σχολαστική και ικανή ερευνήτρια, για την πειραματική βοήθεια που προσέφερε.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον δρ Κωνσταντίνο Καμπά και τον αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης Κωνσταντίνο Ρίτη για τη συμβολή τους τόσο στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων όσο και στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τον λέκτορα Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας Γεώργιο Νότα, έναν ακούραστο και αποδοτικό ερευνητή, διότι συνεισέφερε σημαντικά με την ερευνητική του εμπειρία και τις συμβουλές του σε πολλά στάδια της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον δρ Κώστα Ξυδάκη, για τις χρήσιμες πρακτικές συμβουλές και τη στήριξή του.

Ευχαριστώ, τέλος, το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό του εργαστηρίου ενδοσκοπήσεων πεπτικού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου για τη βοήθειά του στη συλλογή δειγμάτων.

Ιωάννης Δρυγιαννάκης, MD

Στη σύντροφο της ζωής μου Άννα,

πολύτιμο στήριγμα χωρίς το οποίο η πορεία αυτή δεν θα είχε ποτέ ολοκληρωθεί

Στο γιο μου Άρη,

την πιο ευχάριστη έκπληξη της ζωής μου

Στους γονείς μου Αριστόδημο και Μαρία και στον αδελφό μου Κωνσταντίνο,

για την αμέριστη και με κάθε μέσο στήριξή τους στην προσπάθειά μου

Στο θείο μου Δημήτριο Δρυγιαννάκη, MD PhD,

ο οποίος με εισήγαγε στη γοητεία της βιοϊατρικής έρευνας

## 2 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1</b>	<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Νόσος του Crohn</b>	<b>17</b>
3.1.1	Εντερική Φλεγμονή και Ίνωση	19
3.1.2	Κυτταροκίνες	21
3.1.3	Ινωτικός Φαινότυπος	26
3.1.4	Γενετική Ινωτικής νόσου του Crohn	29
3.1.5	Παθολογοανατομία στενώσεων	30
3.1.6	Βιολογικές Θεραπείες	32
<b>3.2</b>	<b>Εντερικοί Υποεπιθηλιακοί Μυοϊνοβλάστες</b>	<b>35</b>
3.2.1	Εμβρυολογία- Ιστογένεση	36
3.2.2	Ιστολογία	39
3.2.3	Φυσιολογία	42
3.2.4	Παθοφυσιολογία Στενώσεων	46
<b>3.3</b>	<b>Επιθηλιακά κύτταρα</b>	<b>54</b>
3.3.1	Επιθηλιακός φραγμός	54
3.3.2	Πηγή αντιμικροβιακών, προ- και αντι- φλεγμονωδών παραγόντων	57
3.3.3	Αμφίδρομη Επικοινωνία με τους Υποεπιθηλιακούς Μυοϊνοβλάστες	58
<b>3.4</b>	<b>Transforming Growth Factor- β</b>	<b>62</b>
3.4.1	Δομή	63
3.4.2	Ενεργοποίηση	66
3.4.3	TGF-β Υποδοχείς	69

3.4.4	SMADs	70
3.4.5	Σηματοδότηση ανεξάρτητη των SMADs	74
3.4.6	Σύνδεση οδού TGF-β με προφλεγμονώδεις ενδοκυττάρια οδούς	74
3.4.7	TGF-β και Ίνωση	79
<b>3.5</b>	<b>Μεταλλοπρωτεάσες – Αναστολείς αυτών</b>	<b>84</b>
3.5.1	Δομή – Τύποι - Ενεργοποίηση	85
3.5.2	Φυσιολογία	88
3.5.3	Παθοφυσιολογία	89
<b>3.6</b>	<b>Εξωκυττάρια ουσία</b>	<b>95</b>
3.6.1	Βασική Μembrάνη	95
3.6.2	Ίνωση	97
<b>3.7</b>	<b>Ενδοθηλίνες</b>	<b>99</b>
3.7.1	Δομή – Ισομορφές - Υποδοχείς	99
3.7.2	Ενδοκυττάρια οδοί	100
3.7.3	Φυσιολογία - Παθοφυσιολογία	101
3.7.3.1	Παθοφυσιολογία Εντέρου	105
<b>3.8</b>	<b>CTGF</b>	<b>106</b>
3.8.1	Φλεγμονή - Επούλωση	107
3.8.2	Φυσιολογία	111
3.8.3	Παθοφυσιολογία	112
<b>3.9</b>	<b>Σύστημα πήξης</b>	<b>114</b>
<b>4</b>	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>117</b>
<b>4.1</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>118</b>
<b>4.2</b>	<b>ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>122</b>
4.2.1	ΥΛΙΚΑ	122

4.2.1.1 Συσκευές _____	122
4.2.1.2 Κυτταρικές σειρές _____	124
4.2.1.3 Υλικά _____	124
4.2.1.4 Αναλώσιμα κυτταροκαλλιιεργειών και ζωικά προϊόντα _____	125
4.2.1.5 Χημικές ουσίες, διαλύματα _____	126
4.2.1.6 Ουσίες διέγερσης _____	127
4.2.1.7 Ισότονα διαλύματα _____	127
4.2.1.8 Εμπορικά διαθέσιμα kit _____	127
4.2.1.9 Αντισώματα ανοσοφθορισμού _____	129
4.2.1.10 Αντίστροφη μεταγραφή & αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης _____	130
4.2.1.11 Αναστολείς _____	132
4.2.1.12 Λογισμικό _____	133
4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ _____	134
4.2.2.1 Ιστοτεμάχια _____	134
4.2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων πρωτογενών κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (SEMFs) _____	135
4.2.2.3 Κυτταρικές σειρές _____	138
4.2.2.4 Κυτταρικές καλλιέργειες _____	138
4.2.2.5 Ανοσοφθορισμός _____	139
4.2.2.6 Διεγέρσεις κυτταροκαλλιιεργειών _____	142
4.2.2.7 Αντίστροφη μεταγραφή και διπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (duplex RT-PCR) _____	143
4.2.2.8 Ανοσοενζυμική μέθοδος (enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA) _____	146
4.2.2.9 Ζυμογραφία σε μετουσιωμένο κολλαγόνο- gelatin (gelatin zymography) _____	148
4.2.2.10 Ανοσοκυτταροχημεία _____	150
4.2.2.11 Μέτρηση κολλαγόνου _____	151
4.2.2.12 Δοκιμασία επούλωσης πληγής (scratch test) _____	152
4.2.2.13 Στατιστική ανάλυση _____	153



<b>4.3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>155</b>
4.3.1	Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών στην Παραγωγή Προϊνωτικών Παραγόντων από Κύτταρα του Εντερικού Βλεννογόνου	155
4.3.1.1	Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν την παραγωγή TGF-β και TIMP-1 από το εντερικό επιθηλιακό κύτταρο, αντίθετα με τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες	156
4.3.1.1.1	Κυτταροσειρές ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου (HT-29, CaCO-2)	156
4.3.1.1.2	SEMFs	166
4.3.1.1.3	18CO	167
4.3.2	Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών στη Δραστικότητα Μεταλλοπρωτεασών από Κύτταρα του Εντερικού Βλεννογόνου	169
4.3.2.1	Η δραστικότητα MMP-2 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών είναι σταθερή και δεν επηρεάζεται από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.	169
4.3.2.1.1	SEMFs	169
4.3.2.1.2	18CO	170
4.3.2.1.3	HT-29, CaCO-2	170
4.3.2.2	Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α και TNF-α επάγουν δραστικότητα MMP-9 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών, ενώ η IFN-γ καταστέλλει το φαινόμενο.	171
4.3.2.2.1	SEMFs	171
4.3.2.2.2	18CO	173
4.3.2.2.3	HT-29, CaCO-2	175
4.3.3	Επίδραση TGF-β1 στη Δραστικότητα MMP-2 & MMP-9 από Μυοϊνοβλάστες	175
4.3.3.1	Η δραστικότητα MMP-2 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών δεν επηρεάζεται από τον TGF-β1.	175
4.3.3.1.1	SEMFs	175
4.3.3.1.2	18CO	176
4.3.3.2	Ο TGF-β1 επάγει δόσοεξαρτώμενα δραστικότητα MMP-9 στο υπερκείμενο υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών	176

4.3.3.2.1 SEMFs	176
4.3.3.2.2 18CO	178
4.3.4 Επίδραση Υπερκείμενου Επιθηλιακών κυττάρων στη Δραστικότητα MMP-2 & MMP-9 από Μυοϊνοβλάστες	180
4.3.4.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από τα επιθηλιακά κύτταρα δεν τροποποιούν τη δραστικότητα MMP-2 από μυοϊνοβλάστες.	181
4.3.4.1.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs	181
4.3.4.1.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO	182
4.3.4.1.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs	182
4.3.4.2 Επιθηλιακά προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν δραστικότητα MMP-9 από τους μυοϊνοβλάστες	183
4.3.4.2.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs	183
4.3.4.2.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO	186
4.3.4.2.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs	188
4.3.4.3 Η επαγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες από επιθηλιακά προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξαρτάται από τον υποδοχέα Β των ενδοθηλινών των μυοϊνοβλαστών	190
4.3.4.3.1 TGF-β	190
4.3.4.3.2 CTGF	193
4.3.4.3.3 Αντιθρομβίνη-III	197
4.3.4.3.4 Υποδοχείς ενδοθηλινών	199
4.3.4.4 Η MMP-9 επάγεται από υπερκείμενο προδιεγερμένων επιθηλιακών και σε μυοϊνοβλάστες απομονωμένους από έντερο ασθενών με νόσο του Crohn με μηχανισμό επίσης εξαρτώμενο από τον ETR-A	203
4.3.5 Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών & TGF-β1 στην Παραγωγή Κολλαγόνου από Μυοϊνοβλάστες	205
4.3.5.1 Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν τροποποιούν την παραγωγή κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες.	206

4.3.5.1.1 SEMFs _____	206
4.3.5.1.2 18CO _____	206
4.3.5.2 Ο TGF-β1 δεν τροποποιεί την παραγωγή κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες. _____	207
4.3.5.2.1 SEMFs _____	207
4.3.5.2.2 18CO _____	207
4.3.6 Επίδραση Υπερκειμένου Επιθηλιακών Κυττάρων στην Παραγωγή Κολλαγόνου από Μυοϊνοβλάστες _____	208
4.3.6.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από επιθηλιακά κύτταρα επί των οποίων επέδρασαν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες. _____	209
4.3.6.1.1 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs _____	209
4.3.6.1.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs _____	210
4.3.6.1.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των 18CO _____	211
4.3.6.1.4 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO _____	211
4.3.6.2 Η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση υπερκειμένων από προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακά κύτταρα δεν εξαρτάται από TGF-β, CTGF, παράγοντες πήξης, TF και ενδοθηλίνες. _____	213
4.3.6.2.1 TGF _____	214
4.3.6.2.2 CTGF _____	214
4.3.6.2.3 Αντιθρομβίνη-III και TF _____	215
4.3.6.2.4 Υποδοχείς ενδοθηλινών _____	216
4.3.6.3 Μυοϊνοβλάστες απομονωμένοι από έντερο ασθενών με νόσο του Crohn παράγουν ιδιοσυστασιακά αυξημένο κολλαγόνο και έχουν ανάλογη απαντητικότητα στο υπερκείμενο επιθηλιακών με αυτούς ομάδας ελέγχου _____	219
4.3.6.3.1 Υψηλότερη ιδιοσυστασιακή παραγωγή κολλαγόνου _____	219
4.3.6.3.2 Επίδραση υπερκειμένου επιθηλιακών _____	219
4.3.7 Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών & TGF-β1 στην Επούλωση Τραύματος από Μυοϊνοβλάστες _____	223

4.3.7.1 Ο TNF-α και η IFN-γ επιβραδύνουν την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.	223
4.3.7.2 Ο TGF-β1 επιταχύνει την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.	226
4.3.8 Επίδραση Υπερκειμένου Επιθηλιακών κυττάρων στην Επούλωση Τραύματος από Μυοϊνοβλάστες	228
4.3.8.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από επιθηλιακά κύτταρα επί των οποίων επέδρασαν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιβραδύνουν την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.	229
4.3.8.1.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs	229
4.3.8.1.2 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs	231
4.3.8.2 Η μείωση της επούλωσης από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση υπερκειμένων από προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακά κύτταρα δεν σχετίζεται με τη ταυτόχρονη επαγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες.	233
4.3.8.2.1 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs	233
<b>4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>236</b>
4.4.1 TGF-β	236
4.4.1.1 Εντερικός βλεννογόνος	236
4.4.1.2 Επιθηλιακά & SEMFs	239
4.4.2 TIMP-1	241
4.4.2.1 Εντερικός βλεννογόνος	241
4.4.2.2 Επιθηλιακά & SEMFs	242
4.4.3 Μεταλλοπρωτεάσες	244
4.4.3.1 Εντερικός βλεννογόνος	244
4.4.3.1.1 Πιθανή θεραπευτική αξία	246
4.4.3.2 Επιμέρους στοιχεία του εντερικού βλεννογόνου	247
4.4.3.3 Σύστημα επιθηλιακών- SEMFs	253
4.4.3.3.1 Ενδοθηλίνες	254
4.4.4 Κολλαγόνο	257

4.4.4.1	Εντερικός βλεννογόνος	257
4.4.4.2	SEMFs	259
4.4.4.3	Σύστημα επιθηλιακών- SEMFs	262
4.4.4.3.1	Μεσολαβητές	264
4.4.5	Κινητικότητα / Πολλαπλασιασμός SEMFs	266
4.4.5.1	Άμεσα αποτελέσματα προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή TGF-β1	266
4.4.5.2	Επίδραση επιθηλιακών	270
<b>4.5</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>273</b>
<b>5</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>276</b>
<b>6</b>	<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	<b>357</b>
<b>7</b>	<b>ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>361</b>
7.1	Εισαγωγή	361
7.2	Ευρήματα	363
7.3	Συμπεράσματα	369
<b>8</b>	<b>EXTENDED SUMMARY</b>	<b>371</b>
8.1	Introduction	371
8.2	Findings	372
8.3	Conclusions	377
<b>9</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>379</b>
9.1	Υπόβαθρο και στόχοι	379
9.2	Μέθοδοι	379
9.3	Αποτελέσματα	379

9.4	Συμπεράσματα	380
<b>10</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>381</b>
10.1	Background and Aims	381
10.2	Methods	381
10.3	Results	381
10.4	Conclusions	382
<b>11</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ / ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b>	<b>383</b>
11.1	Ανηρτημένες Ανακοινώσεις σε Πανελλήνια Συνέδρια	384
11.2	Ανηρτημένες Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια	384
11.3	Δημοσίευση σε Διεθνές Επιστημονικό Περιοδικό καταχωρημένο στο Medline	385
11.4	Αντίγραφα Ανακοινώσεων & Δημοσίευσης	386

### **3 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Η ελκώδης κολίτις (Ulcerative Colitis- UC) και η νόσος του Crohn (Crohn's Disease- CD) είναι τα δύο άκρα της ευρύτερης νοσολογικής οντότητας με την ονομασία Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Εντεροπάθεια (Inflammatory Bowel Disease- IBD) και χαρακτηρίζονται από χρόνια υποτροπιάζουσα φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου που πιθανόν προκαλείται από υπερβολική απάντηση του ξενιστή στην εντερική χλωρίδα ή/ και σε διαιτητικούς παράγοντες (Hibi and Ogata, 2006; Podolsky, 2002). Η εντερική φλεγμονή παραδοσιακά θεωρείται μια διαδικασία, στην οποία T effector κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλούν καταστροφή των άλλων κυττάρων του βλεννογόνου που συμπεριφέρονται ως παθητικοί στόχοι (Fiocchi, 1997). Η χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία οδηγεί στην καταστροφή του επιθηλιακού φραγμού και τα επακόλουθα επιθηλιακά έλκη επιτρέπουν την εύκολη πρόσβαση της εντερικής χλωρίδας του αυλού και διαιτητικών αντιγόνων στα κύτταρα του ίδιου χιτώνα (lamina propria). Στην ανοσολογική απάντηση σε αυτά, τα μεσεγχυματικά κύτταρα επηρεάζουν την χημειοταξία, την παραμονή και την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της σύνθεσης κυτταροκινών, χημειοκινών, εικοσανοειδών και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (Andoh et al., 2005a; Andoh et al., 2005b; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαίωνιση της χρόνιας φλεγμονής (Andoh et al., 2002; Fiocchi, 1997).

Η λύση της φλεγμονώδους δραστηριότητας συνδυάζεται με διαδικασίες επισκευής που θα διευκολύνουν την αναμόρφωση του ιστού και επακόλουθα την αποκατάσταση της φυσιολογικής εντερικής αρχιτεκτονικής και ειδικότερα της δομής του βλεννογόνου. Η παροδική εμφάνιση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων είναι ένα χαρακτηριστικό της ορθής φυσιολογικής επούλωσης των πληγών, αλλά η παράταση της δράσης των εν



λόγω κυττάρων σχετίζεται με υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου και ίνωση, η οποία συχνά παρατηρείται σε ασθενείς με CD και περιλαμβάνει υπερπλασία των μεσεγχυματικών κυττάρων, αποδιοργάνωση των ιστών και υπέρμετρη εναπόθεση κολλαγόνου (Farmer et al., 1985; Graham, 1995; Lang et al., 2009; Lawrance et al., 2001c; Pucilowska et al., 2000a; von Lampe et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες δίνουν προοπτική καινοτόμων θεραπευτικών παρεμβάσεων δείχνοντας ότι μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από βλαστικά κύτταρα (stem cells) του μυελού των οστών παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εντερική επισκευή και ίνωση (Brittan and Wright, 2002; Brittan and Wright, 2004; Pucilowska et al., 2000a).

### 3.1 Νόσος του Crohn

Η νόσος του Crohn (CD) είναι πολυπαραγοντική νόσος που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του εντερικού σωλήνα, για την αιτιοπαθογένεια της οποίας έχουν προταθεί πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών, ανοσολογικών και παραγόντων της εντερικής χλωρίδας (Shanahan, 2002). Η συνολική επίπτωση της CD είναι περίπου 3,1 ως 14,6 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα-έτη στη Βόρεια Αμερική, που ισοδυναμεί με **κίνδυνο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής 0,5- 1%** (Loftus, 2004). Δεν εκδηλώνεται ως μια διακριτή νοσολογική οντότητα, αλλά ως φαινοτυπικά ετερογενής διαταραχή με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις. Περισσότερο από το **ένα τρίτο των ασθενών με CD θα αναπτύξει διακριτό φαινότυπο ινωτικής- στενωτικής νόσου** που οδηγεί σε υποτροπιάζουσες εντερικές στενώσεις (Van Assche et al., 2004). Αυτές είναι το τελικό προϊόν της χρόνιας φλεγμονής και φαινοτυπικά εκφράζουν διατοιχωματικά απορρυθμισμένη επούλωση των λύσεων της συνέχειας του εντερικού βλεννογόνου ως αποτέλεσμα της εντερικής φλεγμονής, η οποία είναι το αίτιο υπερβολικής εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας (Graham

et al., 1988). Στην κλινική επιπλοκή της εντερικής απόφραξης πλην της υπερβολικής εναπόθεσης ουλώδους ιστού συντελεί και η υπέρμετρη σύσπαση των τοπικών μυοϊνοβλαστών.

Η βασική θεραπεία της CD είναι φαρμακευτική. Ωστόσο, η πλειονότητα των ασθενών θα χρειαστεί τουλάχιστον μία χειρουργική παρέμβαση στη διάρκεια της ζωής τους. Οι χειρουργικές επεμβάσεις ευθύνονται για την πλειοψηφία των ημερών νοσηλείας και το 40% του οικονομικού κόστους στη CD. Περισσότερο από το ήμισυ του συνόλου των χειρουργικών επεμβάσεων εκτελούνται για τη λύση εντερικής απόφραξης (Cohen et al., 2000; Silverstein et al., 1999). Η χειρουργική επέμβαση είναι σπάνια θεραπευτική, καθώς **το 70% των ασθενών θα έχουν ενδοσκοπικά στοιχεία υποτροπής της στένωσης εντός 1 έτους, ενώ εντός 4 ετών, το 40% θα έχει μια συμπτωματική υποτροπή στένωσης που θα απαιτήσει εκ νέου ιατρική παρέμβαση** (Dietz et al., 2001; Rutgeerts et al., 1990; Rutgeerts et al., 1984; Whelan et al., 1985). Παρά την πρόοδο στη διαχείριση της CD κατά τα τελευταία 25 έτη, η συχνότητα των στενώσεων και η ανάγκη για χειρουργική παρέμβαση δεν μειώθηκαν (Cosnes et al., 2005). Οι επαναλαμβανόμενες μερικές εντερεκτομές θέτουν αυτούς τους ασθενείς σε αυξημένο κίνδυνο θνητότητας και νοσηρότητας, με απώλεια σημαντικού μήκους του εντέρου που συχνά επιπλέκεται με σύνδρομο βραχέος εντέρου. Παραταύτα, γενικά οι ασθενείς με CD έχουν ένα φυσιολογικό προσδόκιμο επιβίωσης (Farrokhyar et al., 2001). Ωστόσο, η χρόνια φύση της ασθένειας και η ανάγκη για επαναλαμβανόμενες ιατρικές παρεμβάσεις προκαλούν μια σημαντική επιβάρυνση για τους ασθενείς και τους παρόχους υπηρεσιών υγείας. Αν και η παθοφυσιολογία της φλεγμονής στη CD έχει μελετηθεί εκτενώς, η γνώση για την παθογένεια των στενώσεων παραμένει

σχετικά περιορισμένη και η αξία της διερεύνησης των μηχανισμών της είναι προφανής δεδομένων των παραπάνω.

### 3.1.1 Εντερική Φλεγμονή και Ίνωση

Οι ινωτικές νόσοι ή επιπλοκές νόσων χαρακτηρίζονται από υπερβολική ουλοποίηση που οφείλεται στην υπερβολική παραγωγή, εναπόθεση και τη συστολή της εξωκυττάριας ουσίας. Πρόκειται για υποξεία ή χρόνια επιπλοκή, η εξέλιξη της οποίας πραγματοποιείται συνήθως σε χρόνο μηνών ή ετών, και μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία οργάνων ή θάνατο. Παραδείγματα αποτελούν η διαβητική νεφροπάθεια, η κίρρωση του ήπατος, η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αρτηριοσκλήρυνση και το σκληρόδερμα. **Οι ινωτικές νόσοι αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομάδες διαταραχών για τις οποίες δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία** και ως εκ τούτου αποτελούν μια σημαντική ανικανοποίητη ιατρική πρόκληση. Συχνά η μόνη λύση για τους ασθενείς με ίνωση είναι η μεταμόσχευση οργάνων. Δεδομένης όμως της ανεπαρκούς προσφοράς οργάνων σε σχέση με τη ζήτηση και της ιατρικά ανέφικτης σε πολλές περιπτώσεις μεταμόσχευσης, οι ασθενείς συχνά αποβιώνουν. (Leask and Abraham, 2004)

Η φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου που χαρακτηρίζεται από αποεπιθηλιοποίηση και ιστική βλάβη του ίδιου χιτώνα φυσιολογικά ακολουθείται από μια διαδικασία επούλωσης με σκοπό την αποκατάσταση της φυσιολογικής ιστικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας (McAlindon et al., 1998). Στην IBD και ειδικότερα στη CD η χρόνια διατοχωματική φλεγμονή και η ιστική βλάβη ενίοτε προκαλούν μια υπερβολική απάντηση προς την κατεύθυνση της επούλωσης που οδηγεί στην αλλοίωση της ιστικής αρχιτεκτονικής, στην ίνωση και στην επακόλουθη στένωση του λεπτού εντέρου με την

απόφραξη ως λειτουργική συνέπεια (Burke et al., 2007; Rieder et al., 2007). Η **εναλλαγή εξάρσεων και υφέσεων της φλεγμονώδους δραστηριότητας ενδεχομένως έχει ως αποτέλεσμα απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου της επούλωσης** πυροδοτώντας ανεξέλεγκτη εναπόθεση κολλαγόνου στον εξωκυττάριο χώρο και επακόλουθη ίνωση. Η ίνωση και οι σχετιζόμενες επιπλοκές είναι μείζονες αιτίες χειρουργικής παρέμβασης αφού επί του παρόντος δεν υπάρχει αποτελεσματική φαρμακευτική θεραπεία (Van Assche et al., 2004).

Η παραγωγή ινώδους ιστού που πυροδοτείται από την έναρξη της φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει είτε σε επιδιόρθωση της ιστικής αποδόμησης είτε σε ίνωση με το τελικό αποτέλεσμα να εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ σύνθεσης εξωκυττάριας ουσίας και αποδόμησης αυτής. Η **ίνωση** είναι μια χρόνια και προοδευτική διαδικασία που δρα μέσω περίπλοκων αλληλεπιδράσεων κυττάρων, εξωκυττάριας ουσίας και τροφικών παραγόντων, αλλά **υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι είναι αναστρέψιμη, χωρίς όμως επί του παρόντος να είμαστε σε θέση να ταυτοποιήσουμε σαφείς πιθανούς θεραπευτικούς στόχους** (Burke et al., 2007; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Pucilowska et al., 2000b; Rieder et al., 2007; Van Assche et al., 2004). Σχετίζεται με τη μη φυσιολογική συσσώρευση δομικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας από ενεργοποιημένα εντερικά μεσεγχυματικά κύτταρα (Burke et al., 2007; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Pucilowska et al., 2000b; Rieder et al., 2007). Οι κύριοι τύποι μεσεγχυματικών κυττάρων στο έντερο είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα, οι ινοβλάστες και οι μοινοβλάστες, με τους τελευταίους να περιλαμβάνουν τους υποεπιθηλιακούς μοινοβλάστες (subepithelial myofibroblasts- SEMFs) και τα κύτταρα του Cajal, τα οποία όμως έχουν το ρόλο βηματοδότη των λείων μυϊκών ινών για τη ρύθμιση της εντερικής κινητικότητας (Burke et al., 2007;

Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Pucilowska et al., 2000b; Rieder et al., 2007; Vetuschi et al., 2006).

**Ο ρόλος της φλεγμονής ως εναύσματος για την επικοινωνία μεταξύ επιθηλιακών και υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών προς την παθοφυσιολογική κατεύθυνση της ίνωσης- η οποία κατόπιν, όμως, έχει προταθεί ότι δεν εξαρτάται από το φλεγμονώδες ερέθισμα- έχει προταθεί και στον αναπνευστικό βλεννογόνο και προκειμένου για την κρυψιγενή πνευμονική ίνωση (Strieter, 2002). Σύμφωνα με τη θεώρηση αυτή, που υποστηρίζεται από ικανοποιητικά πειραματικά ευρήματα, ο αρχικός τραυματισμός του επιθηλίου πυροδοτεί υπερβολική σε ποσότητα και αναποτελεσματική σε ποιότητα επούλωση, που επιδεινώνεται παρά την μετέπειτα απουσία φλεγμονώδους διεργασίας (Selman and Pardo, 2002). Σε μοντέλο επαγωγής οξείας φλεγμονής σε πνεύμονα με υπερέκφραση ιντερλευκίνης (IL)-1β, η φλεγμονώδης διεργασία πυροδοτεί ιστική καταστροφή και ίνωση, αλλά το ίδιο δεν ισχύει για την φλεγμονή λόγω υπερέκφρασης του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor- TNF)-α (Kolb et al., 2001; Sime et al., 1998). Είναι ενδιαφέρον ότι η εξέλιξη της ίνωσης λαμβάνει χώρα όταν η έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών απουσιάζει από τον πνευμονικό ιστό, αλλά χρονικά συμπίπτει με αυξημένα επίπεδα transforming growth factor (TGF)-β1.**

### **3.1.2 Κυτταροκίνες**

Πολλές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες βρίσκονται αυξημένες στον φλεγμαίνοντα εντερικό ιστό. Οι περισσότερες δεν είναι ειδικές του αιτίου της φλεγμονής ούτε χαρακτηρίζουν αποκλειστικά το ένα ή το άλλο άκρο του συνεχούς φάσματος μεταξύ της CD και της UC. Παραταύτα οι TNF-α, IL-12, IL-18, epithelial cell-derived neutrophil-

activating peptide (ENA)-78 ή C-X-C motif ligand (CXCL)-5 αυξάνονται κυρίως στη CD, ενώ οι IL-6, IL-7, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 ή C-C motif ligand (CCL)-2, thymus and activation regulated chemokine (TARC) ή CCL17, myeloid-related protein (MRP)-8 στη UC. Αυτό είναι ένα από τα στοιχεία με βάση τα οποία η CD χαρακτηρίζεται ως νόσος T helper 1 (Th1) ανοσολογικής απάντησης, ενώ η UC ως Th2 (Autschbach et al., 2002). Σε πειραματικά μοντέλα χρόνιας έκθεσης σε αντιγονικό ερεθισμό της αναπνευστικής οδού κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη ίνωσης των αεραγωγών έχει η IL-13, με μελέτες με ποντίκια knockout για την IL-13 να δείχνουν προς αυτήν την κατεύθυνση (Kumar et al., 2002). Ο **TGF-β1 στο μοντέλο αυτό βρίσκεται downstream της IL-13** (Lee et al., 2001) και επάγεται από αυτήν στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (Richter et al., 2001; Wen et al., 2002).

Παρά τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα ότι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες γενικά αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών (Ciacci et al., 1993b; Kaiser and Polk, 1997; McGee and Vitkus, 1996; Reinecker et al., 1996), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση σε εντερική φλεγμονή και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι έχει κυτταροστατική δράση (Kilshaw, 1985). Επίσης έχουν μετρηθεί αυξημένα επίπεδα IL-1 και TNF-α σε φλεγμαίνοντα εντερικό ιστό (Bailey et al., 1994; Breese et al., 1994; Isaacs et al., 1992; Mahida et al., 1989; McCabe et al., 1993; Murch et al., 1991; Youngman et al., 1993). Οι IL-1 και TNF-α έχουν βρεθεί αυξημένες σε εντερικό ιστό και περιεχόμενο (Braegger et al., 1992; Casini-Raggi et al., 1995; Cominelli et al., 1990a; Cominelli et al., 1990b; Isaacs et al., 1992; Murch et al., 1993; Murch et al., 1995; Rampton and Hawkey, 1984; Reimund et al., 1996), αλλά και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που απομονώθηκαν από ασθενείς με IBD (Reinecker et al., 1993). Ακόμη

αυξημένα επίπεδα είναι τα επίπεδα του επαγωγίμου υποδοχέα του TNF- TNFR2- σε ασθενείς με IBD και σε μοντέλο κολίτιδος (Holtmann et al., 2002).

Η **IL-1** έχει σημαντικές επιπτώσεις στην εντερική λειτουργία, συμπεριλαμβανομένων της διέγερσης έκκρισης Cl<sup>-</sup>, βλέννης και κυτταροκινών, στη διαμόρφωση της νευροδιαβίβασης, στην κινητικότητα και την αναστολή της απορρόφησης NaCl (Chang et al., 1990; Chiossone et al., 1990; Cohan et al., 1991; McGee et al., 1993; McGee et al., 1995; Ruhl et al., 1994). Η συμμετοχή της IL-1 στην εντερική φλεγμονή είναι πολύπλευρο και πολύπλοκο φαινόμενο. Ανάλογα με την τοπική συγκέντρωση, το συγκεκριμένο μοντέλο κολίτιδας, το στάδιο της κολίτιδας και τις ειδικές φλεγμονώδεις παραμέτρους που παρακολουθούνται, η IL-1 εμφανίζει τόσο προ- όσο και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Cominelli et al., 1990a; Cominelli et al., 1990b; Rampton and Hawkey, 1984). Για παράδειγμα, η υπερβολική και ανεξέλεγκτη ενεργός έκκριση Cl<sup>-</sup>, η οποία είναι εν μέρει υπεύθυνη για την άφθονη υδαρή διάρροια που σχετίζεται με εντερική φλεγμονή, διεγείρεται από IL-1 (Chang et al., 1990). Σε πολωμένη συγκαλλιέργεια μυοϊνοβλαστών με τα επιθηλιακά αυξάνει περαιτέρω την απάντηση αυτή από τα επιθηλιακά (Berschneider and Powell, 1992; Hinterleitner et al., 1996).

Κυτταροκίνες και λοιποί προφλεγμονώδεις παράγοντες επιφέρουν ακόμη **παθολογοανατομικές αλλαγές στην αρχιτεκτονική του εντερικού τοιχώματος**. Σε μοντέλο νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή έχει δειχθεί *in vivo* ότι η αναστολή των νιτρικό οξείδιο, IL-1, IL-4, IFN-γ αποτρέπει την υπερπλασία κρυπτών (Garside et al., 1992; Mowat et al., 1993; Mowat and Widmer, 1995). Έχει δειχθεί επίσης άμεσα ότι η έγχυση IFN-γ ή TNF-α σε φυσιολογικά ποντίκια προκαλεί υπερπλασία κρυπτών (Garside et al., 1993). Ομοίως, όγκοι που παράγουν IFN-γ έχουν το ίδιο αποτέλεσμα (Lollini et al., 1995).

Ο **TNF-α** διαβιβάζει ενδοκυττάρια σήματα μέσω του συνήθως ιδιοσυστασιακά εκφραζόμενου TNF receptor (TNFR)-I, αλλά και του επαγόμενου TNFR-II (Baud and Karin, 2001; MacEwan, 2002). Πιο αναλυτικά ο TNF-α, όπως και η IL-1, προκαλούν την αποσύνδεση του αναστολέα IκB του συμπλέγματος που κρατά δεσμευμένο και αδρανή τον πυρηνικό παράγοντα κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB) στο κυτταρόπλασμα και αυτός στη συνέχεια μεταναστεύει στον πυρήνα (Ghosh et al., 1998). Ο NF-κB ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Rel και αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RelA (p65) και την NF-κB1 (p50) (Jobin and Sartor, 2000). Η ενεργοποίηση του NF-κB ρυθμίζεται αυστηρά από τη δέσμευση του από τον IκBa (Baldwin, 1996). Η φωσφορυλίωση και η επακόλουθη αποσύνδεση του IκBa επιτρέπει τη μετατόπιση του ενεργοποιημένου NF-κB στον πυρήνα (Baldwin, 1996). Αυτός με τη σειρά του οδηγεί κυρίως στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν πολλαπλές συνιστώσες της φλεγμονής και σε θετική ανατροφοδότηση του NF-κB (Jobin and Sartor, 2000; Schmid and Adler, 2000), αλλά και στη μείωση ή καταστολή της μεταγραφής σε μερικά γονίδια (Fontaine et al., 2000; Murakami et al., 2000; Supakar et al., 1995; Wissink et al., 1997).

Ενδείξεις του σημαντικού ρόλου του **NF-κB** είναι το ότι η χορήγηση anti-sense ολιγονουκλεοτιδίων για τον προφλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα NF-κB μπορεί να προφυλάξει μερικώς από ίνωση σε μοντέλο χρόνιας TNBS κολίτιδας (Lawrance et al., 2003) και η απαντητικότητα των μυοϊνοβλαστών εντέρου σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προβλέπεται από την εντόπιση NF-κB σε αυτούς (Rogler et al., 1998). Γνωστά μόρια που επάγονται από τον TNF-α είναι η κυκλοξυγενάση-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), η επαγωγίμη ισομορφή συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (inducible NO synthetase- iNOS) και μόρια προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, όπως το intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), μέσω



των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και activator protein-1 (AP-1) (Dinarello, 2000). Ειδικά σε ινοβλάστες πνεύμονος ο TNF-α επάγει Th1 χημειοκίνες σε διάμεσες πνευμονικές νόσους (Sumida et al., 2008) και μεταλλοπρωτεάσες σε κύτταρα του αρθρικού υμένα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Tagoe et al., 2008).

Η **IL-1** προσδέεται στον υποδοχέα IL-1RI και ενδοκυττάρια τα σήματα μεταβιβάζονται μέσω IκB. Βέβαια ο ενδοκυττάριος μηχανισμός της IL-1 δεν περιορίζεται στην μεταγραφική δράση του NF-κB, αλλά με πολλαπλά και εν πολλοίς άγνωστα σηματοδοτικά μονοπάτια, περιλαμβάνει τις οδούς extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2, JNK (Janus kinase), p38, mitogen-activated protein kinase (MAPK) και protein kinase B (PKB ή Akt) (Bankers-Fulbright et al., 1996; Madge and Pober, 2000). Καθώς στόχοι της IL-1 στα πειράματά μας ήταν μεταξύ άλλων οι κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές CaCO-2 και HT-29, αξίζει αναφοράς ότι ένταση των σηματοδοτικών JNK είναι αυξημένη στα CaCO-2 σε σχέση με τα HT-29 και αυτό πιθανόν σχετίζεται αντίστροφα με το βαθμό διαφοροποίησης των δύο κυτταροσειρών (Bocker et al., 2000; Bond et al., 1998).

Η **IFN-γ**, μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που παράγεται από τα Th1 λεμφοκύτταρα και τα natural killer (NK) κύτταρα, παίζει θεμελιώδη ρόλο στην ενδογενή και επίκτητη ανοσία (Boehm et al., 1997). Ως προς το **μηχανισμό δράσης** της, ενεργοποιεί μεταγραφικές απαντήσεις με τη μεσολάβηση της οδού JAK/STAT (signal transducers and activators of transcription) (Darnell et al., 1994). Μετά από διέγερση με IFN-γ, κυτταροπλασματικό STAT1α φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνες του και συγκροτεί ομοδιμερή που μεταφέρονται στον πυρήνα και συνδέονται άμεσα με ανταποκρινόμενους επαγωγείς της μεταγραφής (promoters) γονιδίων- στόχων. Ειδικότερα, το STAT1α προσδέεται με το P300 στον αμινοτελικό τομέα του και η αλληλεπίδραση αυτή παίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο στην

θετική ρύθμιση της σηματοδότησης μεταγραφικών απαντήσεων στον IFN- $\gamma$  (Darnell et al., 1994; Horvai et al., 1997). Εκτός από την επαγωγή μεταγραφικής δραστηριότητας, **η IFN- $\gamma$  μπορεί να καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας** (Ghosh et al., 2001), αλλά οι εμπλεκόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες δεν έχουν εντοπιστεί.

### 3.1.3 Ινωτικός Φαινότυπος

Η CD έχει ταξινομηθεί σύμφωνα με διακριτές παραμέτρους, όπως η ηλικία κατά τη διάγνωση, η θέση και η συμπεριφορά της νόσου (Cosnes et al., 2002; Freeman, 2001; Louis et al., 2001). Αν και η CD μπορεί να εμφανιστεί με ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων και σημείων, οι περισσότεροι ασθενείς θα αναπτύξουν συμπτώματα που ακολουθούν ένα ξεχωριστό μοτίβο με βάση το οποίο ταξινομούνται με βάση τον κλινικό φαινότυπο. Αρχικά οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την ένδειξη για χειρουργική επέμβαση σε νόσο συριγγίων ή μη (Greenstein et al., 1988). Αυτή η κατηγοριοποίηση στη συνέχεια επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει τη νόσο συριγγίων, την ινοστενωτική και τη φλεγμονώδη μορφή ανάλογα με τα προεξάρχοντα κλινικά, ακτινολογικά και ενδοσκοπικά ευρήματα. Περαιτέρω τροποποιήσεις έγιναν στις αναλυτικότερες κατατάξεις της Βιέννης και του Μόντρεαλ (**Πίνακας 1**) (Satsangi et al., 2006).

Χρησιμοποιώντας άλλα κριτήρια οι στενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτές περίξ χειρουργικών αναστομώνσεων, σε φλεγμονώδεις και σε ινωτικές. Οι πρώτες προκύπτουν σε χρόνο μηνών μετά την χειρουργική επέμβαση, είναι συνεχείς στα όρια της αναστόμωσης και δε σχετίζονται με υποτροπή της CD αυτής καθαυτής. Μόνο οι φλεγμονώδεις και οι ινωτικές είναι μέρος της ιστορίας της νόσου αυτής καθαυτής. Οι πρώτες είναι κλινικά

αναστρέψιμες με αγωγή, ενώ η κλασσική παθολογία θεωρεί μη αναστρέψιμες τις δεύτερες, με την τμηματική εντερεκτομή να αποτελεί τη μόνη λύση για αυτές. Αξίζει επίσης αναφοράς το ότι το φάσμα μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης είναι συνεχές με πολλούς ασθενείς να έχουν μικτά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. (Geboes et al., 2000; Sorrentino, 2008)

**Πίνακας 1. Οι κατηγοριοποιήσεις της Βιέννης και του Μόντρεαλ για τη νόσο του Crohn.**

	<b>Βιέννη</b>	<b>Μόντρεαλ</b>
<b>Ηλικία Διάγνωσης</b>	A1: <40 ετών	<b>A1: &lt;16 ετών</b> A2: 17- 40 ετών
	A2: >40 ετών	A3: >40 ετών
<b>Εντόπιση</b>	L1: Ειλεός	L1: Ειλεός
	L2: Παχύ έντερο	L2: Παχύ έντερο
	L3: Ειλεός και Παχύ έντερο	L3: Ειλεός και Παχύ έντερο
	L4: Ανώτερο Πεπτικό	L4: Ανώτερο Πεπτικό <b>μόνο*</b>
<b>Φαινό-τυπος</b>	B1: Μη-ινωτική, Μη-διδυτική	B1: Μη-ινωτική, Μη-διδυτική
	B2: Ινωτική	B2: Ινωτική
	B3: Διδυτική	B3: Διδυτική
		<b>p: Περιπρωκτική νόσος*</b>

\*: δυννητικά προστίθενται στα ανωτέρω L ή B αντίστοιχα

Η αξία, όμως, των ταξινομήσεων αυτών περιορίζεται από το ότι η συμπεριφορά της νόσου αλλάζει στην πορεία της νόσου (Cosnes et al., 2002; Louis et al., 2001). Η

πλειοψηφία των ασθενών έχουν μη στενωτικό- μη διεισδυτικό φαινότυπο κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ωστόσο, με μακροχρόνια παρακολούθηση, το 88% θα αναπτύξει είτε ινωτική είτε διεισδυτική μορφή της νόσου (Cosnes et al., 2002; Louis et al., 2001). Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών θα αναπτύξουν ένα διακριτό στενωτικό χαρακτήρα και η εξέλιξη αυτή συμβαίνει συνήθως εντός 10 ετών από την αρχική διάγνωση (Cosnes et al., 2002; Louis et al., 2001; Van Assche et al., 2004).

Η εντόπιση της νόσου είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην πρόβλεψη μεταβολής της συμπεριφοράς της νόσου με συμμετοχή του λεπτού εντέρου και σχετιζόμενες επακόλουθες πρώιμες στενωτικές επιπλοκές (Farmer et al., 1976). Το φύλο των ασθενών, η αρχική αγωγή, ο χρόνος από την έναρξη των συμπτωμάτων ως τη διάγνωση και η φύση των συμπτωμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζουν την πορεία της νόσου (Langholz et al., 1996). **Αντίθετα, η προηγούμενη σκωληκοειδεκτομή, η εντοπισμένη στον ειλεό νόσος, η μέτριας ή σοβαρότερης βαρύτητας νόσος και η ανάγκη κορτικοστεροειδών σχετίζονται με την ανάπτυξη του ινοστενωτικού φαινοτύπου** (Cosnes et al., 2006; Lichtenstein et al., 2006; Sands et al., 2003). Ως εργαστηριακά προγνωστικά κριτήρια για την ανίχνευση ινωτικής CD έχουν προταθεί η παθολογοανατομία (Bataille et al., 2003), η υπερηχογραφική μέτρηση του πάχους του εντέρου (Castiglione et al., 2004) και τα αντισώματα έναντι του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (Forcione et al., 2004). Για τη διαφοροδιάγνωση μεταξύ φλεγμονώδους και ινωτικής νόσου έχει προταθεί η ενδοσκοπική παρουσία προστενωτικής διάτασης. Απεικονιστικά έχουν προταθεί η μαγνητική τομογραφία (MRI- magnetic resonance imaging) με *per os* χορήγηση μαννιτόλης ή πολυαιθυλενογλυκόλης και *in diethylene triamine pentaacetic acid* (DTPA) συζευγμένου με γαδολίνιο για την ανίχνευση του φλεγμονώδους στοιχείου (Girometti et al., 2008; Maccioni et al., 2006) και η

τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography- PET) με <sup>18</sup>F-δεοξυγλυκόζη (Neurath et al., 2002a).

### 3.1.4 Γενετική Ινωτικής νόσου του Crohn

Η πιο μελετημένη μετάλλαξη που σχετίζεται με την CD είναι στον τομέα **CARD15** (τομέας ενεργοποίησης κασπασών) του Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (**NOD2**) γονιδίου που εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Ο CARD15 της NOD2 παρουσιάζει μεταλλάξεις σε περίπου 50% των ασθενών με CD, ενώ μόνο σε 20% των υγιών μαρτύρων (Lesage et al., 2002). Άτομα που φέρουν μεταλλάξεις του CARD15 και στα δύο αλληλία έχουν 10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου σε σύγκριση με εκείνους που φέρουν στο ένα και οι πρώτοι αντιπροσωπεύουν το 17% των ασθενών με CD (Hugot, 2004; Hugot et al., 1996). Το NOD2 είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη- αισθητήρας του βακτηριακού μουραμύλ-διπεπτιδίου. Εθεωρείτο ότι μεταλλάξεις στον CARD15 τομέα της προκαλούν έλλειμμα στην ενεργοποίηση του NF-κΒ, αλλά πρόσφατες αναφορές δείχνουν το αντίθετο (Maeda et al., 2005). Έχει πάντως δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις αυτές προδιαθέτουν σε προσβολή του ειλεού και σε μεγαλύτερη πιθανότητα συμπτωματικής στενωτικής νόσου (Abreu et al., 2002; Ahmad et al., 2002; Alvarez-Lobos et al., 2005; Lesage et al., 2002). Αντίθετα ο γονότυπος 4G/4G του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) έχει συσχετιστεί με μια μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης συριγγοποιητικού φαινοτύπου (Louis et al., 2003). Επί συνδυασμού των 4G/4G και NOD2/CARD15 γονοτύπων προκύπτει αθροιστικά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ινοστενωτικής νόσου.

Μένει προς διευκρίνιση το αν οι μεταλλάξεις του CARD15 προκαλούν άμεσα στενωτική νόσο ή προκαλούν αυξημένη προσβολή του ειλεού και με τον τρόπο αυτό έμμεσα λειτουργικές στενώσεις (Lichtenstein et al., 2006). Δεν πρέπει να ξεχνούμε ότι μεταλλάξεις συναντώνται μόνο στο 20% της γενετική προδιάθεσης για CD (Eckmann, 2004) και μένει να διευκρινιστεί η κλινική τους χρησιμότητα, που μπορεί τελικά να είναι περιορισμένη (Brant et al., 2003; Vermeire, 2004; Waschke et al., 2005). Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των υποδοχέων του TNF-α σχετίζονται με μειωμένη επίπτωση στενωτικής CD (Waschke et al., 2005).

### 3.1.5 Παθολογοανατομία στενώσεων

Οι εντερικές στενώσεις χαρακτηρίζονται **ιστολογικά** από πάχυνση όλων των στιβάδων του εντέρου, νησίδια λείων μυϊκών ινών στον υποβλεννογόνο χιτώνα, πυκνή εναπόθεση κολλαγόνου, διαταραχές αρχιτεκτονικής με λύση της συνέχειας και πάχυνση του ίδιου μυϊκού χιτώνα. Πέταλα κολλαγόνου επεκτείνονται μέσω του αποδιοργανωμένου ίδιου (υποβλεννογόνιου) μυϊκού χιτώνα για να σχηματίσουν ένα πυκνότερο και παχύτερο χόριο (Graham et al., 1988).

Στο φυσιολογικό έντερο οι κύριοι **τύποι κολλαγόνου** είναι οι I (70%), III (20%) και V (10%). Στενωτικά τμήματα εντέρου χαρακτηρίζονται από αύξηση του συνολικού κολλαγόνου, καθώς και της σχέσης κολλαγόνου III προς V (Graham et al., 1988; Matthes et al., 1992; Stallmach et al., 1992). Αυτοί οι τύποι κολλαγόνου βρίσκονται γενικά σε μεγαλύτερες ποσότητες στους ιστούς υπό επούλωση και το κολλαγόνο τύπου III είναι δεκτικότερο στη συστολή (Bailey et al., 1975; Ehrlich and White, 1981). Η υπερέκφραση

αυτού του τύπου κολλαγόνου στο έντερο των ασθενών με CD δημιουργεί ουλώδη ιστό με μειωμένη ενδοτικότητα και επομένως συμβατό παθοφυσιολογικά με στενώσεις.

Η **φιμπρονεκτίνη** είναι δομική γλυκοπρωτεΐνη και σημαντικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας, όπου διευκολύνει την αλληλεπίδραση κυττάρου- εξωκυττάριας ουσίας. Μελέτες *in situ* υβριδισμού έχουν δείξει υπερέκφραση φιμπρονεκτίνης στα σημεία της στένωσης σε ασθενείς με CD. Υπερέκφρασή της συσχετίζεται με εκείνη των λοιπών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και συνεντοπίζεται με συναθροίσεις ινοβλαστών (Dammeier et al., 1998).

Πολλοί **τύποι μεσεγχυματικών κυττάρων** δυνητικά μπορούν να είναι υπεύθυνοι για την ίνωση, χωρίς όμως το υπεύθυνο να είναι ακόμη σαφές. Είναι επίσης πιθανό, αντί για ένα μόνο είδος κυττάρου, μεσεγχυματικά κύτταρα να βρίσκονται σε κατάσταση συνεχούς διαφοροποίησης και αποδιαφοροποίησης μεταξύ ινοβλαστών, μυϊκών κυττάρων και λείων μυϊκών ινών (Van Assche et al., 2004). Από τη στιγμή, όμως, που στις στενώσεις συναντούμε συσσώρευση ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών και αυξημένη παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και αυτά τα δύο συσχετίζονται καλά μεταξύ τους, η πλέον λογική και απλή υπόθεση προς απόδειξη ή απόρριψη παραμένει η ενεργοποίησή τους από την φλεγμονώδη διεργασία με φαινοτυπική αλλαγή τους προς πολλαπλασιασμό και αυξημένη παραγωγή θεμέλιας ουσίας (Dammeier et al., 1998; Pucilowska et al., 2000a; Pucilowska et al., 2000b).

Ενώ οι μηχανισμοί φλεγμονής είναι αντικείμενο εντατικής μελέτης, οι γνώσεις μας για τους μηχανισμούς των στενώσεων στη CD είναι περιορισμένες. Η **απουσία μοντέλων εντερικής ίνωσης** που να εναρμονίζονται- έστω μερικώς- σε επίπεδο παθολογοανατομικό

και παθοφυσιολογικό- με την ινωτική- στενωτική CD αποτελεί τροχοπέδη στη μελέτη της και την επίτευξη του στόχου προσέγγισης πιθανών μορίων και μηχανισμών που να αποτελούν θεραπευτικούς στόχους. Δεν είναι βέβαιο ότι η επαναλαμβανόμενη ενδοαυλική έγχυση διαβρωτικών/ ερεθιστικών ουσιών, όπως το dextran sodium sulphate (DSS) ή η αιθανόλη μιμούνται επαρκώς σωστά την παθοφυσιολογία της ινωτικής CD. Γενικά η επαναλαμβανόμενη χρήση μικρότερων εβδομαδιαίων δόσεων DSS επί μερικές εβδομάδες φαίνεται να μιμείται καλύτερα το μοντέλο ινωτικής CD (Fichtner-Feigl et al., 2007; Fichtner-Feigl et al., 2006; Fichtner-Feigl et al., 2008; Lawrance et al., 2003). Επίσης, η ενδοαυλική έγχυση αδενοϊών-φορέων που επιμολύνουν το επιθήλιο του παχέος εντέρου ποντικών με TGF-β1 ή MCP-1 έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη εντερικών στενώσεων και μπορεί να είναι καλό μοντέλο ινωτικής CD (Motomura et al., 2006; Vallance et al., 2005).

### 3.1.6 Βιολογικές Θεραπείες

Ο κομβικός ρόλος του TNF-α αποδεικνύεται και με την κλινική εφαρμογή χιμαιρικού μονοκλωνικού αντισώματος έναντι αυτού, το οποίο επιδεικνύει αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα στην πρόκληση και διατήρηση ύφεσης στην ενεργό CD, στην επούλωση των περιπρωκτικών συριγγίων και μείωση της ανάγκης για χειρουργική επέμβαση για επιπλοκές της νόσου (Poritz et al., 2002; Present et al., 1999; Stack et al., 1997; Targan et al., 1997). Ένδειξη της αποτελεσματικότητας της **anti-TNF-α Θεραπείας** υπήρξε η αποτελεσματικότητα της θαλιδομίδης στη θεραπεία της CD (Ehrenpreis et al., 1999). Κλινικές μελέτες δείχνουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με έγχυση anti-TNF-α αντισώματος για τη θεραπεία της σοβαρής ενεργού CD (Rodriguez et al., 1995; Targan et al., 1997; Van Deventer, 1997). Η κλινική δοκιμή ACCENT I έδειξε επίσης ότι η



χρόνια θεραπεία συντήρησης με anti-TNF-α ήταν αποτελεσματική στην πρόληψη της επιδείνωσης CD (Hanauer et al., 2002).

Υπήρχε η επιφύλαξη ότι η θεραπεία με αντί-TNF-α ευθυνόταν για ίνωση μέχρι και στο 12% των ασθενών υπό αντί-TNF-α αγωγή και δημιουργεί ερωτηματικά για τη χρήση του σε καθ' υπεροχή ινωτική μορφή της νόσου (Poritz et al., 2002; Van Assche et al., 2004). Αυτή η επιφύλαξη είναι σε συμφωνία με την κατασταλτική δράση του TNF-α στην έκφραση connective tissue growth factor (CTGF) από ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, που προβλέπει ότι αναστολή του TNF-α θα πυροδοτήσει ίνωση (Abraham et al., 2000; Lin et al., 1998). Παραταύτα, έχει αναφερθεί ότι ανασταλτικό της λειτουργίας του TNF-α αντίσωμα *in vitro* μειώνει την παραγωγή κολλαγόνου από SEMFs (Di Sabatino et al., 2007). Εξ' άλλου η σχετική αυτή κλινική αντένδειξη τείνει να ανατραπεί από νεώτερα κλινικά δεδομένα και με την επισήμανση της αδυναμίας σχεδιασμού ηθικών προοπτικών τυφλών μελετών σε ομάδες με όμοια κλινικά χαρακτηριστικά/ βαρύτητα (Hanauer, 2003; Sorrentino, 2008; Sorrentino et al., 2006). Χρήσιμο στοιχείο για να ληφθεί η απόφαση χορήγησης ή όχι anti-TNF-α αγωγής είναι η επιβεβαίωση έστω του μερικώς φλεγμονώδους χαρακτήρα της εντερικής στένωσης (Sorrentino, 2008; Sorrentino et al., 2007).

Η **IL-10** έχει αντιφλεγμονώδεις (Fedorak et al., 2000) και αντιϊνωτικές ιδιότητες (Mu et al., 2005). Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να επάγουν την τοπική παραγωγή της (Smits et al., 2005) και μπορεί να αποδειχθούν ένα χρήσιμο θεραπευτικό συμπλήρωμα. Έχουν γίνει κλινικές δοκιμές με αυτήν σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονταν σε στεροειδή και παρατηρήθηκε κάποια κλινική βελτίωση (van Deventer et al., 1997).

Η αλληλεπίδραση **CD40/CD40 συνδέτη** (ligand) (CD40L) είναι απαραίτητη για τις ανοσολογικές απαντήσεις των Τ-λεμφοκυττάρων και εμπλέκεται στην παθογένεια της CD (Battaglia et al., 1999; Liu et al., 1999). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει εμπλακεί στην παθογένεια προϋνιτικών νόσων και σε άλλα συστήματα (Adawi et al., 1998; Kaufman et al., 2004; Pontrelli et al., 2006). Η έλευση ενός μονοκλωνικού αντι-ανθρώπινου CD40 αντισώματος (Kasran et al., 2005) παρέχει ένα νέο θεραπευτικό μέσο προς δοκιμή στη σχετιζόμενη με τη CD εντερική ίνωση.

Θεωρητικά ο **TGF-β** αποτελεί πρωταρχικό θεραπευτικό στόχο για την πρόληψη ή τη θεραπεία των εντερικών στένωση σε CD. Ωστόσο, η αναστολή της οδού του μπορεί να οδηγήσει σε μια ανεξέλεγκτη φλεγμονή του βλεννογόνου (Bamba et al., 2003b; Monteleone et al., 2001) και ποντίκια knockout για TGF-β1 παρουσιάζουν φλεγμονή σε πολλαπλά συστήματα και συνήθως δεν επιζούν, κάτι που είναι αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη τον αντιφλεγμονώδη του ρόλο (Bottinger et al., 1997; Kulkarni and Karlsson, 1993; Shull et al., 1992). Προσφέρονται όμως τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGF-β και οι τελικοί μεσολαβητές της δράσης του, όπως ο **CTGF**, ως βέλτιστοι θεραπευτικοί στόχοι. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ποντικοί knockout για τις ισομορφές β2 και β3 παρουσιάζουν μόνο προβλήματα ανάπτυξης (Kaartinen et al., 1996; Sanford et al., 1997).

Πειραματικά μοντέλα ίνωσης παρέχουν πληροφορίες και για έναν αριθμό άλλων πιθανών αντιϊνωτικών παραγόντων. Αυτοί περιλαμβάνουν την **καπτοπρίλη** (μέσω αναστολής της αγγειοτενσίνης II και, συνεπώς, του TGF-β) και **αναστολείς των διαύλων ασβεστίου** όπως η βεραπαμίλη (Van Assche et al., 2004; Wengrower et al., 2004). Το **μονοξειδίο του αζώτου**, το οποίο έχει κυτταροστατικές δράσεις και αναστέλλει τις επιδράσεις του CTGF (Ferrini et al., 2002; Keil et al., 2002), και η **λοπρόστη**, που ελαττώνει

τη δράση του TGF-β μέσω της αναστολής της οδού Ras/ MAPK/ ERK, μπορούν επίσης να είναι επωφελείς (Stratton et al., 2002; Stratton et al., 2001). Η μορφογενετική πρωτεΐνη οστών-7 (bone morphogenetic protein-7, **BMP-7**), η οποία ανταγωνίζεται τις δράσεις του TGF-β, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι αναστρέφει εγκατεστημένη νεφρική ίνωση και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της εντερικής αντιφλεγμονώδους αντίδραση. Θα μπορούσε λοιπόν να αποτελέσει δυνητικό θεραπευτικό στόχο (Maric et al., 2003; Zeisberg et al., 2005). Επιπροσθέτως, οι αναστολείς του 3-υδροξυ-3-μεθυλ-συνενζύμου Α (HMG CoA) ή **στατίνες** έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν την TGF-β-επαγόμενη μεταγραφή του CTGF σε μοντέλα της νεφρικής ίνωσης και ίσως αποδειχθούν χρήσιμοι (Eberlein et al., 2001; Heusinger-Ribeiro et al., 2004). Περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* μελέτες απαιτούνται πριν κάποιος από αυτούς τους παράγοντες επιλεγούν για μελέτες ασφάλειας και ακολούθως κλινικές μελέτες στην ινωτική- στενωτική CD.

## 3.2 Εντερικοί Υποεπιθηλιακοί Μυοϊνοβλάστες

Η ιδέα ότι οι μυοϊνοβλάστες αποτελούν ξεχωριστή κυτταρική μορφολογική οντότητα ανάμεσα σε ινοβλάστες και μυϊκά κύτταρα χρονολογείται ήδη από το 1930 (Maximow and Bloom, 1930). Περίπου μετά από 40 έτη, οι μυοϊνοβλάστες ορίστηκαν ως διακριτός τύπος κυττάρου και προσδιορίστηκαν τα βασικά μικροσκοπικά χαρακτηριστικά τους (Gabbiani et al., 1973; Majno et al., 1971). Έκτοτε έχει δειχθεί η πλαστικότητα των κυττάρων αυτών και οι πολλαπλοί ρόλοι που έχουν σε φυσιολογία και παθοφυσιολογία (Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b). Έχουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά και μπορούν να διαφοροποιούνται προς ινοβλάστες ή προς μυϊκά κύτταρα με την πρόελευσή τους όμως να παραμένει ασαφής (Lippper et al., 1980; Seemayer et al., 1980). Είναι κύτταρα συγγενή σε

προέλευση και λειτουργία με τα αστεροειδή κύτταρα του παγκρέατος και του ήπατος και είναι κομβικής σημασίας στην ίνωση (Roulsom et al., 2001). Υποομάδα μυοϊνοβλαστών αποτελούν οι εντερικοί υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες (subepithelial myofibroblasts-SEMFs) ή ινοβλάστες του περικρυπτικού ελύτρου- όπως παλαιότερα ονομάζονταν- με ανεπαρκώς όμως διερευνημένη την λειτουργική διαφοροποίησή τους από τους μυοϊνοβλάστες του γειτονικού ίδιου χιτώνα (lamina propria) ή τους μυοϊνοβλάστες άλλων οργάνων (Adegboyega et al., 2002; Joyce et al., 1987; Kaye et al., 1971; Kedinger et al., 1990; Richman et al., 1987; Sarpino et al., 1989). Ανήκουν σε μία ευρύτερη οικογένεια α-SMA θετικών ινοβλαστών, τοπογραφικά εντοπισμένων δίπλα σε βασικές μεμβράνες, που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου, τα κύτταρα του Ito στο ήπαρ, τα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού, τους πνευμονικούς συσταλτούς ινοβλάστες και τα παγκρεατικά αστεροειδή κύτταρα (Powell et al., 1999a). Αυξημένος αριθμός SEMFs συναντάται τόσο σε ασθενείς με εντερική ίνωση λόγω CD (Pucilowska et al., 2000a) όσο και σε μοντέλα ίνωσης λόγω εντερικής φλεγμονής (van Tol et al., 1999). Υπάρχουν λοιπόν βάσιμα στοιχεία προς την κατεύθυνση του ρόλου των SEMFs στην εντερική ίνωση.

### 3.2.1 Εμβρυολογία- Ιστογένεση

SEMFs εμφανίζονται στο ανθρώπινο έμβρυο πιθανώς από τη 13<sup>η</sup> και σίγουρα κατά την 21<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και έχει προταθεί η **προέλευσή τους είτε από τη νευρική ακρολοφία είτε από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του εντέρου που ενδεχομένως εδράζονται στο μυϊκό χιτώνα** (McLin et al., 2009; Okada et al., 2000; Powell et al., 2005; Powell et al., 1999b). Πέραν των κλασικότερων αυτών θεωρήσεων πρόσφατα παρουσιάστηκαν στοιχεία ότι οι υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες και αυτοί του ίδιου χιτώνα

(lamina propria) προέρχονται και από μεσοθηλιακά κύτταρα του ορογόνου (Wilm et al., 2005). Στην ενήλικη ζωή υπάρχουν στοιχεία ότι η δεξαμενή των εντερικών μυοϊνοβλαστών ανανεώνεται από διαφοροποίηση ινοβλαστών, αποδιαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων, επιθηλιο-μεσεγγυματική φαινοτυπική μεταβολή επιθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων ή από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (CD45-CD34-CD40-CD80-CD86- $\alpha$ -SMA+) ή/ και ινοκύτταρα (CD45+CD34+CD80+CD86+  $\alpha$ -SMA+) που προέρχονται από CD14+ κυκλοφορούντα μονοκύτταρα από το μυελό των οστών (Abe et al., 2001; Bellini and Mattoli, 2007; De Wever et al., 2008; Powell et al., 2011; Rieder and Fiocchi, 2009; Uccelli et al., 2008). Παράγοντες κλειδιά για τη διαφοροποίηση της πιο άμεσα διαθέσιμης πηγής μυοϊνοβλαστών στο έντερο που είναι οι τοπικοί ινοβλάστες είναι ο TGF- $\beta$ 1, το συγκεκριμένο μεταγράφημα ED-A της φμπρονεκτίνης και η μηχανική τάση (Powell et al., 1999a), με τον TGF- $\beta$ 1 πιθανώς να πρέπει να συνδυαστεί με κάποιον από τους άλλους δύο παράγοντες (Hinz and Gabbiani, 2003; Serini et al., 1998). Αυτόνομα και upstream των άλλων δύο παραγόντων πιθανόν να δρα η μηχανική τάση: η αύξησή της αποτελεί ερέθισμα για πολλαπλασιασμό και έκφραση  $\alpha$ -SMA, ενώ η αναίρεσή της έχει το αντίθετο αποτέλεσμα και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Arora et al., 1999; Grinnell et al., 1999; Hinz et al., 2001; Kessler et al., 2001; Niland et al., 2001). *In vivo* στοιχείο υπέρ της σημασίας του TGF- $\beta$ 1 σε συνδυασμό με τους μυοϊνοβλάστες και στην επούλωση αποτελεί η συνύπαρξη αυξημένων επιπέδων και αριθμού αντίστοιχα με μία πρώιμη και με μία όψιμη κορυφή κατά την επούλωση δερματικών τραυμάτων (Yang et al., 1999a).

Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι SEMFs, όπως και επιθηλιακά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν μαζί με την αναπτυσσόμενη κρύπτη, αλλά και κατά μήκος του άξονα των λαχνών, διαφοροποιούμενοι από μια δισκοειδή μορφολογία

στην κρύπτη σε μια αστεροειδή μορφολογία στην κορυφή, όπου και αποπίπτουν (Powell et al., 1999b). Παλαιές και νεότερες μελέτες δείχνουν ότι βρίσκονται σε συνεχή πορεία προς τον αυλό κατά μήκος της κρύπτης και στη συνέχεια εκτρέπονται στον ίδιο χιτώνα υπό το εντερικό επιθήλιο της επιφάνειας του εντέρου (Kaye et al., 1968; Parker et al., 1974; Pascal et al., 1968). Ο PDGF είναι σημαντικός για την αποτελεσματική ιστογένεση του πετάλου των SEMFs ακριβώς υπό τη βασική μεμβράνη, αλλά και για τον επαρκή πολλαπλασιασμό αυτών (Karlsson et al., 2000).

Τα υποεπιθηλιακά μεσεγχυματικά κύτταρα και τα εκκρινόμενα από αυτούς δομικά συστατικά συγκροτούν τον ίδιο χιτώνα (*lamina propria*) που παρέχει υποστηρικτικό δίκτυο για τα επιθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζει σε σημαντικό βαθμό τη λειτουργία τους (Andoh et al., 2005a; Andoh et al., 2005b; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b). Ακόμη παρέχουν άμεσα διαλυτούς μηνυματοφόρους παράγοντες που ρυθμίζουν πολλαπλές πτυχές στον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (Simon-Assmann and Kedinger, 1993). Ο υποβλεννογόنيος περιέχει δύο πληθυσμούς μυοϊνοβλαστών: τα διάμεσα κύτταρα του Cajal και τους SEMFs.

Τα **κύτταρα του Cajal** σχηματίζουν δίκτυο το οποίο κατανέμεται ευρέως στην υποβλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα, στο χόριο και επεκτείνεται στο εν τω βάθει μυϊκό πλέγμα και μεταξύ των στρωμάτων αυτού. Συνδέουν αποκλειστικά λεία μυϊκά κύτταρα με τους νευρώνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος με τη δημιουργία χασματοσυνδέσεων (*gap junctions*) μεταξύ τους. Σύμφωνα με μορφολογικές και φυσιολογικές μελέτες, τα κύτταρα του Cajal είναι κύτταρα με **ρόλο ηλεκτρικού βηματοδότη** των εντερικών λείων μυϊκών ινών, διευκολύνουν τη μετάδοση του δυναμικού ενέργειας και εκτελούν λεπτή ρύθμιση της νευροδιαβίβασης (Sanders et al., 2002). **Νεότερα δεδομένα υπονοούν τη συμμετοχή τους**

και σε άλλες λειτουργίες, όπως η ανοσοτροποποίηση, η ανάπτυξη, η ιστική επισκευή και η ίνωση (Vetuschi et al., 2006).

### 3.2.2 Ιστολογία

Το στρώμα των SEMFs είναι πιο αναπτυγμένο ανατομικά στις κρύπτες και υπό το επιφανειακό επιθήλιο (Joyce et al., 1987; Kaye et al., 1971). Η **συνοχή** του διατηρείται με στενούς συνδέσμους (tight junctions) και η κυτταροπλασματική επικοινωνία μεταξύ τους διατηρείται με **χασματοσυνδέσεις** (gap junctions) που καθιστούν τα κύτταρα αυτά ένα συνεχές συγκύτιο (Joyce et al., 1987; Kaye et al., 1971). Ειδικά στην περιοχή των κρυπτών παρουσιάζουν **σημαντικό βαθμό αλληλοεπικάλυψης** (Kaye et al., 1968; Powell et al., 1999b), αλλά και αφήνουν «**θυρίδες**» (**fenestrae**) ώστε να είναι δυνατή και η διακυτταρική επικοινωνία με κυτταρική επαφή μεταξύ επιθηλιακών και SEMFs πέραν αυτής μέσω διαλυτών μορίων (Low and McClugage, 1984; Mahida et al., 1997b; McAlindon et al., 1998). Πλέον δεν θεωρείται ότι αποτελούν μόνο μονοστιβάδα α-SMA θετικών περικυττάρων δίκην «δικτύου» υπό το επιθήλιο, αλλά τρισδιάστατο συγκύτιο συνδεόμενο μέσω χασματοσυνδέσεων και «στενών» συνδέσεων (tight junctions) με α-SMA αρνητικούς ινοβλάστες του ίδιου χιτώνα (lamina propria) (Powell et al., 2005).

Σε επίπεδο κυττάρου, οι SEMFs είναι κύτταρα με **μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος** με «**πυκνά σωμάτια**» (**dense bodies**), **μικροϊνίδια**, **διακυτταρικές συνδέσεις**, **ατρακτοειδείς πυρήνες** και **λίγες κυτταροπλασματικές προσεκβολές / ψευδοπόδια** (Adegboyega et al., 2002; Kedinger et al., 1990; Richman et al., 1987; Sappino et al., 1989). Με ηλεκτρονική μικροσκοπία έχουν σαφώς αναπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μικροϊνίδια έχουν χαρακτηριστικές συσταλτών ινιδίων (Eyden, 2008). Διαχωρίζονται από τα

επιθηλιακά με ένα λεπτό, αλλά σαφώς διαφορετικό από αυτό του ίδιου χιτώνα (lamina propria) στρώμα συνδετικού ιστού που ονομάζεται **βασική μεμβράνη** και έχει ιδιαιτερότητες ως προς τη δομή της με βασικότερη τη μεγάλη περιεκτικότητά της σε μη-ινιδικό (non-fibrillar) κολλαγόνο τύπου IV, σε λαμινίνη και σε φιμπρονεκτίνη (Simon-Assmann et al., 1990). Ειδικά για τους μυοϊνοβλάστες που περιβάλλουν επιθηλιακές νεοπλασίες, η φιμπρονεκτίνη προσανατολίζεται με ιδιαίτερο τρόπο παράλληλα και πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης των επίσης προσανατολισμένων μυοϊνοβλαστών, κάτι που δεν ισχύει για κύτταρα της lamina propria (Eyden, 2008). Ενώ στο αναπτυσσόμενο έντερο τα βασικά αυτά συστατικά της βασικής μεμβράνης συντίθενται από κοινού από επιθηλιακά και SEMFs, στο ανεπτυγμένο διαφαίνεται βασικότερος ο ρόλος των SEMFs (Simo et al., 1992; Simon-Assmann et al., 1990).

Με βάση μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους δεν μπορούν να διαχωριστούν από τους ινοβλάστες (Adegboyega et al., 2002). Συνδυάζουν **ανοσοϊστοχημικά** χαρακτηριστικά τόσο των μυϊκών κυττάρων δίνοντας θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για α-ακτίνη λείων μυϊκών κυττάρων (α-smooth muscle actin- **α-SMA**), μυοσίνη κυττάρων λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle myosin- SMM) και ασθενώς θετική για δεσμίνη όσο και των ινοβλαστών με θετική χρώση για **βιμεντίνη** (Adegboyega et al., 2002; Andoh et al., 2005a; Andoh et al., 2005b; Mahida et al., 1997a; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Sappino et al., 1990). Η θετικότητα σε δεσμίνη είναι εντονότερη σε SEMFs κοκκιώδους ή νεοπλασματικού ιστού (Skalli et al., 1989; Truong et al., 1990). Εκφράζουν πολλά στοιχεία του σκελετού μικροϊνιδίων, υπό δυναμική ισορροπία ώστε να εξασφαλιστεί η λειτουργικότητά τους (Sappino et al., 1990; Schmitt-Graff et al., 1994). Δεν εκφράζουν όμως άλλους δείκτες λείων μυϊκών κυττάρων, όπως smoothelin και caldesmon, ούτε



επιθηλιακών, όπως κυτταροκερατίνες, ενώ εκφράζουν επιπλέον μερικούς δείκτες ινοβλαστών, όπως η **προλύλ-υδροξυλάση** και το **Thy-1** (thymocyte differentiation antigen-1 ή CD90: εξοκυττάρια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 25-37 kD συνδεδεμένη με την φωσφατιδύλινοσιτόλη της κυτταρικής μεμβράνης) (Bradley et al., 2009; De Wever et al., 2008; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Rege and Hagoood, 2006; Shan et al., 2010). Το Thy-1, αν και δεν αποτελεί ειδικό δείκτη των ινοβλαστών, είναι σημαντικός δείκτης λειτουργικότητας (Shan et al., 2010). Αντίθετα από τα κύτταρα του Cajal του χόριου και μυϊκού χιτώνα του εντέρου οι SEMFs είναι αρνητικοί για c-kit (Adegboyega et al., 2002). Αξίζει αναφοράς και η άποψη ότι μορφολογία και ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός δεν αρκεί για τον χαρακτηρισμό των μυοϊνοβλαστών, αλλά απαιτούνται συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά ορατά μόνο με ηλεκτρονική μικροσκοπία με κυρίως τη σύνδεση ενδοκυττάριας  $\alpha$ -SMA, κυτταρικής μεμβράνης και φμπρονεκτίνης (ED-A κυρίως), που ως ιστολογική μονάδα ονομάζονται fibronexin (Eyden, 2008).

Συνοπτικά, χωρίς η  **$\alpha$ -SMA** να αποτελεί αποκλειστικό ή ειδικό δείκτη, αυτή σε συνδυασμό με την τοπογραφία αποτελούν τον καλύτερο διαθέσιμο ορισμό των SEMFs (Powell et al., 2011), αλλά πρέπει να ληφθεί υπόψη στην προσπάθεια ανίχνευσής τους σε περιβάλλον φλεγμονής ότι η IFN- $\gamma$  μειώνει την έκφρασή της σε δερματικούς μυοϊνοβλάστες (Desmouliere et al., 1992), όπως και η IL-1 $\alpha$  (Shephard et al., 2004b). Είναι ενδιαφέρον ότι ποντίκια knockout για  $\alpha$ -SMA είναι βιώσιμα και πιθανολογείται αντιρροπιστική αύξηση άλλων ισομορφών SMA προς αναπλήρωση της λειτουργικότητας (Schildmeyer et al., 2000). Σε αδενωματώδεις και υπερπλαστικούς πολύποδες η χρώση για  $\alpha$ -SMA επεκτείνεται στον ίδιο χιτώνα και η χρώση για δεσμίνη είναι πιο έντονη και επίσης επεκτείνεται στον ίδιο χιτώνα (Adegboyega et al., 2002). Η παράταση της έντονης έκφρασης ανοσοϊστοχημικών

χαρακτηριστικών SEMFs μετά την αρχική φάση της ουλοποίησης του τραύματος έχει προταθεί ως ένα αρχικό βήμα στην εγκατάσταση ίνωσης (Simmons et al., 2002). Νέοι υποσχόμενοι δείκτες των SEMFs ίσως αποδειχθούν οι ενδοκυττάριοι **ER-TR7** και **TE-7**, αρχικά εντοπισμένοι σε θύμωμα (Pilling et al., 2009).

### 3.2.3 Φυσιολογία

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις **ιστο-ειδικής και νοσο-ειδικής προσαρμογής ινοβλαστών** με αποτέλεσμα την ετερογένεια στην μορφολογία και τη λειτουργία, συμπεριλαμβανομένων του ρυθμού πολλαπλασιασμού, της εναπόθεσης συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, της έκφρασης και της απάντησης σε διαλυτούς διαβιβαστές (Chen et al., 1989; Fries et al., 1994; Smith et al., 1995; Stoker and Gherardi, 1991). Ινοβλάστες απομονωθέντες από πνευμονική ίνωση, χαρακτηριζόμενη από διαταραχή της κυψελιδικής αρχιτεκτονικής δευτερογενούς της αυξημένης εναπόθεσης κολλαγόνου, εμφανίζουν σημαντικά αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με την κανονικούς πνευμονικούς ινοβλάστες (Jordana et al., 1988). Μπορούν να διαφοροποιηθούν από την παρουσία του Thy-1, μιας γλυκοπρωτεΐνης MB 25 kD, η οποία σχετίζεται με την έκκριση του κολλαγόνου, IL-6 και IL-1β. Παρόμοια ανομοιογένεια μεταξύ ινοβλαστών έχει αναφερθεί σε σκληρόδερμα (Feghali et al., 1992), αλλά και σε μαστό (Schor et al., 1994) και ουρήθρα (Baskin et al., 1993).

**Μυοϊνοβλάστες σε στενή ανατομική και λειτουργική σχέση με επιθηλιακά κύτταρα** συναντώνται σε πολλά όργανα, όπως τα κύτταρα του Ito, τα πειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού και οι ινοβλάστες του οφθαλμικού κόγχου (Valentich et al., 1997). Οι μυοϊνοβλάστες παίζουν σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους στην οργανογένεση, τη διαφοροποίηση και την ομοιόσταση του γαστρεντερικού επιθηλίου (Powell et al., 1999a;

Powell et al., 1999b). Πολλοί ερευνητές καταλήγουν, μέσω διαφορετικών πειραματικών μοντέλων και μελετώντας διαφορετικές παραμέτρους, στο συμπέρασμα ότι οι SEMFs είναι κρίσιμης σημασίας στις επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις και ότι υπάρχει σημαντική παρακρινής επικοινωνία προς το σκοπό της επιθηλιακής διαφοροποίησης. Σε διάφορους ιστούς και όργανα οι μυοϊνοβλάστες εκφράζουν και εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών, ορμονών, νευροδιαβιβαστών, φλεγμονωδών μεσολαβητών, και πρωτεϊνών πρόσφυσης, καθώς και εκφράζουν υποδοχείς για πολλούς από αυτούς τους διαβιβαστές (Powell et al., 1999a). Αυτό επιτρέπει σε αυτά τα κύτταρα να ενεργούν κατά τρόπο παρακρινή διαμεσολαβώντας ροή πληροφοριών και προς τις δύο κατευθύνσεις: από και προς το εντερικό επιθήλιο και το ανοσοποιητικό και άλλα μεσεγχυματικά και νευρωνικά στοιχεία του ίδιου χιτώνα (lamina propria). Οι εντερικοί μυοϊνοβλάστες επίσης εκκρίνουν **κολλαγόνο** και άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, καθώς και ένζυμα λύσης της διάμεσης ουσίας με κυριότερες τις **μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases- MMPs) και τους ιστικούς αναστολείς αυτών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases- TIMPs)**, που είναι σημαντικά για την αναδιαμόρφωση και την επισκευή των ιστών (Powell et al., 1999a).

Για παράδειγμα, αρκετοί τροφικοί και παράγοντες ανάπτυξης, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor- HGF) και ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων (keratinocyte growth factor), εκκρίνονται από τους SEMFs και υποδοχείς αυτών υπάρχουν λειτουργικοί στη μεμβράνη των επιθηλιακών (Powell et al., 1999b). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το προφίλ έκφρασης τέτοιων παραγόντων (TGF-β1, επιμορφίνη, HGF) από τους SEMFs διαφοροποιείται ανάλογα με το ύψος του εντέρου στο οποίο εδράζονται και είναι αναπαραγώγιμο σε *in vitro* καλλιέργειες (Powell et

al., 1999b). Εκφράζουν διαφορετικό γονιδιακό προφίλ ανάλογα με την εντόπισή τους θέτοντας το ερώτημα του τρόπου και της σκοπιμότητας αποτύπωσης σε αυτούς διαφορετικών **προτύπων γονιδιακής έκφρασης** (Powell et al., 2005).

Μέσω της διακυτταρικής ικανότητας επικοινωνίας τους διαδραματίζουν και άλλους ρόλους στη φυσιολογία όπως η **εξώθηση των εκκρίσεων** των εντερικών αδενίων στον εντερικό αυλό (Synnerstad et al., 1998), η συστολή και η κινητικότητα των λαχνών (Joyce et al., 1987; Moore et al., 1989). Επίσης οι SEMFs **τροποποιούν την απορρόφηση ύδατος και ηλεκτρολυτών** στο παχύ έντερο (Beltinger et al., 1999; Berschneider and Powell, 1992; Naftalin and Pedley, 1999).

Διαδραματίζουν ρόλο στην εντερική φλεγμονή με την έκκριση **κυτταροκινών, χημειοκινών, προσταγλανδινών, τροφικών παραγόντων** και συστατικών της θεμέλιας ουσίας (Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b). Με βάση την έκφραση Thy-1 στην κυτταρική μεμβράνη, ινοβλάστες διαφορετικών συστημάτων επιδεικνύουν διαφορετικές ποιοτικά και ποσοτικά απαντήσεις σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα και τροφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, οι Thy-1(-) απαντούν σε IL-1 παράγοντας IL-8, ενεργοποιώντας TGF- $\beta$ 1 και αυξάνοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (Hagoood et al., 2001; Hagoood et al., 2002; Koumas et al., 2002; Zhou et al., 2004). Ο φαινότυπος Thy-1(-) των ινοβλαστών περιοχών πνευμονικής ίνωσης και η μεγαλύτερη επιβάρυνση ποντικών knockout για Th-1 υποσημαίνει τη σημασία του και στην πνευμονική ίνωση, με τον ακριβή παθοφυσιολογικό μηχανισμό να παραμένει άγνωστος (Hagoood et al., 2005).

Η **επανασύσταση του εντερικού επιθηλιακού φραγμού** μετά από τραυματισμό καθοδηγείται και διευκολύνεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και

SEMFs (McKaig et al., 1999; Podolsky, 1997). Παράγοντες που εκκρίνονται από τους SEMFs συμβάλλουν στη φάση αποκατάστασης του επιθηλίου και περιλαμβάνουν τους HGFs, KGFs (fibroblast growth factors- FGF -7, -10), προσταγλανδίνες και CXCL12 (stromal derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ ) (Powell et al., 1999b; Smith et al., 2005). **HGF και KGF** αποτελούν παράγοντες που δρουν μόνο με παρακρινή τρόπο. Αυτοί οι παράγοντες εκκρίνονται **από τα μεσεγχυματικά** κύτταρα, ιδιαίτερα μυοϊνοβλάστες, ενώ **οι υποδοχείς τους (c-met για HGF και FGFR2IIIb για KGFs) εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα αποκλειστικά**. Ο KGF υπερεκφράζεται από εντερικούς μυοϊνοβλάστες σε φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Finch and Cheng, 1999) και σε κοιλιοκάκη (Salvati et al., 2001) και είναι σε θέση να βελτιώσει την επούλωση έλκους λεπτού εντέρου σε αρουραίους (Han et al., 2000). Ο **TGF- $\beta$**  παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση μυοϊνοβλαστών κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος, μεσολαβώντας μεταξύ άλλων την αύξηση της έκφρασης  $\alpha$ -SMA και την αύξηση της συστατικότητας, αλλά και την αύξηση της σύνθεσης MMPs συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας που απαιτούνται για την ιστική αποκατάσταση (Pender and MacDonald, 2004; Powell et al., 1999a).

Ενώ όμως οι αλληλεπίδραση μεσεγχυματικών κυττάρων και επιθηλίου είναι σημαντικές για την ομοιόσταση και τη μορφολογική ακεραιότητα στο γαστρεντερικό σύστημα, διαταραχές της αλληλεπίδρασης αυτής πιθανώς έχουν ρόλο στην παθογένεση νεοπλασιών του εντερικού επιθηλίου (Adegboyega et al., 2002; Kaye et al., 1971; Kinzler and Vogelstein, 1998; Powell et al., 1999b). Οι SEMFs έχουν προταθεί ως βασικό κυτταρικό στοιχείο κολονικών πολυπόδων και νεοπλασιών και ως συνυπεύθυνοι για το μεταστατικό δυναμικό των τελευταίων (Powell et al., 1999b).

Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor- PDGF) BB, ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor- bFGF), ο αυξητικός παράγοντας δίκην ινσουλίνης (insulin-like growth factor-IGF) –I, ο epidermal growth factor (EGF), ο KGF και ο TGF-β αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό SEMFs (Jobson et al., 1998) με τους Okuno και συν. (Okuno et al., 2002) να διαφωνούν ως προς τους τρεις τελευταίους.

Ενδιαφέρον εύρημα και έναυσμα για μελλοντική έρευνα αποτελεί η παρατήρηση ότι σε μεταμόσχευση μυελού μέρος των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών του εντέρου έχουν γονότυπο του δότη και επομένως προέρχονται από το **μυελό των οστών** (Brittan et al., 2005; Brittan et al., 2002). Παρόμοια είναι τα ευρήματα αυξημένης εμφάνισης SEMFs από το μυελό των οστών σε γαστρίτιδα από *Helicobacter* (Houghton et al., 2004). Όμοια είναι τα ευρήματα σε *in situ* εμφύτευση μυελού των οστών στο έντερο που οδηγεί σε εμφάνιση SEMFs με γονότυπο δότη (Brittan et al., 2005; Brittan et al., 2002). Σε ποντίκια που προκλήθηκε TNBS κολίτιδα αυξήθηκε σημαντικά το ποσοστό των προερχόμενων από το μόσχευμα SEMFs (Brittan et al., 2005; Brittan et al., 2002). Επίσης η πλαστικότητα κυττάρων που κλασικά θεωρούσαμε τελικής διαφοροποίησης ολοένα και ανατρέπεται με βάση νεότερα πειραματικά ευρήματα (Brittan et al., 2005; Brittan et al., 2002).

### 3.2.4 Παθοφυσιολογία Στενώσεων

Στις φλεγμαίνουσες περιοχές του εντέρου υπάρχει αυξημένος αριθμός μυοϊνοβλαστών (Powell et al., 2005) και ένας από τους κύριους τύπους κυττάρων που συμβάλλουν στην ίνωση μέσω παραγωγής κολλαγόνου είναι οι μυοϊνοβλάστες (Bogatkevich et al., 2009; Wick et al., 2010). Παρά το γεγονός ότι στους διάφορους ιστούς προέρχονται από τη

διαφοροποίηση διαφορετικών πολυδύναμων κυττάρων, μοιράζονται την κοινή λειτουργία της ανταπόκρισης σε προϋνωτικούς μεσολαβητές και της παραγωγής τελικών δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (Hinz et al., 2007). Ακόμη, η θέση τους ακριβώς κάτω από το επιθήλιο και υπέρ των πολλών διαφορετικών κυττάρων του ίδιου χιτώνα (lamina propria), όπως μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, χωροταξικά τα καθιστά ιδανικό ρυθμιστή της επιθηλιακής επισκευής.

Η **βλάβη στο στρώμα των επιθηλιακών κυττάρων**, για παράδειγμα στο δέρμα, προκαλεί αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των υποκείμενων μυοϊνοβλαστών και μπορεί να είναι σημαντική για την επούλωση των πληγών. Αναγνωρίζεται, ωστόσο ότι όταν ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός μυοϊνοβλαστών επιμένει πέραν των ορίων που επιβάλλονται από τη φλεγμονώδη προσβολή μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για ουλοποίηση και παθολογική ανάπλαση του ιστού (Desmouliere et al., 1995; Schmitt-Graff et al., 1994). Ακόμη η καθυστέρηση της επανεπιθηλιοποίησης αυξάνει την πιθανότητα ουλοποίησης στο δέρμα με αυξημένη συσσώρευση ινοβλαστών και έκκριση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, που υπονοεί την ύπαρξη μηχανισμού αρνητικού παλίνδρομου ελέγχου από τα επιθηλιακά σε αριθμούς και δραστηριότητα των ινοβλαστών του ίδιου χιτώνα (lamina propria) (Machesney et al., 1998). Κυτταροκίνη σημαντική για την αποκατάσταση δερματικού τραυματισμού με την αλληλεπίδραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων του χόριου είναι η IL-1 που στα πρώτα επάγει KGF, ενώ στα δεύτερα GM-CSF (Angel and Szabowski, 2002).

Καθώς οι **μυοϊνοβλάστες** είναι σημαντικός φορέας επούλωσης εντερικών ελκών (Leeb et al., 2002), φυσιολογικά ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται στα πρώιμα στάδια της επούλωσης. Απαντούν στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και με την ενορχήστρωση

προφλεγμονωδών και άλλων τροφικών παραγόντων που εκκρίνουν φλεγμονώδη και άλλα κύτταρα, παράγουν συστατικά εξωκυττάρια ουσίας κατά τρόπο ποσοτικά και ποιοτικά οργανωμένο (Leeb et al., 2002; Pender and MacDonald, 2004; Powell et al., 1999b). Όπως η υπερβολική έκκριση και μειωμένη αποδόμηση εξωκυττάρια ουσίας οδηγεί σε ίνωση, η ισορροπία μπορεί κάλλιστα να οδηγηθεί προς τις αντίθετες συνθήκες και μειωμένος πολλαπλασιασμός, κινητικότητα και έκκριση δομικών συστατικών της εξωκυττάρια ουσίας να προκαλέσει ανεπαρκή επούλωση και παράταση της εξέλκωσης (Leeb et al., 2003).

Στο λεπτό και το παχύ έντερο, οι διαδικασίες αυτές μπορεί να είναι σημαντικές στην παθοφυσιολογία της χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας σε φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Σε αυτές τις συνθήκες, εξελκώσεις του βλεννογόνου και υποεπιθηλιακός πολλαπλασιασμός κυττάρων απαιτούνται για την ιστική επιδιόρθωση. Σε μακροχρόνια φλεγμονή, όμως, σημειώνονται αλλαγές στην αρχιτεκτονική του ίδιου χιτώνα που παρατηρούνται ταυτόχρονα με την καταστροφή των κρυπτών του επιθηλίου και την πλεονασματική παραγωγή εξωκυττάρια ουσίας (Jobson et al., 1998). Η αιτία της στροφής της επούλωσης προς παθολογικό χαρακτήρα είναι άγνωστη, αλλά ο πλεονάζων αριθμός μυοϊνοβλαστών και, κατά συνέπεια, η πλεονάζουσα παραγωγή κολλαγόνου είναι είτε ένας πιθανός αιτιολογικός παράγοντας είτε ο μηχανισμός της παθολογικής διεργασίας. Κατά συνέπεια αποτελεί δυνητικό θεραπευτικό στόχο.

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τον κομβικό ρόλο των μυοϊνοβλαστών στην ινωτική **CD**. Ιστολογικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει συσσώρευση ινοβλαστών στα σημεία της στένωσης. Επιπλέον, οι ινοβλάστες στα σημεία αυτά συσχετίζονται με την έκφραση προϊνωτικών παραγόντων και συστατικών της εξωκυττάρια ουσίας (Dammeier et al., 1998; Pucilowska et al., 2000a; Pucilowska et al., 2000b). Τοπογραφικά, οι SEMFs από



μονοστιβάδα που περιβάλλει την- κρυπτική ιδίως- περιοχή των αδενίων εξελίσσονται σε μία παχύτερη πολυστρωματική στιβάδα στις ινωτικές περιοχές CD και αναγνωρίζονται πολυάριθμες προσεκβολές τους προς τον ίδιο χιτώνα (lamina propria) (Di Sabatino et al., 2009).

Ένας αριθμός πεπτιδίων σημαντικών στην παθογένεση της IBD δυνητικά ρυθμίζουν τον αριθμό των μυοϊνοβλαστών. Πρόκειται για **αυξητικούς παράγοντες**, όπως ο PDGF-BB, ο bFGF (Desmouliere et al., 1995) και ο EGF που μετρούνται στον εντερικό βλεννογόνο (Chowdhury et al., 1996; Cordon-Cardo et al., 1990). Επίσης οι IGF-I και IGF-II έχουν αποδειχθεί ότι είναι αυξημένοι σε ζωικά μοντέλα χρόνιας ίνωσης, όπως η πνευμονική ίνωση από μπλεομυκίνη (Li et al., 1996), αλλά και σε ανθρώπινες ινωτικές νόσους/ επιπλοκές, όπως η νεφροσκλήρυνση (Johnson et al., 1999) και η υπερτροφική δερματική ουλοποίηση (Ghahary et al., 1998), και έχουν δειχθεί ότι παρατείνουν το χρόνο ζωής μεσεγχυματικών κυττάρων (Stewart and Rotwein, 1996a; Stewart and Rotwein, 1996b). Η έκφραση IGF-I είναι αυξημένη σε ζωικά μοντέλα κολίτιδας με SDS (Savendahl et al., 1997), TNBS (Zeeh et al., 1998) ή πεπτιδογλυκάνες-πολυσακχαρίτες (Zimmermann et al., 1993) και τουλάχιστον στα δύο τελευταία μοντέλα εντοπίζεται στις περιοχές ίνωσης (Zeeh et al., 1998; Zimmermann et al., 1993). Σε CD έχει βρεθεί αυξημένος σε εντερικό έκπλυμα (Ghosh et al., 1997) και σε ιστό από ενεργό CD αλλά όχι UC (Pucilowska et al., 2000a). Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης του IGF-I είναι η αύξηση του πολλαπλασιασμού ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών και η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από αυτούς (Lund and Zimmermann, 1996; Simmons et al., 1999).

Οι **προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες** IL-1β (Mahida et al., 1989) και TNF-α (Reinecker et al., 1993) αυξάνονται στη φλεγμονή του παχέος εντέρου και θεωρείται ότι παίζουν

σημαντικό ρόλο στην έναρξη της φλεγμονής (Wardle and Turnberg, 1994). Η προφλεγμονώδης IL-6 (Reinecker et al., 1993) και η αντιφλεγμονώδης IL-10 (Niessner and Volk, 1995) αυξάνονται στην ελκώδη κολίτιδα και αυτές έχουν βασικό ρόλο στην IBD (Schreiber et al., 1995). Αυτές οι κυτταροκίνες μπορούν να παραχθούν σε τοπικό επίπεδο στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου από μακροφάγα ή άλλα λευκοκύτταρα σε μικρή απόσταση από τους μυοϊνοβλάστες και τα επίπεδά τους στους ιστούς μπορούν να μεταβάλλονται σημαντικά στη φλεγμονή.

Στην **IBD ο αριθμός των α-SMA-θετικών κυττάρων είναι αυξημένος** σε σύγκριση με τον φυσιολογικό βλεννογόνο (Andoh et al., 2002; Pucilowska et al., 2000a). Η φυσιολογική επούλωση συνδέεται με την σημαντική μείωση των α-SMA θετικών κυττάρων με το πέρας της αποτελεσματικής επιδιόρθωσης (Desmouliere et al., 1995). Ινοβλάστες απομονωθέντες από τοποθεσίες στένωσης σε ασθενείς με CD παρουσιάζουν και διατηρούν *ex vivo* ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τους διακρίνουν από αυτούς που προέρχονται από γειτονικές μακροσκοπικά κανονικές περιοχές του εντέρου, από φλεγμαίνον έντερο σε ασθενείς με CD ή UC ή από έντερο ομάδας ελέγχου. Επίσης οι SEMFs από CD έχουν ταχύτερο πολλαπλασιασμό σε σχέση με αυτούς από ομάδα ελέγχου (McKaig et al., 2002). Ακόμη, ινοβλάστες απομονωμένοι από εντερικές στενώσεις της CD εκφράζουν αυξημένο IGF-I, που με τη σειρά του διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κολλαγόνου από αυτούς (Pucilowska et al., 2000a; Simmons et al., 2002; Theiss et al., 2005). Άλλοι παράγοντες με παρόμοιες δράσεις είναι οι TGF-β, EGF, PDGF και bFGF (Jobson et al., 1998; Vallance et al., 2005). Επιπλέον, ο vascular endothelial growth factor (VEGF) διαμεσολαβεί αγγειογένεση και επούλωση πληγής, υπερεκφράζεται σε ινοβλάστες στενώσεων και ο TGF-

$\beta$ 1 ρυθμίζει τη δράση του, με τα δύο τελευταία να ισχύουν και για τον CTGF (Beddy et al., 2006; Blalock et al., 2003; Hayashi et al., 2002).

Οι διαφοροποιήσεις περιλαμβάνουν και **μόρια προσκόλλησης, μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας** που επίσης διατηρούνται επί μακρόν σε κυτταρική καλλιέργεια, παρά την απώλεια των *in vivo* ερεθισμάτων. Η έκφραση μορίων προσκόλλησης είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση κυττάρων και διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων (Hynes, 1992). Ακόμη, ινοβλάστες στενώσεων εκφράζουν αυξημένο NF- $\kappa$ B και επιδεικνύουν απαντητικότητα σε IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$  ως προς την έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 (Beddy et al., 2004; Brannigan et al., 2002), το οποίο ευοδώνει τη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων. Επίσης, μυοϊνοβλάστες απομονωμένοι από φλεγμαίνουσες περιοχές εντέρου φέρουν προσκολλημένο στη μεμβράνη τους αυξημένο TNF- $\alpha$  (Di Sabatino et al., 2007).

Τα προφλεγμονώδη μόρια με τη σειρά τους τροφοδοτούν θετικά το **κύκλωμα της ίνωσης** με την έκκριση προϊνωτικών παραγόντων. Η συνέργεια προφλεγμονωδών με τροφικούς παράγοντες προς την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έχουν δειχθεί σε εντερικούς ινοβλάστες και άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα, με παραδείγματα την IL-1 ή τον TNF- $\alpha$  και των αυξητικών παραγόντων bFGF, EGF και του PDGF (Jobson et al., 1998; Tsukamoto et al., 1991). Πάντως αυτό δεν έχει γενική ισχύ για όλες τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Jobson et al., 1998).

Ο φαινότυπος του αυξημένου αριθμού μυοϊνοβλαστών δεν συναντάται μόνο στην εντερική ίνωση αλλά και στην **ίνωση άλλων οργάνων** με πιο καλά μελετημένο το φαινόμενο στο σκληρόδερμα, όπου ινοβλάστες του χόριου ενεργοποιούνται αλλάζοντας

φαινότυπο προς μυοϊνοβλάστες (Krieg et al., 2007). Εικάζεται ότι η επικοινωνία μεταξύ επιθηλιακών και ινοβλαστών μπορεί να έχει ρόλο στη φαινοτυπική αλλαγή των δευτέρων (Shephard et al., 2004b), με τις MMP-2 και MMP-9 να έχουν σημαντικό ρόλο στην αρχική αλλοίωση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας (Sawicki et al., 2005). Στην αναπνευστική οδό ίνωση συναντούμε ως χρόνια επιπλοκή του άσθματος, με παθολογοανατομικά ευρήματα την υποεπιθηλιακή και διατοιχωματική ίνωση, υπερτροφία και υπερπλασία του μυϊκού χιτώνα, αυξημένη αγγειοβρίθεια και υπερπλασία/ μεταπλασία επιθηλιακών καλυκοειδών κυττάρων (Kumar, 2001). Η υποεπιθηλιακή ίνωση είναι μια διακριτή παθολογοανατομική βλάβη του άσθματος που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως κολλαγόνο τύπου III και V, φιμπρονεκτίνη, τενασκίνη και λαμινίνη β2, καθώς και πρωτεογλυκάνες ακριβώς υπό τη βασική μεμβράνη (Kumar, 2001). Η ίνωση συνδέεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού μυοϊνοβλαστών (Brewster et al., 1990), η οποία μπορεί να είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τη σύνθεση και τη συσσώρευση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών εκφράζουν μια ποικιλία των αυξητικών παραγόντων που έχουν τη δυνατότητα να ανατροφοδοτήσουν την παραγωγή τους και τη σύνθεση κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες (Zhang et al., 1999). Αυτοί οι τροφικοί παράγοντες θα μπορούσαν να είναι σημαντικοί στην παθογένεση της υποεπιθηλιακής ίνωσης και των λοιπών μορφολογικών αλλαγών που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών στο χρόνια άσθμα.

Άλλο πιθανό αίτιο πυροδότησης παραγωγής προϊνωτικών παραγόντων ή τελικών προϊόντων ίνωσης είναι η άμεση έκθεση των μυοϊνοβλαστών στη **χλωρίδα** του εντέρου ή στα προϊόντα της, λόγω της απογύμνωσης της επιθηλιακής στιβάδας του φλεγμαίνοντος εντέρου (Beddy et al., 2006). Παραταύτα, λείπουν τα εντυπωσιακά ποσοτικά ευρήματα και

η παθοφυσιολογία της ίνωσης φαίνεται να είναι πιο περίπλοκη από τα διεγχειρόμενα από αντιγόνα του αυλού μεσεγχυματικά κύτταρα που υπερπαράγουν κολλαγόνο.

Η **ρίκνωση** του τραυματισμένου εντερικού βλεννογόνου χάρη στη δράση των SEMFs επιφέρει τη άμεση μείωση της απογυμνωμένης από επιθήλιο επιφάνειας που έρχεται σε άμεση επαφή με το μη στείρο και ερεθιστικό περιεχόμενο του αυλού (Moore et al., 1989). Η υπερβολική συστολή των μυοϊνοβλαστών είναι μία επιπλέον σημαντική παράμετρος στη δημιουργία συμπτωματικών στενώσεων και οδηγεί σε ρίκνωση πλέον της ουλοποίησης. Ο TGF-β1 επάγει την έκφραση α-SMA και τη συστολή μυοϊνοβλαστών δέρματος (Denys et al., 2008). Ινοβλάστες απομονωθέντες από στενώσεις CD έχουν ενισχυμένη συστατική ικανότητα (Regan et al., 2000) και ο TGF-β1 την επάγει περαιτέρω (Mulsow et al., 2005).

Η **κινητικότητα** των μυοϊνοβλαστών και επιθηλιακών είναι άλλος μηχανισμός φυσιολογίας σημαντικός στην επούλωση και στην ίνωση. Ο TGF-β1 επάγει την έκφραση α-SMA, τη συστολή, αλλά μόνος του μειώνει τη μετανάστευση μυοϊνοβλαστών δέρματος (Denys et al., 2008). Σε συνδυασμό όμως με EGF ή bFGF αυξάνει την τελευταία, καθώς πυροδοτούνται ξεχωριστές ενδοκυττάρειες διεργασίες, συνδυασμός των οποίων είναι απαραίτητος για την κυτταρική κίνηση (Denys et al., 2008). Αντίθετα σε κυτταροσειρά επιθηλιακών ο TGF-β1 μόνος ή σε συνδυασμό με άλλους τροφικούς παράγοντες μειώνει την κυτταρική κίνηση (Denys et al., 2008). Η μετανάστευση ινοβλαστών παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των ιστών και την επούλωση τραυμάτων. Ειδικά κατά την αρχική φάση της επούλωσης του τραύματος η μετανάστευση ινοβλαστών εντός και διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας φαίνεται να είναι θεμελιώδες συστατικό και της συστολής του τραύματος.

## 3.3 Επιθηλιακά κύτταρα

Τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα δεν ενεργούν απλώς ως **μηχανικά εμπόδια** στα αντιγόνα του εντερικού αυλού συνδεδεμένα μεταξύ τους με στενούς συνδέσμους (tight junctions), αλλά και ως **λειτουργικοί φραγμοί** με την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων εναντίον των βακτηρίων. Επιπλέον εκκρίνουν χημειοκίνες για την χημειοταξία ουδετερόφιλων προς σημεία επιμόλυνσης με βακτήρια. Διαθέτουν Toll-like receptors (TLRs), των οποίων η σύνδεση με συστατικά του τοιχώματος των βακτηρίων πυροδοτεί την έκφραση από τα επιθηλιακά προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών και επηρεάζει την ακεραιότητα του βλεννογονικού φραγμού. Οι οδοί των TLRs μέσω ρύθμισης των claudins, όπως και άλλες οδοί ρυθμίζουν τη διαπερατότητα του επιθηλίου με παράδειγμα την επαγωγή του TLR2 που αυξάνει την έκφραση της claudin 2 (Cario et al., 2007; Zeissig et al., 2007). Η απαντητικότητα των επιθηλιακών κυττάρων σε φλεγμονώδη ερεθίσματα δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό της γαστρεντερικής οδού: και τα επιθηλιακά της αναπνευστικής οδού δείχνουν απαντητικότητα σε μηχανικό ερεθισμό, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες και πιθανώς οδηγούν την υποεπιθηλιακή φλεγμονή και ίνωση (Olman, 2003).

### 3.3.1 Επιθηλιακός φραγμός

Η ταχύτητα και η ακρίβεια επισκευής του βλεννογονικού επιθηλιακού φραγμού καθορίζει το αν και πότε θα πάψει η διείσδυση μικροοργανισμών της εντερικής χλωρίδας ή των αντιγόνων τους στον ίδιο χιτώνα (lamina propria) του εντέρου και επομένως το χρόνο στον οποίο θα πάψει ο αντιγονικός ερεθισμός των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που εδράζονται ή έλκονται χημειοτακτικά εκεί (Zeissig et al., 2007). Στην IBD ο

επιθηλιακός φραγμός σαφώς δεν λειτουργεί επαρκώς όπως δείχνουν *in vivo* πειράματα με δείκτες διαπερατότητας (Hollander, 1988; Hollander et al., 1986; Katz et al., 1989; Ma, 1997; May et al., 1993). **Μηχανισμοί δυσλειτουργίας των στενών συνδέσεων** (tight junctions) μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων από κυτταροκίνες, με κυριότερες τον TNF- $\alpha$  και την IFN- $\gamma$ , και οι αντίστοιχες ενδοκυττάρειες οδοί της βλάβης έχουν αρχίσει να ταυτοποιούνται σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Ferrier et al., 2003; Hecht et al., 1992; Ma et al., 2005; Ma et al., 1999b; Ma et al., 2000). Ως ένα από τα σημαντικά τελικά βήματα διαφαίνεται η ενεργοποίηση της κινάσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (myosin light-chain kinase- MCLK) (Ma et al., 2005; Ma et al., 2004).

Στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του βλεννογόνου συμμετέχουν αντιφλεγμονώδεις **κυτταροκίνες**, με μελετημένη καλύτερα την IL-22 (Sugimoto et al., 2008). Αντίθετα, ο **TGF- $\beta$**  μειώνει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων (Kurokawa et al., 1987; Podolsky, 1993; Suemori et al., 1991). **Τροφικοί παράγοντες**, όπως οι glucagon-like peptide 2 (GLP-2), IGF-I, HGF, KGF και EGF, έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα (Dignass et al., 1994b; Drucker et al., 1996; Fukamachi et al., 1994; Jones et al., 1999; Nishimura et al., 1998; Ohneda et al., 1997; Playford et al., 1996; Rokutan et al., 1994). Η παρουσία **μακροφάγων** διαταράσσει τον βλεννογονικό φραγμό, ενώ η προσθήκη **SEMFs** μειώνει αυτή την επίδραση των μακροφάγων (Willemsen et al., 2002).

Αναλυτικότερα, η διαπερατότητα του βλεννογονικού φραγμού είναι δυναμικό φαινόμενο και κυτταροκίνες και άλλα σηματοδοτικά ή ομοιοστατικά πεπτίδια τη διαταράσσουν ή τη ρυθμίζουν. Σύμφωνα με αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης ηλεκτρικής αντίστασης μονοστιβάδας κολονικής επιθηλιακής κυτταροσειράς και διαπερατότητας αυτής σε πρωτεΐνες, η IFN- $\gamma$  διαταράσσει την ακεραιότητα του

βλεννογόνου, ενώ ο TGF-β1 δοσοεξαρτώμενα και επί μακρόν προστατεύει από τη βλάβη που αυτή προκαλεί (Fish et al., 1999; Madara and Stafford, 1989; Planchon et al., 1994; Youakim and Ahdieh, 1999). Ο TGF-β1 επίσης προστατεύει από βλάβη του επιθηλιακού φραγμού που προκαλούν οι IL-4, IL-6 και IL-10 (Planchon et al., 1999; Walia et al., 2003). Παρόμοια δράση έχει και ο TNF-α σε κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές (Adams et al., 1993; Ma, 1997; Ma et al., 2005; Ma et al., 2004; Marano et al., 1998; McKay et al., 1996; McKay and Singh, 1997; Rodriguez et al., 1995; Schmitz et al., 2000; Zareie et al., 1998).

Αποκατάσταση του βλεννογόνου οξέως πραγματοποιείται χωρίς κυτταρικό πολλαπλασιασμό με την ταχεία μετάβαση των βιώσιμων επιθηλιακών κυττάρων από γειτονικές περιοχές στην περιοχή της βλάβης, ώστε να καλυφθεί το απογυμνωμένο από επιθηλιακά επιθήλιο (Beck and Podolsky, 1999; Ciacci et al., 1993a; Goke et al., 1996; Lacy, 1988; Nusrat et al., 1992; Waller et al., 1988; Wilson and Gibson, 1997). Αυτή η αρχική αποκατάσταση πιστεύεται ότι διαρκεί λεπτά ως ώρες και εντός 24-48h. Η αποκατάσταση της αρχιτεκτονικής του επιθηλίου στη συνέχεια διαμεσολαβείται από πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων, που σχηματίζουν αναγεννητικές κρύπτες και ακολούθως με τη μετανάστευση αυτών προς τον αυλό και τη διαφοροποίησή τους (Beck and Podolsky, 1999; Ciacci et al., 1993a; Wilson and Gibson, 1997). Πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των TGF-α, TGF-β, FGF, HGF και των πεπτιδίων δίκην τριφυλλίου (intestinal trefoil peptides), προάγουν την επιθηλιακή αποκατάσταση (Dignass et al., 1994c), με τον TGF-β να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις δράσεις όλων προς την αποκατάσταση του επιθηλίου, πλην των intestinal trefoil peptides, που έχουν απευθείας δράση (Beck and Podolsky, 1999). Οι δύο τελευταίοι παράγοντες μάλιστα εκκρίνονται από τα ίδια τα επιθηλιακά. Και τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού στην πνευμονική ίνωση εκφράζουν έντονη



ανοσοθετικότητα για TGF-β1 (Khalil et al., 1996b) και ο TGF-β1 αυξάνει και τον ρυθμό επούλωσης πληγών από αυτά (Han et al., 2000).

### 3.3.2 Πηγή αντιμικροβιακών, προ- και αντι- φλεγμονωδών παραγόντων

Διαταραχές στην έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων που παράγουν τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως οι defensins (Shi et al., 2007; Tanabe et al., 2007), έχουν θέση στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της CD.

Επίσης, το εντερικό επιθήλιο εκφράζει **χημειοκίνες** η παραγωγή πολλών από τις οποίες αυξάνεται στο φλεγμαίνον εντερικό τοίχωμα της IBD (Banks et al., 2003; Dwinell et al., 2003). Παραδείγματα αποτελούν οι CXCL7, CXCL9, CXCL10, CXCL11 (Kruidenier et al., 2006; Manousou et al., 2008). Έχει δειχθεί ότι η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 απαντά στον TNF-α αυξάνοντας την μεταγραφή των γονιδίων των χημειοκινών CXCL1, CXCL8, CXCL10, CXCL11, CCL5, CCL20 (Lee et al., 2008; Manousou et al., 2008). Στα επιθηλιακά κύτταρα και αντίστοιχες κυτταροσειρές, όπως η IEC-6, και η IL-1 επάγει άλλες κυτταροκίνες και χημειοκίνες, όπως οι IL-6, IL-8 και η MCP-1 (Eckmann et al., 1993; Jung et al., 1995; McGee et al., 1993; Reinecker et al., 1995). Πάντως οι αντιφλεγμονώδεις (όπως η IL-10) ή Th2 (IL-4, IL-13) χημειοκίνες φαίνονται να μειώνουν τις απαντήσεις των επιθηλιακών στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, TNF-α, IFN-γ (Manousou et al., 2008) ως προς τις CXCL9, CXCL10, CXCL11, που δρουν και χημειοστακτικά για τα λεμφοκύτταρα (Cole et al., 1998; Farber, 1997). Κομβικό σημείο στις επαγωγές αυτές παίζει ο ενδοκυττάριος μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, χωρίς όμως να μπορεί να αποκλεισθεί και η συμμετοχή άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Baggiolini et al., 1994; Kishimoto et al.,

1995; Martin et al., 1997; Rogler et al., 1998). Ο μηχανισμός του NF-κB ενεργοποιείται σε εντερικές επιθηλιακές σειρές και από την IL-1β (DiDonato et al., 1997; Li et al., 2004) και οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων των κυτταροκινών που προαναφέρθηκαν (Jobin et al., 1997; O'Neill and Greene, 1998).

### 3.3.3 Αμφίδρομη Επικοινωνία με τους Υποεπιθηλιακούς Μυοϊνοβλάστες

Ο **TGF-β** είναι γνωστός παράγοντας που προέρχεται από τους ινοβλάστες και επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την κινητικότητα των επιθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα εμποδίζει την κυτταρική κινητικότητα, μειώνει τη κινητικότητα και προάγει την τελική διαφοροποίηση αυτών, δρώντας αντισταθμιστικά προς πλήθος άλλων παραγόντων που ενεργοποιούνται σε φλεγμονή, ιστική καταστροφή και νεοπλασία (Barnard et al., 1989; Kurokawa et al., 1987). Πλην των διαλυτών παραγόντων (Dignass et al., 1994c), πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι **συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας** (Hay, 1993; Juliano and Haskill, 1993) και οι **διακυτταρικές συνδέσεις** (Kedinger et al., 1987) συνεισφέρουν στην κυτταρική διαφοροποίηση και την επισκευή του επιθηλίου.

Σήματα που μεταδίδονται από τα μεσεγχυματικά στα επιθηλιακά κύτταρα ή το αντίστροφο, με τη μορφή των αυξητικών παραγόντων αποτελούν τη βάση της αμφίδρομης επιθηλιο-μεσεγχυματικής αλληλεπίδρασης, που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των επιθηλιακών (Li and Tseng, 1995; Louvard et al., 1992; Stallmach et al., 1989). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι **επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις**, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με τη θεμέλια ουσία είναι απαραίτητες για την κίνηση και διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (Carroll et al., 1988;

Kedinger et al., 1987). Οι SEMFs ακριβώς υπό τη βασική μεμβράνη του εντέρου ειδικά διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες των επιθηλιακών μέσω τροφικών παραγόντων και κυτταροκινών που παράγουν (Berschneider and Powell, 1992; Dignass et al., 1994c; Nusrat et al., 1994). Οι *Halttunen και συν.*, χρησιμοποιώντας ένα τρισδιάστατο σύστημα συγκαλλιέργειας, διαπίστωσαν ότι επιθηλιακές κυτταροσειρές εντέρου οργάνωνονται και διαφοροποιούνται *in vitro* όταν συγκαλλιεργούνται με ινοβλάστες με το φαινόμενο να είναι εξαρτώμενο από τον TGF-β1 (Halttunen et al., 1996). Ενδιαφέρον είναι ότι αρκούν διαλυτοί μεσολαβητές και δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση η άμεση επαφή ινοβλαστών- επιθηλιακών για το σχηματισμό δομών που ομοιάζουν με τη βασική μεμβράνη υπό τα επιθηλιακά και την οργάνωση των τελευταίων σε αδενικούς σχηματισμούς (Halttunen et al., 1996). Αλλά και η ίδια η βασική μεμβράνη σαφώς έχει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση και διαφοροποίηση των επιθηλιακών, ειδικά κατά την επισκευή του επιθηλίου σε βλάβες CD (Basson et al., 1992a; Basson et al., 1992b; Goke et al., 1996; Louvard et al., 1992). Επιπλέον, οι μυοϊνοβλάστες μέσω του TGF-β- και κυρίως της ισομορφής β3- αυξάνουν την μετανάστευση κυτταροσειρών εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (McKaig et al., 1999). Πολλοί άλλοι προφλεγμονώδεις και τροφικοί παράγοντες, όπως οι IL-1β, IFN-γ, EGF, HGF, bFGF, TGF-α, intestinal trefoil factor, προερχόμενοι από τον υποβλεννογόνο ρυθμίζουν την κινητικότητα των επιθηλιακών (Dignass et al., 1994a; Dignass et al., 1994b; Dignass and Podolsky, 1993; Dignass et al., 1994c; Nusrat et al., 1994). Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι στο δέρμα η επιβράδυνση αποκατάστασης του επιθηλίου αυξάνει την πιθανότητα ουλοποίησης (Machesney et al., 1998).

Βασική οδός που οδηγεί τον πολλαπλασιασμό του εντερικού επιθηλίου είναι η **σηματοδότηση μέσω Wnts**, που αυξάνει την β-κατενίνη στον πυρήνα όπου αυτή συνδέεται

με τον μεταγραφικό παράγοντα T cell factor 4 (TCF4) αυξάνοντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (Nusse, 2003). Μεταξύ αυτών ειδικά τα γονίδια leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (Lgr5) και olfactomedin 4 (Olfm4) εκφράζονται στα επιθηλιακά προγονικά κύτταρα (stem cells) (Barker et al., 2007; van der Flier and Clevers, 2009; Van der Flier et al., 2007). Πλην των Wnt που εκφράζονται αποκλειστικά στο επιθήλιο (3, 6, 9b) και ιδιαίτερα στα κύτταρα του Paneth, υπάρχουν Wnt (2b, 4, 5a, 5b) και ανταγωνιστές τους Dickkopf-related protein (Dkk) -2 και -3, secreted frizzled-related protein (SFRP) -1 και -2 που εκκρίνονται από το εντερικό μεσέγχυμα, καθιστώντας μεσεγχυματικά κύτταρα όπως οι SEMFs υποψήφια να έχουν ελεγκτικό ρόλο στην διαδικασία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης προγονικών επιθηλιακών κυττάρων δρώντας είτε ευοδωτικά προς προγονικά είτε ανασταλτικά προς ώριμα επιθηλιακά (Garcia et al., 2009; Gregorieff et al., 2005; Li et al., 2007; van Es et al., 2005).

**Ανταγωνιστική της οδού του Wnt στο εντερικό επιθήλιο είναι η οδός των BMPs** με τα ενδοκυττάρια SMADs 1, 5, 8 που συνδεόμενα στο SMAD 4 μεταναστεύουν στον πυρήνα οδηγώντας τελικά σε τοπική μείωση της β-κατενίνης μέσω της PTEN η οποία μειώνει τη δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα Akt (Waite and Eng, 2003). Οι BMPs εκφράζονται σε τελικά διαφοροποιημένα επιθηλιακά και καταστέλλουν την οδό του Wnt, που επικρατεί στα προγονικά επιθηλιακά. Αλλά και στην οδό αυτή τα κύτταρα του στρώματος έχουν ρόλο εκκρίνοντας BMP4, διεγερόμενα από Hedgehog πρωτεΐνες που εκκρίνουν τα επιθηλιακά, η οποία προσδέεται εκ νέου στον τύπου 1 υποδοχέα BMPs των επιθηλιακών και σηματοδοτεί σε αυτά (He et al., 2004; Sukegawa et al., 2000). Παράγοντας που επιτείνει την έκφραση BMP4 στους ινοβλάστες είναι η επιμορφίνη, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την κυτταρική μεμβράνη που ανήκει στην οικογένεια της συνταξίνης, η

οποία με τη σειρά της σχετίζεται με την πρόσδεση κυστιδίων στην κυτταρική μεμβράνη (He et al., 2007b). Στις κρύπτες στο περιβάλλον των προγονικών επιθηλιακών κυττάρων δεν υπάρχει σηματοδότηση BMPs λόγω έκφρασης από τα τοπικά μεσεγχυματικά κύτταρα αναστολέων των BMPs και συγκεκριμένα gremlin-1, -3 και chordin-like 1, με το φαινόμενο να ατονεί προς τον αυλό (Kosinski et al., 2007).

Μεταξύ άλλων οι SEMFs επικοινωνούν με τα επιθηλιακά μέσω του άξονα της **IL-11**: εκκρίνουν IL-11 (Bamba et al., 2003b) που προσδέεται στον υποδοχέα IL-11Ra των επιθηλιακών (Deutscher et al., 2006; Kiessling et al., 2004), αλλά και σε μακροφάγα (Leng and Elias, 1997) και T λεμφοκύτταρα (Bozza et al., 2001) του ιδίου χιτώνα (lamina propria), στα οποία μειώνουν την παραγωγή Th1 κυτταροκινών (IL-12, IFN- $\gamma$ ). Επαγωγείς της IL-11 στους SEMFs είναι η IL-1 $\beta$ , ο TGF- $\beta$ 1 μέσω ERK και MAPK και η PGE<sub>2</sub> μέσω των υποδοχέων EP-2 και EP-4 (Hoang et al., 2007). Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν έναυσμα κλινικών μελετών θεραπευτικής χρήσης της IL-11 στη CD (Herrlinger et al., 2006; Sands et al., 2002).

Και σε άλλα συστήματα διαφαίνεται η σημασία τόσο μεσεγχυματικών κυττάρων όσο και διάμεσης ουσίας για την οργάνωση των επιθηλιακών σε δομές που προσεγγίζουν συνθήκες φυσιολογίας, όπως στην περίπτωση της οργάνωσης επιθηλιακών νεφρού σε δομές που ομοιάζουν με **νεφρικά σωληνάρια** όταν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα κολλαγόνο, με τους τροφικούς παράγοντες όμως να μη έχουν σε κάθε σύστημα όμοιους ρόλους (Montesano et al., 1991). Η επικοινωνία μεταξύ εντερικών SEMFs και επιθηλιακών έχει επίσης ανατομική και λειτουργική αναλογία με την **επικοινωνία μεταξύ περικυττάρων και ενδοθηλιακών** στα τριχοειδή αγγεία και **αστεροειδών κυττάρων και ηπατοκυττάρων** στο ήπαρ και τα μυοϊνοβλαστικά κύτταρα σε όλες αυτές τις περιπτώσεις πιθανώς έχουν κοινή εμβρυολογική καταγωγή και συνεισφορά προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών

στην ανανέωσή τους (Powell et al., 2011). Τα επιθηλιακά δεν επικοινωνούν μόνο με τους SEMFs. Έχει δειχθεί επικοινωνία των επιθηλιακών και με άλλα κύτταρα του ίδιου χιτώνα (lamina propria), όπως με τα δενδριτικά μέσω λεμφοποιητίνης (Zaph et al., 2007).

### 3.4 Transforming Growth Factor- β

Οι τρεις ισομορφές Transforming Growth Factor-β (TGF-β) είναι μέλη μιας μεγάλης **οικογένειας πλειοτροπικών κυτταροκινών** που περιλαμβάνει BMP, τις ακτιβίνες και άλλους σχετιζόμενους παράγοντες. Αναγνωρίζεται ως πλειοτροπικός παράγοντας που ενέχεται σε πολλαπλές ουσιώδους σημασίας βιολογικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός (Kay et al., 1998; Strutz et al., 2001; Thannickal et al., 1998), η μετανάστευση (Adelmann-Grill et al., 1990; Andresen and Ehlers, 1998; Ellis et al., 1992; Ellis and Schor, 1998; Postlethwaite et al., 1987), η διαφοροποίηση (Simmons et al., 2002), η σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας (Eickelberg et al., 1999; Ellis et al., 1992; Ellis and Schor, 1998; Shimaio et al., 1999), η συστολή (Thannickal et al., 1998) και η τροποποίηση των ανοσολογικών απαντήσεων (Wells, 2000). Παράγεται από ποικιλία κυττάρων, όπως αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και μακροφάγα (Postlethwaite et al., 1987). Στο έντερο ο ρόλος του είναι καθοριστικός σε συνθήκες φλεγμονής, όπως έχει δειχτεί με την καθυστερημένη ανάρρωση και τα αντίστοιχα παθολογοανατομικά ευρήματα σε μοντέλο πειραματικής κολίτιδας με DSS σε ποντίκια στα οποία ο υποδοχέας TβRII είναι επαγωγίσιμος (Beck et al., 2003; Hahm et al., 2001). Ακόμη ο TGF-β1 έχει σημαντικό ρόλο στην πόλωση της ανοσολογικής απάντησης στο έντερο και στην ανοσολογική ανοχή σε *per os* αντιγόνα (Strober et al., 1997).

### 3.4.1 Δομή

Ο TGF-β, μια ομοδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από 112 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 25 kD, ανήκει σε μια ευρύτερη ομάδα σηματοδοτικών-ομοιοστατικών μορίων που καλούνται συλλογικά **υπεροικογένεια TGF-β**, η οποία διακρίνεται σε δύο μεγάλες ομάδες: α) TGF-β, ακτιβίνη, nodal και β) BMP, growth and differentiation factor (GDF), Mullerian inhibiting substance (MIS). Πλέον η υπερικογένεια TGF-β περιλαμβάνει τουλάχιστον 100 ευδιάκριτες πρωτεΐνες, όλες με τουλάχιστον μια περιοχή παρόμοιας ακολουθίας αμινοξέων (ομολογία), κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο (Chin et al., 2004). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες δρουν νωρίς στην εμβρυογένεση (Akhurst et al., 1990), άλλες ελέγχουν το σχηματισμό του χόνδρου (Frenkel et al., 2000), του οστού (Reddi and Cunningham, 1990) και των γενετικών οργάνων, άλλες καταστέλλουν την αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων (Glick et al., 1996), επιταχύνουν την επούλωση (Massague, 1999) ή ρυθμίζουν σημαντικές ανοσολογικές (Moustakas et al., 2002) και ενδοκρινικές λειτουργίες (Roberts, 1998).

Στα θηλαστικά **τρεις ισομορφές** του TGF-β έχουν προς το παρόν ταυτοποιηθεί: οι TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3. Έχουν μεγάλο βαθμού ομολογία στις αμινοξικές ακολουθίες τους, αλλά κάθε ισομορφή προκύπτει από διαφορετικό γονίδιο που εδράζεται σε άλλο χρωμόσωμα (Roberts, 1998). Για παράδειγμα η ισομορφή TGF-β1 προκύπτει από μετάφραση γονιδίου στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 19 (19q) (Moses et al., 1987). Ο TGF-β εκκρίνεται σαν πρωτεϊνικό σύμπλεγμα υψηλού μοριακού βάρους που αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες συνδεδεμένες μη ομοιοπολικά: το ώριμο TGF-β διμερές, το διμερές TGF-β προπεπτίδιο ή λανθάνουσα πρωτεΐνη (Latency Associated Protein- LAP) και την πρωτεΐνη που προσδένεται στη LAP (Latent TGF-β Binding Protein- LTBP) (Shi and

Massague, 2003; Taipale et al., 1998). Ακόμη εξωκυττάρια στο σύμπλοκο μπορούν να συνδεθούν η  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνη και η πρωτεογλυκάνη ντεκορίνη (Taipale et al., 1998).

**Αναλυτικότερα, η μετατροπή του προπεπτιδίου σε ώριμο TGF- $\beta$  γίνεται σε διαδοχικά στάδια με κυριότερο αυτό της επίδρασης της ενδοπεπτιδάσης φουρίνης που διασπά το δεσμό ανάμεσα στα αμινοξέα 278 και 279 (Khalil, 1999). Τα προϊόντα από το αμινοτελικό άκρο διμερίζονται και σχηματίζουν την LAP (μοριακού βάρους 70 kD), ενώ τα προϊόντα από το καρβοξυτελικό άκρο διμερίζονται και σχηματίζουν τον ώριμο TGF- $\beta$  (MB 25 kD) (Khalil, 1999). Όμως η LAP (πλέον 44 kD) παραμένει μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τον ώριμο TGF- $\beta$ , τον καθιστά αδρανή και διευκολύνει την εξωκυττάρωσή του (Khalil, 1999).**

Έτσι, ο TGF- $\beta$  εκκρίνεται σε λανθάνουσα (latent) μορφή ως σύμπλοκο τριών διαφορετικών πρωτεϊνών: α) του ενεργού TGF- $\beta$ , β) του σχετιζόμενου με την έλλειψη ενεργότητας πεπτιδίου (latency-associated peptide- LAP) και γ) της πρωτεΐνης που προσδέεται με τον λανθάνοντα (latent) TGF- $\beta$  (latent TGF- $\beta$  binding protein- LTBP). Το σύμπλοκο και των τριών ονομάζεται μείζων (large) λανθάνων (latent) TGF- $\beta$  (LLTGF- $\beta$ ), ενώ χωρίς την LTBP έλασσων (small) λανθάνων (latent) TGF- $\beta$  (SLTGF- $\beta$ ) (Lawrence, 1996; Munger et al., 1997). Δύο πολυπεπτίδια TGF- $\beta$  συνδέονται σε διμερές με υδρόφοβους δεσμούς και δύο δισουλφιδικές γέφυρες και το κάθε μονομερές διαμορφώνεται με τρεις διατηρημένες δισουλφιδικές γέφυρες στο εσωτερικό του (Shi and Massague, 2003). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί που διατηρούν την τριτοταγή δομή του και ο διμερισμός του είναι αποφασιστικής σημασίας για τη δράση του (Postlethwaite et al., 1987).

Η παρουσία του LAP φαίνεται να έχει συγκεκριμένους λειτουργικούς σκοπούς. Κάθε LAP του TGF- $\beta$ 1 (LAP-1) περιέχει συνδεδεμένα με άζωτο (N) μόρια υδατανθράκων (Purchio et



al., 1988) και δύο από αυτά έχουν φωσφορικές ομάδες συνδεδεμένες στη μαννόζη-6 που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον υποδοχέα mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor receptor-II της κυτταρικής μεμβράνης (Kovacina et al., 1989; Purchio et al., 1988). Υπάρχουν τρεις κυστεΐνες σε κάθε LAP-1 και αυτές στις θέσεις 223 και 225 είναι σημαντικές για τον διμερισμό των μονομερών LAP-1 με δισουλφιδικούς δεσμούς (Brunner et al., 1989). Η τρίτη κυστεΐνη είναι στη θέση 33 και εμπλέκεται στη δέσμευση του LAP-1 στην LTBP (Saharinen et al., 1996).

Το ενεργό τμήμα του TGF-β δεν συνδέεται με την **LTBP** και η σύνδεση αυτή καθαυτή δεν σχετίζεται με τη λανθάνουσα κατάσταση (Brown et al., 1990; Lawrence, 1996; Munger et al., 1997). Περιγράφονται αρκετές LTBP και κωδικοποιούνται από γονίδια διαφορετικά από εκείνα που κωδικοποιούν τους latent TGF-β (Kanzaki et al., 1990; Moren et al., 1994; Yin et al., 1995). Οι LTBP χαρακτηρίζονται από 15-19 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δίκην EGF και υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη (Kanzaki et al., 1990; Lawrence, 1996; Moren et al., 1994; Munger et al., 1997; Yin et al., 1995). Οι LTBP παρουσιάζουν ομολογία με τις fibrillins 1 και 2, οι οποίες αποτελούν συστατικά του μικρο-ινώδους συνδετικού ιστού, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι LTBP μπορούν επίσης να είναι σημαντικό δομικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας (Kanzaki et al., 1990; Lawrence, 1996; Moren et al., 1994; Munger et al., 1997; Yin et al., 1995). Ένας επιπλέον ρόλος των LTBP είναι ότι με τη σύνδεσή τους με τον λανθάνοντα (latent) TGF-β (L-TGF-β) στο σύστημα Golgi διευκολύνουν την ταχεία έκκρισή του (Miyazono et al., 1991). Ωστόσο, η πιο συχνά περιγραφόμενη λειτουργία της LTBP είναι η σύνδεση του L-TGF-β στην εξωκυττάρια μήτρα, όπου αυτός χρησιμεύει ως απόθεμα προς άμεση ενεργοποίηση (Taipale et al., 1994).

### 3.4.2 Ενεργοποίηση

Όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηριστικό όλων των ισομορφών TGF-β είναι η **έκκρισή τους σε βιολογικά ανενεργό μορφή**. Η διαδικασία ενεργοποίησης πραγματοποιείται στο εξωκυττάριο περιβάλλον με μη ειδικούς για τη συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν αφενός ακραίες φυσικές ή χημικές συνθήκες που φυσικά δεν είναι συμβατές με μηχανισμούς *in vivo* ενεργοποίησης (pH<2, pH>8, θερμοκρασία 100°C, χαοτροπικοί παράγοντες, όπως sodium dodecyl sulfate ή ουρία) και αφετέρου πλειάδα μη ειδικών πρωτεασών (Khalil, 1999). Πρωτεάσες που εξωκυττάρια τελικά ενεργοποιούν *in vivo* την κυρίως μελετημένη ισομορφή TGF-β1 είναι η πλασμίνη, η ενδογλυκοσιδάση F, η σιαλιδάση, η ιϊκή νευραμινιδάση (Schultz-Cherry and Hinshaw, 1996), οι καθεψίνες B και D, η καλπαΐνη, η θρομβοσπονδίνη 1, η ιντεγκρίνη ανβ6 (Munger et al., 1999) και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίου (Khalil, 1999).

Η **πλασμίνη** προέρχεται από το πλασμινογόνο με την ενζυματική δράση της ουροκινάσης- ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (urokinase plasminogen activator- uPA) ή του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator- tPA). Η ενζυμική δραστηριότητα του uPA εμφανίζεται ενώ είναι συνδεδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη με τον αντίστοιχο υποδοχέα (uPA receptor- uPAR). Σύνδεση του tPA σε έναν υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί, αλλά και ο tPA μπορεί να εμπλέκεται στην παραγωγή πλασμίνης ειδικά σε συνθήκες μικροαιμορραγιών στην εντερική εξωκυττάρια ουσία (Allan and Martin, 1995; Reuning et al., 1998). Ο σχηματισμός της πλασμίνης παρέχει πρωτεολυτική δραστηριότητα που μπορεί να είναι σημαντική όχι μόνο στην ινωδόλυση, αλλά σε ποικιλία από άλλες λειτουργίες των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που διαμεσολαβούνται από την ενεργοποίηση της L-TGF-β.

Η **καλπαΐνη** είναι μία πρωτεάση με ενζυμικό μηχανισμό βασιζόμενο στο αμινοξύ κυστεΐνη και πρόκειται για ένζυμο με σημαντικό ρόλο σε διάφορα φαινόμενα φυσιολογίας. Βασικό χαρακτηριστικό της καλπαΐνης είναι ο ρόλος της σε βιολογικές διαδικασίες που απαιτούν αργή, περιορισμένη και κατά συνέπεια δυνητικά υποκείμενη σε πολλαπλούς μηχανισμούς ελέγχου πρωτεόλυση. Η οικογένεια της καλπαΐνης περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες πρωτεασών στις οποίες συνεχώς προστίθενται μέλη. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στην ευρεία ή περιορισμένη ιστική κατανομή και στο  $Ca^{++}$ -εξαρτώμενο του μηχανισμού. Η καλπαΐνη ανήκει στις  $Ca^{++}$ -εξαρτώμενες ευρείας κατανομής ουδέτερες ενδοπεπτιδάσες. Έχουν μελετηθεί καλύτερα δύο τύποι καλπαΐνης: η  $\mu$  (I) και η  $m$  (II). Διαθέτουν και τα δύο είδη δύο υπομονάδες: μία καταλυτική υπομονάδα μεγέθους 80 kDa και μία ρυθμιστική 30 kDa με παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά. Η διαφορά μεταξύ τους είναι το ότι η  $\mu$ -καλπαΐνη ενεργοποιείται από συγκεντρώσεις  $Ca^{++}$  τάξης  $\mu M$ , ενώ η  $m$ -καλπαΐνη από  $mM$ . Η καλπαΐνη έχει δειχθεί ότι διασπά *in vitro* τον SLTGF- $\beta$  σε ενεργό/ώριμο TGF- $\beta$  σε συγκεντρώσεις του 0.1- 1 U/ml, αλλά και το LAP, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις του (Abe et al., 1998). Υπέρ της *in vivo* δραστικότητας της καλπαΐνης συνηγορούν και αποτελέσματα *ex vivo* πειραμάτων (Abe et al., 1998).

Η **θρομβοσπονδίνη** (thrombospondin- TSP) υπάρχει σε 5 ισομορφές (Adams, 1997) με την TSP-1 να έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον L-TGF- $\beta$ 1 και απελευθερώνει ενεργό TGF- $\beta$ 1 στον οποίο ακολούθως προσδένεται (Schultz-Cherry et al., 1995; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993). Η αυξημένη αυθόρμητη φλεγμονή σε ποντικούς knockout για την TSP-1 υπονοεί τον *in vivo* ρόλο του μηχανισμού, αλλά ο φαινότυπος δεν είναι τόσο έντονος όσο σε ποντικούς knockout για τον TGF- $\beta$ 1, πιθανώς λόγω αλληλεπικάλυψης των πολλαπλών μηχανισμών ενεργοποίησης (Crawford et al., 1998).

Επιπροσθέτως, όταν **ρίζες οξυγόνου** παρήχθησαν πειραματικά με οξείδωση του ασκορβικού οξέος υπό την δράση  $Fe^{+++}/EDTA$  ή  $Ca^{++}$  ως καταλυτών υπήρξε ενεργοποίηση TGF- $\beta$ 1 χωρίς να αυξηθεί η εξωκυττάρωση TGF- $\beta$ 1 *in vitro* (Barcellos-Hoff and Dix, 1996). Παρόμοια αποτελέσματα δίνει η ακτινοβόληση και η αύξηση του ενεργού TGF- $\beta$  συνάδει με την μετακτινική ίνωση που προκύπτει ως χρόνια βλάβη *in vivo* σε διάφορα όργανα (Barcellos-Hoff et al., 1994).

Ένας άλλος μηχανισμός ενεργοποίησης του L-TGF- $\beta$ 1, ανεξάρτητος από πρωτεάσες περιγράφηκε πρόσφατα. Αμινοξικές αλληλουχίες αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού (RGD) στη LAP-1 του L-TGF- $\beta$ 1 συνδέονται με την ιντεγκρίνη ανβ6 των επιθηλιακών κυττάρων. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι εφικτή μόνο αν **η ανβ6 είναι προσδεδεμένη έμμεσα μέσω των εστιακών επαφών (focal adhesions) στον κυτταροσκελετό** και οδηγεί σε αλλαγή στερεοδομής του L-TGF- $\beta$ 1, ώστε ο ώριμος TGF- $\beta$ 1 να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα T $\beta$ R-II (Munger et al., 1999). Με αυτή την οδό ενεργοποίησης δεν υπάρχει απελευθέρωση της LAP ή ενεργού TGF- $\beta$ 1 και υποστηρίζεται ότι η οδός έχει κυρίαρχο ρόλο στη δραστικότητα πέριξ επιθηλιακών κυττάρων, χωρίς απελευθέρωση διαλυτού TGF- $\beta$  (Munger et al., 1999). Ο ίδιος ο TGF- $\beta$ 1 επάγει την ανβ6 δρώντας ως παράγοντας θετικής παλίνδρομης ανατροφοδότησης της οδού (Sheppard et al., 1992; Wang et al., 1996). *In vivo* ποντικοί knockout για β6 παρουσιάζουν αυθόρμητη φλεγμονή σε δέρμα και πνεύμονες χωρίς ίνωση, εύρημα συμβατό με τον αντιφλεγμονώδη και προϊνωτικό ρόλο του TGF- $\beta$  (Munger et al., 1999). Όμως ανάμοια με τους ποντικούς που είναι knockout για τον TGF- $\beta$ 1 δεν παρουσιάζουν φλεγμονή σε άλλα όργανα, πιθανώς λόγω ιστο-ειδικής εντόπισης ή ανάγκης και για αυτόν το μηχανισμό ενεργοποίησης τοπικά (Shull et al., 1992).

Η **απενεργοποίηση** του δραστικού TGF-β γίνεται μεταξύ άλλων με τη δέσμευσή του από **α<sub>2</sub>-μακροσφαιρίνη, ντεκορίνη και β-γλυκάνη** (Miyazono et al., 1993). Επίσης οι ενεργοποιητές t-PA και η UPA δεν είναι μόνο επαγώγιμοι, αλλά η δραστηριότητά τους μπορεί επίσης να ανασταλεί από τις τέσσερις ισομορφές του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitor- **PAI**), που σημαίνει τα t-PA και UPA και προς φαγοκυττάρωση (Allan and Martin, 1995; Lyons et al., 1988; Reuning et al., 1998; Vaughan, 1998). Το γεγονός ότι η έκφραση uPA στην επιφάνεια μειώνεται όταν η παραγωγή πλασμίνης είναι μειωμένη και η αντίθετη δράση των υψηλών επιπέδων γλυκόζης, της αγγειοτενσίνης II και της θρομβοξάνης δηλώνουν τη δυναμικότητα του φαινομένου (Allan and Martin, 1995; Gibbons et al., 1992; Khalil et al., 1996a; Lyons et al., 1988; Miyazono and Heldin, 1989; Negrete et al., 1995; Reuning et al., 1998; Taipale et al., 1994; Vaughan, 1998; Ziyadeh et al., 1994). Επιπλέον, ο ίδιος ο L-TGF-β ενεργοποιεί μηχανισμό παλίνδρομης αρνητικής αυτορρύθμισης επάγοντας τον PAI (Sato et al., 1990).

### 3.4.3 TGF-β Υποδοχείς

Τα μέλη της οικογένειας TGF-β προσδένονται σε δύο διακριτούς τύπους υποδοχέων TGF-β (TGF-β receptor- TβR), τους **TβR-I (ALK5) και TβR-II**, οι οποίοι απαιτούνται αμφότεροι για τη μεταγωγή του σήματος ενδοκυττάρια. Τα ενδοκυττάρια τμήματα των υποδοχέων αυτών είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Ο TβR-II είναι κινάση που ενεργοποιείται με την πρόσδεση του TGF-β. Με την πρόσδεση αυτή αρχικά με τον TβR-II και ακολούθως του συμπλόκου με τον TβR-I σχηματίζεται ετεροεξαμερές από τέσσερα μόρια υποδοχέων (δύο μόρια TβR-II και δύο TβR-I) και δύο μόρια TGF-β. Ακολούθως ο TβR-II φωσφορυλιώνει τον TβR-I σε μία ακολουθία TTSGSGSG (GS τομέας) που βρίσκεται διαμεμβρανικά και τον τομέα με δράση κινάσης, που βρίσκεται ενδοκυττάρια. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται ο TβR-

Ι που δρα ως το πρώτο ενδοκυττάριο μήνυμα της οδού. Στη σταθεροποίηση της σύνδεσης TGF-β/TβR-II μετέχουν και επικουρικά μόρια με σημαντικό ρόλο, όπως η β-γλυκάνη και ο SMAD anchor for receptor activation (SARA ή TβR-III). (Lutz and Knaus, 2002; Shi and Massague, 2003)

Υπάρχουν επτά γνωστοί τύποι υποδοχέων για την υπερικογένεια TGF-β, μόνο ένας από τους οποίους χρησιμεύει ειδικά για την πρόσδεση των TGF-β (TβR-II). Από τους 5 TβR-I (activin receptor-like kinases- ALK), μόνο ο ALK-5 έχει το ρόλο μηνυματοφόρου μορίου για τον TGF-β, με γνωστή μόνο την εξαίρεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα οποία ενέχεται ο ALK-1, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ενεργοποιεί και την οδό της BMP. (Lutz and Knaus, 2002; Miyazawa et al., 2002; Shi and Massague, 2003)

### 3.4.4 SMADs

Το πρώτο επιβεβαιωμένο ενδοκυττάριο μήνυμα της οδού του TGF-β είναι οι πρωτεΐνες SMAD. Οι πρωτεΐνες SMAD είναι ομόλογες της “mothers against decapentaplegic” (MAD) της δροσόφιλας (*Drosophila melanogaster*) και της SMA της *Caenorhabditis elegans*. Η ονομασία είναι συνδυασμός και των δύο. Το λήμμα “mothers against decapentaplegic” προκύπτει από το εύρημα ότι μετάλλαξη του γονιδίου MAD στη μητέρα καταστέλλει το γονίδιο “decapentaplegic” στο έμβρυο. Διακρίνονται λειτουργικά σε τρία είδη: α) SMADs ενεργοποιούμενα από το σύμπλεγμα TβR (Receptor-activated SMADs- **R-SMADs**), τα οποία προκειμένου για τον TGF-β είναι τα SMAD 2 και SMAD 3, β) SMAD-συμπράγοντας (Co-mediator SMAD- **Co-SMAD**), που είναι το κοινό για όλα τα SMADs και είναι το SMAD 4 και γ) ανασταλτικά SMADs (Inhibitory SMADs- **I-SMADs**), που είναι τα SMAD 6 και SMAD 7.

(Lutz and Knaus, 2002; Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Shi and Massague, 2003)

Τα R-SMADs και τα Co-SMADs είναι πρωτεϊνικά μόρια αποτελούμενα από περίπου 500 αμινοξέα, στα οποία διακρίνονται δύο σφαιρικές περιοχές με διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων που συνδέονται με εύκαμπτη ευθεία περιοχή. Οι δύο αυτές περιοχές ονομάζονται MH1 και MH2 τομείς, με τον πρώτο να βρίσκεται αμινοτελικά και τον δεύτερο καρβοξυτελικά. (Lutz and Knaus, 2002)

Τα R-SMADs, αλλά όχι το Co-SMAD, περιέχουν την αλληλουχία Σερίνη-Χ-Σερίνη (SXS) στον MH2 (καρβοξυτελικό) τομέα τους. Η ενεργοποίηση των R-SMADs γίνεται με την φωσφορυλίωση από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα ΤβR-I δύο αμινοξικών αλληλουχιών SXS του MH2 τομέα. Λόγω διαδοχικών αλλαγών στη στερεοδιάταξή τους τα R-SMADs πιθανώς ομομερίζονται και το σύμπλοκο στη συνέχεια γίνεται ετερομερές με την πρόσδεση του Co-SMAD (SMAD 4). Για την ακριβή στοιχειομετρία του συμπλόκου αυτού υπάρχουν ακόμη αντιφατικά δεδομένα. Στο βήμα της ενεργοποίησης δρουν και επικουρικοί παράγοντες που είτε άμεσα είτε έμμεσα ακινητοποιούν τα SMADs 2 και 3, όπως ο SARA, ο Disabled-2, η αξίνη και η ELF β-σπεκτρίνη (Shi and Massague, 2003). Η ακόλουθη φωσφορυλίωση των SMADs 2 και 3 ελαττώνει τη συγγένεια με τα μόρια αυτά και επιβοηθεί στην απελευθέρωσή τους (Lutz and Knaus, 2002; Shi and Massague, 2003). Τα I-SMADs- SMADs 6 και 7- δρουν ανασταλτικά ανταγωνιζόμενα την πρόσδεση των R-SMADs στον ενεργοποιημένο ΤβR ή την πρόσδεση των R-SMADs στο SMAD 4 αντίστοιχα και σημαίνουντάς τα προς αποδόμηση (ubiquitination). (Derynck and Zhang, 2003; Lutz and Knaus, 2002; Monteleone et al., 2004b; Roberts et al., 2003)

Γενικά, ο **MH2** τομέας είναι διατηρημένος σε όλα τα SMADs και ενέχεται κυρίως στα ακόλουθα: α) αλληλεπίδραση με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα TβR-I, β) σχηματισμό ομομερών και ετερομερών συμπλόκων SMADs, και γ) αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων για μετάβαση εντός και εκτός του κυτταρικού πυρήνα (Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Moustakas et al., 2001; Shi and Massague, 2003).

Όταν δεν επιδρά ο TGF-β τα R-SMADs και τα Co-SMADs κατανέμονται ισομερώς σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα, ενώ τα I-SMADs βρίσκονται κυρίως στον πυρήνα. Η nuclear localisation signal (NLS) (πλούσια σε λυσίνες περιοχή) του MH2 τομέα του SMAD 3 αναγνωρίζει την ιμπορτίνη α του πυρηνικού φακέλου που είναι προσδεσμένη στην ιμπορτίνη β, προσδέεται σε αυτή και ακολούθως το σύμπλοκο μπορεί να διεισδύσει στον πυρήνα με διευκολυνόμενη μεταφορά μέσω των νουκλεοπορινών. Το SMAD 2 διεισδύει με πρότερη άμεση σύνδεση σε νουκλεοπορίνες και η οδός αυτή εναλλακτικά χρησιμοποιείται και από το SMAD 3. (Reguly and Wrana, 2003; Shi and Massague, 2003)

Ο **MH1** (αμινοτελικός) τομέας του Co-SMAD και των περισσότερων R-SMADs (εκτός του πρωτεϊνικού προϊόντος του πιο συνήθους μεταγραφήματος SMAD 2) λόγω τμήματός τους με δομή β-hairpin έχουν ικανότητα πρόσδεσης στην αλληλουχία 5'-AGAC-3' (SMAD binding element- SBE) του DNA. Ο MH1 (αμινοτελικός) τομέας των I-SMADs διαφέρει από αυτόν των R-SMADs και Co-SMADs και δεν προσδέεται στο DNA (Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Moustakas et al., 2001; Shi and Massague, 2003). Και ο MH1 και ο MH2 (καρβοξυτελικός) τομέας αλληλεπιδρούν με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα, ταυτόχρονα με την άμεση (SMAD 3) ή έμμεση (SMAD 2) πρόσδεση των R-SMADs στο DNA (Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Moustakas et al., 2001; Reguly and Wrana, 2003; Shi and Massague, 2003). Με αυτόν τον τρόπο ευοδώνουν ή



αναστέλλουν σε ποικίλο βαθμό τη μεταγραφή πολλών γονιδίων (Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Moustakas et al., 2001; Reguly and Wrana, 2003; Shi and Massague, 2003). Πολλοί άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως το P300, σχηματίζουν σύμπλοκα με τα συμπλέγματα SMAD 2 ή 3 και SMAD 4 στον πυρήνα, δρώντας ως ένα ακόμη βήμα λεπτής ρύθμισης της ενεργοποίησης της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων (Attisano and Wrana, 2002; Fukuchi et al., 2001).

Η **συνδεδετική των δύο τομέων εύκαμπτη περιοχή**, που δεν είναι διατηρημένη, περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Αυτές επιτρέπουν εξειδικευμένη επικοινωνία με άλλα βιοχημικά μονοπάτια. Ειδικά η πρόσδεση εκεί των πρωτεϊνών Smurf 1 και Smurf 2 μαζί με την πρόσδεση του SMAD 7 οδηγεί αυτά τα μόρια σε αποδόμηση (Shi and Massague, 2003). Επίσης, η αποφωσφορυλίωση από φωσφατάσες των παραπάνω θέσεων παίζει ρόλο στην παύση της λειτουργίας της οδού του TGF-β (Massague and Wotton, 2000; Miyazawa et al., 2002; Moustakas et al., 2001; Shi and Massague, 2003). Άλλη οδός τερματισμού της σηματοδότησης είναι η έξοδος από τον πυρήνα του συμπλόκου SMAD 3- SMAD 4 με τη σύνδεσή του με τον τομέα ROC1 (Fbw1a) της ubiquitinase SCF (Skp1, Cullins, F-box proteins) και την επακόλουθη αποδόμησης του από το 26S πρωτεόσωμα (Fukuchi et al., 2001).

Ενδείξεις υπέρ του ότι η οδός του TGF-β λειτουργεί με τον γενικό τρόπο που περιγράφηκε και στον εντερικό βλεννογόνο παρέχουν μελέτες σε μακροφάγα του ίδιου χιτώνα (lamina propria) από εντερικό βλεννογόνο IBD, που δείχνουν ότι αν εμποδισθεί η μεταγραφή SMAD 7 αυτά ανταποκρίνονται καλύτερα σε εξωγενή TGF-β1 φωσφορυλιώνοντας περισσότερο το SMAD 3. Με παρόμοιο χειρισμό σε *ex vivo* καλλιέργεια εντερικού βλεννογόνου ασθενών με IBD αποκαθίσταται η σηματοδότηση TGF-

β και μειώνεται η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Monteleone et al., 2008; Monteleone et al., 2001).

### 3.4.5 Σηματοδότηση ανεξάρτητη των SMADs

Σε αντίθεση με την οδό των SMADs, δεν είναι επαρκώς διερευνημένη η ενδοκυττάρια σηματοδότηση του TGF-β, καθώς υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για την ή τις οδούς που είναι ανεξάρτητες των SMADs. Για παράδειγμα ο TGF-β1 ενεργοποιεί την JNK, μέλος των MAPK, με μηχανισμό και εξαρτώμενο και ανεξάρτητο με τα SMADs σε επιθηλιακά. Δεν αποκλείεται και οι οδοί των ERK1/2 κινασών και του p38 να ενεργοποιούνται άμεσα από τον TGF-β1 τουλάχιστον στα επιθηλιακά κύτταρα, όπως έχει δειχθεί σε κύτταρα knockout για διάφορα SMADs (Hanafusa et al., 1999; Hartsough and Mulder, 1995; Hartsough and Mulder, 1997).

### 3.4.6 Σύνδεση οδού TGF-β με προφλεγμονώδεις ενδοκυττάρειες οδούς

Ο αμεσότερος τρόπος σε επίπεδο οργανισμού με τον οποίο έχει δειχτεί η **αντιφλεγμονώδης δράση του TGF-β στις βλεννογονικές επιφάνειες** είναι το ότι ποντίκια knockout για SMAD 3 παρουσιάζουν αυξημένους σε μέγεθος λεμφαδένες και βακτηριακά αποστήματα πλησίον των βλεννογονικών επιφανειών. Τα λεμφοκύτταρά τους έχουν ενεργοποιημένο φαινότυπο που δεν επηρεάζεται *in vitro* από τον TGF-β1 ως αναμενόταν και τα ουδετερόφιλα δεν παρουσιάζουν χημειοταξία προς αυτόν. (Yang et al., 1999b)

Η οδός TGF-β/SMADs ελέγχεται από τον καταρράκτη MAPK, που είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και ενεργοποιούνται ως απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Ενεργώντας σε συνδυασμό με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, οι MAPK μπορούν να αλλάξουν την

κατάσταση φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων και ως εκ τούτου επιτρέπουν στο κύτταρο να αλλάξει το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης ως απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Ειδικά στους εντερικούς ινοβλάστες η σηματοδότηση ERK1/2-MAPK σε συνδυασμό με την πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C- PKC) παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των TGF-β απαντήσεων στους εντερικούς ινοβλάστες (Mulsow et al., 2005).

Ο **TNF-α** καταστέλλει τις TGF-β-εξαρτώμενες απαντήσεις με την αύξηση της προστακυκλίνης, προκαλώντας αύξηση της έκφρασης JNK/ MAPK και SMAD 7, καθένα από τα οποία έχει άμεσα ή έμμεσα αντιϊνωτικά αποτελέσματα (Bitzer et al., 2000; Leask et al., 2003). Η προστακυκλίνη έχει αυτή τη δράση μέσω ERK1/2. Κλειδί στην αναστολή της οδού του TGF-β από την οδό του TNF-α είναι και η επαγωγή του JNK από τον TNF-α και συνακόλουθα των υποστρωμάτων του: c-Jun και JunB, που ανήκουν στην οικογένεια AP-1 μεταγραφικών παραγόντων (Nagarajan et al., 2000; Shi et al., 1998; Verrecchia et al., 2003). Το c-Jun δεσμεύει το SMAD 3 και μειώνει τη διαθεσιμότητα ελεύθερου SMAD 3 (Leask et al., 2003; Shi et al., 1998; Verrecchia et al., 2003). Επιπροσθέτως η ενεργοποίηση του NF-κΒ από τον TNF-α σε άλλες μελέτες φαίνεται να ενέχεται επίσης στον μηχανισμό αναστολής της οδού TGF-β (Verrecchia et al., 2000) ενώ σε άλλες όχι (Verrecchia et al., 2003). Και η **IFN-γ** αναστέλλει την οδό του TGF-β έμμεσα με καταστολή των σηματοδοτικών SMAD 2 και 3 μέσω αύξησης του SMAD 7 (Leask and Abraham, 2004).

Είναι ενδιαφέρον ότι σε μεσαγγειακά κύτταρα, η επαγωγή του κολλαγόνου τύπου I από τον TGF-β απαιτεί τον «καταρράκτη» ras/MEK/ERK/MAPK, αλλά όχι τον p38/MAPK. Αντιστρόφως, σε ινοβλάστες δέρματος η ίδια απάντηση απαιτεί p38/MAPK και όχι ras/MEK/ERK/MAPK (Hayashida et al., 1999; Sato et al., 2002). Ωστόσο, η επαγωγή του CTGF και στα δύο είδη κυττάρων απαιτεί ras/MEK/ERK/MAPK (Chen et al., 2002; Leask et

al., 2003; Stratton et al., 2002). Επίσης, η επαγωγή της φμπρονεκτίνης και κολλαγόνου από TGF-β σε ινοβλάστες είναι ανεξάρτητη από SMADs και απαιτεί τον καταρράκτη των JNK/MAPK, αλλά και των c-Jun, c-Fos (Hoccevar et al., 1999; Jonk et al., 1998; Piek et al., 2001; Wong et al., 1999). Όμως υπάρχει και διαμεσολαβούμενη από το SMAD 3 επαγωγή των c-Fos και c-Jun (Jonk et al., 1998; Piek et al., 2001; Wong et al., 1999). Επιπλέον, η δράση του SMAD 4 ενισχύεται μετά από φωσφορυλίωσή του από την οδό ras/MAP/ERK (Leask and Abraham, 2004; Roelen et al., 2003; Yue and Mulder, 2000). Διαφαίνεται λοιπόν ότι σε συγκεκριμένα κύτταρα και συνθήκες οι ενδοκυττάρειες προφλεγμονώδεις οδοί ίσως μεσολαβούν ή ενισχύουν- αντί να ανταγωνίζονται- συγκεκριμένα αποτελέσματα του TGF-β.

Ως προς την επίδραση των προφλεγμονωδών οδών στο **SMAD 7**, ο μηχανισμός επαγωγής από τον TNF-α του ανασταλτικού για την οδό TGF-β SMAD 7 σε άλλες πειραματικές συνθήκες επιβεβαιώνεται (Bitzer et al., 2000) και σε άλλες όχι (Verrecchia et al., 2000; Verrecchia et al., 2003), ενώ σε κάποιες φαίνεται να έχει την αντίθετη επίδραση (Nagarajan et al., 2000). Όμοια δράση τουλάχιστον σε συγκεκριμένα κύτταρα, όπως σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών από ινοσάρκωμα, και σε συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες έχει και η **IFN-γ** (Leask and Abraham, 2004; Ulloa et al., 1999), αν και αυτό μπορεί να μην ισχύει για φυσιολογικούς ινοβλάστες (Ghosh et al., 2001).

Συνολικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των προφλεγμονωδών και της οδού του TGF-β ως προς την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Οι μοριακές λεπτομέρειες των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των προφλεγμονωδών οδών των MAP και των ERK κινασών με την οδό του TGF-β παραμένουν άγνωστες και είναι πιθανόν οι προφλεγμονώδεις οδοί να μην έχουν αποκλειστικά

ανασταλτική δράση, αλλά να προάγουν τη δραστηριότητα της οδού σε ορισμένα σημεία. Είναι πιθανό να πρόκειται για οδούς που δρουν είτε ανασταλτικά είτε ευοδωτικά ανάλογα με τα γονίδια στόχους ή το λοιπό ενδοκυττάριο σηματοδοτικό περιβάλλον.

Ως προς το **επίδραση της οδού του TGF-β στην οδό του TNF-α**, έχει προταθεί ο μηχανισμός της αύξησης της τριστετραπρολίνης (tris-tetra-proline- TTP), πρωτεΐνης που ενέχεται στην αποδόμηση του TNF-α mRNA, από τον TGF-β μέσω απευθείας σύνδεσης του μηνυματοφόρου συμπλόκου της οδού του TGF-β SMAD 3/ SMAD 4 στον promoter του γονιδίου της TTP (Ogawa et al., 2003). Υπάρχει επίσης το δεδομένο ότι ο TGF-β αναστέλλει τη συσσώρευση του ενδοκυττάριου μηνυματοφόρου μορίου NF-κB του TNF-α στον κυτταρικό πυρήνα μονοπύρηνων κυττάρων εντερικού βλεννογόνου, αν του TNF-α προηγηθεί επώαση με TGF-β1, αναστολή που δεν συμβαίνει αν πρόκειται για μονοπύρηνα εντερικού βλεννογόνου ασθενών με IBD, πιθανώς εξαιτίας της υπερέκφρασης του αναστολέα της οδού του TGF-β, **SMAD 7** (Monteleone et al., 2004a). Βέβαια στα ίδια κύτταρα οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν επάγουν SMAD 7 όπως σε κυτταρικές σειρές και οι οδός του TGF-β φαίνεται κατεσταλμένη κρίνοντας από τα επίπεδα p-SMAD3 (Monteleone et al., 2004b). Η δυναμική του φαινομένου όμως δεν εξαντλείται από ποσοτικές μετρήσεις SMAD 7 mRNA και πρωτεΐνης, αφού δείχθηκε μειωμένος βαθμός ubiquitination συγκεκριμένων αμινοξέων λυσίνης (και επομένως αδρανοποίησης και σήμανσης προς αποδόμηση) και αυξημένος βαθμός ακετυλίωσης (και επομένως προστασίας από αποδόμηση) σε SMAD 7 εντερικού ιστού ασθενών IBD σε σχέση με ομάδα ελέγχου (Monteleone et al., 2005; Monteleone et al., 2004b). Το γεγονός του μη ελέγχου της έκφρασής του από τον ίδιο τον TGF-β1 με τον συναντούμενο σε πολλές οδούς μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (Di Sabatino et al., 2009) και ο πιθανός

έλεγχός του από προφλεγμονώδεις παράγοντες (Bitzer et al., 2000) ασφαλώς ενισχύει την άποψη ότι το SMAD 7 αποτελεί τον βασικό μηχανισμό με τον οποίο οι προφλεγμονώδεις παράγοντες αναστέλλουν την αντιφλεγμονώδη οδό του TGF-β. Επίσης ο ίδιος ο TGF-β έχει δειχθεί να επάγει το SMAD 7 δημιουργώντας βρόγχο αρνητικής αυτορρύθμισης (Nakao et al., 1997; von Gersdorff et al., 2000).

**Ειδικά** σε μονοπύρηνια ασθενών με CD υπερεκφράζεται ο επαγόμενος από τον TNF-α μεταγραφικός παράγοντας T-bet, τα επίπεδα του οποίου αποτυγχάνει να ελέγξει ο TGF-β, όπως συμβαίνει σε φυσιολογικό έντερο (Neurath et al., 2002b). Ειδικά σε μακροφάγα ο TGF-β1 έχει αντιφλεγμονώδη δράση, μειώνοντας κυτταροκίνες, NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ανταγωνιζόμενος δοσοεξαρτώμενα τις δράσεις της IFN-γ και μειώνοντας τους υποδοχείς της (Ding et al., 1990; Musso et al., 1990; Pinson et al., 1992; Tsunawaki et al., 1988). Η οδός TGF-β/SMADs επίσης αναστέλλει την ενδοκυττάρια οδό της IL-6 στα CaCO-2 μέσω καταστολής της φωσφορυλίωσης των STAT1 και STAT3 και μείωσης της μετάβασής τους στον πυρήνα και τελικά μειώνει τη μεταγραφή γονιδίων των οποίων η μεταγραφή είναι εξαρτώμενη από την IL-6 (Walia et al., 2003).

Αξίζουν αναφοράς τα ευρήματα που συνηγορούν υπέρ της **συνεργασίας της οδού της IL-13 και του TGF-β προς την εντερική ίνωση**. Πιο αναλυτικά, σε μοντέλο χρόνιας φλεγμονής με επανειλημμένη ενδοαυλική έγχυση TNBS και επακόλουθης ίνωσης, πλην της μεταβολής του profile ανοσολογικής απάντησης από Th1 (IFN-γ, IL-12) σε Th17 (IL-17, IL-23), διαπιστώθηκε υπερέκφραση TGF-β1 και IL-13. Η IL-13 διαπιστώθηκε ότι είναι upstream του TGF-β1 και δρα μέσω του επαγωγίμου IL-13Rα<sub>2</sub> (Fichtner-Feigl et al., 2007; Fichtner-Feigl et al., 2006). Οι δράσεις αυτές για τον μεν TGF-β1 διαμεσολαβούνται από την κλασική για αυτόν οδό του SMAD 3 και για την IL-13 από παραλλαγή του μεταγραφικού

παράγοντα AP-1 αποτελούμενη από τα c-Jun και Fra-2 (Fichtner-Feigl et al., 2006; Fichtner-Feigl et al., 2008). Downstream των IL-13 και TGF-β1 βρίσκεται ο IGF-I και η ενεργοποίηση του early growth response gene-1 (egr-1) (Fichtner-Feigl et al., 2008). Τμήματα της σκιαγραφούμενης αυτής οδού ίνωσης επιβεβαιώνονται και σε μοντέλο πνευμονικής ίνωσης με μπλεομυκίνη (Fichtner-Feigl et al., 2006). Διαφαίνεται λοιπόν ότι η σηματοδότηση της IL-13 μπορεί να είναι απαραίτητη για την τελική προϊνωτική δράση του TGF-β1 σε συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, που πιθανώς έχουν αναλογία με *in vivo* παθοφυσιολογία IBD.

Ακόμη, ως απόκριση στην φλεγμονή σε **μοντέλα κολίτιδας** με TNBS ή οξαζολόνη σε ποντικούς μετράται αυξημένος TGF-β1, αλλά η δράση του είναι μειωμένη λόγω μειωμένων επιπέδων ενδοκυττάριου p-SMAD 3, που πιθανώς με τη σειρά τους οφείλονται σε αυξημένο SMAD 7 (Boirivant et al., 2006). Χορήγηση anti-sense ολιγονουκλεοτιδίων έναντι του mRNA του SMAD 7 βελτίωνε την κολίτιδα, αποκαθιστούσε την σηματοδότηση της οδού και μείωνε αντίστοιχα τις Th1 και Th2 προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και τα αντίστοιχα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια (Boirivant et al., 2006).

### 3.4.7 TGF-β και Ίνωση

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ομοιόσταση σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένου του εντέρου, εξαρτάται από την έκφραση και την αποτελεσματική δράση του TGF-β και των ενδοκυττάρων σημάτων αυτού SMADs (Burke et al., 2007; Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b; Pucilowska et al., 2000b; Rieder et al., 2007; Van Assche et al., 2004). Ο ρόλος του **TGF-β στην ίνωση** υποστηρίζεται από ευρήματα που δεν περιορίζονται μόνο στο έντερο. Υπέρ της κλινικής σύνδεσης του TGF-β με ίνωση είναι το ότι η διακοπή της

σηματοδότησης στην οδό TGF-β/SMADs, είτε με την απαλοιφή του SMAD 3 ή την επαγωγή του SMAD 7, προσδίδει αντοχή στην ίνωση των ιστών σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, των νεφρών, των πνευμόνων και του ήπατος (Dong et al., 2002; Dooley et al., 2003; Flanders, 2004; Fukasawa et al., 2004; Inagaki and Okazaki, 2007; Inazaki et al., 2004; Lakos et al., 2004; Nakao et al., 1999; Zhao et al., 2002). Επίσης κομβικό ρόλο έχει ο TGF-β1 στην ηπατική (Gressner et al., 2002) και παγκρεατική ίνωση (Vaquero et al., 1999).

Σε **πνεύμονα και δέρμα**, ειδικά με μοντέλα επαγωγής πνευμονικής ίνωσης με μπλεομυκίνη και δερματικής με ακτινοβολία αντίστοιχα, κομβικό είναι το εύρημα ότι ίνωση δεν προκύπτει σε ποντίκια knockout για το κυριότερο μηνυματοφόρο μόριο SMAD3 του TGF-β (Bonniaud et al., 2004; Flanders et al., 2002; Zhao et al., 2002). Επίσης ο εξωγενής TGF-β1 προάγει την ίνωση *in vivo* σε πληγές εμβρυϊκού ιστού και όταν ενέεται υποδόρια σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών (Lin et al., 1995; Mustoe et al., 1987). Αντίθετα η χορήγηση anti-TGF-β αντισωμάτων ή αντίστοιχων anti-sense νουκλεοτιδίων μειώνει *in vivo* την ουλοποίηση και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας (Duncan et al., 1999; Lin et al., 1995). Πιθανή εξαίρεση στην προϊνωτική δράση του TGF-β, αποτελεί η ισομορφή TGF-β3, που φαίνεται άλλοτε να ενισχύει την έκκριση εξωκυττάριας ουσίας και άλλοτε να την καταστέλλει (Coker et al., 1997; O'Kane and Ferguson, 1997).

Ο TGF-β έχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των ινοβλαστών στο έντερο, και αυτό ενισχύεται περαιτέρω από το εύρημα ότι ο TGF-β υπερεκφράζεται από ινοβλάστες στενώσεων **CD** (McKaig et al., 2002). Οι TGF-β1 και TGF-β2 ισομορφές ειδικά έχουν εμπλακεί σε παθοφυσιολογία ίνωσης, ενώ για τον TGF-β3 έχουν προταθεί αντιϊνωτικές ιδιότητες (Leask and Abraham, 2004). Υπάρχει υποψία, με έμμεσες μετρήσεις



των ισομορφών TGF-β, ότι υπάρχει διαφορική έκφραση ισομορφών TGF-β σε μυοϊνοβλάστες υγιών, ασθενών με UC και ασθενών με CD (McKaig et al., 2002). Ακόμη, παρατηρείται υπερέκφραση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών του μορίων p-SMAD 2 και 3 και μειωμένη έκφραση του ανασταλτικού της οδού SMAD 7 στις **ινωτικές περιοχές του εντέρου ασθενών με CD** (Di Sabatino et al., 2009). Ειδικά το SMAD 7 εμφανίζεται αυξημένο και στις φλεγμίνουσες περιοχές του εντέρου (Di Sabatino et al., 2009), όπως μπορεί να προβλεφθεί από το γεγονός ότι επάγεται από τις προφλεγμονώδεις οδούς ώστε να κατασταλεί η αντιφλεγμονώδης δράση του TGF-β (ενότητα 3.4.6).

Και σε μηχανισμούς ινωτικών διαταραχών του **δέρματος**, όπως στο σκληρόδερμα, ο TGF-β αυξάνει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών καθώς και τη σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και ως εκ τούτου θεωρείται ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξή τους (Leroy et al., 1989; Roberts and Sporn, 1993). Ζωικά μοντέλα σκληροδέρματος επίσης υποστηρίζουν τη συμμετοχή του TGF-β στην παθογένεια της νόσου και θεραπεία με anti-TGF-β αντίσωμα ήταν αποτελεσματική στην πρόληψη της δερματικής και πνευμονικής ίνωσης στη νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (graft-versus-host disease- GVHD) και σε μοντέλο σκληροδέρματος (McCormick et al., 1999). Διαγραφή ενός από τα δύο TGF-β αλληλόμορφα οδήγησε σε μείωση της δερματικής ίνωσης σε παρόμοιο μοντέλο (McGaha et al., 2001).

Αυξημένος TGF-β1 και υποδοχέας του EGF έχουν μετρηθεί σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με **άσθμα** μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο (Hastie et al., 2002; Puddicombe et al., 2000; Redington et al., 1997), αλλά δεν ήταν σαφείς οι διαφορές χωρίς πρόκληση σε ασθματικούς σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου (Amishima et al., 1998; Aubert et al., 1994; Hoshino et al., 1998; Polosa et al., 2002).

Σε **μοντέλα** δερματικής ίνωσης τα ζώα που δεν διαθέτουν **SMAD 3** δείχνουν επιτάχυνση της επούλωσης του τραύματος, μειωμένο σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, αυξημένη επανεπιθηλιοποίηση και μειωμένη φλεγμονή μετά από χειρουργικό τραυματισμό που πιθανόν να οφείλονται σε μειωμένη χημειοταξία (Ashcroft et al., 1999) και αντίσταση στη δερματική ίνωση που προκαλείται από ακτινοβολία (Flanders et al., 2002). Περαιτέρω στήριξη στο ρόλο του SMAD 3 στην ινωτική απάντηση παρέχει η παρατήρηση ότι τα αυξημένα επίπεδα του ενεργοποιημένου SMAD 3 υπάρχουν σε μοντέλα ίνωσης με μπλεομυκίνη, σε ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και της αιχμής σε βλάβες σκληροδέρματος (Liu et al., 2003a; Mori et al., 2003; Takagawa et al., 2003). Ωστόσο, όλα τα μοντέλα δεν έχουν ακριβώς τους ίδιους μηχανισμούς ίνωσης: σε εγκατεστημένη ίνωση συχνά δεν δείχνουν ενεργοποίηση της οδού του TGF-β, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση προϊνωτικών μορίων από κάποιο σημείο και μετά ίσως ανεξαρτητοποιείται από την οδό του TGF-β (Dooley et al., 2001; Holmes et al., 2003; Holmes et al., 2001). Έτσι, αν και ο SMAD 3 διαδραματίζει καίριο ρόλο στην έναρξη της ίνωσης, μπορεί να μην είναι αναγκαίος για τη συντήρηση του ινώδους φαινοτύπου. Ρόλο σε αυτό έχει και η επιβράδυνση της επανεπιθηλιοποίησης που προκαλεί η ενδοκυττάρια οδός των SMADs και η συνακόλουθη επίταση της τοπικής άθροισης μεσεγχυματικών κυττάρων, πιθανώς ως απάντηση στην επαφή της lamina propria (ίδιος χιτώνας) με την εντερική χλωρίδα: σε ποντίκια ετερόζυγα για το SMAD 3 η επανεπιθηλιοποίηση είναι ταχύτερη μετά από πειραματική κολίτιδα (Tokumasa et al., 2004). Παρόμοιο είναι το αποτέλεσμα της απαλοιφής ενός από τα δύο αλληλία για το SMAD 3 σε δερματικές πληγές (Ashcroft and Roberts, 2000; Ashcroft et al., 1999; Massague, 1999). Βέβαια στα δύο αυτά μοντέλα διαφέρει ο βαθμός φλεγμονής στη lamina propria (ίδιος χιτώνας) που είναι

συγκρίσιμος στο έντερο αλλά σαφώς μειωμένος στο δέρμα (Ashcroft et al., 1999; Tokumasa et al., 2004).

Το ανασταλτικό της οδού του TGF-β **SMAD 7** έχει βρεθεί αυξημένο σε κυκλοφορούντα και εντερικά T λεμφοκύτταρα ασθενών με IBD. Πειραματική αναστολή του αποκαθιστά την σηματοδότηση του TGF-β1 και την κατασταλτική του δράση στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Monteleone et al., 2001). Η μειωμένη έκφραση του ανασταλτικού της οδού SMAD 7 σε ινοβλάστες σκληροδέρματος σε άλλες μελέτες επιβεβαιώνεται (Dong et al., 2002) και σε άλλες όχι (Holmes et al., 2001; Mori et al., 2003).

Αν και η αδυναμία επιβίωσης ποντικών knockout και για τα δύο αλληλίου TGF-β1 δυσχεραίνει το σχεδιασμό μελετών με μεγαλύτερο βάθος, διαφαίνεται ότι απαιτούνται και άλλοι παράγοντες για την εγκατάσταση χρονίζουσας ίνωσης (Chujo et al., 2005; Chujo et al., 2009). Οπότε, η ακεραιότητα του μηχανισμού του TGF-β έχει προταθεί ως αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη ώστε η φλεγμονή να επιπλεχθεί με ίνωση (Bonniaud et al., 2005). Μέσω και της επίδρασης του TGF-β και στους ινωδολυτικούς μηχανισμούς, αυτός καθίσταται σημαντικός ρυθμιστής της ισορροπίας μεταξύ λύσης και σύνθεσης της εξωκυττάριας ουσίας (Eickelberg et al., 1999; Wells, 2000).

Η φυσιολογική επούλωση των πληγών γενικά ρυθμίζεται από την πολύπλοκη **ισορροπία** μεταξύ προϊνωτικών (TGF-β1, CTGF) και αντιϊνωτικών (TNF-α και IFN-γ) παραγόντων. Επομένως η ίνωση μπορεί και να θεωρηθεί όχι απλό αποτέλεσμα δράσης του TGF-β, αλλά πιθανή αποτυχία οδών αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της αντιφλεγμονώδους δράσης του, που έχει ως παράπλευρη συνέπεια την αποτυχία τερματισμού και της επούλωσης

του δράσης, γεγονός που οδηγεί σε ίνωση. Μπορεί να μετέχει λοιπόν και υπό αυτό το πρίσμα στην παθοφυσιολογία της ίνωσης διαφόρων οργάνων (Ihn, 2002a; Ihn, 2002b).

Ο TGF-β1 ακόμη επιτείνει την έκφραση α-SMA και προκαλεί **συστολή** σε μεσεγχυματικά κύτταρα, γεγονός που σχετίζεται με το φαινότυπο ενεργού μυοϊνοβλάστη που αυτά διατηρούν (Desmouliere et al., 1993; Vaughan et al., 2000) και, εφόσον πλην της ίνωσης, η συστολή του εντερικού τοιχώματος είναι χαρακτηριστικό των συμπτωματικών στενώσεων (ενότητα 3.1.5), το εύρημα αυτό ενισχύει την υποψία συμμετοχής του TGF-β στην παθοφυσιολογία αυτών. Πάντως αδρανοποίηση μόνον του TGF-β1 δεν είναι ικανή συνθήκη να αναστείλει πλήρως τη φαινοτυπική αυτή μετατροπή των μεσεγχυματικών κυττάρων (Shephard et al., 2004b; Smola et al., 1994). Σημαντικό πάντως ενδιάμεσο μόριο μεταξύ TGF-β1 και έκφρασης α-SMA είναι το μεταγράφημα φιβρονεκτίνης ED-A (Serini et al., 1998). Ακόμη ο TGF-β1 ενεργοποιεί πλην των ινοβλαστών/ μυοϊνοβλαστών και τα λεία μυϊκά κύτταρα, αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό τους και ήπια τη σύνθεση κολλαγόνου από αυτά (Graham et al., 1990).

### 3.5 Μεταλλοπρωτεάσες – Αναστολείς αυτών

Κομβικό ρόλο στην επικοινωνία, κινητικότητα και πολλαπλασιασμό επιθηλιακών και SEMFs διαδραματίζει η βασική μεμβράνη που βρίσκεται ανάμεσά τους. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases- MMPs) ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα ενζύμων που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία και μεταξύ αυτών και τα συστατικά της βασικής μεμβράνης (Nagase and Woessner, 1999; Nelson et al., 2000). Εκκρίνονται γενικά ως ανενεργές προμορφές από πολλά διαφορετικά μεσεγχυματικής ή επιθηλιακής προέλευσης κύτταρα, όπως και μονοπύρρηνα/μακροφάγα, ουδετερόφιλα και άλλα κύτταρα

του ανοσοποιητικού συστήματος (Pender and MacDonald, 2004). Οι MMPs θεωρούνται φορείς ιστικής λύσης στη φλεγμονή, αλλά και παράγοντες αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της φλεγμονώδους δραστηριότητας και είναι ουσιώδους σημασίας για τη δυναμική αναμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας. Διαμεσολαβούν κυτταρική διήθηση, κυτταρική μετανάστευση, ιστική βλάβη και αναδιαμόρφωση/ επισκευή, αλλά και ενεργοποίηση κυτταροκινών (Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Mott and Werb, 2004) και ρόλοι τους επεκτείνονται σε ευρύ νοσολογικό φάσμα που περιλαμβάνει τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την οστεοαρθρίτιδα (Karpetanakis et al., 2010), την περιοδοντική νόσο, την αθηροσκλήρωση, τη μετάσταση νεοπλασματικών κυττάρων (Brown, 1998; Kahari and Saarialho-Kere, 1999), το πνευμονικό εμφύσημα (Birkedal-Hansen et al., 1993; Nagase and Woessner, 1999) και τη δερματική ίνωση (Ghahary et al., 1998). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η δράση των MMPs ελέγχεται από την παρουσία αναστολέων τους και έτσι εμποδίζεται η υπερβολική λύση της εξωκυττάριας ουσίας. Η κυριότερη κατηγορία τέτοιων αναστολέων είναι οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (tissue inhibitors of metalloproteinases- TIMPs).

### 3.5.1 Δομή – Τύποι - Ενεργοποίηση

Οι MMPs συγκροτούν **οικογένεια >23 δομικά σχετιζόμενων  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενων ενδοπεπτιδασών που χρησιμοποιούν  $Zn^{2+}$  ως συνένζυμο** και γενικά εκκρίνονται ως αδρανή πρόδρομα μόρια που με πρωτεόλυση ενεργοποιούνται προς μικρότερα ενζυμικά ενεργά μόρια (Baugh et al., 1999; Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Mott and Werb, 2004). Έχουν κοινούς ή παρόμοιους λειτουργικούς τομείς και μηχανισμούς ενεργοποίησης με παράδειγμα τη δράση πρωτεασών σερίνης, όπως η πλασμίνη, και μεμβρανικού τύπου MMPs, όπως η membrane type (MT)-MMP-1 (Corbel et al., 2002; Philip et al., 2004; Vu and

Werb, 2000). Πρόκειται για τα μόνα ένζυμα που μπορούν να αποδομήσουν το κολλαγόνο στην αρχική του τριπλή ελικοειδή μορφή σε ουδέτερο pH στον εξωκυττάριο χώρο (Matsubara et al., 1991).

Με βάση την ειδικότητα υποστρωμάτων και τις ομοιότητες σε αμινοξική αλληλουχία και σε λειτουργικούς τομείς, διακρίνονται σε **κολλαγενάσες** (MMP-1, -8, -13, -18), **στρωμελυσίνες** (MMP-3, -7, -10, -11), **gelatinases** (MMP-2, -9), **ελαστάση** (MMP-12) και **μεμβρανικού τύπου** (membrane type- MT) MMPs (MMP-14 ή MT-MMP-1, -15, -16, -17, -24, -25) (Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Mott and Werb, 2004; Nagase and Woessner, 1999; Pender and MacDonald, 2004). Το φάσμα διαρκώς επεκτείνεται με τη διαρκή ταυτοποίηση νεότερων MMPs (-19, -20, -23, -26, -27, -28) (de Coignac et al., 2000; Nagase and Woessner, 1999; Pender and MacDonald, 2004). Η MMP-1 είναι μια διάμεση κολλαγενάση και προκαλεί την αποδόμηση των τύπων κολλαγόνου I, II και III με διάσπασή των αμιδικών δεσμών τους σε μοναδικό σημείο, ώστε οι έλικές τους να απελιχθούν (Fields et al., 1987) και να μπορέσουν να δράσουν επ' αυτών οι γελατινάσες (gelatinases) MMP-2 (gelatinase A) και MMP-9 (gelatinase B) προκαλώντας πρωτεόλυση με δράση σε πολλαπλά σημεία. Αφ' εαυτού τα δύο αυτά τελευταία ένζυμα διασπούν τους μη ινώδεις τύπους κολλαγόνου IV και V (Nelson et al., 2000; Sternlicht and Werb, 2001). Ειδικά το κολλαγόνο τύπου IV είναι βασικό δομικό συστατικό της βασικής μεμβράνης του εντέρου, εκατέρωθεν της οποίας εδράζονται τα επιθηλιακά και οι SEMFs. Η στρωμελυσίνες MMP-3 (στρωμελυσίνη-1) και MMP-10 έχουν ευρύτερο φάσμα διασπώντας πρωτεογλυκάνες, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη και μη ινώδεις τύπους κολλαγόνου και επομένως έχουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης (Galloway et al., 1983; Murphy et al., 1991; Nelson et al., 2000; Sternlicht and Werb, 2001).

Η δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα. Αρχικά ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής και στο επίπεδο της εξωκυττάριας **ενεργοποίησης**, αφενός από μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs) της κυτταρικής μεμβράνης, με καλύτερα διερευνημένους τους υπότυπους 1 ως 5, και αφετέρου από άλλες ήδη ενεργοποιημένες MMPs (Deryugina et al., 1998; Pender and MacDonald, 2004). Για παράδειγμα οι gelatinases ενεργοποιούνται από την MMP-1, η MMP-1 από την MMP-3 και σε μικρότερο βαθμό από τις MMP-2, MMP-7, MMP-10, η MMP-2 από την MMP-14 (Ueno et al., 1997). Πλην των ίδιων των MMPs υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης των MMPs, όπως η ιντεγκρίνη  $\alpha 4\beta 1$  που ενεργοποιεί την MMP-2, αλλά και επάγει την MT-MMP-1 (Pender et al., 2000).

Επιπροσθέτως, η δραστηριότητα των MMPs ελέγχεται από ειδικούς ιστικούς **αναστολείς** των μεταλλοπρωτεασών (tissue inhibitors of metalloproteinases- TIMPs) και από μη ειδικούς αναστολείς, όπως η  $\beta 2$ -μακροσφαιρίνη (Nagase and Woessner, 1999; Nelson et al., 2000; Ueno et al., 1997). Ο TIMP-1 θεωρείται επαγωγίμος αναστολέας των MMPs και συναντάται σε ποικιλία ιστών (Docherty et al., 1992), ενώ ο TIMP-2 παράγεται συνήθως ιδιοσυστασιακά και ο προμότοράς του έχει χαρακτηριστικά housekeeping γονιδίου (Hammani et al., 1996). Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη με μέγεθος 28 kD παρούσα σε πλήθος ιστών που προσδένεται σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 στις MMPs και τις αδρανοποιεί λειτουργικά (Brew et al., 2000; Gomez et al., 1997; Murphy et al., 1989; Pender and MacDonald, 2004; Welgus and Stricklin, 1983). Πλην της ρόλου του ως αναστολέα των MMPs, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι ρόλοι, όπως η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Guedez et al., 1998a; Guedez et al.,

1998b; Stricklin and Welgus, 1986). Περίπου το ήμισυ των κυττάρων που εκφράζουν TIMP-1 στον εντερικό βλεννογόνο είναι οι μυοϊνοβλάστες (Holten-Andersen et al., 1999).

### 3.5.2 Φυσιολογία

Λεπτή ισορροπία μεταξύ MMPs και TIMPs ελέγχει το ρυθμό της αναδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας υπό φυσιολογικές συνθήκες, με σκοπό την αναδιαμόρφωση του ιστού κατά την φλεγμονή και την επούλωση. **Η εξωκυττάρια ουσία είναι σε δυναμική ισορροπία σύνθεσης και αποδόμησης** και οι MMPs έχουν κυρίαρχο ρόλο στο καταβολικό τμήμα της ισορροπίας αυτής. Αυτές αποδομούν πολλές σημαντικές εξωκυττάριας πρωτεΐνες με κυρίως δομικό ρόλο, όπως κολλαγόνο, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη, και η υπερδραστηριότητά τους μπορεί να οδηγήσει σε απορύθμιση της ισορροπίας (Bitzer et al., 2000; Gao et al., 2005; Heuschkel et al., 2000; von Lampe et al., 2000). Στοιχεία που προσδέονται στις αλληλουχίες ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου (promoters) της MMP-9 είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 και NF-κB (Sato et al., 1993; Sato and Seiki, 1993; West-Mays et al., 1999). Η MCP-1, TNF-α, ο TGF-β1 και η IL-1α επάγουν την κυτταρική έκφραση MMPs σε μερικά κύτταρα/ συστήματα (MacNaul et al., 1990; Vallance et al., 2005; Yamamoto et al., 2000).

Ο επαγώγιμος **TIMP-1** έχει δειχθεί ότι επιλεκτικά αναστέλλει λειτουργικά την επίσης συνήθως επαγόμενη προ-MMP-9, ενώ οι TIMP -2 και -4 την σταθερά εκφραζόμενη προ-MMP-2 (Sawicki et al., 2005). MMP9 και TIMP-1 παράγονται όχι μόνο από μεσεγχυματικά κύτταρα αλλά και από κλασικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως CD4+, CD3+ και κυτταροτοξικά CD8+ λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα του αίματος και



αυξάνονται περαιτέρω με *in vitro* ανοσολογική διέγερσή τους (Johnatty et al., 1997). Θεωρείται ότι διευκολύνουν τη χημειοτακτική διείσδυσή τους στους περιφερικούς ιστούς.

Ρόλοι των μεταλλοπρωτεασών άλλοι πλην των κλασικών πρωτεολυτικών, όπως για παράδειγμα στην **πήξη** με την συγκόλληση αιμοπεταλίων, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί (Sawicki et al., 1997). Έχει επίσης δειχθεί και ενδοκυττάρια δραστικότητα της MMP-2 υπό παθολογικές συνθήκες (Wang et al., 2002).

### 3.5.3 Παθοφυσιολογία

MMPs εκκρίνονται από μια ευρεία ποικιλία κυττάρων, όπως ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, λεία μυϊκά, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και από ώριμα λευκοκύτταρα, όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, και λεμφοκύτταρα (Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Mott and Werb, 2004; Sternlicht and Werb, 2001). Αν και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπλαση των ιστών, απορρυθμισμένη έκφρασή τους έχει εμπλακεί σε διάφορες νόσους, όπως η αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση, η μετεμφραγματική ισχαιμική βλάβη του μυοκαρδίου, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και οι μεταστάσεις του και η IBD (Dubois et al., 1999; Gao et al., 2005; Hemdahl et al., 2006; Itoh et al., 2002; Liu et al., 1998; Martignetti et al., 2001; Mook et al., 2004; Turpeenniemi-Hujanen, 2005; Vermaelen et al., 2003). *In vitro* ενδείξεις υπάρχουν όχι μόνο για τη συμμετοχή των MMP -1, -2, -3- πλην της αποδόμησης- και στη συστολή της διάμεσης ουσίας ως απάντηση στην άμεση επίδραση ουδετερόφιλων ή αιμοπεταλίων, κάτι που *in vivo* συμβαίνει κατά την διήθηση από ουδετερόφιλα και τις μικροαιμορραγιές στην οξεία φλεγμονή του εντερικού τοιχώματος (Fredriksson et al., 2006). Υποστηρικτική του ρόλου των MMPs στην καταστροφή του βλεννογόνου είναι η επιβράδυνση της απόπτωσης του επιθηλίου με την προσθήκη

ανταγωνιστή τους σε *ex vivo* καλλιέργεια εμβρυικού εντερικού ιστού (Pender et al., 1997). Και οι TIMP -1 και -2 αυξάνονται ταυτόχρονα, αλλά αυτό δεν εμποδίζει τη συστολή της διάμεσης ουσίας (Fredriksson et al., 2006): πιθανώς η **στοιχειομετρία αύξησης MMPs:TIMPs** ευθύνεται (von Lampe et al., 2000).

Οι MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 και η MT-MMP-1 έχουν βρεθεί αυξημένες στην **IBD** (Bailey et al., 1994; Baugh et al., 1998a; Baugh et al., 1999; Kirkegaard et al., 2004b; Pender et al., 1997; von Lampe et al., 2000). Οι MMP-1 και MMP-3 συγκεκριμένα εντοπίζονται αυξημένες σε ιστό πέριξ ελκών και κοκκιώδη ιστό τόσο σε UC όσο και σε CD (Matthes et al., 1993), εντονότερα εντός των μονοκυττάρων που διηθούν τον ιστό (Bailey et al., 1994), ενώ δεν ανιχνεύονται σε υγιή βλεννογόνο (Hammani et al., 1996). Δεδομένα υπάρχουν και για το ρόλο των MMP-1 και -3 στα χείλη δερματικών ελκών, με πιθανότητα όμως το τελικό αποτέλεσμα να είναι η ευόδωση της επούλωσης, αντίθετα με το έντερο, πιθανώς και λόγω δράσης τους επί των κερατινοκυττάρων (Podolsky, 1997; Saarialho-Kere, 1998; Vassalli and Saurat, 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο επαγωγίμος χαρακτήρας των MMP-1 και MMP-3 μπορεί να προβλεφθεί και από την δομή των προμοτόρων των γονιδίων τους, που διαθέτουν ποικίλες αλληλουχίες με μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Jaworski et al., 1999; Kirstein et al., 1996; Price et al., 2001). Επίσης, οι ινοβλάστες στα χείλη των ελκών εκφράζουν MMP-13 (Saarialho-Kere et al., 1996; Vaalamo et al., 1998) και οι MMP-2 και MT-MMP-1 επίσης έχουν δειχθεί να υπερεκφράζονται στα χείλη ελκών UC και να προάγουν την κυτταρική κίνηση μεσεγχυματικών κυττάρων (Pender et al., 2000).. Σημαντικό ρόλο μπορεί να έχει και η MMP-7 στα χείλη ελκών και στη διαδικασία επανεπιθηλιοποίησης κρίνοντας από δεδομένα που αφορούν το βρογχικό επιθήλιο (Dunsmore et al., 1998) και πρόδρομα ευρήματα στις εξελκώσεις IBD (Saarialho-Kere et al.,

1996). Παρόμοια ευρήματα υπάρχουν για τις MMP-9 και -10 (Schuppan and Freitag, 2004; Vaalamo et al., 1998). Επιπλέον, δραστικότητα MMP-12 υπάρχει στον ίδιο χιτώνα (lamina propria) του εντέρου και αυξάνεται στα υποεπιθηλιακά μακροφάγα από CD (Salmela et al., 2002; Salmela et al., 2001). Γενικά, η μεταλλοελαστάση MMP-12 παράγεται και είναι επαγωγίμη στα μακροφάγα με πιθανό ρόλο ιδίως στην κινητικότητά τους (Vaalamo et al., 1998). Οι κολλαγενάσες, ανιχνεύονται σε μικρά ποσά στα μονοκύρηννα ανεξαρτήτως φλεγμονής ή όχι του εντερικού τοιχώματος (Bailey et al., 1994).

Οι MMP-1, -3, -9 επίσης συσχετίζονται με συρίγγια σε IBD, και η MMP-9 συνδέεται με ενεργό φλεγμονή των **συρριγίων** (Kirkegaard et al., 2004a; Schuppan and Freitag, 2004). Αξίζει αναφοράς ότι η MT-MMP-1 μεταξύ άλλων ενεργοποιούν πολλές από τις MMPs που εκκρίνονται σε ανενεργό μορφή στην εξωκυττάρια ουσία (Deryugina et al., 1998) και βρίσκεται αυξημένη σε μυοϊνοβλάστες του ίδιου χιτώνα (lamina propria). Επίσης, οι MMP-3 και MMP-12 είναι μειωμένες σε **περιοχές εντερικής ίνωσης** και αυξημένες σε φλεγμαίνουσες περιοχές (Di Sabatino et al., 2009).

Πρώιμα ανοσοϊστοχημικά πειράματα με αντιορρό έδειξαν ελάχιστη έκφραση MMP-9 μέσα σε **πολυμορφοκύρηννα** του ίδιου χιτώνα, αλλά εντονότατη έκφραση MMP-9 καθ'όλο το πάχος του τοιχώματος σε φλεγμαίνουσα ή ινωτική μορφή CD, με μέγιστη στον ίδιο χιτώνα και στον υποβλεννογόνιο (Bailey et al., 1994). Οι στρωμελυσίνες MMP-3 και MMP-10 φυσιολογικά εκφράζονται μόνο στα αραιά **μονοκύρηννα** σε έντερο υγιών ή σε μη προσβεβλημένα τμήματα από ασθενείς με CD (Bailey et al., 1994). Σε φλεγμαίνοντα τμήματα CD ανιχνεύονται σε περιοχές υπερτροφίας του μυϊκού χιτώνα και σε UC σε περιοχές βλεννογονικής βλάβης (Bailey et al., 1994). Η MMP-7 εντοπίζεται στο εντερικό επιθήλιο ασθενών με IBD, κυρίως κοντά σε αποστήματα κρυπτών και σχετίζεται με

αποδόμηση της βασικής μεμβράνης (Saarialho-Kere et al., 1996; Wilson and Matrisian, 1996). Τα **ουδετερόφιλα**, τα οποία αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της φλεγμονωδών κυττάρων στην οξεία κολίτιδα, εκκρίνουν κυρίως τις ισομορφές MMP-9 και MMP-8 (Parks et al., 2004) και η αποθηκευμένη σε κυστίδια MMP-9 αποτελεί το 30% του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους (Ordenakker et al., 2001). *In vitro* απόδειξη της σημασίας της MMP-9 για την μετανάστευση των ουδετερόφιλων αποτελεί η αδυναμία τους να διαπεράσουν τεχνητή βασική μεμβράνη αν ανασταλεί η δραστηριότητα της MMP-9 (Delclaux et al., 1996). Είναι ενδιαφέρον στον σχεδιασμό του πλάνου της έρευνάς μας ότι οι MMP-2 και MMP-9 ανιχνεύονται κυρίως **πέριξ των επιθηλιακών κυττάρων των κρυπτών** που περιβάλλουν αποδομημένη θεμέλια ουσία και στις υποκείμενες εξελκώσεις (Schurpan and Hahn, 2000; Seifert et al., 1996; Tarlton et al., 2000). Ακόμη η MMP-3 στους **SEMFs** επάγεται από TNF-α και IL-1β με την IL-17 να δρα συνεργικά με τις δύο πρώτες κυτταροκίνες (Bamba et al., 2003a).

Η υπερέκφραση MMPs μπορεί να επιτρέψει την **εισβολή και μετανάστευση των ινοβλαστών** μέσω του τοιχώματος του εντέρου διευκολύνοντας την ανάπτυξη διατοχωματικής ινωτικής βλάβης (Stawowy et al., 2004). Ακόμη, η υπερέκφραση MMPs στην οξεία φάση μπορεί επίσης να εξυπηρετεί την **ευχερέστερη μετανάστευση και χημειοταξία φλεγμονωδών κυττάρων**, αλλά **απορρύθμιση** της λεπτής αυτής ισορροπίας MMPs και προϋνωτικών παραγόντων μπορεί να έχει ως επιβλαβή συνέπεια την διατήρηση της εξέλκωσης και τη δημιουργία συριγγίων. Η MMP-9 θεωρείται το τελικό βήμα του καταρράκτη ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεασών που αποδομεί τη θεμέλια ουσία και έχει δειχθεί ότι η επαγωγή της διαφέρει ανά τύπο κυττάρων και συνδέεται με πολλά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια των προφλεγμονωδών οδών, όπως τα NF-κΒ, AP-1 και

PKC (Fabunmi et al., 1996; Sato et al., 1993; Sato and Seiki, 1993). Γενικά, η παραγωγή gelatinases θεωρείται ότι έχει βασικό ρόλο στην **πρόσβαση των λευκοκυττάρων** μέσω λύσης εξωκυττάριας ουσίας και βασικών μεμβρανών μέχρι το επιθήλιο στα σημεία της φλεγμονής.

Μυοϊνοβλάστες στενώσεων έχει δειχθεί ότι ιδιοσυστασιακά υπερεκφράζουν και **TIMP-1**, η οποία εμποδίζει την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας και συνεπώς προάγει την παθολογία της ίνωσης (McKaig et al., 2003). Ο TGF-β ευοδώνει τη διαδικασία με την επαγωγή TIMP-1 και την αναστολή MMP-1 και MMP-3 (Ma and Chegini, 1999; Ma et al., 1999a). Η υπερέκφραση TIMP-1 κατά τη διαδικασία της επούλωσης έχει διαπιστωθεί και σε άλλα συστήματα, όπως σε αυτό της επούλωσης χρόνιων ελκών δέρματος (Cook et al., 2000). Σε κολλαγονώδη κολίτιδα στον υποβλεννογόνο χιτώνα, παράλληλα με την τοπική αύξηση του κολλαγόνου, παρατηρείται τοπική αύξηση της ανοσοθετικότητας για TIMP-1, που είναι πιθανό να ανατροφοδοτεί θετικά το κύκλωμα ίνωσης (Gunther et al., 1999). Η TIMP-3 έχει επίσης αναφερθεί αυξημένη σε ινοβλάστες πέριξ ελκών σε IBD (Vaalamo et al., 1998).

Πλην του ρόλου τους στην λύση της εξωκυττάριας ουσίας οι MMPs έχουν ενεργό ρόλο στην **ωρίμανση πλήθους χημειοκινών** που αυξάνονται στον φλεγμαίνοντα εντερικό βλεννογόνο, όπως οι CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (granulocyte chemotactic protein 2) και CXCL12 (McQuibban et al., 2001; McQuibban et al., 2000; McQuibban et al., 2002; Van Den Steen et al., 2003). Επίσης MMPs τροποποιούν τις CXCL7 και CXCL8 ώστε αυτές να δρουν χημειοτακτικά προς φλεγμονώδη κύτταρα (Kruidenier et al., 2006; Van den Steen et al., 2000).

MMPs υπερεκφράζονται και σε άλλες ασθένειες του γαστρεντερικού, όπως η MMP-3 στην νεκρωτική εντεροκολίτιδα πρόωρων νεογνών (Pender et al., 2003). Επίσης αυξημένες MMP-1, -3, -12 έχουν βρεθεί σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες και μακροφάγα και σαφώς έχουν παθοφυσιολογικό ρόλο στην κοιλιοκάκη (Daum et al., 1999; Salmela et al., 2001). Στην κολλαγονώδη κολίτιδα αντίθετα έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση των MMP-1 και MMP-13, γεγονός που συμβάλλει στην μειωμένη αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (Aigner et al., 1997; Bonderup et al., 2003; Gunther et al., 1999). Παρόμοια στην εκκολπωμάτωση οι MMP-1, -2, -3, -9 είναι μειωμένες, ενώ οι TIMP-1 και -2 αυξημένες (Mimura et al., 2004). Οι MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13 και -14 υπερεκφράζονται επίσης σε νεοπλασία παχέος εντέρου, συσχετίζονται με το στάδιο της νόσου και έχουν προγνωστική αξία, ενώ η MMP-12 σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση λόγω του ανασταλτικού της ρόλου στην αγγειογένεση (Zucker and Vacirca, 2004).

Οι **gelatinases** MMP-2 και MMP-9 ενέχονται επίσης στην μετανάστευση δενδριτικών κυττάρων και στην ικανότητα των T-κυττάρων να διασχίζουν τη βασική μεμβράνη (Leppert et al., 1995; Ratzinger et al., 2002). Ακόμη η μετανάστευση των λεμφοκυττάρων από το αίμα στους λεμφαδένες μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων των φλεβιδίων απαιτεί MMPs (Faveeuw et al., 2001). Επιπροσθέτως, οι MMPs δρουν ως μετατροπείς του TNF- $\alpha$  (Gearing et al., 1994) και ως ενεργοποιητές του ανενεργού TGF- $\beta$ 1 σε ενεργό (Imai et al., 1997). Σε οργανοκαλλιέργειες εμβρυϊκού εντέρου ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων με IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  συνοδεύεται από αύξηση των MMP-1 και -3, αποδόμηση γλυκοζαμινογλυκανών και ιστική καταστροφή μέσω του τοπικά παραγόμενου TNF- $\alpha$  (Pender et al., 1998b; Pender et al., 1997). Είναι ενδιαφέρον ότι η αυξημένη δραστηριότητα MMP εντοπίζεται στους SEMFs

(Pender et al., 1998b). Τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις του σημαντικού και ευρύτερου ρόλου των MMPs στη φλεγμονή.

## 3.6 Εξωκυττάρια ουσία

Συνοπτικά, η βασική μεμβράνη και η εξωκυττάρια ουσία του γαστρεντερικού σωλήνα δεν αποτελούν τα στατικά, αμιγώς δομικά στοιχεία που κάποτε θεωρούνταν ότι είναι. Αντίθετα, αντιπροσωπεύουν δυναμικό στοιχείο κυτταρικής ρύθμισης και σε μεγάλο βαθμό επηρεάζονται από τους μυοϊνοβλάστες.

### 3.6.1 Βασική Μεμβράνη

Τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας που εκκρίνονται από τους μυοϊνοβλάστες προσδίδουν μοναδικά χαρακτηριστικά στις κυτταρικές επιφάνειες, τις βασικές μεμβράνες και την εξωκυττάρια ουσία. Μέσω της ικανότητά τους να δεσμεύουν αυξητικούς παράγοντες ή να δρουν ως συνεργικοί υποδοχείς για αυτούς, να δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, να αλλάζουν την διακυτταρική πρόσφυση και τη μετανάστευση και να αναδιοργανώνουν το εξωκυττάριο περιβάλλον, τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και ιδιαίτερα οι πρωτεογλυκάνες μπορεί είτε να αναστέλλουν είτε να επάγουν κυτταρικές διεργασίες αναμόρφωσης, επισκευής ή καρκινογένεσης. (Powell et al., 2005)

Η **βασική μεμβράνη** ή βασικό έλασμα που χωρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα από τους SEMFs αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο IV, λαμινίνες, και πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης (nidogen, perlecan). Και οι δύο τύποι κυττάρων εκατέρωθεν (επιθηλιακά, SEMFs) συμβάλλουν στη σύνθεσή της, με το κολλαγόνο IV και τη nidogen κυρίως συντίθεται από

SEMFs. Η εξωκυττάρια ουσία του ίδιου χιτώνα (*lamina propria*) όμως κατά κύριο λόγο συντίθεται από τοπικούς μυοϊνοβλάστες και ινοβλάστες. (Powell et al., 1999a; Powell et al., 1999b)

Οι **πρωτεογλυκάνες** είναι πρωτεΐνες που ομοιοπολικά συνδεδεμένες με τουλάχιστον μία αλυσίδα γλυκοζαμινογλυκάνης: χονδροϊτίνη, δερματάνη, κερατάνη, ή ηπαράνη. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις χάρη στην ικανότητά τους να δεσμεύουν αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες, να ενεργούν ως συνεργικοί υποδοχείς για διάφορους αυξητικούς παράγοντες, δρουν ως συνδέτες (*ligands*) για υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και να τροποποιούν κυτταρικές διαδικασίες όπως η πρόσφυση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση (Iozzo, 1998). Για παράδειγμα, πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, χρησιμεύουν ως συνεργικοί υποδοχείς για μέλη της οικογένειας του TGF- $\beta$  και άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι VEGF, HGF, IGF-2, Wnts, Sonic hedgehog homolog (Shh), FGF-1 και FGF-2 και έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία βαθμιδώσεων συγκέντρωσης Wnt και Shh (Iozzo, 1998). Η ντεκορίνη, μία εκκρινόμενη πρωτεογλυκάνη θειϊκή χονδροϊτίνης, δεσμεύει επίσης μέλη της οικογένειας του TGF- $\beta$  με υψηλή συγγένεια και, ανάλογα με το περιβάλλον, μπορεί είτε να αναστείλει ή να αυξήσει τη βιοδραστικότητα του TGF- $\beta$ . Η ντεκορίνη αλληλεπιδρά επίσης με τον υποδοχέα του EGF, οδηγώντας σε παροδική ενεργοποίησή του που ακολουθείται από γρήγορη καταστολή της δραστηριότητάς του. Υπερέκφραση ντεκορίνης με τη χρήση του ανασυνδυασμένου αδενοϊού μειώνει δραματικά την ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων καρκίνου του παχέος εντέρου και μικροένεση της ντεκορίνης στον πυρήνα καταστέλλει την μετάσταση του καρκίνου του μαστού σε ζωικά μοντέλα (Reed et al., 2005). Μεσεγχυματικά έκφραση των



μελών της οικογένειας της συνδεκάνης, υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα FoxL1, επηρεάζει την ανάπτυξη και επιβίωση του επιθηλίου, τροποποιώντας τη σηματοδότηση Wnt (Perreault et al., 2005).

### 3.6.2 Ίνωση

Η ίνωση χαρακτηρίζεται από μεταβολές στο μεταβολισμό του κολλαγόνου, δηλαδή του βασικού συστατικού της εξωκυττάριας ουσίας, που οδηγεί σε συσσώρευσή του στον ιστό (Mauch et al., 1993; Varga et al., 1987). Υπέρ της **αύξησης του κύκλου αναβολισμού-καταβολισμού** του κολλαγόνου στη CD και όχι της στατικής συσσώρευσής του είναι τα αυξημένα επίπεδα του C-τελοπεπτιδίου στον ορό ασθενών με CD (Kjeldsen et al., 1995). Στην ελκώδη κολίτιδα η μειωμένη εξωκυττάρια εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I και III, παρά τα αυξημένο αντίστοιχο mRNA, μπορεί να υποδηλώνει τον αυξημένο καταβολισμό του (Matthes et al., 1992).

Οι **τύποι κολλαγόνου** I και III αποτελούν την πλειοψηφία του κολλαγόνου εντός φυσιολογικού παρεγχύματος σε όλο το ανθρώπινο σώμα, μαζί με μικρότερες ποσότητες των τύπων κολλαγόνου IV, V και VI. Το κολλαγόνο τύπου I είναι το κύριο συστατικό του δέρματος, των τενόντων και των οστών. Έχει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό και είναι υπεύθυνο για τη μηχανική σταθερότητα του συνδετικού ιστού. Το κολλαγόνο τύπου III παρουσιάζει παρόμοια κατανομή με το τύπου I και κατά πάσα πιθανότητα συμβάλλει στην ελαστικότητα και την ευελιξία του ιστού. Τα απόλυτα ποσά και σχετικές αναλογίες του κολλαγόνου τύπου I και III διαφέρουν πολύ μεταξύ τους σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς. Γενικά, στα πρώιμα στάδια ίνωσης σε πλήθος οργάνων αυξάνεται ο λόγος κολλαγόνου τύπου III σε σχέση με το κολλαγόνο τύπου I. Αντίθετα, σε όψιμα στάδια

ίνωσης η ενεργός εναπόθεση κολλαγόνου υποχωρεί και ο λόγος του κολλαγόνου τύπου III:I μειώνεται (Aycocock and Seyer, 1989; Baskin et al., 1993; Wegrowski et al., 1988). Οι μεταβολές είναι παρόμοιες και στην ινωτική CD του εντέρου και η σταδιοποίηση αυτή της ίνωσης είναι σχετικά ακριβής και για την εντερική ίνωση (Graham et al., 1988; Kjeldsen et al., 1995).

Μεταξύ της διάμεσης ουσίας επούλωσης και αυτής του ινωτικού ιστού εντέρου πλην των ποσοτικών διαφορών σε διάμεση ουσία υπάρχουν και ποιοτικές. Πιο συγκεκριμένα σημαντικός παράγοντας είναι η **αναλογία τενασκίνης/undulin**. Η τενασκίνη θεωρείται δείκτης πολλαπλασιασμού των μεσεγχυματικών κυττάρων και μετανάστευσης αυτών, ενώ η undulin βρίσκεται συνήθως σε πυκνή και διαφοροποιημένη διάμεση ουσία. Η διάκριση της διάμεσης ουσίας σε περιέχουσα σημαντικά ποσά τενασκίνης ή undulin έχει ήδη περιγραφεί στο πλαίσιο εναποθέσεων διάμεσης ουσίας που υπόκεινται σε ταχεία αναδιαμόρφωση, όπως η εξωκυττάρια ουσία όγκων ή η ηπατική ίνωση (Knittel et al., 1992; Schurpan et al., 1990). Έτσι, η εξωκυττάρια ουσία που υπόκειται σε γρήγορη λύση και επανασύνθεση, ανεξάρτητα από τη σύνθεση του κολλαγόνου, αποτελείται από χαλαρά συνδεδεμένες ίνες κολλαγόνου με υψηλή περιεκτικότητα σε τενασκίνη. Αντίθετα, η διάμεση ουσία ουλώδους ιστού, όπως αυτή της CD ή ηπατικής κίρρωσης παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε undulin, αλλά χαμηλή σε τενασκίνη (Becker et al., 1993; Klingel et al., 1993; Milani et al., 1994; Schurpan et al., 1990; Zhang et al., 1993). Η undulin συμπυκνώνει τη διάμεση ουσία με τη δέσμευση και τη διασύνδεση των τύπων κολλαγόνου I, III, V, και VI και της decorin (Ehnis et al., 1997; Ehnis et al., 1996; Ehnis et al., 1998). Αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν την κλινική συνέπεια της εντερικής στένωσης επί ίνωσης σε CD.

## 3.7 Ενδοθηλίνες

Οι ενδοθηλίνες είναι μία οικογένεια αγγειοδραστικών πεπτιδίων και η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και έχει δειχθεί ότι ασκεί πολυλειτουργικό ρόλο σε ποικιλία ιστών και κυττάρων (Yanagisawa et al., 1988). Αρχικά μελετήθηκαν υποδοχείς και δραστικότητα σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα τοιχώματος αγγείων (Yanagisawa et al., 1988). Η έκφραση όμως υποδοχέων ενδοθηλινών σε πλήθος ιστών και κυττάρων και η επακόλουθη έρευνα ανέδειξε τους πολλαπλούς ρόλους της οδού πλην της ρύθμισης του αγγειακού τόνου, όπως για παράδειγμα στο νευρο-ενδοκρινικό σύστημα (Stojilkovic and Catt, 1996).

### 3.7.1 Δομή – Ισομορφές - Υποδοχείς

Η ενδοθηλίνη (ET) είναι πεπτίδιο 21-αμινοξέων. Συναντάται σε τρεις ισομορφές, ET-1, ET-2 και ET-3, που όλες προέρχονται από το ίδιο πρόδρομο πεπτίδιο που ονομάστηκε «μεγάλη ενδοθηλίνη» (Davenport, 2002; Yanagisawa et al., 1988). Το πεπτίδιο αυτό προέρχεται από αρχική επεξεργασία του μεταγραφήματος του mRNA προ-προ-ενδοθηλίνης (Marsen et al., 1999). Ακολούθως η «μεγάλη ενδοθηλίνη» διασπάται μεταξύ των αμινοξέων τρυπτοφάνη στη θέση 21 και βαλίνης ή ισολευκίνης στην 22 που καταλύεται από το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης (endothelin converting enzyme-ECE) (Xu et al., 1994). Το ένζυμο αυτό συναντάται σε τρεις ισομορφές με την ECE-1 να είναι η κυρίαρχη και αποτελεί βασικό βήμα ρύθμισης των συγκεντρώσεων ενεργής ενδοθηλίνης (Shao et al., 2003).

Υπάρχουν δύο διακριτοί τύποι υποδοχέων των ενδοθηλινών: endothelin receptor (ETR) - A και -B. (Rubanyi and Polokoff, 1994; Sokolovsky, 1995). Οι υποδοχείς ενδοθηλινών είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από τρία τμήματα: ένα επίμηκες αμινοτελικό εξωκυττάριο τμήμα, επτά διαμεμβρανικές έλικες και το ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Οι δύο υποδοχείς έχουν μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας στη διαμεμβρανική περιοχή και στο ενδοκυττάριο άκρο και μεγαλύτερο βαθμό ανομοιότητας στο εξωκυττάριο τμήμα και συγκεκριμένα στις έλικες 1 και 3 (Orgenorth et al., 1992). Τα γονίδια των ETR-A (Hosoda et al., 1992) και ETR-B (Arai et al., 1993) εδράζονται στα χρωμοσώματα 14 και 13 αντίστοιχα. Οι τρεις ενδοθηλίνες προσδέονται με διαφορετική χημική συγγένεια με τους δύο ισομορφές υποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα, ο ETR-A είναι εκλεκτικός για την ET-1 (ET-1 > ET-2 > ET-3) ενώ ο ETR-B παρουσιάζει ίδια συγγένεια και για τις τρεις τύπους ενδοθηλίνης (Arai et al., 1990; Davenport, 2002; Inoue et al., 1989; Sakurai et al., 1990; Sokolovsky, 1995). Για την πρόσδεση των ενδοθηλινών στους υποδοχείς τους απαιτείται  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  (Juan et al., 2008).

### 3.7.2 Ενδοκυττάρια οδοί

Οι υποδοχείς των ενδοθηλινών είναι συζευγμένοι αλλοστερικά και λειτουργικά με G-πρωτεΐνες. Downstream των ενδοθηλινών, **ενδοκυττάρια** διεγείρεται η οδός της φωσφολιπάσης C με παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης και 1,2-διακυλογλυκερόλης, που μεταξύ άλλων οδηγεί σε διφασική αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{++}$  και έκφραση των c-fos και c-myc (Takuwa et al., 1989). Συγκεκριμένα η ET-1 όταν συνδέεται με τον ETR-A, ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C-β, η οποία αυξάνει το σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης και διακυλογλυκερόλης, οδηγώντας σε αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης  $Ca^{++}$  και ενεργοποίηση της PKC, αλλά και την ενεργοποίηση των οδών των

MAPK και των ERK (Battistini et al., 1995; Douglas and Ohlstein, 1997; Juan et al., 2008; Kawana et al., 1995; Lauth et al., 2000; Lee et al., 1990; Lee et al., 1991; Orphenorth, 1995; Wang et al., 1995; Wang et al., 1992). Ακόμη προκαλεί αύξηση των επιπέδων ενδοκυττάρου cAMP (Juan et al., 2008; Sokolovsky, 1995). Η σύνδεση της ET-1 με τον ETR-B στα ενδοθηλιακά επάγει τη σύνθεση προστακυκλίνης και NO, της οποίας η απελευθέρωση προς τα λεία μυϊκά κύτταρα μεσολαβεί προσωρινή αγγειοδιαστολή (Sakurai et al., 1990).

Η συστολή των λείων μυϊκών ινών από τις ενδοθηλίνες γίνεται μέσω της κλασσικής οδού φωσφορυλίωσης της μυοσίνης από ειδική κινάση η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα καλμοδουλίνης-  $Ca^{++}$  που σχηματίζεται με την αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{++}$ , χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί η συμμετοχή και της οδού της GTPάσης rhoA και ακολούθως της σχετικής κινάσης rho associated kinase επί της μυοσίνης (Somlyo and Somlyo, 1994; Somlyo and Somlyo, 2000).

Ο **TGF- $\beta$**  θεωρείται επαγωγέας των ενδοθηλινών μέσω του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 και με διαφορετική ενδοκυττάρια οδό από αυτή των SMADs (Castanares et al., 2006; Rodriguez-Pascual et al., 2003). Η οδός έχει δείχθει ότι ενεργοποιείται σε συνθήκες τραυματισμού σε κύτταρα Ito, ενώ αμφισβητείται σε ενδοθηλιακά (Rodriguez-Vita et al., 2005; Shao et al., 2003; Shi-Wen et al., 2006). Πάντως δεν διαφαίνεται η ύπαρξη μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης αυτορρύθμισης της οδού της ενδοθηλίνης, τουλάχιστον στα λεία μυϊκά κύτταρα (Rodriguez-Vita et al., 2005).

### 3.7.3 Φυσιολογία - Παθοφυσιολογία

Μεσεγγυματικά κύτταρα από πολλούς ιστούς εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς ενδοθηλινών (Levin, 1995). Ο πρωταρχικός και καλύτερα διερευνημένος φυσιολογικός

ρόλος του συστήματος των ενδοθηλινών είναι η **ρύθμιση του τόνου του αγγειακού τοιχώματος** (Yanagisawa et al., 1988) με τον ETR-A να διαμεσολαβεί αγγειοσυστολή (Arai et al., 1990) και τον ETR-B προσωρινή αγγειοδιαστολή (Sakurai et al., 1990). Συστηματική χορήγηση ET-1 αυξάνει την δραστηριότητα του συμπαθητικού τμήματος του αυτόνομου νευρικού συστήματος και της αρτηριακής πίεσης μέσω του ETR-A (Li et al., 1998; Nakamura et al., 1999). Ένας αριθμός μελετών σε μοντέλα υπερτασικών αρουραίων λόγω χορήγησης δεοξυκορτικοστερόνης δείχνουν ότι στο μοντέλο αυτό υπάρχουν αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης πλάσματος (Lariviere et al., 1993) και η χορήγηση μη εκλεκτικού ανταγωνιστή των ETR-A και ETR-B μερικώς αναστρέφει το φαινόμενο (Li et al., 1994). Σε επίπεδο επιλοκών της υπέρτασης ανταγωνιστές του ETR-A εμποδίζουν την εναπόθεση κολλαγόνου στα μυοκάρδιο, υπενδοκάρδιο, επικάρδιο και στο αγγειακό τοίχωμα, όπως επίσης και την αύξηση του TGF- $\beta$ 1 και της φιβρονεκτίνης στο μυοκάρδιο (Ammarguella et al., 2001; Ammarguella et al., 2002), αν και δεν είναι ασφαλής η απόδοση των παθολογοανατομικών αυτών μεταβολών στην υπέρταση, καθώς πάντα υπάρχει η πιθανότητα να πρόκειται για άμεση συνέπεια της δεοξυκορτικοστερόνης. Ο ανταγωνισμός του ETR-A επίσης αναστέλλει την αντιρροπιστική αύξηση της δραστηριότητας gelatinases και την επαγωγή μορίων αγγειακής προσκόλλησης στο μυοκάρδιο (Ammarguella et al., 2002). Εκτός από την άμεση αγγειοσυσπαστική επίδρασή της, η ET-1 ενισχύει τις υπερτασικές δράσεις των άλλων αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως της αγγειοτενσίνης II (Yoshida et al., 1992), της νορεπινεφρίνης και της σεροτονίνης (Yang et al., 1990). Η ET-1 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών (Brown and Littlewood, 1989; Guo et al., 1996), η οποία μπορεί να προκαλέσει πάχυνση του αγγειακού τοιχώματος. Επιπλέον, επηρεάζει την εξέλιξη της καρδιακής ίνωσης (Hafizi et al., 2004) και

αυξάνεται και σε αγγειακή βλάβη αθηροσκληρωτικής αρχής (Lerman et al., 1991; Mitani et al., 2000). Όλες αυτές οι δράσεις συμβάλουν στην ανάπτυξη της υπέρτασης και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Αλλά η ενδοθηλίνη μέσα από πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια έχει ένα ευρύτερο φάσμα βιολογικών δράσεων πλην του αγγειόσπασμου, συμπεριλαμβανομένων της **σύσπασης των βρόγχων** (Held et al., 1997), του **κυτταρικού πολλαπλασιασμού** (Hafizi et al., 1999; Piacentini et al., 2000) και της **ρύθμισης της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών** (Simoncini et al., 1999; Yasin et al., 1994). Ακόμη οι ενδοθηλίνες ευνοούν τη **μετανάστευση** ενδοθηλιακών, λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών και λείων μυϊκών κυττάρων (Kohno et al., 1998; Noiri et al., 1997; Peacock et al., 1992; Sampiao et al., 2000) και αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών τύπων μεσεγχυματικών κυττάρων, όπως η κυτταροσειρά εντερικών ινοβλαστών 3T3, τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα της αορτής, αλλά όχι στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα ή κύτταρα του Ito (Battistini et al., 1993; Mallat et al., 1995; Takuwa et al., 1989). Μεσολαμβάνουν την πρώιμη συστολή ινοβλαστών δέρματος σε μοντέλα επούλωσης πριν αυτοί αποκτήσουν τελικό φαινότυπο μυοϊνοβλάστη και επάγουν την μετατροπή ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες στο δέρμα (Shephard et al., 2004a; Shi-Wen et al., 2004). Όμοιο ρόλο στην επαγωγή, συστολή και ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων (κυττάρων του Ito) φέρονται να έχουν και στην ηπατική ίνωση μέσω του υποδοχέα ETR-B (Rockey, 1995; Rockey and Cello, 1993; Rockey and Chung, 1996). Συμβατός με τα ανωτέρω ευρήματα φαινότυπος παρατηρείται σε υπερέκφραση ανθρώπινου ET-1 με γενετικούς χειρισμούς σε διαγονιδιακά ποντίκια στο νεφρό: παρατηρούνται σπειραματοσκλήρυνση, διάμεση **ίνωση** και νεφρικές κύστες (Hoche et al., 1997), αλλά και *in vitro* παρατηρείται συστολή των μεσαγγειακών κυττάρων του νεφρού

υπό ενδοθηλίνες (Simonson and Dunn, 1990). Και στη νεφρική ίνωση σε ασθενείς έχει ανιχνευθεί αυξημένη ET-1 downstream της αγγειοτενσίνης (Hochoer et al., 1997).

Βασικός μηχανισμός αύξησης της παραγωγής ET-1 σε διάφορους ιστούς είναι η **άσκηση μηχανικής τάσης** (Chen et al., 2001b; Malek et al., 1993; Ruwhof et al., 2000; van Wamel et al., 2001; Wang et al., 1993). Έτσι, οι ενδοθηλίνες ευθύνονται μερικώς για την αναμόρφωση ιστών μετά από φλεγμονή και για την ίνωση μετά από την άσκηση τάσης (van Wamel et al., 2001; Yamazaki et al., 1996).

Όπως προαναφέρθηκε, οι ενδοθηλίνες ενέχονται στην κυτταρική διαίρεση (Komuro et al., 1988; Nakaki et al., 1989; Ohnishi et al., 1989) και παρουσιάζουν αυξημένα συστηματικά και ιστικά επίπεδα σε διαφορετικές **νεοπλασίες**, όπως του πνεύμονα (Giaid et al., 1990), ήπατος (Ishibashi et al., 1993), προστάτη (Nelson et al., 1996) και μαστού (Kojima and Nihei, 1995; Yamashita et al., 1992). Εκκρίνονται από πολλά είδη επιθηλιακών νεοπλασματικών κυττάρων, όπως παγκρεατικών (Oikawa et al., 1994), ωοθήκης (Moraitis et al., 1997), μαστού (Baley et al., 1990), στομάχου (Mathieu et al., 1998), νεφρού (Shichiri et al., 1989) και προστάτη (Kusuhara et al., 1990) και αποτελούν αυτοτροφικούς παράγοντες για αυτά (Moraitis et al., 1999; Shichiri et al., 1991). Ειδικά σε επιθηλιακή κολονική νεοπλασία με ή χωρίς ηπατικές μεταστάσεις έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα, στον νεοπλασματικό ιστό και στους γειτονικούς ιστούς (Inagaki et al., 1992), καθώς και υποδοχείς στα νεοπλασματικά κύτταρα (Asham et al., 2001; Asham et al., 1998). Κυτταροσειρές επιθηλιακών όπως τα HT-29 διαθέτουν υποδοχείς ενδοθηλίνης και έχουν διερευνηθεί λειτουργίες τόσο του ETR-A (Ali et al., 2000) όσο και του ETR-B. Τα συμπεράσματα είναι συγκεκριμένα για το αν η ET-1, πιθανώς μέσω του ETR-A, αφ' εαυτής επιδρά στον πολλαπλασιασμό των HT-29 (Ali et al., 2000; Peduto Eberl et al., 2003).



Αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως αυτή προκύπτει σε **σακαρώδη διαβήτη** τύπου 2 (Kawamura et al., 1992; Takahashi et al., 1990), παχυσαρκία (Ferri et al., 1995) και υπέρταση (Kohno et al., 1990). Επιπλέον, η ET-1 έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη σε λιποκύτταρα αρουραίων (Lee et al., 1998) και σε λεία μυϊκά κύτταρα αρτηριών (Jiang et al., 1999) *in vitro* και σε αρουραίους *in vivo* (Juan et al., 1996). Σε υγιείς ανθρώπους, εξωγενής χορήγηση ET-1 προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη, μειώνοντας την ινσουλινοεξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης στους σκελετικούς μύες, χωρίς να μειώνει τη ροή του αίματος στους σκελετικούς μύες (Ottosson-Seeberger et al., 1997). Επιπλέον, η ET-1 ίσως διαμεσολαβεί την ανάπτυξη της υπέρτασης που συνοδεύει την αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως προτείνεται από δεδομένα σε *in vivo* μοντέλα με ποντικούς που προσλαμβάνουν *per os* φρουκτόζη και στους οποίους εγχέεται ινσουλίνη, και η υπέρταση αυτή μπορεί να προληφθεί με επιτυχία με χορήγηση ανταγωνιστών του ETR-A (Juan et al., 1998; Juan et al., 2004). Ακόμη ενδοθηλίνες ενέχονται στην ομοιόσταση νερού και αλάτων (Goraca, 2002; Mortensen, 1999).

### **3.7.3.1 Παθοφυσιολογία Εντέρου**

Η ενδοθηλίνη έχει σημαντικό ρόλο και στο φυσιολογικό έντερο και στην εντερική φλεγμονή (Inagaki et al., 1991). Ινοβλάστες από πολλούς ιστούς εκφράζουν ETR-A και ETR-B (Levin, 1995) και αυτό έχει επιβεβαιωθεί σε **κολονικούς ινοβλάστες** (Knowles et al., 2011). Οι ενδοθηλίνες, με πιο μελετημένη την ET-1, έχουν βρεθεί να ενεργοποιούν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η συστολή και η έκφραση παραγόντων αναδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, αλλά και η φαινοτυπική μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες (Shi-Wen et al., 2004; Shi-Wen et al., 2001; Xu et al., 2004). Η ενδοθηλίνη 1

έχει δειχθεί συγκεκριμένα ότι προκαλεί χημειοταξία και συστολή κολονικών μυοϊνοβλαστών (Kernochan et al., 2002), αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, προκαλεί συστολή τους, επάγει σε αυτούς CTGF και κολλαγόνο μέσω και των δύο υποδοχέων της και έχει χημειοτακτική δράση μέσω του ETR-B (Knowles et al., 2011), παρόμοια με τις απαντήσεις ινοβλαστών δέρματος και πνεύμονα (Gallelli et al., 2005; Piacentini et al., 2000; Xu et al., 1998).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ειδικά η **παράμετρος της συσταλτικότητας** δεν τροποποιείται από καμία από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 και TNF-α, αλλά μόνο από την ET-1 (Kernochan et al., 2002). Ειδικά για τον πολλαπλασιασμό έχει δειχθεί έμμεση δράση με ταυτόχρονη αναστολή λειτουργίας των υποδοχέων ενδοθηλίνης (Knowles et al., 2011), αλλά όχι άμεσα με την εξωγενή ενδοθηλίνη (Kernochan et al., 2002), εύρημα που παραπέμπει στον σημαντικό ρόλο της ενδογενώς παραγόμενης ενδοθηλίνης. Η ET-1 επίσης έχει βρεθεί να διαμορφώνει το σχήμα των SEMFs και να επάγει τη μετανάστευσή τους μέσω ETR-B και Rho κινασών (Furuya et al., 1994; Tangkijvanich et al., 2001).

## 3.8 CTGF

Ο αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού (connective tissue growth factor- CTGF) είναι ένα πεπτίδιο πλούσιο σε κυστεΐνη, που αρχικά ταυτοποιήθηκε σε υπερκείμενα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου, τα οποία εμφανίζουν χημειοτακτική και μιτογόνο δράση προς μεσεγχυματικά κύτταρα, παρόμοια με τη δράση του PDGF (Bradham et al., 1991). Ο CTGF διεγείρει μεσεγχυματικού τύπου κύτταρα, περιλαμβανομένων ινοβλαστών, χονδροκυττάρων και οστεοβλαστών, προς

πολλαπλασιασμό και παραγωγή δομικών συστατικών του συνδετικού ιστού, όπως κολλαγόνο 1 και φιβρονεκτίνη, αλλά και προς αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας.

### 3.8.1 Φλεγμονή - Επούλωση

Η θρομβίνη, ωστόσο, έχει μια σειρά από άλλες σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που δεν είναι άμεσα σχετιζόμενες με την πήξη. Διασπά τους protease-activated receptors (PARs) -1, -3 και -4, που είναι παρόντες στην επιφάνεια των πολλών τύπων κυττάρων (Asokanathan et al., 2002; Coughlin, 1999). Μέσα από αυτές τις δράσεις, η θρομβίνη πιστεύεται ότι συμμετέχει σε απαντήσεις επισκευής και αναμόρφωσης αυξάνοντας την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ινοβλαστών, καθώς και την παραγωγή δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και αυξητικών παραγόντων (Benezra et al., 1993; Bogatkevich et al., 2001; Chambers et al., 1998; Dawes et al., 1993; Herbert et al., 1994). Η επικοινωνία μεταξύ φλεγμονής και ενεργοποίησης του εξωγενούς καταρράκτη της πήξης έχει περιγραφεί σε διάφορα μοντέλα της νόσου (Mackman, 2009).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι και ο **FVIIa μπορεί επίσης να προκαλέσει ενδοκυττάρια σηματοδότηση ανεξάρτητη από τον καταρράκτη της πήξης** (Camerer et al., 1996b; Poulsen et al., 1998; Rottingen et al., 1995). Ακόμη επηρεάζει την κυτταρική κινητικότητα (Muller et al., 1999). Η πρόσδεση του FVIIa στον TF προκαλεί ενδοκυττάρια κινητοποίηση του  $Ca^{++}$  μέσω της εξειδικευμένης για τη φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη φωσφολιπάσης C (Camerer et al., 1996b; Rottingen et al., 1995) καθώς και την ενεργοποίηση των MAPK (Camerer et al., 1999; Poulsen et al., 1998) σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Στον πνεύμονα αυξημένα επίπεδα θρομβίνης έχουν αναφερθεί σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage- BAL) μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο σε ασθενείς με άσθμα, και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην επίδραση του BAL επάνω σε ινοβλάστες (Terada et al., 2004). Η θρομβίνη έχει συνδεθεί με την παραγωγή προκολλαγόνου (Howell et al., 2001) και την έκφραση CTGF σε ινοβλάστες πνεύμονα μέσω του υποδοχέα PAR-1 (Howell et al., 2001; Yu et al., 2009). Επιπλέον, έχει δειχθεί συσχέτιση μεταξύ πήξης και φλεγμονώδους αντίδρασης σε ασθενείς με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (acute respiratory distress syndrome- ARDS), συμπεραίνοντας ότι η έκφραση της TF από ουδετερόφιλα στο κυψελιδικό μικροπεριβάλλον είναι εξαρτώμενη από C5a και TNF-α (Kambas et al., 2008). Ακόμη έχει βρεθεί αυξημένος TF σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με βρογχοπνευμονική δυσπλασία (Kambas et al., 2011; Niu et al., 1998).

Η θρομβίνη επίσης μπορεί να τροποποιήσει απαντήσεις **επιθηλιακών** κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης (Suzuki et al., 2005) και την επαγωγής mucin (Chokki et al., 2004). Η δέσμευση του FVIIa στον TF σε κυτταροσειρά κερατινοκυττάρων προκαλεί δόσοεξαρτώμενες απαντήσεις ενδοκυττάριου ασβεστίου, φωσφορυλίωση και των τριών διαφορετικών οδών των MAPK, ERK-1/2, p38, JNK και αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του egr-1 (Camerer et al., 1999). Η ενεργοποίηση του TF, πλην της ενεργοποίησης του μηχανισμού της πήξης ενεργοποιεί ενδοκυττάρια οδούς που αυξάνουν τη μεταγραφή αρκετών γονιδίων με σημαντικότερα αυτά των μεταγραφικών παραγόντων c-fos, ETR101, BTEB2, fra-1, c-myc, egr-1, του αποσταθεροποιητή του mRNA TTP, των τροφικών παραγόντων CTGF, amphiregulin, heparin binding EGF-like (hbEGF) και FGF-5, των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-8, IL-1b, leukemia inhibitory factor (LIF) και macrophage inflammatory protein 2-alpha (MIP2α), των μεταλλοπρωτεασών MMP-1 και MMP-3 και

άλλων, όπως τα RhoE, uPAR, plasminogen activator inhibitor (PAI)-2, Jagged1, της ενεχόμενης στην ωρίμανση του mRNA cyclophilin, του growth arrest and DNA damage 45 (GADD45), του υποδοχέα προσταγλανδινών PGE<sub>2</sub>R (Camerer et al., 2000). Πειράματα σε τρία διαφορετικά είδη κυττάρων (επιθηλιακά παχέος εντέρου, ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα) έδειξαν ότι το σύμπλοκο TF-FVIIa πυροδοτεί ακόμη τη μεταγραφή των VEGF (Ollivier et al., 1998) και uPAR (Taniguchi et al., 1998). Σε ινοβλάστες ο TF μειώνει την αναγκαία συγκέντρωση PDGF που απαιτείται για την αύξηση της κινητικότητάς τους (Taniguchi et al., 1998).

Το pattern επαγωγής γονιδιακής δραστηριότητας που ενεργοποιείται από τον TF παραπέμπει και προς την κατεύθυνση της **διαδικασίας επούλωσης** λύσης της συνέχειας του βλενογόννου, στην οποία υπάρχουν δεδομένα για ενεργοποίηση των egr-1, c-fos και c-myc, που σχετίζονται μεταξύ άλλων και με την επαγόμενη από τροφικούς παράγοντες κινητικότητα (Dieckgraefe and Weems, 1999; Martin, 1997; Pawar et al., 1995). Οι hbEGF και AR θεωρούνται βασικοί παράγοντες επούλωσης τραύματος, όντας αυξημένοι εξωκυττάρια στην πρόκληση τραυματισμού έλκοντας χημειοτακτικά επιθηλιακά και ινοβλάστες και ευοδώνοντας τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών (Martin, 1997; Raab and Klagsbrun, 1997; Stoll et al., 1997). Ο CTGF και ο μιτογόνος παράγοντας των ινοβλαστών FGF-5 επάγουν την ανάπτυξη συνδετικού ιστού και την αγγειογένεση (Igarashi et al., 1993; Pawar et al., 1995; Zhan et al., 1988). Οι CXC χημειοκίνες IL-1β, IL-8, MIP2a, ο σχετιζόμενος με την IL-6 LIF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε φλεγμονή και τραύμα σε πολλούς ιστούς (Vita et al., 1993). Ο RhoE είναι σημαντικός για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Guasch et al., 1998) και το σύμπλεγμα uPAR-uPA ενεργοποιεί το πλασμινογόνο που με τη σειρά του ενεργοποιεί πλήθος μεταλλοπρωτεασών (Romer et al.,

1996a; Romer et al., 1996b; Romer et al., 1994). Οι MMP-1 και MMP-3 αποδομούν, πλην του κολλαγόνου, πλήθος άλλων δομικών πρωτεϊνών και ενεργοποιούν άλλες μεταλλοπρωτεάσες (Hasty et al., 1987; Knauper et al., 1996; Pilcher et al., 1997). Στο εύρος των επαγόμενων γονιδίων, υπάρχουν και γονίδια που παρέχουν μηχανισμούς αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της διαδικασίας, όπως το fra-1, που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που προσδέεται και απενεργοποιεί το c-Jun (Yoshioka et al., 1995). Το σύμπλοκο TF-FVIIa έχει σημαντικό ρόλο στη χημειοταξία λείων μυϊκών κυττάρων (Sato et al., 1997), αλλά και κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης.

Εκτός από τα ενδοθηλιακά και τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα έχουν πρόσφατα δειχθεί ότι εκφράζουν τον TF (Kambas et al., 2008; Maugeri et al., 2006; Rafail et al., 2008; Redecha et al., 2008; Redecha et al., 2007; Ritis et al., 2006). Οι **φλεγμονώδεις μεσολαβητές** C5a (Kambas et al., 2008; Kourtzelis et al., 2010; Maugeri et al., 2006; Redecha et al., 2008; Redecha et al., 2007; Ritis et al., 2006), TNF- $\alpha$  (Kambas et al., 2008; Rafail et al., 2008; Szotowski et al., 2005) και IL-1 $\beta$  (Parry and Mackman, 2000) **είναι όλοι επαγωγείς του TF.**

Είναι πιθανό ότι η υπερέκφραση του CTGF σε αθηρωματικές πλάκες θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης τοπικής έκφρασης του TF. Η ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από τον TF οδού της πήξης δεν παίζει μόνο σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της θρομβογονικότητας της αθηρωματικής πλάκας, αλλά μπορεί επίσης να έχει και άλλες επιπτώσεις στο τοίχωμα των αγγείων (Taubman et al., 1997). Για παράδειγμα, η θρομβίνη (Huang and Ives, 1987; McNamara et al., 1993), ο FXa (Gasic et al., 1992), το σύμπλοκο FVIIa-TF εμφανίζονται να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και, συνεπώς, μπορούν να διαδραματίσουν έναν ρόλο στην υπερπλασία του έσω

χιτώνα των αγγείων. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το σύμπλοκο FVII-TF μπορεί να έχει άμεσες επιπτώσεις στη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων της αορτής και στον πολλαπλασιασμό εμβρυϊκών λείων μυϊκών κυττάρων νεογνικής αορτής (Kamikubo et al., 1997; Sato et al., 1997; Sato et al., 1996). Είναι πιθανό ότι κάποια, αν όχι όλα, αυτά τα φαινόμενα είναι διαμεσολαβούμενα από FVIIa-TF και την επαγόμενη έκφραση του CTGF και γεννούν το ερώτημα της συμμετοχής του TF στην **εντερική ίνωση**.

Γενικά, τέτοιας φύσεως δράσεις της θρομβίνης και του TF δεν σχετίζονται άμεσα με την πήξη, αλλά είναι συμβατές έμμεσα με αυτήν, υπό την ευρύτερη έννοια ότι η πήξη, η ιστική επισκευή και αναδιαμόρφωση μπορούν να θεωρηθούν σε κάποιο βαθμό συνδεδεμένες και ενορχηστρούμενες διαδικασίες.

### 3.8.2 Φυσιολογία

Ο CTGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από αυτούς και το σχηματισμό κοκκιωμάτων (Bradham et al., 1991; Brigstock et al., 1997; Shi-wen et al., 2000). Προάγει την κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση σε ευρύ φάσμα κυττάρων (Babic et al., 1999; Chen et al., 2001a; Crean et al., 2002), καθώς και τη συστολή της εξωκυττάριας ουσίας (Shi-wen et al., 2000). Επιμόλυνση ινοβλαστών με φορέα έκφρασης CTGF ενεργοποιεί τον promoter του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου I (Shi-wen et al., 2000). Πειράματα με χρήση CTGF και εξουδετερωτικών του αντισωμάτων προτείνουν ότι ο CTGF μεσολαβεί τουλάχιστον κάποιες από τις επιδράσεις του TGF-β στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών, την πρόσφυσή τους και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, συμπεριλαμβανομένων κολλαγόνου και φμπρονεκτίνης (Blom et al., 2001; Crean et al., 2002; Grotendorst, 1997; Leask et al., 2002; Wang et al., 2001; Weston et al., 2003).

Δυστυχώς ποντίκια έστω και ετερόζυγα για το γονίδιο CTGF πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση λόγω ελλείμματος στην οστεογένεση μεταξύ άλλων (Inkovic et al., 2003).

### 3.8.3 Παθοφυσιολογία

Ενώ ο CTGF έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, αυξημένη έκφραση αυτού ανιχνεύθηκε *in vivo* στους ινοβλάστες σε πολλές **ινωτικές νόσους**, όπως το συστηματικό και τοπικό σκληρόδερμα, η νεφρική, ηπατική, παγκρεατική, πνευμονική ίνωση και η IBD (Abou-Shady et al., 2000; Allen et al., 1999; Dammeier et al., 1998; di Mola et al., 2002; Igarashi et al., 1996; Igarashi et al., 1995; Ito et al., 1998; Lasky et al., 1998; Murphy et al., 1999; Paradis et al., 1999). Επιπλέον σε πολλές από αυτές τις νόσους τα επίπεδα έκφρασης του CTGF στο πλάσμα είναι ανάλογα με την έκταση και τη βαρύτητα της νόσου (Sato et al., 2000). Αυξημένος CTGF ανιχνεύεται επίσης σε αθηρωματικές πλάκες και τα υψηλά επίπεδα CTGF στην αθηροσκλήρωση δυνητικά είναι υπεύθυνα για τη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας και, συνεπώς, την εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών (Oemar and Luscher, 1997; Oemar et al., 1997).

Η έκφραση CTGF έχει βρεθεί αυξημένη σε μυοϊνοβλάστες του ορογόνου εντέρου ασθενών με CD (Beddy et al., 2006). Διέγερση με **TGF-β** επάγει CTGF σε ινοβλάστες ορογόνου από ομάδα ελέγχου στα επίπεδα που εγγενώς ευρίσκονται σε CD (Beddy et al., 2006). Επαναλαμβανόμενες εγχύσεις CTGF μετά από TGF-β διατηρούν και αυξάνουν την συσσώρευση ινοβλαστών και κολλαγόνου σε μοντέλο δερματικής ίνωσης (Chujo et al., 2005). Ο CTGF εμπλέκεται ακόμη στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ενεργοποιώντας ινοβλάστες και κυψελιδικά κύτταρα τύπου II (Allen et al., 1999) και στην πνευμονική ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη (Yu et al., 2009). Οι εξωγενείς TGF-β και CTGF ίσως είναι



επαρκείς για την ανάπτυξης χρόνιας ίνωσης, αλλά η εξωγενής πάλι παροχή και άλλων τροφικών παραγόντων, όπως ο bFGF περαιτέρω ενισχύει την ανάπτυξη ίνωσης (Chujo et al., 2009). Πλην της ίνωσης, συνοδά φαινόμενα όπως η διήθηση από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα φαίνονται να είναι δευτερογενή λόγω αύξησης κυτταροκινών, όπως η MCP-1, αφού σε ποντίκια knockout για αυτή αυτά δεν συναντώνται ενώ η ίνωση παραμένει (Chujo et al., 2009).

Σημαντικό λοιπόν μόριο upstream του CTGF είναι σε πολλά συστήματα ο TGF-β (Holmes et al., 2001). Ο TGF-β **επάγει** τον CTGF μέσω της κλασσική οδού των SMADs με την πρόσδεση του αντίστοιχου συμπλόκου στο στοιχείο transcription enhancer factor (TEF) του promotor του CTGF (Holmes et al., 2001; Leask et al., 2003; Mori et al., 2003). Ενώ ο TGF-β αυξάνει, ο TNF-α αναστέλλει την έκφρασή του σε αυτά τα κύτταρα (Beddy et al., 2006). Η ET-1 επίσης διεγείρει την παραγωγή CTGF από ινοβλάστες πνεύμονα και δέρματος (Leask et al., 2009; Shi-wen et al., 2000). Περιέργως, αν και ο TNF-α καταστέλλει τον TGF-β επαγόμενο CTGF και σε ινοβλάστες σκληροδέρματος, η υπερέκφραση του CTGF στο σκληρόδερμα είναι ανεξάρτητη από SMADs, εξαρτώμενη από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (Holmes et al., 2003; Holmes et al., 2001) και δεν καταστέλλεται από TNF-α (Abraham et al., 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι η χρόνια ίνωση που παρατηρείται σε σκληρόδερμα μπορεί να είναι συνέπεια της ικανότητας των ινοβλαστών της βλάβης να ξεφεύγουν από τις αντιϊνωτικές επιπτώσεις και αυτής της κυτταροκίνης.

Ο CTGF, λοιπόν, είναι υποψήφιος **τελικός παράγοντας πριν την επαγωγή των τελικών προϊόντων ίνωσης**- κυρίως του κολλαγόνου- σε πολλά *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα και προηγούνται αυτού ο TGF-β και ο ET-1, που φαίνονται να δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους (Chujo et al., 2005; Gore-Hyer et al., 2002; Holmes et al., 2001).

## 3.9 Σύστημα πήξης

Το σύστημα της πήξης συμμετέχει ενεργά σε διάφορα ινωτικά μοντέλα (Howell et al., 2001; Imokawa et al., 1997; Kimura et al., 2005; Scotton et al., 2009; Yu et al., 2009) μέσω της παραγωγής θρομβίνης. Είναι πρωτεάση που διασπά το ινωδογόνο σε ινώδες κατά τα τελευταία βήματα της πήξης (Bar-Shavit et al., 1992). Η ενεργοποίηση της θρομβίνης, ως εκ τούτου, αποτελεί βασικό και με ακρίβεια ρυθμιζόμενο βήμα στην πήξη. Άλλοι βιολογικοί της ρόλοι περιλαμβάνουν την αγγειογένεση στο έμβρυο και στον ενήλικα και τις μεταστάσεις νεοπλασιών (Raparort and Rao, 1995; Ruf and Mueller, 1996; Shoji et al., 1998).

Ο ιστικός παράγοντας (tissue factor- **TF**) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με σταθερά υψηλά επίπεδα έκφρασης στους περιβάλλοντες ιστούς, αλλά όχι σε κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το αίμα (Camerer et al., 1996a). Η ρήξη αυτών των ορίων ή η επαγωγή της σύνθεσης TF σε μονοκύτταρα (Rivers et al., 1975) και ενδοθηλιακά κύτταρα (Camerer et al., 1996a) θα επιτρέψει σε παράγοντες πήξης να έχουν επαφή με κύτταρα εκφράζοντα TF στην κυτταρική μεμβράνη τους. Ο TF λειτουργεί ως συμπαράγοντας ενεργοποίησης του ζυμογόνου FVII (πρωτεάση σερίνης) προς ενεργοποιημένο FVIIa και στη συνέχεια επιτείνει τη δράση του FVIIa επάνω στα υποστρώματά του (Raparort and Rao, 1995). Το **σύμπλοκο FVIIa-TF** προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα τη διάσπαση του ινωδογόνου και τη δημιουργία θρόμβου από ινώδες. Ο καταρράκτης της πήξης συντονίζεται με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και συγκροτούν την κύρια γραμμή της προστασίας από την απώλεια αίματος μετά από τραυματισμό.

Τα υπάρχοντα δεδομένα υποστηρίζουν **δύο διακριτούς τρόπους ενδοκυττάριας μεταγωγής σημάτων από τον TF**: τον εξαρτώμενο από το ενδοκυττάριο τμήμα του TF και ανεξάρτητο από την πρωτεολυτική δραστηριότητα του συμπλόκου FVIIa-TF και τον εξαρτώμενο από την πρωτεολυτική δραστηριότητα του συμπλόκου FVIIa-TF και ανεξάρτητο από το ενδοκυττάριο τμήμα του TF (Ruf and Mueller, 1999). Ένας αυξανόμενος αριθμός πρόσφατων δημοσιεύσεων αναφέρουν ότι ο δεύτερος μηχανισμός είναι ο βασικός. Για παράδειγμα, η σύνδεση του FVIIa με τον TF στο εξωκυττάριο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί ενδοκυττάριας ταλαντώσεις της συγκέντρωσης  $Ca^{++}$  σε έναν αριθμό κυττάρων που εκφράζουν TF (Camerer et al., 1996b; Rottingen et al., 1995), παροδική φωσφορυλίωση τυροσινών σε μονοκύτταρα (Masuda et al., 1996), ενεργοποίηση των MAPK (Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999), μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων σε ινοβλάστες (Pendurthi et al., 1997), επαγωγή uPAR σε νεοπλασματικά κύτταρα (Taniguchi et al., 1998) και έκφραση egr-1 σε HaCaT κύτταρα (Camerer et al., 1999). Επειδή με την αδρανοποίηση της ενεργού θέσης του FVIIa, αυτός αποτυγχάνει να προκαλέσει πολλές από τις παραπάνω απαντήσεις σηματοδότησης, όπως τις ταλαντώσεις  $Ca^{++}$  (Camerer et al., 1996b), την ενεργοποίηση MAPK (Poulsen et al., 1998) και την επαγωγή γονιδίων (Camerer et al., 1999; Poulsen et al., 1998), φαίνεται ότι **η καταλυτική δραστηριότητα του FVIIa απαιτείται για την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος**. Επιπλέον, αναστολείς FXa ή/ και θρομβίνης δείχτηκε ότι δεν αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον FVIIa ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (Camerer et al., 1999; Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενδοκυττάριας δράσεις του FVIIa απορρέουν άμεσα από την πρωτεολυτική του δραστηριότητα και όχι από τον καταρράκτη της πήξης. Ενδιαφέρον είναι ότι ο κυτταροπλασματικός τομέας του TF δεν είναι απαραίτητος ούτε για

την πρωτεολυτική δραστικότητα του συμπλόκου FVIIa-TF ή την ενδοκυττάρια σηματοδότηση, τουλάχιστον όπως αυτή κρίνεται από τη φωσφορυλίωση MAPK (Sorensen et al., 1999) και την έκφραση egr-1 (Camerer et al., 1999).

## **4 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 4.1 ΣΚΟΠΟΣ

Μελέτες έδειξαν αλλαγές στην αναλογία έκφρασης μεταξύ των ισομορφών του TGF-β σε βλεννογόνο και μυοϊνοβλάστες ασθενών με φλεγμονώδη εντεροπάθεια (inflammatory bowel disease- IBD) σε σχέση με αυτούς που προέρχονται από μη πάσχοντες (Babyatsky et al., 1996; di Mola et al., 1999; Lawrance et al., 2001c; McKaig et al., 2002; Pucilowska et al., 2000a) και προτείνουν τον TGF-β ως σύνδεσμο μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης στο έντερο (Bonniaud et al., 2005; Vallance et al., 2005; Van Assche et al., 2004). Ως προς τα επιθηλιακά κύτταρα δεδομένα υπάρχουν για την προστατευτική δράση της ισομορφής TGF-β1 έναντι των κυτταροκινών στη διατήρηση της λειτουργικότητας του επιθηλίου (Ma, 1997; Planchon et al., 1994; Willemsen et al., 2002), αλλά και του ρόλου αυτού και των ενδοκυττάρων σημάτων της οδού του σε επαγόμενη κολίτιδα σε ποντικούς (Tokumasa et al., 2004; Walia et al., 2003).

Δεδομένα από knockout ποντίκια υποδηλώνουν ρόλο των μεταλλοπρωτεασών (metalloproteinases- MMPs) στην σοβαρότητα της κολίτιδος, προστατευτικό σε δεδομένες πειραματικές συνθήκες (Garg et al., 2006) ή επιβαρυντικό σε άλλες (Castaneda et al., 2005). Διφορούμενα αποτελέσματα ως προς το αν εκφράζουν MMPs έχουν δημοσιευτεί για τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Alvarado et al., 2008; Bawadi et al., 2005; Horiuchi et al., 2003; Kermorgant et al., 2001; Kim et al., 2009; Ko et al., 2005; Lee and Lim, 2007; Li et al., 2005; Matsuoka et al., 2000; Stahtea et al., 2007; Vishnubhotla et al., 2007). Ακόμη, δεν υπάρχει ενιαίο προφίλ έκκρισης των μεταλλοπρωτεασών από ινοβλάστες: ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες από διαφορετικά συστήματα, υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και φλεγμονώδη ερεθίσματα εκφράζουν διαφορετικές MMPs (Fredriksson et al., 2006).

Ελάχιστες ανεπιβεβαίωτες αναφορές υπάρχουν πάνω στο προφίλ έκκρισης από εντερικούς μυοϊνοβλάστες (McKaig et al., 2003; Yasui et al., 2004) και ελάχιστα δεδομένα πάνω στη διεγερσιμότητα των κυττάρων αυτών ως προς την παραγωγή τους. Το ίδιο ισχύει για τον επαγώγιμο αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών-1 (TIMP-1) (McKaig et al., 2003; Yasui et al., 2004).

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η νόσος του Crohn, αναγνωρίζεται ότι η υπέρμετρη ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός των μυοϊνοβλαστών ευθύνεται για την υπερβολική έκκριση και εξωκυττάρια εναπόθεση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως το κολλαγόνο, που οδηγεί στην απώλεια λειτουργικότητας και στη στένωση του εντέρου (Jobson et al., 1998; Tarlton et al., 2000). Στη νόσο Crohn η ανάπτυξη στενώσεων είναι συχνό φαινόμενο, αλλά οι ενεχόμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διασαφηνιστεί (Sorrentino, 2008).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, θελήσαμε να διερευνήσουμε πτυχές της ισορροπίας μεταξύ των προϊνωτικών και ινωδολυτικών παραγόντων στον άξονα μεταξύ του εντερικού επιθηλιακού κυττάρου και του υποκείμενου υποεπιθηλιακού μυοϊνοβλάστη (Willemsen et al., 2002). Επιπροσθέτως, θελήσαμε να διερευνήσουμε τη διαταραχή της ισορροπίας αυτής στη φλεγμονή και να βρούμε *in vitro* διαταραχές που θα μπορούσαν να έχουν *in vivo* προβολή στην παθογένεια της εντερικής στένωσης ή της εξέλκωσης του βλεννογόνου στη νόσο του Crohn. Συγκεκριμένα τέθηκαν και αναζητήθηκαν απαντήσεις στα παρακάτω ερωτήματα:

- Ποιά η έκφραση των τριών ισομορφών του προϊνωτικού και αντιφλεγμονώδους **TGF-β** από τις εξής καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων παχέος εντέρου:

**επιθηλιακές κυτταροσειρές CaCO-2 και HT-29, πρωτογενείς υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες (subepithelial myofibroblasts- SEMFs), κυτταροσειρά εμβρυϊκών κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO;** Παρατηρούνται μεταβολές υπό την προσομοίωση **φλεγμονώδους περιβάλλοντος (inflammatory milieu);**

- Ποιά η έκφραση και οι πιθανές μεταβολές υπό την προσομοίωση φλεγμονώδους περιβάλλοντος (inflammatory milieu) των ινωδολυτικών μεταλλοπρωτεασών 2 και 9 (matrix metalloproteinases-2 και -9, **MMP-2 και MMP-9**) από τις ίδιες καλλιέργειες κολονικών επιθηλιακών κυττάρων και μυοϊνοβλαστών;
- Ποιά η έκφραση και οι πιθανές μεταβολές υπό την προσομοίωση φλεγμονώδους περιβάλλοντος (inflammatory milieu) του υποτύπου 1 του προϊνωτικού ιστικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, **TIMP-1**) από επιθηλιακά και μυοϊνοβλάστες;
- Παρατηρούνται **αλλαγές στην παραγωγή κολλαγόνου** από τους μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή TGF-β;
- Πώς επηρεάζει το προφλεγμονώδες περιβάλλον ή ο προϊνωτικός TGF-β1 την **ικανότητα των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών να επουλώνουν** λύση της συνέχειας του εντερικού βλεννογόνου;
- Υπάρχει **επικοινωνία (crosstalk)** μέσω διαλυτών παραγόντων μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και μυοϊνοβλαστών ως προς την έκφραση προϊνωτικών και ινωδολυτικών παραγόντων (TGF-β ισομορφές, TIMP-1, MMP-2, MMP-9, κολλαγόνο) και την ικανότητα επούλωσης από τους μυοϊνοβλάστες;
- **Διαφοροποιεί η πιθανή αυτή επικοινωνία (crosstalk) τη συνολική απάντηση στο φλεγμονώδες περιβάλλον;**



- Μέσω ποιών διαλυτών σηματοδοτικών μορίων διαμεσολαβείται αυτή η πιθανή επικοινωνία;

## 4.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.2.1 ΥΛΙΚΑ

#### 4.2.1.1 Συσκευές

Τα κολονοσκόπια του ενδοσκοπικού εργαστηρίου του πεπτικού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του παχέος έντερου και τη λήψη ιστοτεμαχίων κατασκευάστηκαν από τη Fujinon Ευρώπης (Γερμανία).

Η απομόνωση κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (SEMFs) και οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (culture hood), εφοδιασμένο και με λαμπτήρα υπεριώδους φωτός και κατασκευασμένο από τη Holten Δανίας. Ο επωαστήρας στον οποίο αναπτύχθηκαν οι κυτταροκαλλιέργειες και έγιναν οι επωάσεις σε θερμοκρασία 37°C κατασκευάστηκε από τη Thermo Scientific Γερμανίας και οι συνθήκες σε αυτόν διατηρήθηκαν στη θερμοκρασία αυτή και σε 5% CO<sub>2</sub>.

Η ψυχόμενη φυγόκεντρος για τη φυγοκέντρωση κωνικών σωλήνων 15 και 50 ml και μικροσωληναρίων 1,5 ml με τους αντίστοιχους ρότορες ήταν προϊόντα της Heraeus Ηνωμένου Βασιλείου. Οι συσκευές ήπιας (shaker) και ισχυρής (rocker) ανάδευσης αγοράστηκαν από τη Stuart Scientific Ηνωμένου Βασιλείου και τη Biosan Λιθουανίας αντίστοιχα.

Το ψυγείο θερμοκρασίας 4-8°C ήταν προϊόν της Pitsos Ελλάδας, ο καταψύκτης θερμοκρασίας -20 °C της De'Longhi Ιταλίας και ο καταψύκτης -80 °C της Jouan ΗΠΑ.

Χρησιμοποιήθηκαν για τη φύλαξη δειγμάτων και αναλωσίμων που απαιτούσαν αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Ο θερμοκυκλωτής (thermal cycler) που χρησιμοποιήθηκε στην αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription- RT) και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction- PCR) για την ταχεία αλλαγή θερμοκρασιών και διατήρησή τους επί συγκεκριμένο χρόνο προκειμένου για δεδομένους όγκους ήταν προϊόν της Applied Biosystems ΗΠΑ. Η συσκευή απεικόνισης υπό υπεριώδες φως των πηκτών της PCR ανήκε στη σειρά AlphaImager και αγοράστηκε από την Alpha Innotech, ΗΠΑ.

Το αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για πλάκες 96 βοθρίων και το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση έντασης μονοχρωματικού φωτός μήκους κύματος 450 nm (ανοσοενζυμική μέθοδος- enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA και δοκιμασία Sirius Red) και 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς στην ELISA) σε βοθρία επίσης πλακών 96 βοθρίων κατασκευάστηκαν από τη BioTek Instruments Γερμανίας.

Η συσκευές κάθετης και οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της ζυμογραφίας και της PCR αντίστοιχα ήταν κατασκευής της Bio-Rad Laboratories ΗΠΑ. Η συσκευή τροφοδοσίας ρεύματος και προς τις δύο συσκευές κατασκευάστηκε από τη Pharmacia Biotech Σουηδίας.

Το φωτονικό μικροσκόπιο για την παρατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών ήταν προϊόν της Nikon Ιαπωνίας. Το ανάστροφο εφοδιασμένο με κάμερα μικροσκόπιο με το οποίο ελήφθησαν οι εικόνες της δοκιμασίας επούλωσης πληγής ήταν κατασκευής της Leica Microsystems Γερμανίας.

#### 4.2.1.2 Κυτταρικές σειρές

Οι ανθρώπινες κολονικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές HT-29 και CaCO-2 που χρησιμοποιήθηκαν είναι νεοπλασματικής προέλευσης από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (Fogh et al., 1977; Rousset, 1986; Trainer et al., 1988). Συγκεκριμένα τα HT-29 απομονώθηκαν από 44χρονη Καυκάσια που έπασχε από καλώς διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα παχέος παθολογοανατομικού εντέρου σταδίου I ([http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91072201&collection=ecacc\\_gc](http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91072201&collection=ecacc_gc)) και τα CaCO-2 από 72χρονο Καυκάσιο που έπασχε από μετρίως διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου σταδίου II ([http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc\\_gc](http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc_gc)).

Τα CCD-18CO (18CO) είναι μη νεοπλασματική κυτταρική σειρά ινοβλαστών που απομονώθηκαν από το παχύ έντερο έγχρωμου θήλεος βρέφους 2,5 μηνών (<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/search.jsp?searchtext=18CO&dosearch=true>) (Simmons et al., 1999; Valentich et al., 1997).

#### 4.2.1.3 Υλικά

Για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 25 ή 75 cm<sup>2</sup> με φίλτρο πόρων 0,25 μm στο πώμα (ώστε ο αέρας μέσα σε αυτές να μπορεί να ανανεώνεται με το πώμα της φλάσκας ερμητικά κλειστό και κατ' αυτόν τον τρόπο να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις), πλάκες 6 ή 12 βοθρίων (επιφάνειας 9,6 ή 3,5 cm<sup>2</sup> αντίστοιχα) και γυάλινα πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 2 ή 8 θαλάμων, όλα προϊόντα της Nuncl Δανίας. Από την ίδια εταιρία αγοράστηκαν πλάκες 96 βοθρίων για τις ELISA, τη

δοκιμασία Sirius Red και τη φύλαξη υπερκειμένων. Οι αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες όγκου 15 και 50 ml και οι μικροσωληνίσκοι 1,5 και 0,25 ml ποικίλων χρήσεων ήταν προϊόντα της Eppendorf Γερμανίας και οι καλυπτρίδες των πλακιδίων ανοσοφθορισμού και ανοσοκυτταροχημείας της Fisher Scientific Ηνωμένου Βασιλείου. Μembrάνες ερμητικού κλεισίματος των πλακών 96 βοθρίων αγοράστηκαν από την R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου.

#### ***4.2.1.4 Αναλώσιμα κυτταροκαλλιιεργειών και ζωικά προϊόντα***

Τα υλικά καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Hank's balanced salt solution (HBSS) με και χωρίς  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$ , McCoy's, minimum essential medium (MEM), MEM-Alpha, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) και Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI). Αυτά και ο εμβρυϊκός βόειος ορός (fetal bovine serum- FBS) με τον οποίο εμπλουτίστηκαν ήταν προϊόντα της Gibco Ηνωμένου Βασιλείου. Από την ίδια εταιρία παρασκευάστηκε και το διάλυμα αποκόλλησης κυττάρων για την ανακαλλιέργειά τους που περιείχε την πρωτεάση θρυψίνη σε συγκέντρωση 0,25 % και τη χηλική ουσία ethylene-diamino-tetra-acetic acid (EDTA) σε συγκέντρωση 1 mM, (T/ EDTA). Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, γενταμυκίνη και το αντιμυκητιασικό αμφοτερικίνη B αγοράστηκαν από τη Gibco Ηνωμένου Βασιλείου, ενώ το αντιβιοτικό βανκομυκίνη από την Abbott Γερμανίας.

Προμηθευτήκαμε ακόμη αποξηραμένο βόειο ορό άνευ λιπιδίων σε PBS από τη Fluka Ελβετίας, αλβουμίνη βόειου ορού (bovine serum albumin- BSA) για χρήση στις ELISA από τη Sigma-Aldrich ΗΠΑ και ορό αιγός (Normal Goat Serum- NGS) για χρήση στον ανοσοφθορισμό από την Chemicon Γερμανίας. Τέλος το βόειο μετουσιωμένο κολλαγόνο

(gelatin) που χρησιμοποιήθηκε στις πηκτές της ζυμογραφίας παρασκευάστηκε από τη Sigma-Aldrich ΗΠΑ.

#### *4.2.1.5 Χημικές ουσίες, διαλύματα*

Η διθειοτρεϊτόλη (dithiothreitol- DTT) και το αιθυλένο-διάμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid- EDTA) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση SEMFs, όπως και παραφορμαλδεΐδη (paraformaldehyde- PFA) για τη μονιμοποίηση των κυττάρων αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich ΗΠΑ σε στερεά μορφή. Από την ίδια εταιρία αγοράστηκαν η αγαρόζη, το βρωμιούχο αιθίδιο, το Ficoll 400, το κυανούν της βρωμοφαινόλης που χρησιμοποιήσαμε στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση, τα Tween-20, υδροχλωρικό οξύ (HCl), καυστικό νάτριο (NaOH), 4-(2-υδροξυαιθύλ)-1-πιπεράζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) και θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) που χρησιμοποιήθηκαν στις ELISA και τα δωδεκύλ-θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulphate- SDS), γλυκερόλη, χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>), χλωριούχο ψευδάργυρο (ZnCl<sub>2</sub>), μεθανόλη, οξικό οξύ και οι χρωστικές κυανούν της βρωμοφαινόλης και Coomassie blue R-250 που χρησιμοποιήθηκαν στη ζυμογραφία. Το ιοντικό απορρυπαντικό Triton X-100 (octyl phenol ethoxylate) που χρησιμοποιήθηκε στη ζυμογραφία και τον ανοσοφθορισμό ήταν επίσης προϊόν της Sigma-Aldrich ΗΠΑ, όπως και η αιματοξυλίνη και η ηωσίνη που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοκυτταροχημεία.

Το υλικό κάλυψης φθορισμού (mounting medium) Vectashield παρασκευάστηκε από τη Vector Laboratories Ηνωμένων Πολιτειών και το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα λύσης κυττάρων για τη χρήση της πρωτεΐνης από την Promega ΗΠΑ. Τέλος, στις ζυμογραφίες χρησιμοποιήθηκαν δύο δείκτες μοριακού βάρους (MB), ένας από την Promega ΗΠΑ και ένας από την Takara Ιαπωνίας.

#### **4.2.1.6 Ουσίες διέγερσης**

Οι ανθρώπινες κυτταροκίνες ιντερλευκίνη-1α (interleukin-1α- IL-1α), tumor necrosis factor-α (TNF-α) και ο ανθρώπινος transforming growth factor-β1 (TGF-β1) για τις επιδράσεις στις κυτταρικές καλλιέργειες αγοράστηκαν λυοφιλοποιημένα από την R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου. Οι IL-1α, TNF-α διαλύθηκαν στον κοινό προτεινόμενο διαλύτη (0,1 % BSA σε PBS), ενώ ο TGF-β1 στο προτεινόμενο διάλυμα 4 mM HCl με 1 mg/ml BSA στις μέγιστες προτεινόμενες συγκεντρώσεις (IL-1α: 10 µg/ml, TNF-α: 100 µg/ml και TGF-β1: 20 µg/ml). Η ιντερφερόνη-γ (interferon-γ- IFN-γ) αγοράστηκε είτε σε διάλυμα συγκέντρωσης 1.000.000 U/ml από τη Roche Γερμανίας είτε λυοφιλοποιημένο από την R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου. Όλες οι ουσίες διατηρήθηκαν στους -20°C σε κλάσματα.

#### **4.2.1.7 Ισότονα διαλύματα**

Αγοράστηκαν δισκία που έκαστο διαλυόμενο σε 500 ml H<sub>2</sub>O παρήγαγε το ρυθμιστικό διάλυμα phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, και 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 7,4-7,6) από τη Gibco Ηνωμένου Βασιλείου. Το Tris buffered saline (TBS: 0,5 M Tris Base, 9 % NaCl, 0,5 % Tween-20, pH 8,4) παρασκευάστηκε από συστατικά που αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich ΗΠΑ. Από υλικά της Sigma-Aldrich ΗΠΑ παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Tris/ Borate/ EDTA (TBE) 0,5x που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR: 5,4 gr/lit Tris Base, 13,75 gr/lit βορικό οξύ, 0,05 M EDTA (pH 8).

#### **4.2.1.8 Εμπορικά διαθέσιμα kit**

Εμπορικά διαθέσιμα kits για τη μέτρηση με ELISA των TGF-β 1, TGF-β2, TGF-β3 και TIMP-1 σε υπερκείμενα καλλιιεργειών έφεραν την επωνυμία DuoSet και αγοράστηκαν από την

R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου (<http://www.rndsystems.com/pdf/dy240.pdf>, <http://www.rndsystems.com/pdf/dy302.pdf>, <http://www.rndsystems.com/pdf/dy243.pdf> και <http://www.rndsystems.com/pdf/dy970.pdf> αντίστοιχα). Περιείχαν λυοφιλοποιημένα τα αντισώματα σύλληψης και ανίχνευσης και γνωστή ποσότητα της προς μέτρηση πρωτεΐνης, τα οποία διαλύθηκαν στις προτεινόμενες αρχικές συγκεντρώσεις με τον προτεινόμενο διαλύτη και αποθηκεύθηκαν σε κλάσματα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Περιελάμβαναν ακόμη σε μορφή διαλύματος στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση που αποθηκεύτηκε στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το εύρος αξιόπιστης μέτρησης που προσέφεραν ήταν για όλες τις ELISA 31,25- 2000 pg/ml. Από την ίδια εταιρεία αγοράστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  τετραμεθυλβενζιδίνη (tetramethylbenzidine- TMB) και  $\text{H}_2\text{O}_2$  για την τελική αντίδραση παραγωγής χρώματος στις ELISA.

Το Sircol kit για τη χρωματομετρική μέτρηση του ολικού κολλαγόνου με τη χρωστική Sirius Red, το δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (1 mg/ml) βοείου κολλαγόνου I και το διάλυμα 0,5 M NaOH που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκε από την Biocolor Ηνωμένου Βασιλείου και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου εκτός από το κολλαγόνο μετά την πρώτη χρήση ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Για την ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του connective tissue growth factor (CTGF) χρησιμοποιήθηκε το kit LSAB + System-AP της DAKO Δανίας που επιτύγχανε σύζευξη του πολυκλωνικού αντισώματος (immunoglobulin) IgG αιγός έναντι του ανθρώπινου CTGF (Santa Cruz Biotechnology ΗΠΑ) με την αλκαλική φωσφατάση και χρωματισμό του CTGF ερυθρού με φουσκίνη. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες φύλαξης και χρήσης των επιμέρους συστατικών του. Η χρώση αυτή συνδυάστηκε με χρώση του κυτταρικού υποστρώματος με αιματοξυλίνη και ηωσίνη που αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich ΗΠΑ σε στερεά μορφή.



#### 4.2.1.9 Αντισώματα ανοσοφθορισμού

Το μονοκλωνικό IgG<sub>2a</sub> αντίσωμα ποντικού έναντι της ανθρώπινης βιμεντίνης αγοράστηκε από την Chemicon Γερμανίας σε συγκέντρωση 1 mg/ml (διαλύτης: 0,5 % BSA σε PBS με συντηρητικό 0,09 % NaN<sub>3</sub>) και αποθηκεύθηκε στους 4°C. Το μονοκλωνικό IgG<sub>2a</sub> αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης α-ακτίνης λείων μυϊκών ινών (α-smooth muscle actin- α-SMA) σε συγκέντρωση 1 mg/ml (διαλύτης: PBS με συντηρητικό 0,09 % NaN<sub>3</sub>) ήταν προϊόν της Millipore Ηνωμένου Βασιλείου και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20°C. Το μονοκλωνικό IgG<sub>1</sub> αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης δεσμίνης σε συγκέντρωση 1 mg/ml (διαλύτης: 0,02 M φωσφορικά άλατα, 0,25 M NaCl με συντηρητικό 0.1 % NaN<sub>3</sub>) παρασκευάστηκε από την Chemicon Γερμανίας και αποθηκεύτηκε στους 4°C. Ως αντίσωμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε υβριδικό IgG<sub>2b</sub> αντίσωμα ποντικού χωρίς στόχο σε ανθρώπινα κύτταρα αγορασμένο από την R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου που είχε ελεγχθεί ώστε να μην δίνει χρώση φόντου σε ποικιλία ιστών. Σύμφωνα με τις οδηγίες το λυοφιλοποιημένο με 5% τρεχαλόζη αντίσωμα διαλύθηκε σε PBS σε συγκέντρωση 500 μg/ml και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20°C. Το φθορίζον μέσω της συζευγμένης χρωστικής Alexafluor 488 (AF488) πολυκλωνικό δεύτερο αντίσωμα από αίγα έναντι όλων των βαρέων αλυσίδων IgG και όλων των ελαφρών αλυσίδων αντισωμάτων ποντικού συγκέντρωσης 2 mg/ml, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση με φθορισμό των προαναφερθέντων αντισωμάτων, ήταν προϊόν της Invitrogen Ηνωμένου Βασιλείου και αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι στους 4°C.

#### 4.2.1.10 Αντίστροφη μεταγραφή & αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το διάλυμα λύσης κυττάρων Trizol για την απομόνωση mRNA ήταν προϊόν της Invitrogen Ηνωμένου Βασιλείου. Το χλωροφόρμιο, η ισοπροπανόλη και η αιθανόλη που χρησιμοποιούνταν για την εξαγωγή mRNA αγοράζονταν από την Sigma-Aldrich ΗΠΑ και ήταν καθαρότητας για μελέτες μοριακής βιολογίας (molecular biology grade).

Τα kit για να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription- RT) του mRNA ήταν αυτά της DNAση, που περιελάμβανε 1 U/μl DNAση (σε 20 mM οξικό νάτριο- pH 6,5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM PMSF, 50 % v/v γλυκερόλη), 25 mM EDTA, 10x DNase buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl), και της superscript II αντίστροφης μεταγραφάσης, που περιελάμβανε 200 U/μl superscript II (σε 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01 % v/v NP-40, 50 % v/v γλυκερόλη), 0,1 M DTT, 5x first strand buffer (250 mM Tris-HCl- pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) που ήταν προϊόντα της Invitrogen Ηνωμένου Βασιλείου. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή oligo(dT)<sub>12-18</sub> εκκινητής σε συγκέντρωση 0.5 μg/μl σε H<sub>2</sub>O της Invitrogen Ηνωμένου Βασιλείου, δεοξυριβονουκλεοτίδια αδενίνης, θυμίνης, κυτοσίνης, γουανίνης (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) συγκέντρωσης 2,5 mM έκαστο της Roche Γερμανίας και το μίγμα αναστολέων RNAσων RNAsin (50 U/μl) της Promega ΗΠΑ. Όλα αποθηκεύονταν στους -20°C.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction- PCR) χρησιμοποιούνταν DNA πολυμεράση του *Thermus aquaticus* (Taq) συγκέντρωσης 1 U/μl, κατάλληλο 10x PCR buffer με MgCl<sub>2</sub> και dNTPs της Roche Γερμανίας. Όλα αποθηκεύονταν στους -20°C. Χρησιμοποιούνταν ζεύγη εκκινητών (primers) με αναμενόμενο μέγεθος

προϊόντος ειδικό για mRNA, καθώς καθένας συνδεόταν σε διαφορετικό εξόνιο. Αγοράστηκαν λυοφιλοποιημένοι από την Invitrogen Ευρώπης, ανασυστάθηκαν με H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 50 μM και αποθηκεύτηκαν σε κλάσματα στους -20°C. Αναλυτικά οι αλληλουχίες, το μέγεθος του προϊόντος και οι θεωρητικές βέλτιστες θερμοκρασίες για την προσαρμογή τους στο εκμαγείο (annealing temperatures- T<sub>m</sub>) αυτών των εκκινητών (primers) παρουσιάζονται στον Πίνακας 2. Ο δείκτης με βαθμίδωση ανά 100 βάσεις (PCR ladder) που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρασκευάστηκε από την Invitrogen, ΗΠΑ.

**Πίνακας 2. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν:** παρουσιάζονται για κάθε cDNA η αλληλουχία του ευθέος (5' → 3') και του ανάστροφου (3' → 5') εκκινητή (primer), το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος από κάθε ζεύγος εκκινητών (primers) και η βέλτιστη θερμοκρασία για την προσαρμογή του κάθε εκκινητή (primer) στο εκμαγείο (annealing temperature- T<sub>m</sub>).

cDNA	Προσανα- τολισμός	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (base pairs)	T <sub>m</sub> (°C)
TGF-β1	5' → 3'	TGCTGAGGCTCAAGTTAAAA	224	56
	3' → 5'	TGTGTTATCCCTGCTGTCAC		57
TGF-β2	5' → 3'	TGCTCTGTGGGTACCTTGAT	120	58
	3' → 5'	TGAACTCTGCTTTCACCAAA		57
TGF-β3	5' → 3'	GCTACTATGCCAACTTCTGC	215	55
	3' → 5'	ACAAGACTTCACCACCATGT		55
GAPDH	5' → 3'	CAACGGATTTGGTCGTATTG	184	56
	3' → 5'	GATGACAAGCTTCCC GTTCT		58

\*GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)- γονίδιο σταθερά μεταγραφόμενο

#### 4.2.1.11 Αναστολείς

Στις μελέτες δράσης των υπερκειμένων των επιθηλιακών κυττάρων επί των μωϊνοβλαστών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αδρανοποιητικά αντισώματα: μονοκλωνικό IgG<sub>1</sub> ποντικού έναντι ανθρώπινων TGF-β<sub>1</sub>, -β<sub>2</sub>, -β<sub>3</sub> (anti-pan-TGF-β) (<http://www.rndsystems.com/pdf/mab1835.pdf>), πολυκλωνικό κουνελιού έναντι ανθρώπινου connective tissue growth factor (anti-CTGF) (<http://m1.acris-antibodies.com/pdf/AP01150PU-N.pdf>), μονοκλωνικό IgG<sub>1</sub> ποντικού έναντι ανθρώπινου ιστικού παράγοντα (anti-tissue factor- anti-TF) (Kambas et al., 2011) και μονοκλωνικό IgG<sub>1</sub> ποντικού έναντι MMP-9 (anti-MMP-9) (Schnaper et al., 1993). Το anti-pan-TGF-β από την R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου αγοράστηκε λυοφιλοποιημένο από διάλυμα PBS με 5 % τρεχαλόζη, διαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O στη συνιστώμενη συγκέντρωση (500 μg/ml) και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -80°C. Το anti-CTGF αγοράστηκε από την Acris Antibodies Γερμανίας λυοφιλοποιημένο, διαλύθηκε με PBS σε συγκέντρωση 1 mg/ml κατά τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20°C. Το anti-TF αγοράστηκε από την American Diagnostica ΗΠΑ λυοφιλοποιημένο (διαλύτης: 0, 15 M PBS (pH 7,4) / 200 mM μαννιτόλης), ανασυστάθηκε με H<sub>2</sub>O σε διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml κατά τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -80°C. Τέλος το anti-MMP-9 αγοράστηκε από την Acris Antibodies Γερμανίας διαλυμένο σε 10 mM PBS (pH 7,4), 0,2 % BSA και 0.09% NaN<sub>3</sub> σε συγκέντρωση 1 mg/ml και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20°C (<http://m1.acris-antibodies.com/pdf/AM00258AF-N.pdf>). Ως αντίσωμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε και στις μελέτες αναστολής το υβριδικό IgG<sub>2b</sub> αντίσωμα ποντικού χωρίς επίτοπο πρόσδεσης σε ανθρώπινα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκε και στις μελέτες ανοσοφθορισμού (R&D Systems Ηνωμένου Βασιλείου).

Ο ανθρώπινος αναστολέας πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης αντιθρομβίνη-III με τη φαρμακευτική επωνυμία Kybernin P αγοράστηκε από την ZLB Behring GmbH Γερμανίας και χρησιμοποιήθηκε στις ίδιες μελέτες ώστε να ανασταλεί η λειτουργία πολλαπλών παραγόντων της πήξης (IIa, VIIa, IXa- XIIa) (Kambas et al., 2011; Olson et al., 2010). Όντας λυοφιλοποιημένος διαλύθηκε με H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 10.000 IU/ml και αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20°C. Ακόμη χρησιμοποιήσαμε τους εκλεκτικούς συνθετικούς χημικούς αναστολείς Azepane-1-carboxyl-Leu-D-Trp(For)-D-Trp-OH (BQ-610) (Rao et al., 2008) και N-cis-2,6-Dimethylpiperidinocarbonyl-β-tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)-D-Nle-OH (BQ-788) (Kernochan et al., 2002; Knowles et al., 2011) του υποδοχέα των ενδοθηλινών τύπου A και B αντίστοιχα (Ishibashi et al., 2001; Jaureguiberry et al., 2004; Juan et al., 2008). Αγοράστηκαν από την Bachem Γερμανίας λυοφιλοποιημένοι και ανασυστάθηκαν με H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 1mM και αποθηκεύτηκαν σε κλάσματα στους -20°C. Χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M επί τη βάση πειραματικών δεδομένων από μελέτες δέσμευσής τους στους υποδοχείς ενδοθηλινών και δοσοεξαρτώμενης απάντησης σε αυτούς (Ishibashi et al., 2001; Jaureguiberry et al., 2004; Juan et al., 2008; Knowles et al., 2011; Rao et al., 2008).

#### **4.2.1.12 Λογισμικό**

Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Word (έκδοση 2010) της Microsoft ΗΠΑ και το Acrobat (έκδοση 8.0 Professional) της Adobe, ΗΠΑ για τη συγγραφή της διατριβής, το Excel (έκδοση 2010) της Microsoft ΗΠΑ για την επεξεργασία και παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων και το Photoshop CS (έκδοση 5) της Adobe ΗΠΑ για την επεξεργασία των εικόνων. Το ImageJ (έκδοση 1.41) του National Institute of Health (NIH) ΗΠΑ χρησιμοποιήθηκε για τη φωτομέτρηση των διαυγών ζωνών της ζυμογραφίας και το SPSS (έκδοση 17.0) της IBM ΗΠΑ για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

## 4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.2.2.1 Ιστοτεμάχια

Στο ενδοσκοπικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης μεταξύ κολονοσκοπούμενων και στα πλαίσια προσυμπτωματικού ελέγχου ή προγραμματισμένης πολυπεκτομής, επιλέγονταν άτομα χωρίς συστηματικό ή τοπικό φλεγμονώδες νόσημα ή νεοπλασία. Αυτό διασφαλιζόταν με λήψη σύντομου ιστορικού και φυσική εξέτασή τους, καθώς και ανασκόπηση του ιατρικού φακέλου και του βιβλιαρίου υγείας / ασφάλισής τους προς αναζήτηση κάθε σχετικής κλινικής και εργαστηριακής πληροφορίας. Λαμβανόταν επίσης η προφορική ενήμερη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή στη μελέτη, σύμφωνα με το εγκεκριμένο από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης ερευνητικό πρωτόκολλο. Μετά την προώθηση του οργάνου ως το τυφλό και κατά την έξοδό του οργάνου λαμβάνονταν με λαβίδα βιοψίας 5- 15 ιστοτεμάχια από διάφορα σημεία κατά μήκος του βλεννογόνου του παχέος εντέρου, υπό την προϋπόθεση ότι κατά τη διάρκεια της κολονοσκόπησης δεν υπήρχαν θετικά ευρήματα, με την εξαίρεση πολυποειδών μορφωμάτων. Στην περίπτωση αυτή, τα δείγματα λαμβάνονταν από σημεία απομακρυσμένα πέραν των 10 cm από τέτοια μορφώματα. Ιστοτεμάχια επίσης μονιμοποιούνταν σε φορμαλδεΰδη και αποστέλλονταν προς ιστολογική εξέταση στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ανασκοπούσαμε την έκθεση του παθολογοανατομικού εργαστηρίου και εξαιρούσαμε από τη μελέτη ιστοτεμάχια στα οποία το πολυποειδές μόρφωμα αποδεικνυόταν νεοπλασία ή η παθολογοανατομική έκθεση έθετε υποψία για άλλη εντερική νόσο. Επίσης συλλέχθηκαν ιστοτεμάχια από ασθενείς με μέτρια προς σοβαρή ενδοσκοπικά φλεγμονή (Crohn's Disease

Activity Index- CDAI>150) αλλά όχι ίνωση του παχέος εντέρου στα πλαίσια διαγνωσμένης νόσου του Crohn (Crohn's Disease- CD) που δεν ελάμβαναν θεραπεία.

Τα ιστοτεμάχια αποθηκεύονταν προσωρινά (μέχρι 2 h) σε κρύο (0°C) HBSS (pH 7,3) με  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  και αντιβιοτικά (100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 2,5 µg/ml αμφοτερικίνη B, 50 µg/ml γενταμυκίνη, 64 µg/ml βανκομυκίνη: P/S/A/G/V), που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να επιτύχουμε στείρες καλλιέργειες κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (subepithelial myofibroblasts- SEMFs). Ειδικά για τη βακτηριοστατική έναντι στελεχών εντερόκοκκων βανκομυκίνη επελέγη αυτή η κατά πολύ μεγαλύτερη των συνήθων ελάχιστων βακτηριοκτόνων συγκεντρώσεων (minimum inhibiting concentration- MIC) συγκέντρωση (van Essen and de Jonge, 2011). Αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες (tubes) όγκου 50ml χρησιμοποιούνταν για την αποθήκευση αυτή και από του σημείου αυτού σε κάθε χειρισμό τους τα ιστοτεμάχια αντιμετωπίζονταν ως στείρα. Η θερμοκρασία των 0°C διατηρούταν με τη βύθιση των δοχείων σε θρυμματισμένο πάγο. Αυτός ο χειρισμός κρίθηκε αναγκαίος ώστε να μειωθεί ο μεταβολικός ρυθμός των κυττάρων των ιστοτεμαχίων προς αποφυγή εκτεταμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης.

#### ***4.2.2.2 Απομόνωση ανθρώπινων πρωτογενών κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (SEMFs)***

Εντός 2 h τα ιστοτεμάχια βλεννογόνου παχέος εντέρου μεταφέρονταν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας & Ηπατολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης και ακολουθούσε εκεί η διαδικασία απομόνωσης ανθρώπινων πρωτογενών κολονικών SEMFs υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (hood).

Αρχικά γίνονταν τρεις πλύσεις στο θρεπτικό συλλογής (HBSS με  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  και P/S/A/G/V) διάρκειας 3- 5min η καθεμία υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την σταδιακή έκπλυση βλέννης και μικροοργανισμών. Ακολουθούσαν άλλες τρεις πλύσεις με HBSS με P/S/A/G/V χωρίς  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$  που είχαν επιπλέον σκοπό την αφαίρεση  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$  από το εξωκυττάριο περιβάλλον, ώστε να μην είναι αποτελεσματική η διακυτταρική σύνδεση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων μέσω δεσμοσωμάτων αλλά και των ιδίων κυττάρων με τη θεμέλια ουσία μέσω ημιδεσμοσωμάτων. (Kouroumalis et al., 2005; Lawrance et al., 2001b; Mahida et al., 1997b)

Ακολουθούσε επώαση επί 10 min υπό ισχυρή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με το προηγούμενο θρεπτικό στο οποίο είχε προστεθεί DTT σε συγκέντρωση 1 mM και ακολούθως έκπλυση των επιθηλιακών κυττάρων που απελευθερώνονταν και των μικροοργανισμών με σύντομες επώσεις σε θρεπτικό χωρίς DTT διάρκειας 3- 5 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DTT είναι αποδιατακτικός παράγοντας και με τη χαμηλή συγκέντρωσή του επί μικρό χρονικό διάστημα επιδιώχθηκε η μετουσίωση και συνακόλουθη απώλεια τρισδιάστατης δομής και λειτουργικότητας των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας με σκοπό τη βέλτιστη αποεπιθηλιοποίηση και τη διευκόλυνση της μετέπειτα εξόδου στο θρεπτικό των SEMFs. Ο πειραματικός χειρισμός που μόλις περιγράφηκε επαναλαμβανόταν δις. (Kouroumalis et al., 2005; Lawrance et al., 2001b; Mahida et al., 1997b)

Κατόπιν, γινόταν επώαση των ιστοτεμαχίων επί 30 min υπό ανάδευση στους  $37^{\circ}\text{C}$  σε HBSS με P/S/A/G/V και EDTA 3 mM χωρίς  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$ . Το EDTA ως χηλικός παράγοντας δέσμευε τα ελεύθερα ιόντα  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$  και η χρήση του αποσκοπούσε και πάλι στο να επιτευχθεί πλήρης λύση διακυτταρικών συνδέσεων και συνεπώς καλύτερη



αποεπιθηλιοποίηση. Μετά από κάθε τέτοια επώαση ακολουθούσαν σύντομα (3- 5 min) ξεπλύματα με το ίδιο θρεπτικό μέσο χωρίς EDTA υπό ισχυρή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και η όλη η διαδικασία επίσης επαναλαμβανόταν δις. (Kouroumalis et al., 2005; Lawrance et al., 2001b; Mahida et al., 1997b)

Τα απογυμνωμένα από επιθηλιακά κύτταρα και με λιγότερο συνεκτικό το συνδετικό ιστοτεμάχια παχέος εντέρου (ώστε να διευκολυνθεί/ επιταχυνθεί η μετανάστευση των μυοϊνοβλαστών από τα ιστοτεμάχια) τοποθετούνταν σε φλάσκες επιφάνειας 25 ή 75 cm<sup>2</sup> με θρεπτικό μέσο RPMI με 10 % FBS και P/S/A/V προς καλλιέργεια μέσα σε κλίβανο επώασης με θερμοκρασία 37°C και 5 % CO<sub>2</sub>. Μόνο η γενταμικίνη που χρησιμοποιούταν στην αρχική κατεργασία των ιστοτεμαχίων αφαιρούταν εξαρχής από την καλλιέργεια. Σε 2-4 εβδομάδες εμφανίζονταν οι πρώτοι μυοϊνοβλάστες που από τα ιστοτεμάχια είχαν μεταναστεύσει και προσδεθεί στο δάπεδο της φλάσκας. Γινόταν αλλαγή θρεπτικού δις εβδομαδιαίως. Επίσης μετά από 28 ημέρες η βανκομικίνη και τα αρχικά ιστοτεμάχια επίσης αφαιρέθηκαν από το καλλιεργητικό μέσο. Παρατηρήσαμε πολυάριθμες εστίες πρόσδεσης SEMFs και πολλαπλασιασμού αυτών στο δάπεδο της φλάσκας και εφόσον είχε καλυφθεί τουλάχιστον 70% της επιφάνειας καλλιέργειας της φλάσκας (εντός 2 μηνών συνήθως) προχωρούσαμε στην πρώτη ανακαλλιέργεια. (Kouroumalis et al., 2005; Mahida et al., 1997b)

Έχει δειχθεί ότι οι μυοϊνοβλάστες αυτοί στην καλλιέργεια διατηρούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των SEMFs να παράγουν λαμινίνες -β1 και -γ1 και κολλαγόνο τύπου IV και να διατηρούν τη θετικότητα σε α-SMA και τα παραπάνω χαρακτηριστικά επί ανακαλλιεργειών (Mahida et al., 1997a). Εντερικοί μυοϊνοβλάστες αρουραίων έχουν επίσης δειχθεί ότι σε πρώιμες διαιρέσεις διατηρούν ικανή ποσότητα κυτταροπλάσματος, έκφραση

$\alpha$ -SMA, κολλαγόνου IV, φμπρονεκτίνης και προάγουν τον πολλαπλασιασμό σειρών επιθηλιακών κυττάρων, χαρακτηριστικά που σε απώτερες διαιρέσεις (>9) χάνουν (Poureyron et al., 2003).

#### **4.2.2.3 Κυτταρικές σειρές**

Οι ανθρώπινες σειρές κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 και CaCO-2 προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και η κυτταροσειρά ανθρώπινων κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO από εμβρυϊκό βλεννογόνο παχέος εντέρου (Fogh et al., 1977; Rousset, 1986; Trainer et al., 1988). Αξίζει αναφοράς το ότι έχει περιγραφεί διαφοροποίηση των επιθηλιακών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής προς κλώνους με τελικά φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά (Halttunen et al., 1996; Matsumoto et al., 1990; Zweibaum et al., 1985).

Τα 18CO εμφανίζουν πολλά από τα χαρακτηριστικά των SEMFs, όπως η αντιστρεπτή αστεροειδής μορφολογία, η έκφραση  $\alpha$ -SMA, χαρακτηριστικά ενδοκυττάρια οργανίδια των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων και μεμβρανικούς υποδοχείς του νατριουρητικού πεπτιδίου και των ενδοθηλινών (Simmons et al., 2002; Simmons et al., 1999; Valentich et al., 1997). Ακόμη παράγουν ιδιοσυστασιακά COX1, ενώ η COX2 είναι επαγωγίμη (Mifflin et al., 2002) και η IL-1 επάγει PGE<sub>2</sub> στα 18CO (Hinterleitner et al., 1996).

#### **4.2.2.4 Κυτταρικές καλλιέργειες**

Οι κυτταρικές καλλιέργειες έγιναν σε φλάσκες επιφάνειας 75 cm<sup>2</sup> χρησιμοποιώντας το θρεπτικό υλικό McCoy's για τα HT-29, MEM για τα CaCO-2, MEM-Alpha για τα 18CO και DMEM για τους SEMFs, όλα εμπλουτισμένα με 10% FBS και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100 mg/ml), στρεπτομυκίνη (100μg/ml) και αμφοτερικίνη B (2,5 mg/ml). Προχωρούσαμε σε

ανακαλλιέργεια όταν τα κύτταρα είχαν καλύψει τουλάχιστον το 95 % του πυθμένα της φλάσκας χρησιμοποιώντας 3 ml ισότονου διαλύματος που περιείχε την πρωτεάση θρυψίνης (0,25 %) και τη χηλική ουσία EDTA (1 mM, δεσμεύει τα ελεύθερα ιόντα  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$ ) μετά από δύο σύντομες πλύσεις με HBSS με τα παραπάνω αντιβιοτικά χωρίς  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$ . Η επώαση με το διάλυμα θρυψίνης και EDTA γινόταν στους 37°C για 5- 10 min. Το EDTA ως χηλικός παράγοντας δέσμευε τα ελεύθερα ιόντα  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  και η θρυψίνη πραγματοποιούσε ήπια πρωτεόλυση πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, ώστε να επιτευχθεί λύση των διακυτταρικών συνδέσεων και των συνδέσεων με τον πυθμένα της φλάσκας και συνεπώς να ελευθερωθούν τα κύτταρα σε εναιώρημα. Ακολουθούσε κορεσμός του διαλύματος θρυψίνης / EDTA με μεγάλη ποσότητα θρεπτικού διαλύματος το οποίο λόγω του FBS και της παρουσίας  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  αδρανοποιούσε τη θρυψίνη και ανέστρεφε την ένδεια  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  αντίστοιχα, αποτρέποντας πιθανό κυτταρικό θάνατο λόγω παράτασης αυτών των συνθηκών. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν σε κωνικούς σωλήνες (tubes) των 50 ml στα 150 g για 7 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η κυτταρική πελέττα επαναδιαλυόταν σε καθαρό θρεπτικό μέσο, ο όγκος του οποίου σε κάθε 75 cm<sup>2</sup> φλάσκα ανακαλλιέργειας ήταν 15 ml. Η σχέση ανακαλλιέργειας ήταν 1:3-5 για HT-29 και CaCO-2 και 1:2 για 18CO και SEMFs. Οι καλλιέργειες πραγματοποιούνταν σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C και 5 % CO<sub>2</sub>.

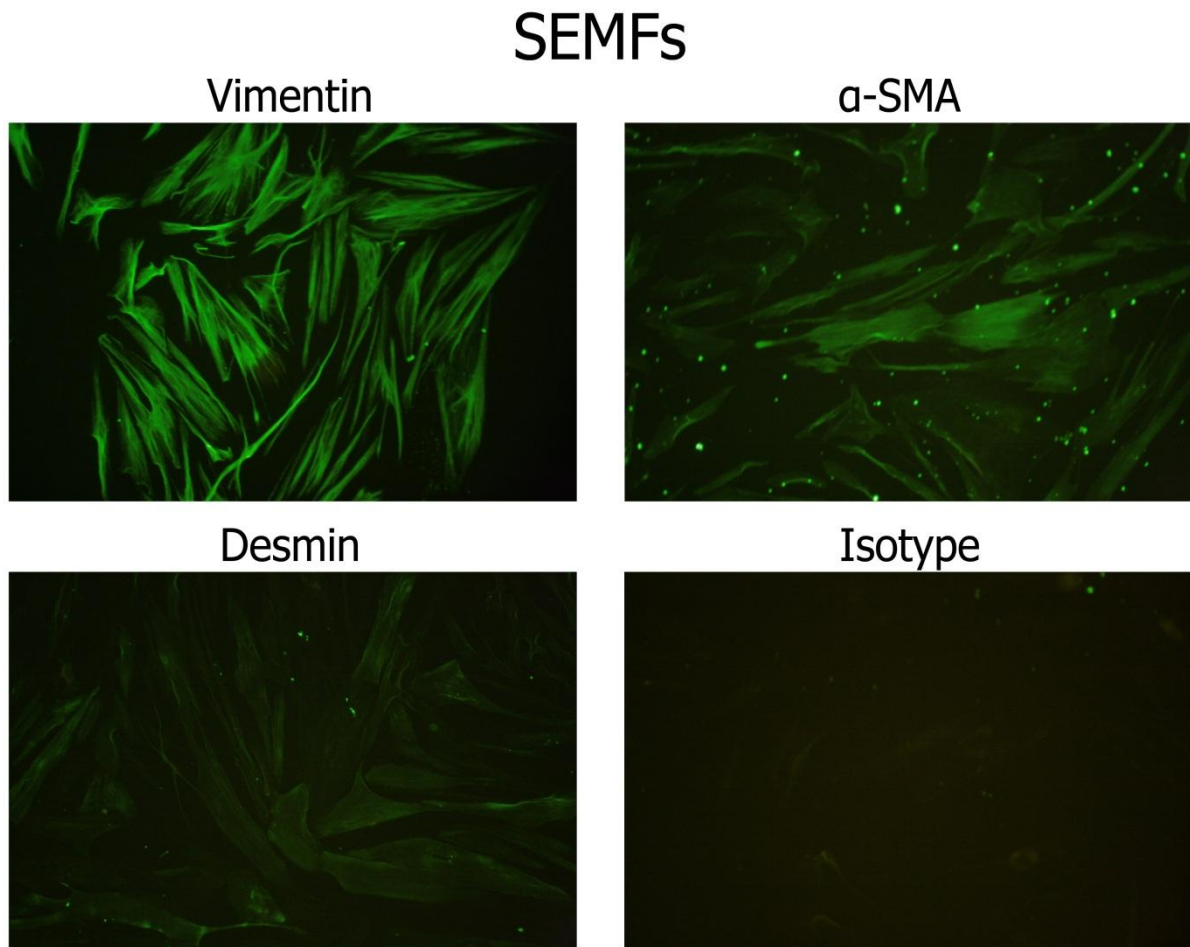
#### **4.2.2.5 Ανοσοφθορισμός**

Ο φαινότυπος των SEMFs επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού. Οι SEMFs διαιρέθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν σε πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 2 ή 8 θαλάμων μέχρι πληρότητας 80 %. Τότε το θρεπτικό μέσο DMEM αφαιρέθηκε και έγιναν δύο πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Προστέθηκε PFA ως μονιμοποιητικό μέσο για 20

min και ακολούθησαν άλλα τρία πλυσίματα με TBS διάρκειας 10 min το καθένα. Ακολούθως προστέθηκε 3,3 % ορός αιγός (Normal Goat Serum- NGS) για 30 min ώστε να επιτευχθεί κορεσμός των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων σε επόμενο βήμα. Κατόπιν, επαναλήφθηκαν άλλες δύο πλύσεις με TBS. Ακολούθως τα αντισώματα έναντι ανθρώπινης βιμεντίνης (0,5 μg/ml), α-ακτίνης λείων μυϊκών ινών (α-SMA, 0,5 μg/ml) και δεσμίνης (1 μg/ml) ή αντίσωμα ελέγχου (1 μg/ml) που δεν είχε επίτοπο σε ανθρώπινα κύτταρα διαλύθηκαν σε TBS που περιείχε 0,5 % NGS και 0,3 % Triton-X 100 (προς εξασφάλιση προσπέλασης των αντισωμάτων στο κυτταρόπλασμα) για 12- 18 h στους 4°C. Ακολούθησαν τρία νέα πλυσίματα με TBS διάρκειας 5 min το καθένα και ακολούθως προστέθηκε το φθορίζον (AF488) δεύτερο αντίσωμα που προσδενόταν στο σταθερό τμήμα οποιουδήποτε αντισώματος IgG ποντικού διαλυμένο σε TBS και σε 0,1 mg/ml για 1 h στο σκοτάδι. Ξεπλύναμε εκ νέου με TBS τρεις αφήνοντας 5 min ανάμεσα στα πλυσίματα. Κατόπιν αφαιρέσαμε πολύ προσεκτικά το πλαστικό των θαλάμων και τα υπολείμματα σιλικόνης που έμειναν στο πλακίδιο. Τέλος, προσθέσαμε 1 λεπτή σταγόνα υλικού κάλυψης φθορισμού (mounting medium) πάνω σε καθέναν από τους πυθμένες, τοποθετήσαμε την καλυπτρίδα προσεκτικά ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα ανάμεσα και σφραγίσαμε πλευρικά αεροστεγώς με λάκα για όνυχες για να μην αποξηρανθούν τα μονιμοποιημένα κύτταρα.

Τα πλακίδια φυλάσσονταν στο σκοτάδι στους 4°C και εξετάζονταν στο μικροσκόπιο φθορισμού εντός δύο εβδομάδων. Οι μυοϊνοβλάστες ταυτοποιήθηκαν ως βιμεντίνη θετικά, α-SMA θετικά και δεσμίνη ασθενώς θετικά κύτταρα με σήμα κατά πολύ εντονότερο από αυτό του αντισώματος ελέγχου (Adegboyega et al., 2002; Jobson et al., 1998; Lawrance et

al., 2001b; Leeb et al., 2002; Leeb et al., 2003; Mahida et al., 1997a; McKaig et al., 2002; Pourreyron et al., 2003; Powell et al., 2005). (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1.** Οι πρωτογενείς υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες ταυτοποιούνται ως βιμεντίνη (+),  $\alpha$ -ακτίνη λείων μυϊκών ινών (+), δεσμίνη (+/-) κύτταρα. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες ανοσοφθορισμού για βιμεντίνη,  $\alpha$ -ακτίνη λείων μυϊκών ινών ( $\alpha$ -smooth muscle actin-  $\alpha$ -SMA), δεσμίνη και αντίσωμα ελέγχου ιδίου ισοτύπου χωρίς επίτοπο (Isotype).

Παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζει και η κυτταροσειρά 18CO, με δισκοειδή κύτταρα και πυρήνες, μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος, αλλά και αστεροειδή μορφολογία με δενδριτικές προσεκβολές σε συνθήκες μειωμένων θρεπτικών συστατικών (Valentich et al., 1997). Ομοίως με τους SEMFs εκφράζουν  $\alpha$ -SMA, βιμεντίνη και ασθενώς δεσμίνη (Valentich et al., 1997).

#### 4.2.2.6 Διεγέρσεις κυτταροκαλλιιεργειών

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις διαιρέσεις 18- 29 για τα CaCO-2, 17- 40 για τα HT-29, 20- 30 για τα 18CO (από την παραλαβή τους) και 3- 8 για τους πρωτογενείς SEMFs (από την απομόνωσή τους). Τα κύτταρα ετίθεντο σε πλάκα έξι (έκαστο επιφάνειας 9.6 cm<sup>2</sup>) ή δώδεκα (3.5 cm<sup>2</sup>) φρεατίων αντί φλασκών. Μόλις έφθαναν σε πληρότητα 95%, αντικαθιστούσαμε με θρεπτικό υλικό χωρίς FBS για 16- 24 ώρες και έπειτα με όγκο 1,5 ή 0,553 ml/ φρεάτιο προκειμένου για πλάκα 6 ή 12 φρεατίων αντίστοιχα, κρατώντας έτσι το λόγο επιφάνειας καλλιέργειας προς όγκο θρεπτικού σταθερή. Κατόπιν γινόταν αλλαγή με θρεπτικό χωρίς FBS στο οποίο είχαν προστεθεί ή όχι μία ή περισσότερες από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α (10 μg/ml), TNF-α (100 μg/ml), IFN-γ (300 IU/ml) ή ο TGF-β1 σε βαθμίδωση συγκεντρώσεων (250, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 20.000 pg/ml). Τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών συλλέγονταν στις 24 h σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια όγκου 1,5 ml, φυγοκεντρούνταν στα 100 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προς καθίζηση των κυτταρικών συγκριμάτων και το υπερκείμενο καταψυχόταν στους -80°C σε νέα μικροσωληνάρια 1,5 ml ή σε βοθρία πλακών 96 βοθρίων. Τα κύτταρα λύονταν είτε με Trizol αν προορίζονταν για μελέτη mRNA ή με εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα λύσης αν προορίζονταν για μελέτη πρωτεϊνών και το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο (cell lysate) φυλασσόταν στους -80°C.

Σε πειράματα διέγερσης εντερικών μυοϊνοβλαστών (SEMFs, 18CO) με υπερκείμενο από κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου (HT-29, CaCO-2) εφαρμόστηκε τροποποίηση του πρωτοκόλλου, ώστε οι κυτταροκίνες διέγερσης των επιθηλιακών να μην έχουν πιθανή άμεση επίδραση στους μυοϊνοβλάστες. Αρχικά στα επιθηλιακά ετίθετο απλό θρεπτικό ή θρεπτικό με μία ή περισσότερες από τις τρεις κυτταροκίνες (IL-1α, TNF-α, IFN-γ στις ίδιες

συγκεντρώσεις) επί 6 h, χρόνο ικανό για να ληφθούν τα ενδοκυττάρια σήματα από αυτές (Bocker et al., 2000; Dossinger et al., 2002; Kolios et al., 2000; Lee et al., 2008; Li et al., 2004; Liu et al., 2003b; Ma et al., 2005; Manousou et al., 2008; Paul et al., 2009; Yeruva et al., 2008). Ακολούθως τα κύτταρα πλένονταν προσεκτικά με το αντίστοιχο θρεπτικό χωρίς FBS ώστε να εκπλυθούν και τα υπολείμματα των κυτταροκινών και ετίθετο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο χωρίς κυτταροκίνες για άλλες 18 h. Το υπερκείμενο αυτό των επιθηλιακών (Epithelial Cell Conditioned- ECC medium) ετίθετο υπέρ καλλιέργειών μυοϊνοβλαστών επί 24 h με ή χωρίς την προσθήκη αναστολέων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-ran-TGF-β (10 ng/ml, <http://www.rndsystems.com/pdf/mab1835.pdf>), anti-CTGF (9 μg/ml, <http://m1.acris-antibodies.com/pdf/AP01150PU-N.pdf>), anti-TF (10 μg/ml) (Kambas et al., 2011), anti-MMP-9 (4 ng/ml, <http://m1.acris-antibodies.com/pdf/AM00258AF-N.pdf>) ή αντίσωμα ελέγχου σε όμοια συγκέντρωση με το αντίσωμα υπό μελέτη, οι αναστολείς BQ-610 και BQ-788 του υποδοχέα ενδοθηλινών A και B αντίστοιχα σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M (Ishibashi et al., 2001; Jaureguiberry et al., 2004; Juan et al., 2008; Rao et al., 2008) και αντιθροβίνη-III (3 U/ml) (Kambas et al., 2011; Olson et al., 2010). Οι περαιτέρω χειρισμοί του παρέμεναν ίδιοι με αυτούς που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

#### ***4.2.2.7 Αντίστροφη μεταγραφή και διπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (duplex RT-PCR)***

Το RNA απομονωνόταν από τα cell lysates σε Trizol με προσθήκη χλωροφορμίου, φυγοκέντρηση (12.000 g, 15 min), επώαση του διαφανούς υπερκειμένου (που περιείχε το mRNA) με διάλυμα ισοπροπανόλης 70 % για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και νέα φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 min. Η σχηματιζόμενη λευκή πελέττα με το mRNA πλενόταν δις με διάλυμα αιθανόλης 70 % (12.000 g για 10 min και 7.500 g για 5 min) και

ακολούθως διαλυτοποιούταν σε 15- 40 μl στείρο και χωρίς DNAσες και RNAσες H<sub>2</sub>O. Το διαλυμένο σε H<sub>2</sub>O mRNA αποθηκευόταν στους -80°C και περαιτέρω πειραματικοί χειρισμοί γίνονταν πλέον μόνο πάνω σε πάγο. Η συγκέντρωση του mRNA στα δείγματα εκτιμήθηκε με φωτομέτρηση υπεριώδους και εφαρμογή του τύπου:  $RNA (\mu g/ml) = OD_{260nm} \times dilution \text{ factor} \times 40$ .

Με βάση την υπολογιζόμενη συγκέντρωση σε όγκο που περιείχε 1 μg mRNA σε συνολικό όγκο 8 μl (ή μόνον H<sub>2</sub>O ως δείγμα ελέγχου) προσετίθετο DNAση 1 U/ 9 μl σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min ώστε να αποδομηθεί το εναπομείναν DNA από την παραπάνω μηχανική διαδικασία απομόνωσης mRNA. Κατόπιν η DNAση απενεργοποιούταν αρχικά με προσθήκη 2,5 mM EDTA (1 μl) που δέσμευε Ca<sup>++</sup> και Mg<sup>++</sup> και ακολούθως με θέρμανση στους 65°C για 10 min στον θερμοκυκλωτή. Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη oligo(dT)<sub>12-18</sub> 1 μg/ 20 μl εκκινητή (primer) που προσδενόταν στις κοινές στο άκρο όλων των mRNA poly(A) ακολουθίες βέλτιστα υπό 70°C για 10 λεπτά (θερμοκυκλωτής). Οι ακολουθίες αυτές λειτουργούσαν ως ακολουθίες έναρξης για το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση στο επόμενο στάδιο (200 U / 20 μl). Ακολούθως στο κάθε δείγμα προσθέταμε 4 μl / 20 μl 5x first strand buffer, δεοξυριβονουκλεοτίδια (2,5 nM / 20 μl εκάστου dNTP), 0,2 nM DTT / 20 μl (αποδιατακτικός παράγοντας που θα κρατήσει ευθείες της αλυσίδες mRNA, ώστε να λαμβάνει χώρα η αντίστροφη μεταγραφή), αναστολέα RNAσών (50 U / 20 μl) και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (200 U / 20 μl). Τα δείγματα θερμαίνονταν στους 42°C για 60 min και κατόπιν στους 95°C για 5 min ώστε να αδρανοποιηθεί η superscript II. Με την αντίστροφη μεταγραφή (RT) λαμβάναμε πολλαπλά αντίγραφα όλων των αρχικών μορίων mRNA σε μορφή cDNA.



Το cDNA (ή μόνον H<sub>2</sub>O ως δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιούνταν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) όγκου 20 μl με 1 U Taq DNA πολυμεράση, 2,5 nM / 20 μl εκάστου dNTP και τέσσερις ειδικούς εκκινητές (primers): ένα ζευγάρι για το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο GAPDH σε κατάλληλο κλάσμα της συνιστώμενης συγκέντρωσης (5 μM) και ένα ζευγάρι για κάθε ισομορφή TGF-β (5 μM). Αναλυτικά οι συνθήκες των PCR ήταν: 1) 94°C για 5 min (αρχική αποδιάταξη δίκλωνου cDNA- initial cDNA denaturation), 2) κατόπιν μεταβλητός αριθμός κύκλων της μορφής: 94°C για 30 sec (αποδιάταξη- denaturation), βέλτιστη θερμοκρασία των εκκινητών (primers) για την προσαρμογή τους στο εκμαγείο 30 sec (annealing), 72°C για 30 sec (επιμήκυνση των εκκινητών- extension), γ) 72°C για 7 min (τελική επιμήκυνση- final extension) και δ) διατήρηση θερμοκρασίας στους 4°C. Με δοκιμές προσδιοριζόταν πειραματικά η βέλτιστη θερμοκρασία σε κάθε τετράδα εκκινητών (primers) για την προσαρμογή τους στο εκμαγείο, που δεν ταυτιζόταν απαραίτητα με το θεωρητικό μέσο όρο, αφού συχνά δεν λαμβάναμε ικανοποιητικά αποτελέσματα, ως προς ένταση σήματος και παραπροϊόντα, χρησιμοποιώντας αυτόν. Ακόμη με δοκιμές προσεγγίσθηκε και ο βέλτιστος αριθμός κύκλων, ώστε και σήμα να υπάρχει στην ηλεκτροφόρηση των δύο εκλεκτικά πολλαπλασιασμένων cDNA σε πηκτή αγαρόζης και αυτό να μην είναι υπερκορεσμένο, ώστε να μπορούμε να λάβουμε μια ημιποσοτική εντύπωση έκφρασης των mRNA.

Με διαλύτη TBE 0,5 x παρασκευαζόταν πηκτή (gel) αγαρόζης 2 % που περιείχε και 40 μg /100 ml βρωμιούχο αιθίδιο με διάλυση, βρασμό και ψύξη στην κατάλληλη μήτρα. Τα προϊόντα της PCR αναμιγνύονταν με σταθερό όγκο διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης 0,25 % και Ficoll-400 3 %, ώστε αφενός το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης να είναι ορατό και αφετέρου το μείγμα να καθιζάνει στα βοθρία της πηκτής. Ίση ποσότητα από το κάθε μείγμα

και δείκτης μεγέθους DNA (βαθμίδωση αριθμού βάσεων ανά 100) φορτωνόταν στα βοθρία και ακολουθούσε οριζόντια ηλεκτροφόρηση στην πηκτή (gel) υπό σταθερή τάση 100 V. Μόλις η απομάκρυνση του μετώπου προσέγγιζε τα 5 cm παύαμε την ηλεκτροφόρηση και λαμβάναμε απεικόνιση της πηκτής (gel) υπό υπεριώδες φως, καθώς χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο που προσδενόταν στο cDNA δημιουργούνταν φθορίζουσες μπάντες στο μέγεθος βάσεων που αντιστοιχούσε σε καθένα από τα δύο προϊόντα: GAPDH (σταθερό σήμα αναφοράς) και TGF-β1 ή -β2 ή -β3. Επιδιώχθηκε η σταθερότητα του πρώτου ώστε να υπάρχει μια πρώτη ποιοτική αξιολόγηση του δευτέρου ως προς επαγωγή, καταστολή ή σταθερότητα πριν προχωρήσουμε απευθείας στην μέτρηση των αντίστοιχων εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

#### ***4.2.2.8 Ανοσοενζυμική μέθοδος (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA)***

Ανθρώπινες εμπορικά διαθέσιμες ELISA χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των τριών TGF-β ισομορφών και του TIMP-1 σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Σύμφωνα με τα συνιστώμενα από τον προμηθευτή πρωτόκολλα, πλάκες 96 βοθρίων επωάζονταν κατά τη διάρκεια της νύκτας σε θερμοκρασία δωματίου με 100 μl PBS με τις συνιστώμενες από τον κατασκευαστή συγκεντρώσεις του πρωτεύοντος αντισώματος (αντίσωμα σύλληψης, 2 μg/ml) ώστε αυτό να εμπεδωθεί στον πυθμένα των βοθρίων. Στη συνέχεια οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης δεσμεύονταν με 300μl του συνιστώμενου διαλύματος για μία ώρα (TGF-β 1: 5 % Tween-20 και TGF-β2, TGF-β3, TIMP-1: 1 % BSA- σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Ο λανθάνων TGF-β ενεργοποιούνταν με οξίνιση (1 N HCl σε όγκο ίσο με 10 % του δείγματος) για 10 min και ακολουθούσε επαναλκαλοποίηση των δειγμάτων με 2,7 N NaOH / 1 M HEPES για τον TGF-β1 ή 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES για TGF-

$\beta 2$  και TGF- $\beta 3$  (ίσος με τον παραπάνω όγκο), ώστε να μετράται η συνολική συγκέντρωση της κάθε ισομορφής και όχι μόνο αυτή της ενεργού μορφής. Προκειμένου για τις ισομορφές TGF- $\beta$  δεν γινόταν περαιτέρω αραίωση των υπερκειμένων πέραν αυτής που επέφερε η διαδικασία ενεργοποίησης ( $\approx 71\%$ ), ενώ για τον TIMP-1 γινόταν αραίωση στο 30% στα υπερκείμενα επιθηλιακών κυτταροσειρών και στο 50% στα υπερκείμενα μυοϊνοβλαστών. 100  $\mu\text{l}$  από τα αραιωμένα υπερκείμενα ή διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης προς μέτρηση τοποθετούνταν ανά βοθρίο σε διπλέττα ανά δείγμα επί 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε η πρωτεΐνη προς μέτρηση στα δείγματα να δεσμευτεί στους πυθμένες των βοθρίων από το εμπεδωμένο αντίσωμα σύλληψης. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης αρνητικά δείγματα ελέγχου με τον ίδιο διαλύτη χωρίς τη διαλυμένη πρωτεΐνη. Ακολουθούσε η επώαση επί 2 h με το δευτερογενές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (αντίσωμα ανίχνευσης), που προσδενόταν στην πρωτεΐνη προς μέτρηση σε διαφορετική θέση από το αντίσωμα σύλληψης, στη συνιστώμενη συγκέντρωση και διαλύτη (TGF- $\beta 1$ : 300 ng/ml σε 1,4 % βόειο ορό άνευ λιπιδίων σε PBS, TGF- $\beta 2$ : 300 ng/ml, TGF- $\beta 3$ : 100 ng/ml, TIMP-1: 50 ng/ml σε 1 % BSA σε PBS). Επόμενο βήμα ήταν η σύζευξη του προσδεμένου αντισώματος ανίχνευσης μέσω της συνδεδεμένης σε αυτό βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη που ήταν συνδεδεμένη με τη σειρά της με Horseradish υπεροξειδάση (Horseradish peroxidase- HRP). Απαιτούνταν όγκος 100 $\mu\text{l}$  και χρόνος 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταξύ των ως τώρα βημάτων γίνονταν τρεις πλύσεις των βοθρίων με 0,05 % Tween-20 σε PBS. Κατόπιν γινόταν προσθήκη 50  $\mu\text{l}$  τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) και 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (αντιδρώντα της HRP) σε κάθε βοθρίο, ώστε ανάλογα με την ποσότητα HRP και συνεπώς πρωτεΐνης προς μέτρηση σε κάθε βοθρίο να παραχθεί ανάλογη ένταση κυανού χρώματος από την οξείδωση της TMB. Σε δείγματα που

περιείχαν TGF- $\beta$  ισομορφές ή TIMP-1 το κυανό χρώμα άλλαζε σε ωχρό και εντός 15- 30 min παύαμε τη δράση της HRP με την προσθήκη 50  $\mu$ l 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Σύμφωνα με τις οδηγίες του προϊόντος, μετριόταν με φωτόμετρο η ένταση φωτός (optical density- OD) μήκους κύματος 450 nm από την οποία αφαιρούνταν η OD στα 540 nm (φόντο).

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, αρχικά από όλες τις OD αφαιρούνταν η μέση τιμή των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου. Από τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης της προς μέτρηση πρωτεΐνης κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη της συγκέντρωσης σε συνάρτηση με την OD στο πρόγραμμα Excel και με το ίδιο πρόγραμμα η καμπύλη αυτή προσεγγιζόταν με την πιο κατάλληλη τετραωνυμική μαθηματική συνάρτηση. Κατόπιν, η συνάρτηση αυτή χρησιμοποιούταν για να υπολογιστεί η συγκέντρωση κάθε βοθρίου δεδομένης της OD του και αναγόταν σε συγκέντρωση του δείγματος μετά από διαίρεση με το ποσοστό αραιώσης. Ο μέσος όρος των δύο δειγμάτων από το ίδιο δείγμα λαμβανόταν υπόψη.

#### **4.2.2.9 Ζυμογραφία σε μετουσιωμένο κολλαγόνο- gelatin (gelatin zymography)**

Οι ενζυμικές δραστηριότητες των μεταλλοπρωτεασών 2 και 9 (MMP-2 και MMP-9 αντίστοιχα) ανιχνεύονταν και ποσοτικοποιούνταν με ζυμογραφία σε μετουσιωμένο κολλαγόνο- gelatin (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994; McKaig et al., 2003; Xidakis et al., 2005). Πηκτή (gel) με 10 % δωδεκύλ-θειικό Νάτριο (SDS) και 0,25 % βόειο μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin) παρασκευαζόταν. Υπερκείμενα καλλιέργειών ή θρεπτικό ως αρνητικό δείγμα ελέγχου προστίθενταν σε συμπυκνωμένο 5 φορές (5x) διάλυμα ανάμειξης δείγματος (sample buffer: 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 5 % SDS, 20 % γλυκερόλη, 0,1 % κυανού της βρωμοφαινόλης) και επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Τα δείγματα

καθώς και δείκτης μοριακού βάρους φορτώνονταν στην πηκτή και ηλεκτροφορούνταν με ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 20 mA και μέγιστης διαφοράς τάσης 140 V επί 6 h, ώστε τα ένζυμα να διαχωρίζονται με βάση το μοριακά βάρη (MB) τους. Κατόπιν, οι πηκτές πλένονταν τέσσερις φορές (15 min κάθε φορά) σε περίσσεια διαλύματος επανασύστασης της λειτουργικότητάς των MMPs (renaturing buffer: 2.5 % Triton X-100), ώστε να λαμβάνουν εκ νέου την αρχική τριτοταγή δομή τους και να μπορούν να καταστούν λειτουργικά. Ακολουθούσε πλύσιμο 30 min σε διάλυμα με ιόντα που διασφάλιζαν δράση MMPs (development buffer: 50 mM TrisCl, pH 7,5, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 μM ZnCl<sub>2</sub>, 0,02 % Brij-35) και επώαση επί 60- 80 h στους 37°C στο ίδιο διάλυμα. Το development buffer διασφάλιζε το απαραίτητο pH και ιοντική σύνθεση ώστε να είναι δραστικά τα ένζυμα στην πηκτή. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι λειτουργικές πλέον μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) διασπούσαν τη gelatin στα σημεία που αντιστοιχούσαν στα MB τους.

Κατόπιν οι πηκτές επωάζονταν επί 3 h σε διάλυμα χρώσης (0,5 % Coomassie blue R-250, 30 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ), που έδινε κυανή χρώση στα μέρη της πηκτής που υπήρχε gelatin αλλά άφηνε χωρίς χρώση τα μέρη στα οποία αυτή είχε ήδη διασπασθεί από μεταλλοπρωτεάσες. Κατόπιν οι πηκτές επωάζονταν με διάλυμα αποχρωματισμού (50 % μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 30- 60 min ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αντίθεση χρώματος μεταξύ των λευκωπών περιοχών της ενζυμικής δράσης των μεταλλοπρωτεασών και της λοιπής κυανής πηκτής. Αξιολογήθηκαν η ενεργός MMP-9 που αντιστοιχούσε σε λευκωπή περιοχή με MB≈ 100 kD, η προμορφή και η ενεργός μορφή της MMP-2 σε MB≈ 72 και 68 kD (τα MB εντοπίζονταν με τη βοήθεια του δείκτη MB) (Cook et al., 2000; Fredriksson et al., 2006; Kerrigan et al., 2000; Lu et al., 2004; Reel et al., 2009; Sasaki et al., 2000). Οι λευκές ζώνες σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη εκτιμάται ότι αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα MB

(120- 220 kDa) και μειώνονται ή εξαφανίζονται μετά από επώαση με APMA, οπότε έχει προταθεί ότι οι ζώνες υψηλού μοριακού βάρους είναι το αποτέλεσμα δέσμευσης των MMPs με μικροσφαιρίνη (25 kDa) (Triebel et al., 1992; Woessner, 1995) ή lipocalin (Kjeldsen et al., 1993), με αποτέλεσμα την παραγωγή μονομερών (125 kDa) και διμερών (215 kDa). Η ποσοτικοποίηση της έντασης των λευκωπών περιοχών γινόταν μετά από αφαίρεση του σήματος του φόντου με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ, αφότου οι έγχρωμες σαρωμένες εικόνες μετατρέπονταν σε εικόνες βαθμίδωσης γκριζου με το πρόγραμμα Photoshop CS. Βεβαιωνόμασταν επίσης ότι το αρνητικό δείγμα ελέγχου δεν παρήγαγε περιοχές λύσης της gelatin.

#### **4.2.2.10 Ανοσοκυτταροχημεία**

Πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημική χρώση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του προϊόντος LSAB + System-AP. Συνοπτικά, SEMFs σε πλακίδια καλλιέργειας δύο θαλάμων υποβλήθηκαν σε επιδράσεις με ή χωρίς ECC medium από επιθηλιακές κυτταροσειρές (HT-29, CaCO-2) προδιεγερμένες ή όχι με το σύνολο των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α και IFN-γ. Επίσης οι ίδιες επιθηλιακές κυτταροσειρές επώαστηκαν με τις ίδιες τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες για να αξιολογηθεί ή παραγωγή CTGF από αυτές. Μετά από 24 h επίδρασης, τα κύτταρα πλύθηκαν και μονιμοποιήθηκαν με παγωμένη αιθανόλη για 20 min. Κατόπιν ενυδατώθηκαν και επώαστηκαν για 30 min με 3,3 % NGS για να μειωθεί η μη ειδική χρώση. Ακολούθως, επώαστηκαν με anti-CTGF αντίσωμα σε αραιώση 1:100 υπό θερμοκρασία δωματίου για 4 h. Στη συνέχεια, τα πλακίδια επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε βιοτινυλιωμένο δεύτερο αντίσωμα έναντι αιγός. Τέλος έγινε χρώση με στρεπταβιδίνη συζευγμένη σε αλκαλική φωσφατάση ώστε με την ισχυρή σύνδεση βιοτίνης

του αντισώματος και στρεπταβιδίνης να προσκολληθεί η αλκαλική φωσφατάση στο δεύτερο αντίσωμα. Με το χρωμογόνο φουσκίνη ο CTGF απεικονίστηκε έντονα ερυθρός. Αιματοξυλίνη χρησιμοποιήθηκε για να χρωσθούν οι κυτταρικοί πυρήνες κυανοί και ηωσίνη για να χρωσθεί το κυτταρόπλασμα ασθενώς ερυθρό, ως χρώσεις φόντου.

#### **4.2.2.11 Μέτρηση κολλαγόνου**

Η μέθοδος της ερυθρής χρωστικής Sirius Red (Sircol kit) ανιχνεύει το σύνολο του διαλυτού κολλαγόνου αποδίδοντας έτσι μια συνολική συνιστώσα της παραγωγής του κυριότερου συστατικού της εξωκυττάριας ουσίας. Η οργανική αυτή χρωστική έχει την ιδιότητα σύνδεσης με τις επαναλαμβανόμενες τριπεπτιδικές αλληλουχίες Γλυκίνη-Χ-Υ (Χ: προλίνη, Υ: υδροξυλιωμένη προλίνη) που υπάρχουν στα ανέλικτα άκρα των περισσοτέρων μορφών κολλαγόνου (van der Rest and Garrone, 1991). Προσθέταμε το δείγμα ή διαλύματα ίδιου όγκου και γνωστής ποσότητας βόειου κολλαγόνου Ι σε 200 μl της χρωστικής ή τη χρωστική μόνη της (αρνητικό δείγμα ελέγχου) και επωάζαμε επί 30 min υπό ήπια ανάδευση. Κατόπιν φυγοκεντρούσαμε τα δείγματα στις 12.600 στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και κρατούσαμε την ερυθρή πελέττα κολλαγόνου-χρωστικής. Ακολούθως, στην πελέττα προσθέταμε 420 μl διαφανούς αλκαλικού διαλύματος 0,5 M NaOH, διάλυμα το οποίο επαναδιέλυε την πελέττα υπό ήπια ανάδευση επί 10 min. Έτσι, το διάλυμα γινόταν ερυθρό με την ένταση του χρώματος να είναι συνάρτηση της αρχικής ποσότητας του κολλαγόνου, λόγω της γραμμικής αναλογίας δέσμευσης κολλαγόνου-χρωστικής. Από 200 μl ανά δείγμα μεταφέρονταν σε δύο βοηθία πλάκας 96 βοηθίων και ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 540 nm. Ο μέσος όρος των OD των δύο βοηθίων αναγόταν σε συγκέντρωση κολλαγόνου με τη βοήθεια γραμμικής συνάρτησης συγκέντρωσης-OD που απεικονίστηκε και προσεγγίστηκε μαθηματικά στο Microsoft Excel αξιοποιώντας τα

δεδομένα των OD των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης βόειου κολλαγόνου I. Πριν την αναγωγή αυτή από όλες αυτές τις OD είχε αφαιρεθεί η OD του αρνητικού δείγματος ελέγχου. (<http://www.biocolor.co.uk/manuals/sircol.pdf>)

Το κολλαγόνο που μετρήθηκε ήταν προϊόν λύσης κυττάρων (cell lysate) από ένα βοθρίο πλάκας 12 βοθρίων με πληρότητα μυοϊνοβλαστών 100 %, καθώς προκαταρκτικά πειράματα εφαρμογής της μεθόδου σε συμπυκνωμένα υπερκείμενα καλλιιεργειών SEMFs έδειξαν ότι αυτοί παράγουν μετρήσιμο με τη μέθοδο κολλαγόνο  $<<1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  επιφάνειας καλλιέργειας με 100% πληρότητα. Οι ODs για 1 βοθρίο πλάκας 6 ή 12 βοθρίων ουσιαστικά δε διέφεραν από αυτές του αρνητικού δείγματος ελέγχου. Αυτό καθιστούσε απαγορευτική τη μέτρηση κολλαγόνου σε υπερκείμενα προκειμένου για ρεαλιστικές πειραματικές επιφάνειες καλλιέργειας.

#### **4.2.2.12 Δοκιμασία επούλωσης πληγής (scratch test)**

Η επούλωση αναγνωρίζεται ως η πολυδιάστατη απάντηση του έμβριου όντος που αποσκοπεί να αποκαταστήσει την ιστική συνοχή και τη λειτουργία του οργάνου. Η κινητικότητα και ο πολλαπλασιασμός ως άθροισμα των SEMFs μελετήθηκε *in vitro* με τη δοκιμασία επούλωσης πληγής (scratch test) (Di Sabatino et al., 2009; Liang et al., 2007; Rodriguez et al., 2005). Μειώναμε σταδιακά την συγκέντρωση FBS από 10 % σε 5 % στο καλλιιεργητικό μέσο αφότου οι SEMFs σχημάτισαν συμπαγές στρώμα με σκοπό τη μείωση του πολλαπλασιασμού τους και την καλύτερη προσέγγιση *in vivo* συνθηκών μη αφθονίας θρεπτικών συστατικών. Περαιτέρω μείωση δεν ήταν δυνατή διότι αποτελέσματα πρόδρομων πειραμάτων έδειξαν αμελητέα κινητικότητα/ πολλαπλασιασμό SEMFs υπό μικρότερες συγκεντρώσεις FBS, έστω και χωρίς επιδράσεις. Πολύ αργός ήταν και ο ρυθμός



με τον οποίο επουλώνονταν οι πληγές στα 18CO, έστω και υπό 10 % FBS και για αυτό δεν μελετήθηκε η παράμετρος της επούλωσης πληγής στα 18CO.

Σε βοθρία πλάκας 6 βοθρίων με πληρότητα SEMFs 100 % μειώναμε σταδιακά την συγκέντρωση FBS από 10 % σε 5 % και με την άκρη ρύγχους (tip) 200 μl προκαλούσαμε ευθεία πληγή στο συμπαγές στρώμα κυττάρων. Χαράζαμε επίσης από την εξωτερική πλευρά στον πυθμένα των βοθρίων 3- 6 φορές. Ξεπλέναμε δύο φορές με θρεπτικό υλικό προσεκτικά για να μην αποκολλήσουμε άλλα κύτταρα. Ακολούθως προσθέταμε είτε θρεπτικό υλικό με 5% FBS με ή χωρίς τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ, TGF-β1 μόνες ή σε συνδυασμούς είτε ECC medium από επιθηλιακές κυτταροσειρές (HT-29, CaCO-2) προδιεγερμένες ή όχι με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες για 6 h. Μετά από 30 λεπτά λαμβάναμε με ανάστροφο μικροσκόπιο εικόνες εκατέρωθεν των 3-8 προκαθορισμένων σημείων τομής της πληγής και των χαραγών σε κάθε βοθρίο. Οι εικόνες αυτές μας επέτρεπαν να μετρήσουμε με το πρόγραμμα ImageJ τις αρχικές αποστάσεις μεταξύ των δύο όχθων της πληγής (λαμβάνονταν 3 μετρήσεις ανά εικόνα). Η ίδια διαδικασία μέτρησης αποστάσεων επαναλαμβανόταν μετά από 48 h στα ίδια σταθερά σημεία. Ποσοτικοποιούσαμε διαιρώντας το ποσοστό επούλωσης του χάσματος στα δείγματα με επιδράσεις διά του ποσοστού επούλωσης στα δείγματα ελέγχου και εκφράζοντάς το ως % ποσοστό.

#### **4.2.2.13 Στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ραβδογράμματα αριθμητικών μέσων τιμών με τις γραμμές σφάλματος να αναπαριστούν τα τυπικά σφάλματα της μέσης τιμής και τα ραβδογράμματα αυτά δημιουργήθηκαν με το λογισμικό Microsoft Excel. Πρόκειται για δεδομένα από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

Οι συγκρίσεις μεταξύ ανεξάρτητων παρατηρήσεων γίνονται με το Student's *t* test. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο  $p \leq 0,05$ . Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό SPSS.

## 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.3.1 Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών στην Παραγωγή Προϊνωτικών Παραγόντων από Κύτταρα του Εντερικού Βλεννογόνου

Μελετήθηκε η έκκριση των **3 ισομορφών** του Transforming Growth Factor- $\beta$  (**TGF- $\beta$** ) και του ιστικού αναστολέα 1 των μεταλλοπρωτεασών (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, **TIMP-1**) με ανοσοενζυμική μέθοδο ανίχνευσης (ELISA) σε υπερκείμενα καλλιεργείων:

1. δύο κυτταροσειρών ανθρώπινων **επιθηλιακών** κυττάρων παχέος εντέρου νεοπλασματικής προέλευσης (**HT-29** και **CaCO-2**),
2. καλλιεργείων **πρωτογενών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών** παχέος εντέρου (subepithelial myofibroblasts- **SEMFs**) και
3. **κυτταροσειράς μυοϊνοβλαστών** παχέος εντέρου νεοπλασματικής προέλευσης (**18CO**).

Μελετήθηκε επίσης η **επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$**  επί της έκκρισης αυτής. Επελέγη ο χρόνος των **24h** αφενός ως χρόνος έκκρισης ικανής συγκέντρωσης των ανωτέρω ουσιών στο υπερκείμενο (αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων) και αφετέρου ως αποδεκτό χρονικό σημείο μέτρησης πρωτογενών φαινομένων. Πριν, με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction- **PCR**) επιχειρήθηκε να ελεγχθεί η δράση των τριών κυτταροκινών επί των ισομορφών TGF- $\beta$  σε πρωιμότερα χρονικά σημεία (αλλά και ως τις 48 h) στις κυτταροσειρές επιθηλιακών, ώστε να σχηματισθεί μια πρώτη αρχική εντύπωση για το αν αυτά τα προϊνωτικά μόρια εκφράζονται και αν παρατηρούνται αλλαγές στην έκφρασή τους λόγω των κυτταροκινών.

Ως προς το τελικό προϊόν της μετάφρασης, δηλαδή των πρωτεϊνικών ισομορφών TGF-β, μετρήθηκε η συνολική συγκέντρωση ενεργής και ανενεργής ισομορφής και αυτό έγινε διότι στο *in vivo* εξωκυττάριο περιβάλλον υπάρχει πλήθος μη ειδικών ως προς την οδό του TGF-β παραγόντων που ενεργοποιούν το ανενεργό κλάσμα του TGF-β αποκόπτοντας το latency associated peptide (LAP). Τέτοιοι είναι τα ένζυμα ενδογλυκοσιδάσες (Miyazono et al., 1992), νευραμινιδάση (Schultz-Cherry and Hinshaw, 1996), καθεψίνες (Lyons et al., 1988), καλπαΐνη (Abe et al., 1998), θρομβοσπονδίνη-1 (Crawford et al., 1998; Schultz-Cherry et al., 1995; Yehualaeshet et al., 1999), πλασμινογόνο (Khalil, 1999), αλλά και οι ενεργές ρίζες O<sub>2</sub> (Barcellos-Hoff et al., 1994; Barcellos-Hoff and Dix, 1996; Barcellos-Hoff et al., 1995) και η ιντεγκρίνη αVβ6 (Munger et al., 1999). Η ανενεργή μορφή ενεργοποιήθηκε με οξινοποίηση επί 10 min και ακολούθησε επανακαλοποίηση, όπως περιγράφηκε αναλυτικότερα στις μεθόδους.

#### **4.3.1.1 Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν την παραγωγή TGF-β και TIMP-1 από το εντερικό επιθηλιακό κύτταρο, αντίθετα με τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες**

4.3.1.1.1 Κυτταροσειρές ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου (HT-29, CaCO-2)

##### **4.3.1.1.1.1 TGF-β1**

Το mRNA της ισομορφής TGF-β1 (224 ζεύγη βάσεων- base pairs, bp) ευρέθη να εκφράζεται σε PCR με δύο ζεύγη primers- το ένα για τον TGF-β1 και το άλλο για το σταθερά εκφραζόμενο mRNA ελέγχου (GAPDH)- σε cell lysates της κυτταροσειράς επιθηλιακών παχέος εντέρου HT-29 χωρίς επιδράσεις (**Εικόνα 2A**). Υπό την επίδραση των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) παρατηρήθηκε μια σαφής αύξηση

της έντασης σήματος με κορυφή στις 6 h (**Εικόνα 2A**). Παρόμοια ήταν τα ευρήματα και στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών παχέος εντέρου CaCO-2 με εντονότερη τη διαφορά μεταξύ κυττάρων χωρίς επιδράσεις και αυτών με επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (**Εικόνα 2B**). Το χρονικό σημείο της κορυφής ήταν και στην περίπτωση αυτή στις 6 h (**Εικόνα 2B**).

Προχωρώντας στην μέτρηση της εκκρινόμενης TGF-β1 πρωτεΐνης με ELISA, ευρέθη να εκκρίνεται μια βασική συγκέντρωση  $437 \pm 24$  pg/ml σε υπερκείμενο όγκου 1,5 ml καλλιέργειας **HT-29** που κάλυπταν πλήρως επιφάνεια εμβαδού  $9.6 \text{ cm}^2$  (επιφάνεια καλλιέργειας σε βοθρίο πλάκας 6 βοθρίων) στις 24 ώρες καλλιέργειας. **Και οι τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ευρέθησαν να αυξάνουν τη συγκέντρωση αυτή.** Η IL-1α είχε τη μέγιστη δράση αυξάνοντας τον εκκρινόμενο TGF-β1 στα  $646 \pm 65$  pg/ml ( $p < 0,01$ ). Ο TNF-α επίσης αύξησε τον εκκρινόμενο TGF-β1 στα  $526 \pm 9$  pg/ml ( $p < 0,01$ ) και η IFN-γ στα  $551 \pm 7$  pg/ml ( $p < 0,02$ ). Ποσοστιαία οι επαγωγές από IL-1α, TNF-α και IFN-γ ήταν  $148 \pm 10$  %,  $120 \pm 2$  % και  $126 \pm 7$  % αντίστοιχα. **Οι περισσότεροι συνδυασμοί δύο εκ των προφλεγμονωδών αυτών κυτταροκινών αύξησαν περαιτέρω την επαγωγή κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο.** Ειδικότερα, ο συνδυασμός IL-1α και IFN-γ αύξησε τον TGF-β1 στα  $742 \pm 44$  pg/ml ( $170 \pm 6$  %,  $p < 10^{-7}$  σε σχέση με τη βασική έκκριση,  $p < 0,01$  σε σχέση με την IFN-γ), ο συνδυασμός TNF-α και IFN-γ στα  $726 \pm 48$  pg/ml ( $166 \pm 7$  %,  $p < 10^{-4}$  σε σχέση με τη βασική έκκριση,  $p < 0,01$  σε σχέση τόσο με τον TNF-α όσο και με την IFN-γ, ενώ αυξητική τάση είχε και ο συνδυασμός IL-1α και TNF-α ( $644 \pm 29$  pg/ml,  $147 \pm 5$  %). **Η επαγωγή μεγιστοποιήθηκε υπό την επίδραση του συνδυασμού και των τριών αυτών κυτταροκινών:**  $923 \pm 41$  pg/ml ( $211 \pm 4$  %,  $p < 10^{-11}$  σε σχέση με τη βασική έκκριση,  $p < 0,01$  σε σχέση με οποιοδήποτε συνδυασμό δύο κυτταροκινών). (**Εικόνα 3A**)

Υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας τα **CaCO-2** είχαν χαμηλότερη βασική έκκριση TGF-β1: 177±21 pg/ml, συγκέντρωση στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα HT-29 ( $p < 10^{-10}$ ). Στην κυτταροσειρά αυτή οι επαγωγές ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τα HT-29 με την **IL-1α να έχει και πάλι την εντονότερη δράση αυξάνοντας τον εκκρινόμενο TGF-β1 στα 340±47 pg/ml (192±14 % της βασικής έκκρισης,  $p < 0,01$ ).** Ο TNF-α αύξησε τον εκκρινόμενο TGF-β1 στα 280±61 pg/ml (158±22 %,  $p < 0,05$ ) και η IFN-γ στα 311± 107pg/ml (175±34 %,  $p < 0,05$ ). Και στα CaCO-2 οι συνδυασμοί των κυτταροκινών αυτών ανά δύο προκάλεσαν περαιτέρω αύξηση του εκκρινόμενου TGF-β 1. Συγκεκριμένα οι συνδυασμοί IL-1α και TNF-α, IL-1α και IFN-γ, TNF-α και IFN-γ αύξησαν τον εκκρινόμενο TGF-β1 στα 567±136 pg/ml (320±24 %), 645±240 pg/ml (364±37 %), 448±122 pg/ml (253±27 %) αντίστοιχα. Η στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με τη βασική έκκριση παρέμεινε σε όλες τις περιπτώσεις στο  $p < 0,01$ , ενώ στο  $p < 0,05$  κυμάνθηκε η στατιστική σημαντικότητα του συνδυασμού IL-1α και TNF-α σε σχέση με μόνη την IL-1α ή μόνο τον TNF-α. Και στην κυτταροσειρά αυτή **ο συνδυασμός και των τριών κυτταροκινών προκάλεσε μέγιστη επαγωγή** του εκκρινόμενου TGF-β1 (700±138 pg/ml, 395±20 %). Η στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με τη βασική έκκριση ήταν και στην περίπτωση αυτή στο  $p < 0,01$ , ενώ στο  $p < 0,05$  ήταν η στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με του συνδυασμό IL-1α και TNF-α. **(Εικόνα 3B)**

#### *4.3.1.1.1.2 TGF-β2*

Και το mRNA της ισομορφής TGF-β2 (120 bp) ευρέθη να εκφράζεται (PCR με δύο ζεύγη primers: TGF-β2 και GAPDH) σε cell lysates των HT-29 χωρίς επιδράσεις **(Εικόνα 2C)**. Υπό την επίδραση των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) πιθανόν να υπήρξε προσωρινή αύξηση της έντασης σήματος στις 2 h **(Εικόνα 2C)**. Σαφέστερα ήταν τα

ευρήματα στα CaCO-2 με εντονότερη και χρονικά εμμένουσα τη διαφορά μεταξύ κυττάρων χωρίς επιδράσεις και αυτών με επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (**Εικόνα 2D**). Το χρονικό σημείο της κορυφής ήταν και στην περίπτωση αυτή στις 6 h (**Εικόνα 2D**).

Στις 24 ώρες ο TGF- $\beta$ 2 ευρέθη να εκκρίνεται από τα **HT-29** σε βασική συγκέντρωση  $291\pm 45$  pg/ml υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας στο ίδιο χρονικό σημείο (24h). Στην περίπτωση αυτή οι τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκάλεσαν μια μικρή και στατιστικά ασήμαντη αύξηση, με την IL-1 $\alpha$  να αυξάνει την έκκριση στα  $404\pm 66$  pg/ml ( $139\pm 16$  % της βασικής παραγωγής), τον TNF- $\alpha$  στα  $419\pm 92$  pg/ml ( $144\pm 22$  %) και την IFN- $\gamma$  στα  $364\pm 100$  pg/ml ( $125\pm 27$  %). **Στατιστική σημαντικότητα επετεύχθη με την επίδραση οποιουδήποτε συνδυασμού δύο κυτταροκινών:** ο συνδυασμός IL-1 $\alpha$  και TNF- $\alpha$  αύξησε τον εκκρινόμενο TGF- $\beta$ 2 στα  $629\pm 141$  pg/ml ( $216\pm 22$  %,  $p < 0,01$  σε σχέση με τη βασική έκκριση), ο συνδυασμός IL-1 $\alpha$  και IFN- $\gamma$  στα  $530\pm 125$  pg/ml ( $182\pm 24$  %,  $p < 0,05$ ) και ο συνδυασμός TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  στα  $584\pm 123$  pg/ml ( $201\pm 21$  %,  $p < 0,05$ ). **Η επαγωγή ήταν μέγιστη και πάλι υπό την επίδραση και των τριών κυτταροκινών:**  $643\pm 76$  pg/ml ( $221\pm 12$  %,  $p < 0,01$  σε σχέση με τη βασική έκκριση ή το συνδυασμό IL-1 $\alpha$  και TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,05$  σε σχέση με τον συνδυασμό TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ ). (**Εικόνα 3C**)

Αντίθετα με τις επαγωγές αυτές στα HT-29, η βασική παραγωγή των  $190\pm 42$  pg/ml στα **CaCO-2** δεν τροποποιούνταν στατιστικά σημαντικά από τις IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  μόνες ή σε συνδυασμούς. (**Εικόνα 3D**)

#### 4.3.1.1.1.3 TGF- $\beta$ 3

Το mRNA της ισομορφής TGF- $\beta$ 3 (224 bp) ευρέθη και αυτό να εκφράζεται (PCR με δύο ζεύγη primers: TGF- $\beta$ 3 και GAPDH) σε cell lysates των HT-29 χωρίς επιδράσεις (**Εικόνα 2C**).

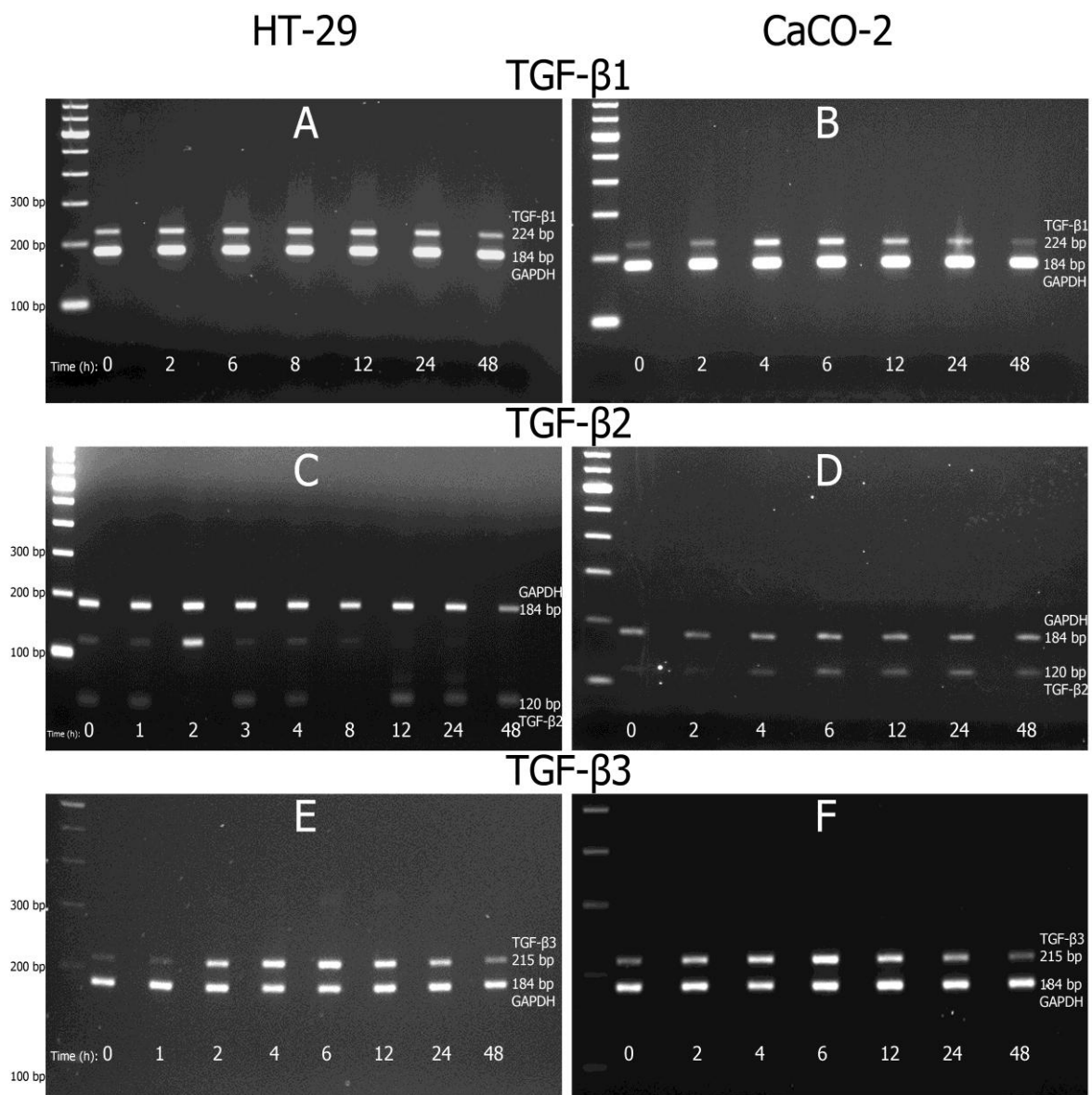
Ομοίως υπό την επίδραση των τριών προλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) παρατηρήθηκε μια σαφής αύξηση της έντασης σήματος με κορυφή στις 6 h (**Εικόνα 2C**). Παρόμοια ήταν τα ευρήματα και στα CaCO-2 (**Εικόνα 2D**). Το χρονικό σημείο της κορυφής ήταν και στην περίπτωση αυτή στις 6 h (**Εικόνα 2D**).

Ανάλογη ήταν και η επίδραση των τριών κυτταροκινών στην έκκριση του TGF-β 3. Προκειμένου για τα **HT-29**, η βασική παραγωγή των 201±31 pg/ml αυξήθηκε στα 365±57 pg/ml (182±16 % της βασικής παραγωγής,  $p < 0,02$ ) από την IL-1α, ενώ και η IFN-γ την αύξησε στα 323±72 pg/ml (161±22 %,  $p < 0,04$ ). Η αύξηση από τον TNF-α στα 264±44 pg/ml (131±17 % της βασικής παραγωγής) κρίθηκε στατιστικά ασήμαντη. Και στην περίπτωση του TGF-β3 **όλοι οι συνδυασμοί κυτταροκινών ανά 2 αύξησαν περαιτέρω τον εκκρινόμενο TGF-β3**: IL-1α και TNF-α στα 425±80 pg/ml (212±19 %,  $p < 0,01$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή,  $p < 0,05$  σε σχέση με τον TNF-α), IL-1α και IFN-γ στα 444±54 pg/ml (221±12 %,  $p < 0,001$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή), TNF-α και IFN-γ στα 358±58 pg/ml (178±16 %,  $p < 0,03$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή,  $p < 0,01$  σε σχέση με τον TNF-α). Και πάλι ο συνδυασμός και των τριών κυτταροκινών προκάλεσε μέγιστη επαγωγή στα 495±61 pg/ml (247±12 %,  $p < 10^{-4}$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή). (**Εικόνα 3E**)

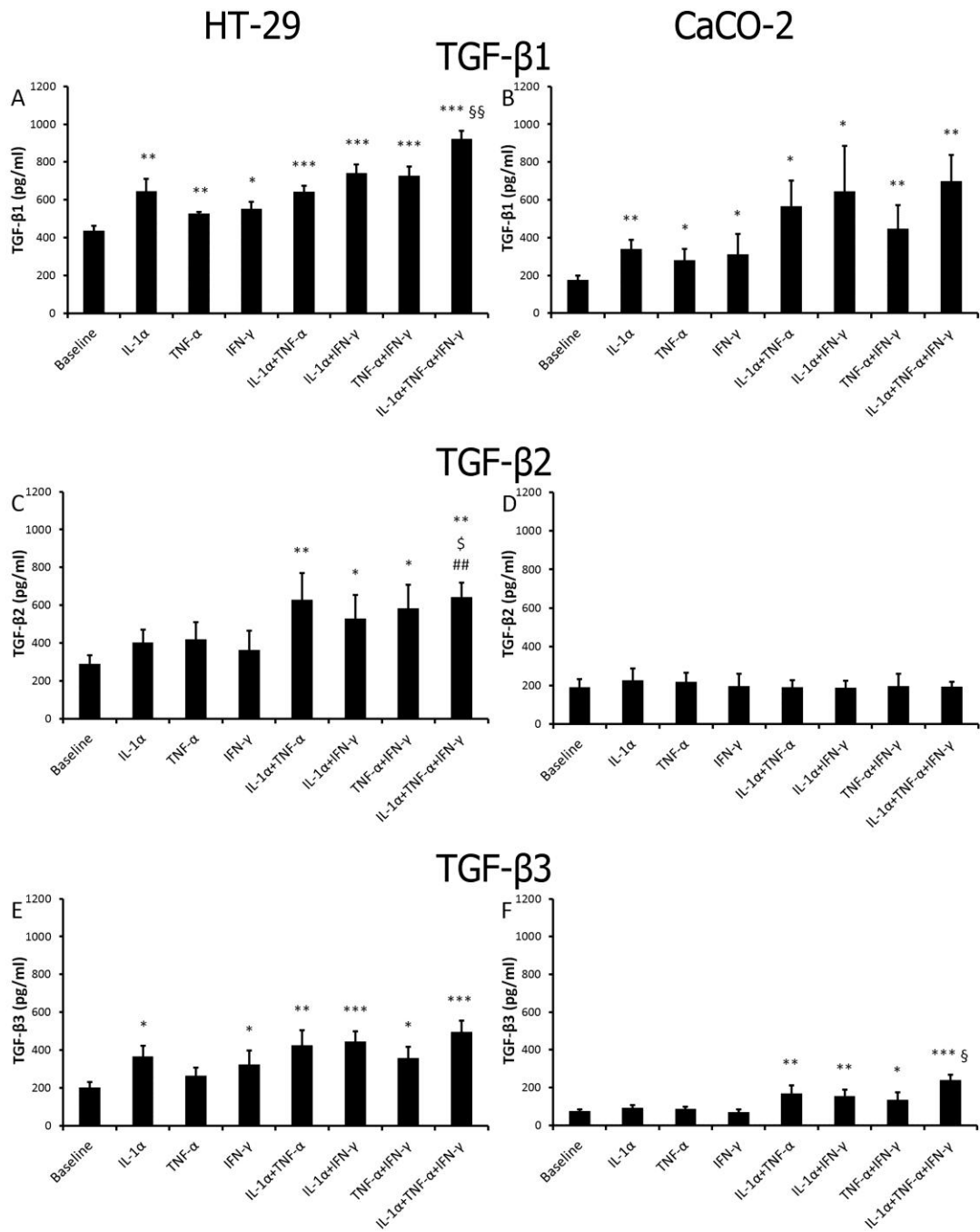
Στα **CaCO-2** η βασική παραγωγή του TGF-β3 (75±9 pg/ml) δεν αυξήθηκε αισθητά υπό την επίδραση έκαστης οποιασδήποτε των IL-1α, TNF-α, IFN-γ. Όμως στατιστικά σημαντική ήταν η **αύξηση από όλους τους συνδυασμούς δύο ή τριών κυτταροκινών**. Συγκεκριμένα ο συνδυασμός IL-1α και TNF-α αύξησαν τον TGF-β3 στα 170± 42 pg/ml (225±25 %,  $p < 0,01$  σε σχέση με τη βασική έκκριση), ο IL-1α και IFN-γ στα 156±32 pg/ml (207±20 %,  $p < 0,01$ ), ο TNF-α και IFN-γ στα 135±40 pg/ml (179±29 %,  $p < 0,03$ ) και ο συνδυασμός και των τριών



κυτταροκινών μέγιστα στα 241±26 pg/ml (319±11 %,  $p < 10^{-7}$  σε σχέση με τη βασική έκκριση και  $p < 0,05$  σε σχέση με οποιονδήποτε συνδυασμό των κυτταροκινών ανά δύο). (Εικόνα 3F)



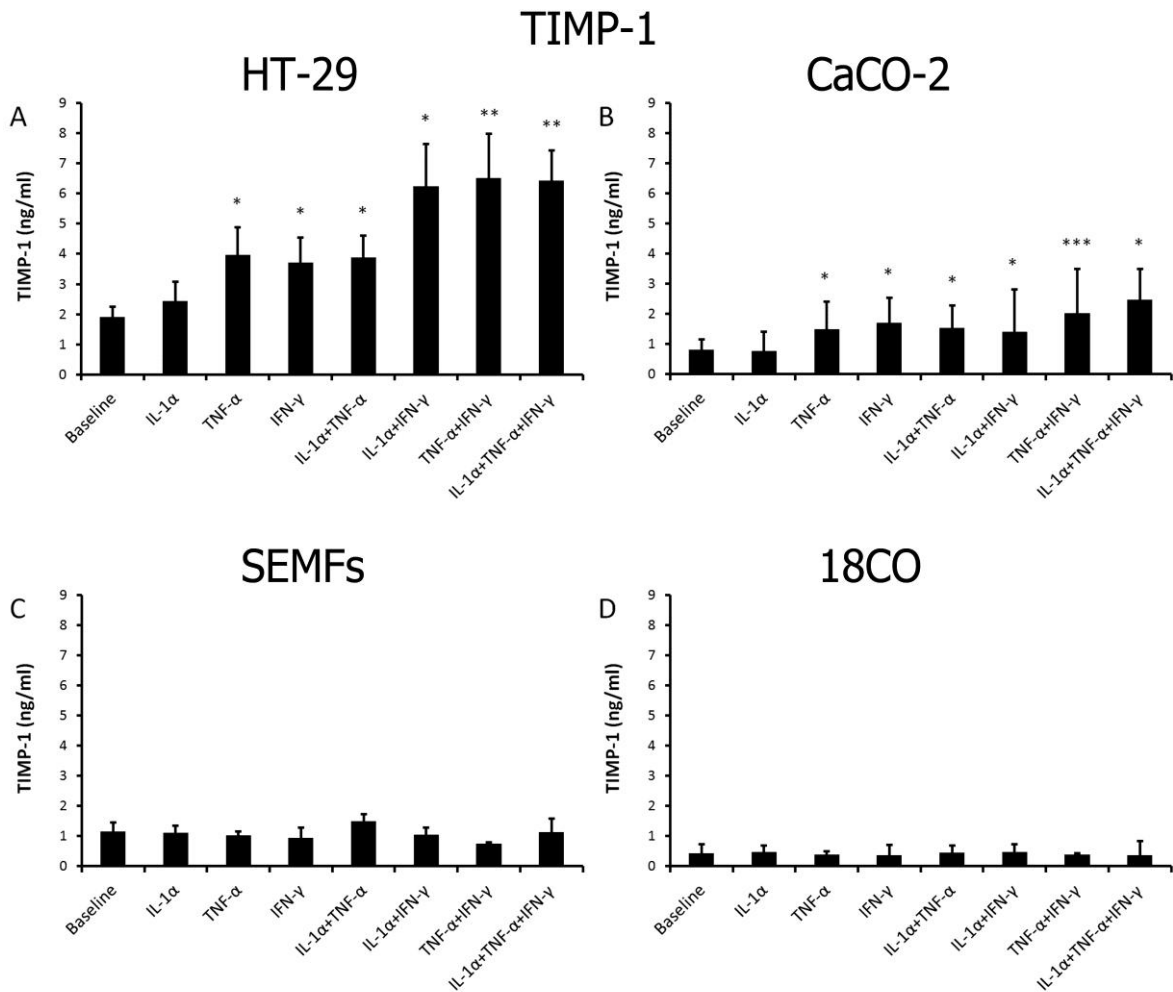
**Εικόνα 2.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν το mRNA των ισομορφών TGF-β σε κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου. Έγινε PCR με δύο ζεύγη εκκινητών (primers)- ένα για την καθεμία από τις ισομορφές TGF-β και ένα για το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH- σε διάφορα χρονικά σημεία από 0 ως 24 ώρες επίδρασης των IL-1α, TNF-α and IFN-γ επιδιώκοντας μια αρχική ημιποσοτική εκτίμηση. Και οι δύο κυτταροσειρές (HT-29: A, C, E και CaCO-2: B, D, F) εξέφραζαν ιδιοσυστασιακά mRNA και των τριών ισομορφών TGF-β (1: A- B, 2: C- D και 3: E- F). Οι IL-1α, TNF-α, IFN-γ σε συνδυασμό έδωσαν μια πρώτη εντύπωση επαγωγής των τριών ισομορφών TGF-β και στις δύο κυτταρικές σειρές μέγιστα περίπου στις 6 h με την εξαίρεση του TGF-β 2 στα HT-29.



**Εικόνα 3.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν τον εκκρινόμενο TGF-β σε κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου. Η παραγωγή TGF-β1 (A, B), TGF-β2 (C, D) και TGF-β3 (E, F) σε HT-29 (A, C, E) και CaCO-2 (B, D, F) μετρήθηκε με ELISA σε υπερκείμενα καλλιέργειών. Τα αποτελέσματα διέγερσης με IL-1α, TNF-α and IFN-γ και τους συνδυασμούς τους για 24 h από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται. Εξάιρεση στις παρατηρούμενες επαγωγές είναι ο TGF-β2 στα CaCO-2. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  και \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή. §  $p < 0,05$  και §§  $p < 0,01$  σε σχέση με οποιοδήποτε συνδυασμό των IL-1α, TNF-α and IFN-γ ανά δύο. ##  $p < 0,01$  σε σχέση με το συνδυασμό IL-1α και TNF-α, §  $p < 0,05$  σε σχέση με το συνδυασμό των TNF-α και IFN-γ.

#### 4.3.1.1.1.4 TIMP-1

Τα **HT-29** και τα **CaCO-2** παρουσίασαν επίσης βασική παραγωγή TIMP-1 ( $1,908 \pm 0,337$  ng/ml και  $0,822 \pm 0,106$  ng/ml αντίστοιχα). Η βασική αυτή παραγωγή δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την IL-1α ( $128 \pm 26$  % και  $93 \pm 6$  % σε σχέση με τη βασική παραγωγή αντίστοιχα), ενώ αντίθετα σαφής ήταν η **επαγωγή από TNF-α ή IFN-γ**. Συγκεκριμένα ο TNF-α αύξησε την παραγωγή στα  $3,973 \pm 0,912$  ng/ml ( $208 \pm 23$  %,  $p < 0,05$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή) στα HT-29 και στα  $1,492 \pm 0,463$  ng/ml ( $182 \pm 31$  %,  $p < 0,05$ ) στα CaCO-2. Η IFN-γ αύξησε τον εκκρινόμενο TIMP-1 στα  $3,716 \pm 0,816$  ng/ml ( $195 \pm 22$  %,  $p < 0,05$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή) στα HT-29 και στα  $1,708 \pm 0,758$  ng/ml ( $208 \pm 44$  %,  $p < 0,05$ ) στα CaCO-2. Ο συνδυασμός των TNF-α και IFN-γ προσθετικά αύξησε τον εκκρινόμενο TIMP-1 στα  $6,515 \pm 1,451$  ng/ml ( $341 \pm 22$  %,  $p < 0,05$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή ή μόνο τον TNF-α ή την IFN-γ) στα HT-29. Όμοια ευρήματα υπήρξαν και στα CaCO-2 ( $2,029 \pm 0,758$  ng/ml,  $247 \pm 15$  %,  $p < 10^{-4}$ ). Επιβεβαίωση του ανύπαρκτου ή περιορισμένου ρόλου της IL-1α αποτέλεσε η στατιστικά ασήμαντη επίδρασή της επί μονών ή του συνδυασμού των υπολοίπων δύο κυτταροκινών ως προς την έκκριση TIMP-1 και στις δύο κυτταροσειρές. (Εικόνα 4A και Εικόνα 4B για HT-29 και CaCO-2 αντίστοιχα)

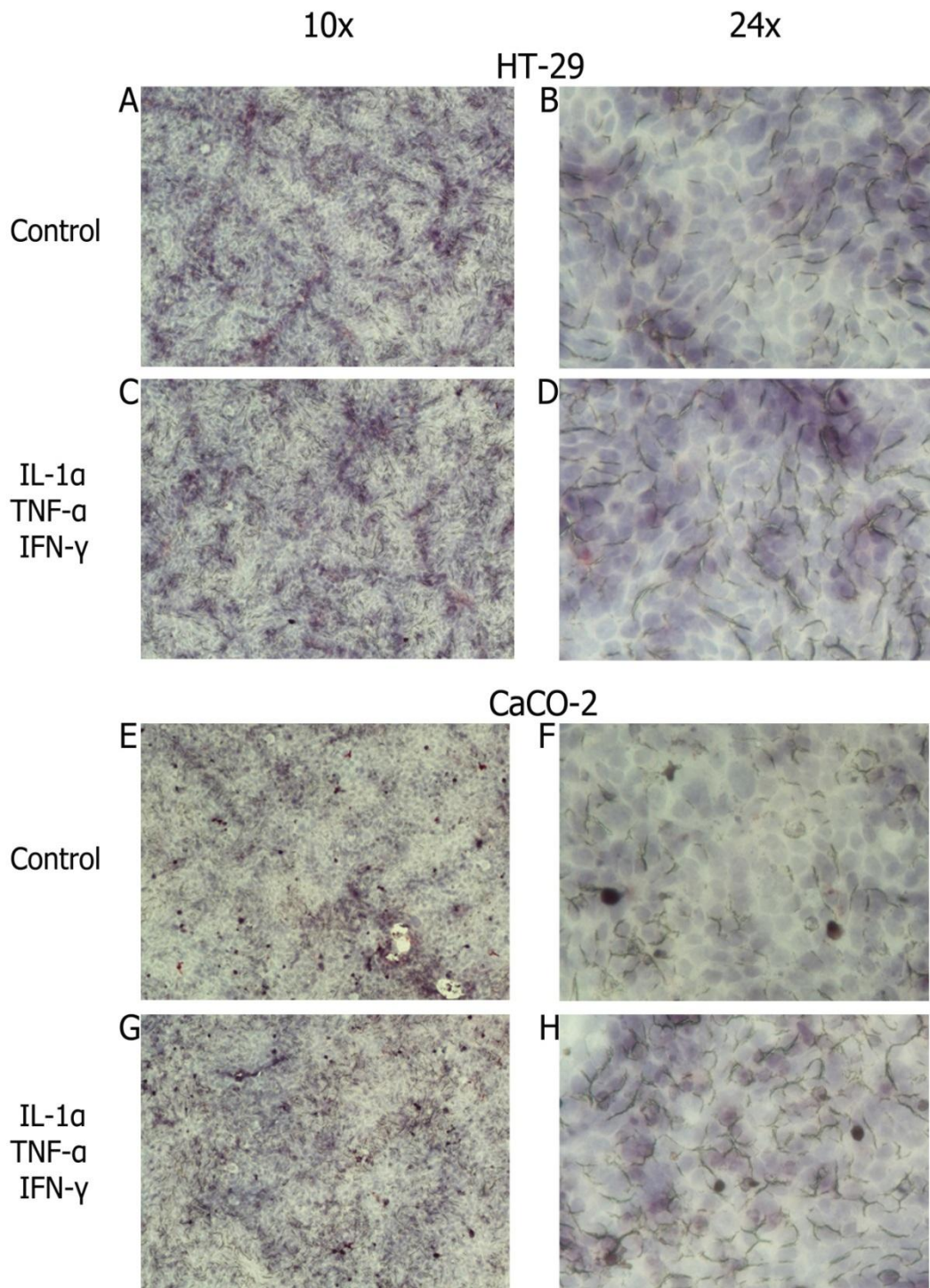


**Εικόνα 4.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν τον εκκρινόμενο TIMP-1 σε κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου. Η παραγωγή TIMP-1 στις κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου HT-29 (A) και CaCO-2 (B), σε πρωτογενείς SEMFs (C) και την κυτταροσειρά μυοϊνοβλαστών παχέος εντέρου 18CO (D) με ELISA σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα διέγερσης με IL-1α, TNF-α and IFN-γ για 24 h από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται. Οι κυτταροκίνες αυτές αυξάνουν την έκκριση TIMP-1 από τα HT-29 και CaCO-2, αλλά όχι από SEMFs και 18CO. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  και \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με τη βασική παραγωγή.

#### 4.3.1.1.1.5 CTGF

Σε μελέτες ανοσοκυτταροχημείας για να αποκτήσουμε μια αρχική ποιοτική εκτίμηση αν εκφράζεται ο CTGF στις κυτταρικές σειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου, δεν διαπιστώσαμε κάτι τέτοιο ούτε στα HT-29 (Εικόνα 5A και Εικόνα 5B) ούτε στα CaCO-2 (Εικόνα 5E και

**Εικόνα 5F).** Διέγερση αυτών με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επί 24 h δεν επέφερε έκφραση CTGF (HT-29: **Εικόνα 5C και Εικόνα 5D**, CaCO-2: **Εικόνα 5G και Εικόνα 5H**). Συνεπώς κρίθηκε ότι δεν είχε αξία το να προχωρήσουμε στην ποσοτική μέτρηση με ELISA του CTGF σε υπερκείμενα καλλιιεργειών HT-29 και CaCO-2.



**Εικόνα 5.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν προκαλούν παραγωγή CTGF σε κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου. Η παραγωγή CTGF στις κυτταροσειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου HT-29 (A, C, E, G) και CaCO-2 (B, D, F, H) εκτιμήθηκε με ανοσοκυτταροχημεία. Παρουσιάζονται δύο μεγεθύνσεις: 10x (A, C, E, G) και 24x (B, D, F, H). Ούτε τα HT-29 (A- D) ούτε τα CaCO-2 (E- H) χωρίς (A- B, E- F αντίστοιχα) ή με (C- D, G- H αντίστοιχα) διέγερση με IL-1α, TNF-α and IFN-γ επί 24 h δεν παρουσιάζουν χρώση για CTGF. Θετικά control ανοσοκυτταροχημείας CTGF με τα ίδια υλικά, τις ίδιες μεθόδους στα ίδια πειράματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 15.

#### 4.3.1.1.2 SEMFs

##### 4.3.1.1.2.1 TGF-β ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ

Οι πρωτογενείς ανθρώπινοι υποεπιθηλακοί μυοϊνοβλάστες παχέος εντέρου (SEMFs) παρουσίασαν μία ελάχιστη βασική έκκριση **TGF-β1** ( $47 \pm 12$  pg/ml) στο χρονικό σημείο των 24h. Η τιμή αυτή είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από το κατώτερο όριο της μεθόδου ανίχνευσης ELISA ( $31.5$  pg/ml). Επιπλέον οι IL-1α, TNF-α, IFN-γ δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στην ελάχιστη αυτή βασική έκκριση ούτε μόνες ούτε σε συνδυασμούς (πχ συνδυασμός και των τριών αυτών κυτταροκινών:  $45 \pm 11$  pg/ml). (Εικόνα 6A)

Οι SEMFs δεν παρουσίαζαν ανιχνεύσιμη έκκριση **TGF-β2** στις 24h. Αντίθετα, ανιχνεύσιμη, αλλά σε εξίσου χαμηλές συγκεντρώσεις με τον TGF-β1, ήταν η ισομορφή **TGF-β3** ( $41 \pm 20$  pg/ml), χωρίς και σε αυτήν την περίπτωση να παρατηρείται κάποια δράση των κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ επ' αυτής (πχ συνδυασμός και των τριών αυτών κυτταροκινών:  $39 \pm 26$  pg/ml) (Εικόνα 6C).

##### 4.3.1.1.2.2 TIMP-1

Αντίθετα με τις ισομορφές TGF-β οι SEMFs παρουσίασαν επίπεδα έκκρισης TIMP-1 συγκρίσιμα με αυτά των HT-29 και CaCO-2. Συγκεκριμένα στις 24h καλλιέργειας η μετρούμενη συγκέντρωση ήταν  $1,152 \pm 0,302$  ng/ml. Παραταύτα, οι IL-1α, TNF-α, IFN-γ

μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς- δεν είχαν κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα υπό συνδυασμό και των τριών η έκκριση στο ίδιο χρονικό σημείο ήταν  $1,126 \pm 0,457$  ng/ml. (Εικόνα 3C)

#### 4.3.1.1.3 18CO

##### 4.3.1.1.3.1 TGF- $\beta$ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ

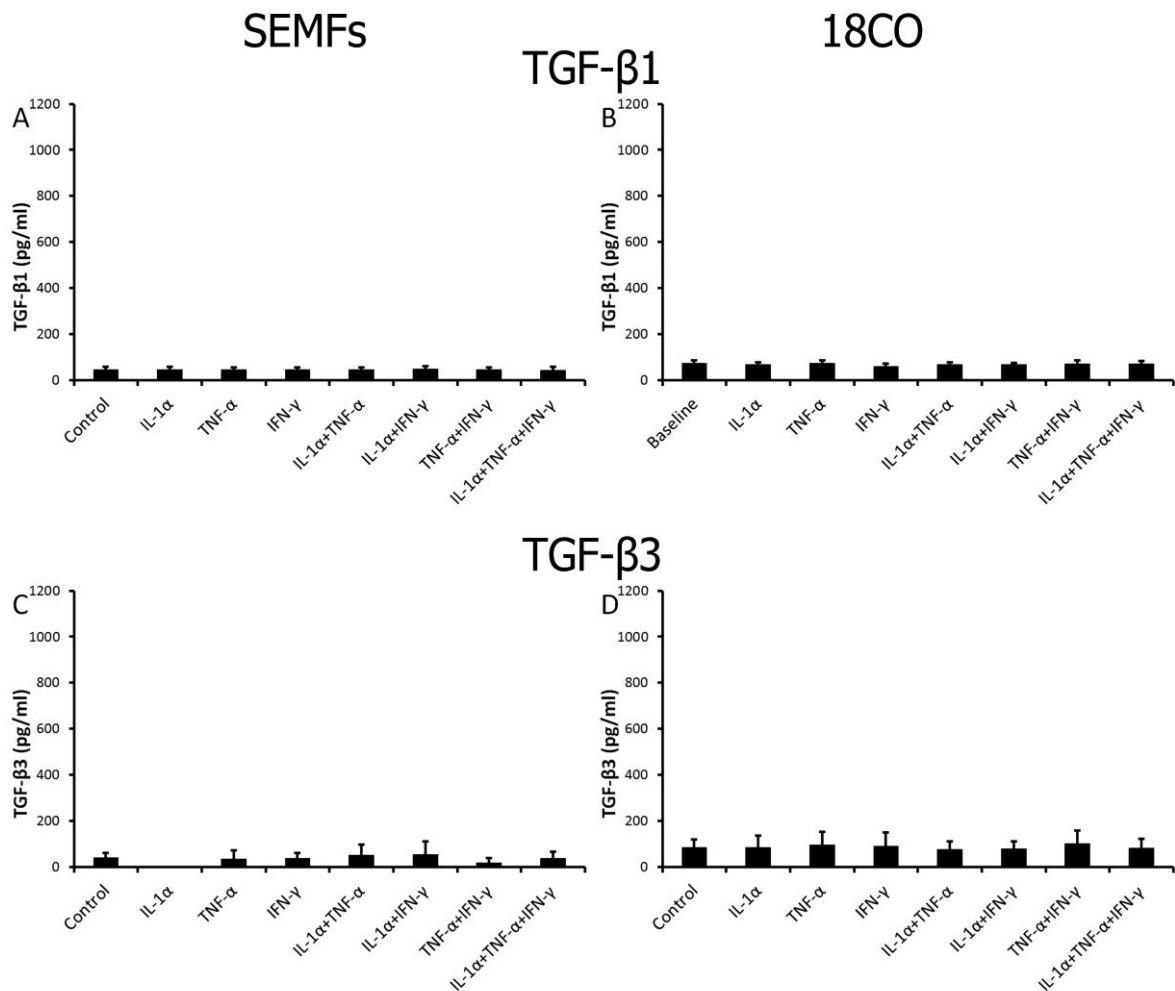
Παρόμοια με τους SEMFs, η ανάλογη κυτταροσειρά 18CO παρουσίασε μία ελάχιστη βασική έκκριση **TGF- $\beta$ 1** ( $75 \pm 10$  pg/ml) στο χρονικό σημείο των 24h. Ομοίως με τους SEMFs, οι IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στην ελάχιστη αυτή βασική έκκριση ούτε μόνες ούτε σε συνδυασμούς (πχ συνδυασμός και των τριών αυτών κυτταροκινών:  $71 \pm 11$  pg/ml). (Εικόνα 6B)

Μη ανιχνεύσιμη ήταν και στα 18CO η έκκριση **TGF- $\beta$ 2** στις 24h. Αντίθετα, ανιχνεύσιμη, αλλά σε εξίσου χαμηλές συγκεντρώσεις με τον TGF- $\beta$ 1, ήταν η ισομορφή **TGF- $\beta$ 3** ( $86 \pm 33$  pg/ml), χωρίς και σε αυτήν την περίπτωση να παρατηρείται κάποια δράση των κυτταροκινών IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  επ' αυτής (πχ συνδυασμός και των τριών αυτών κυτταροκινών:  $84 \pm 38$  pg/ml) (Εικόνα 6D).

##### 4.3.1.1.3.2 TIMP-1

Επίπεδα έκκρισης συγκρίσιμα με αυτά των HT-29 και CaCO-2, αλλά αισθητά μικρότερη έκκριση βασικών επιπέδων TIMP-1 σε σχέση με τους SEMFs παρουσίασαν τα 18CO:  $0,427 \pm 0,047$  ng/ml ( $p < 0,01$  σε σύγκριση με τους SEMFs). Όμως όπως και στην περίπτωση των SEMFs, οι IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς δεν είχαν

κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα υπό συνδυασμό και των τριών η έκκριση στο ίδιο χρονικό σημείο (24h) ήταν  $0,368 \pm 0,027$  ng/ml. (Εικόνα 3B)



**Εικόνα 6.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν επηρεάζουν τον εκκρινόμενο TGF-β σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες παχέος εντέρου. Η παραγωγή TGF-β1 (A, B) και TGF-β3 (C, D) σε HT-29 (A, C) και CaCO-2 (B, D) μετρήθηκε με ELISA σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα διέγερσης με IL-1α, TNF-α and IFN-γ για 24 h από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται.



### 4.3.2 Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών στη Δραστικότητα Μεταλλοπρωτεασών από Κύτταρα του Εντερικού Βλεννογόνου

Μελετήθηκε η δραστικότητα δύο εκ των κυριότερων κολλαγενασών: της μεταλλοπρωτεάσης 2 και της μεταλλοπρωτεάσης 9 (**MMP-2** και **MMP-9** αντίστοιχα). Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται έτσι λόγω του ότι έχουν ως συνένζυμα ιόντα  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$ . Έχουν την ιδιότητα να διασπούν μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin)- εξ' ου και η ονομασία gelatinase A και B αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ζυμογραφίας σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Σύντομα τα υπερκείμενα αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή που περιείχε αφενός δωδεκυλ-θειικό νάτριο (SDS) και αφετέρου gelatin. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι MMPs διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό βάρος (MB) τους. Ακολούθως το SDS της πηκτής αντικαταστάθηκε με Triton-X και προστέθηκε  $\text{Mg}^{++}$  και  $\text{Ca}^{++}$ , ώστε οι μεταλλοπρωτεάσες να αποκτήσουν την αρχική τριτοταγή δομή και τη δραστικότητά τους. Η δραστικότητα των μεταλλοπρωτεασών προσδιορίστηκε με βάση τη φωτεινότητα και το μέγεθος της μάντας λύσης της gelatin της πηκτής στο MB που αντιστοιχεί στις MMP-2 και MMP-9.

#### 4.3.2.1 Η δραστικότητα MMP-2 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών είναι σταθερή και δεν επηρεάζεται από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.

##### 4.3.2.1.1 SEMFs

Στο υπερκείμενο 24h των SEMFs σταθερά ανιχνευόταν έντονη βασική δραστικότητα MMP-2 σε MB που αντιστοιχούσε τόσο στην προ-MMP-2 ( $\approx 72$  kD) όσο και στην ενεργό MMP-2 ( $\approx 68$  kD), με την προμορφή να κυριαρχεί. Η βασική αυτή δραστικότητα παρέμεινε

ανεπηρέαστη από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς στις 24 h επώασης. Συγκεκριμένα, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα η συνολική δραστικότητα προ-MMP-2 και MMP-2 ήταν  $91\pm 22\%$  πάνω από την ένταση φωτός του φόντου (δηλαδή  $191\pm 22\%$  της έντασης φωτός του φόντου), με την επίδραση ήταν IL-1α  $101\pm 26\%$ , TNF-α  $97\pm 19\%$ , IFN-γ  $90\pm 18\%$  και συνδυασμού και των τριών κυτταροκινών  $77\pm 16\%$ , χωρίς να προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επίσης δε διαφάνηκαν διαφορές στην αναλογία προμορφής και ενεργού μορφής μεταξύ της βασικής έκκρισης και κάποιας από τις παραπάνω επιδράσεις. **(Εικόνα 7A και Εικόνα 7C)**

#### 4.3.2.1.2 18CO

Όμοια με τους πρωτογενείς SEMFs, η κυτταροσειρά 18CO επίσης παρουσίαζε μια σταθερή δραστικότητα MMP-2 σε υπερκείμενα 24h και αυτή δεν επηρεάστηκε από τις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Συγκεκριμένα, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα η δραστικότητα ήταν  $228\pm 19\%$  πάνω από την ένταση φωτός του φόντου, IL-1α  $208\pm 3\%$ , TNF-α  $248\pm 76\%$ , IFN-γ  $274\pm 81\%$  και συνδυασμού και των τριών κυτταροκινών  $231\pm 81\%$ , χωρίς και πάλι οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Ούτε σε αυτά τα κύτταρα παρατηρήθηκαν διαφορές στην αναλογία προμορφής και ενεργού μορφής μεταξύ της βασικής έκκρισης και κάποιας από τις παραπάνω επιδράσεις. **(Εικόνα 8A και Εικόνα 8B)**

#### 4.3.2.1.3 HT-29, CaCO-2

Σε αντιδιαστολή με τις ανωτέρω παρατηρήσεις, σε υπερκείμενα 24ωρων καλλιιεργειών των επιθηλιακών κυτταροσειρών HT-29 και CaCO-2 ζυμογραφικά δεν ανιχνεύθηκε καμία

δράση MMP-2 ( $\approx 70$  kD). Αυτό δεν άλλαξε ούτε με την επίδραση μίας ή κάθε δυνατού συνδυασμού των κυτταροκινών IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .

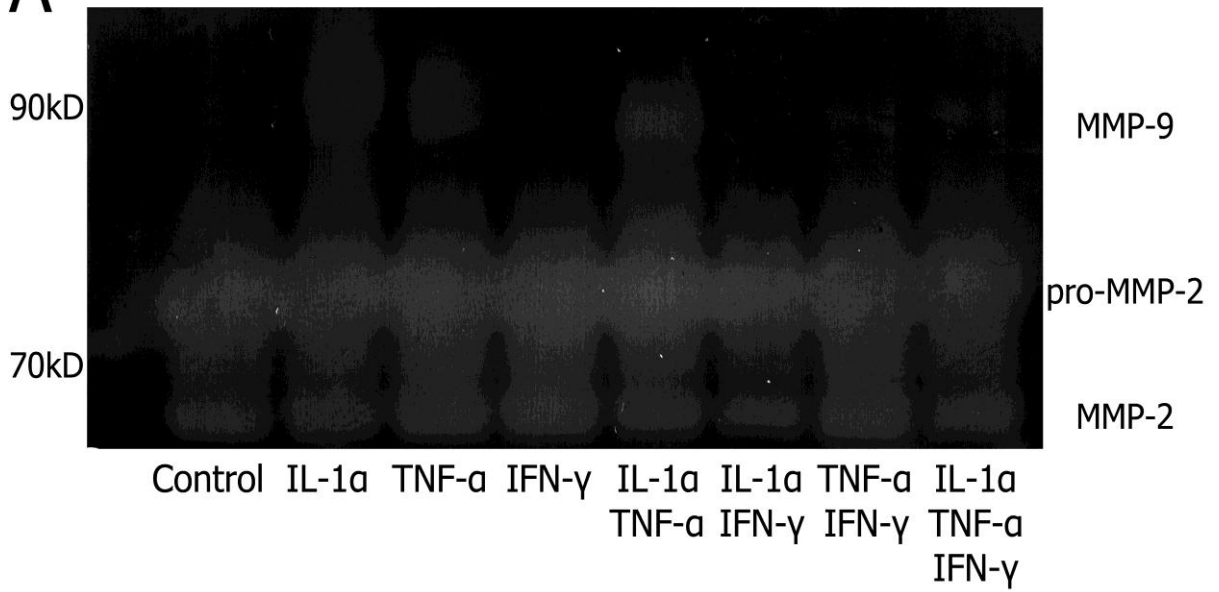
#### ***4.3.2.2 Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 $\alpha$ και TNF- $\alpha$ επάγουν δραστικότητα MMP-9 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών, ενώ η IFN- $\gamma$ καταστέλλει το φαινόμενο.***

##### **4.3.2.2.1 SEMFs**

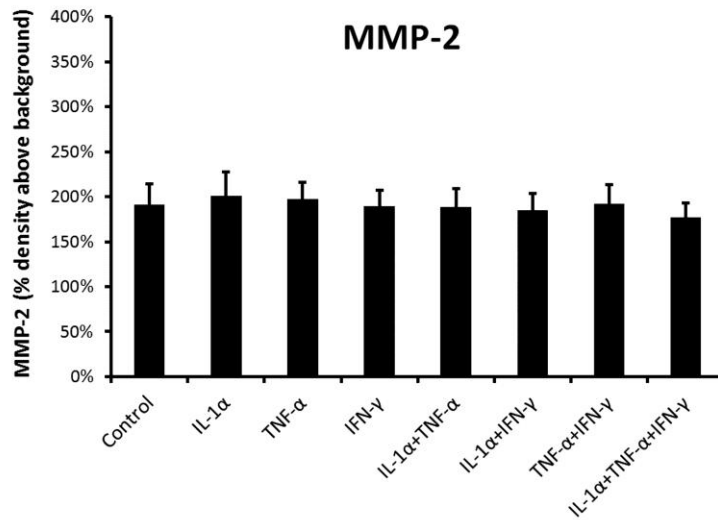
Σε αντιδιαστολή με την MMP-2, **SEMFs** χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα δεν εμφάνιζαν δραστικότητα MMP-9 σε υπερκείμενα καλλιέργειας 24h (**Εικόνα 7A**). Αντίθετα, υπό την επίδραση IL-1 $\alpha$  επί 24 ώρες προκλήθηκε δραστικότητα ενεργής MMP-9 στο υπερκείμενο με εμφάνιση μπάντας λύσης της gelatin σε MB $\approx 90$ kD (**Εικόνα 7A**). Αυτή η μπάντα ποσοτικοποιούμενη με φωτομέτρηση έδωσε ένταση σήματος ίση με  $101\pm 56$  % ( $p < 0,05$ ) πάνω από το φόντο (**Εικόνα 7C**). Ο TNF- $\alpha$  προκάλεσε εντονότερη επαγωγή στο  $235\pm 116$  % ( $p < 0,05$ ) (**Εικόνα 7A και Εικόνα 7C**). Η συνεπίδραση και των δύο αυτών προφλεγμονωδών κυτταροκινών έδρασε αθροιστικά προκαλώντας δραστικότητα MMP-9 ίση με  $456\pm 228$  % ( $p < 0,05$ ) (**Εικόνα 7A και Εικόνα 7C**). Αντίθετα, η IFN- $\gamma$ , παρά το ότι μόνη της δεν προκάλεσε κανένα φαινόμενο ( $2\pm 2$  %), όταν προστέθηκε στην IL-1 $\alpha$ , στον TNF- $\alpha$  ή στο συνδυασμό τους ανέστειλε ισχυρά την επαγωγή της MMP-9 που οι κυτταροκίνες αυτές χωρίς την παρουσία της προκαλούσαν (**Εικόνα 7A**). Ποσοτικά η επαγωγή στο  $101\pm 56$  % από IL-1 $\alpha$  μειώθηκε στο  $38\pm 36$  % με την προσθήκη IFN- $\gamma$  και η επαγωγή στο  $201\pm 19$  % από TNF- $\alpha$  μειώθηκε στο  $19\pm 11$  % ( $p < 0,05$ ) (**Εικόνα 7C**). Η IFN- $\gamma$  ανέστειλε ισχυρά και την επαγωγή από το συνδυασμό IL-1 $\alpha$  και TNF- $\alpha$  από το  $456\pm 228$  % στο  $52\pm 34$  % ( $p < 0,05$ ) (**Εικόνα 7C**). Συνεπώς, η συνεπίδραση και των τριών αυτών προφλεγμονωδών κυτταροκινών δεν προκάλεσε επαγωγή MMP-9 από τους SEMFs.

# SEMFs

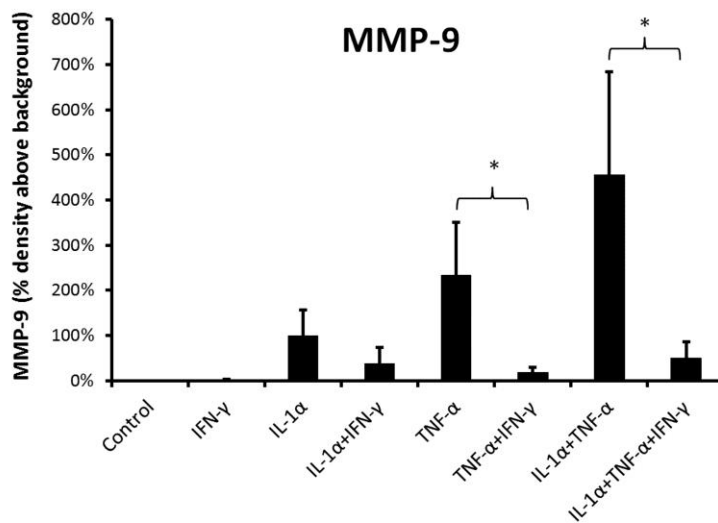
**A**



**B**



**C**



**Εικόνα 7.** Η IL-1α και ο TNF-α επάγουν MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs), ενώ η προσθήκη IFN-γ αναστέλλει το φαινόμενο αυτό. Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 σε υπερκείμενα 24h από SEMFs (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 επιδεικνύει σταθερή δραστηριότητα σε SEMFs χωρίς επιδράσεις ή με την επίδραση IL-α, TNF-α, IFN-γ μόνων ή σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν παρουσιάζεται σε SEMFs χωρίς επιδράσεις, αλλά επάγεται αθροιστικά από IL-α και TNF-α (A, C). Η IFN-γ χωρίς την παρουσία άλλων κυτταροκινών δεν έχει δράση στην MMP-9 (A, C). Όμως η προσθήκη της στις IL-1α ή/ και TNF-α αναιρεί την επαγωγική δράση τους στην MMP-9 (A, C). \*  $p \leq 0,05$ .

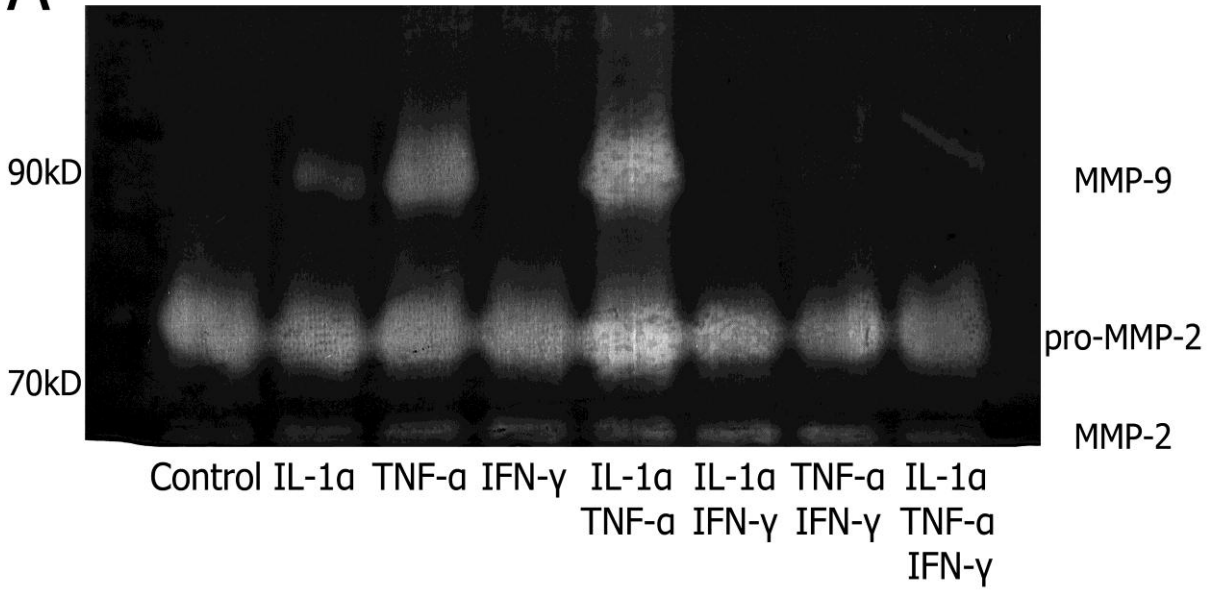
#### 4.3.2.2.2 18CO

Όμοιες ήταν οι επιδράσεις των υπό μελέτη κυτταροκινών και στην αντίστοιχη των εντερικών μυοϊνοβλαστών κυτταροσειρά **18CO**. Η **IL-1α** επί 24 ώρες προκάλεσε **επαγωγή** δραστηριότητας MMP-9 στο υπερκείμενο κατά  $49 \pm 19$  % πάνω από το φόντο, ενώ ο **TNF-α** προκάλεσε **έντονη επαγωγή** στο  $203 \pm 4$  % ( $p < 0,01$ ). Ο συνδυασμός τους προκάλεσε μια περαιτέρω αύξηση ( $232 \pm 65$  %,  $p < 0,05$ ). Η **IFN-γ ανέστειλε όλες τις παραπάνω επαγωγές** στα  $16 \pm 14$  %,  $32 \pm 20$  % ( $p < 0,01$ ) και  $24 \pm 7$  % ( $p < 0,05$ ) αντίστοιχα. (Εικόνα 8A και Εικόνα 8C)

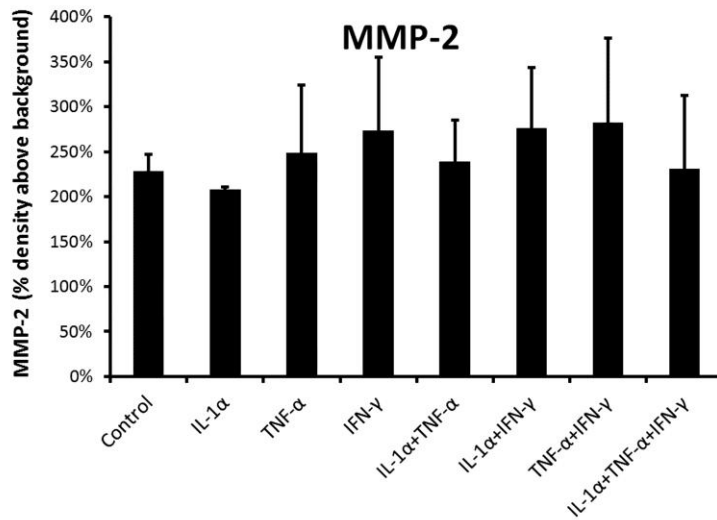
**Εικόνα 8.** Η IL-1α και ο TNF-α επάγουν MMP-9 στην κυτταροσειρά κολονικών μυοϊνοβλαστών **18CO**, ενώ η προσθήκη IFN-γ αναστέλλει το φαινόμενο αυτό. Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 σε υπερκείμενα 24h από 18CO (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 επιδεικνύει σταθερή δραστηριότητα σε 18CO χωρίς επιδράσεις ή με την επίδραση IL-α, TNF-α, IFN-γ μόνων ή σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν παρουσιάζεται σε 18CO χωρίς επιδράσεις, αλλά επάγεται αθροιστικά από IL-α και TNF-α (A, C). Η IFN-γ χωρίς την παρουσία άλλων κυτταροκινών δεν έχει δράση στην MMP-9 (A, C). Όμως η προσθήκη της στις IL-1α ή/ και TNF-α αναιρεί την επαγωγική δράση τους στην MMP-9 (A, C). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

# 18CO

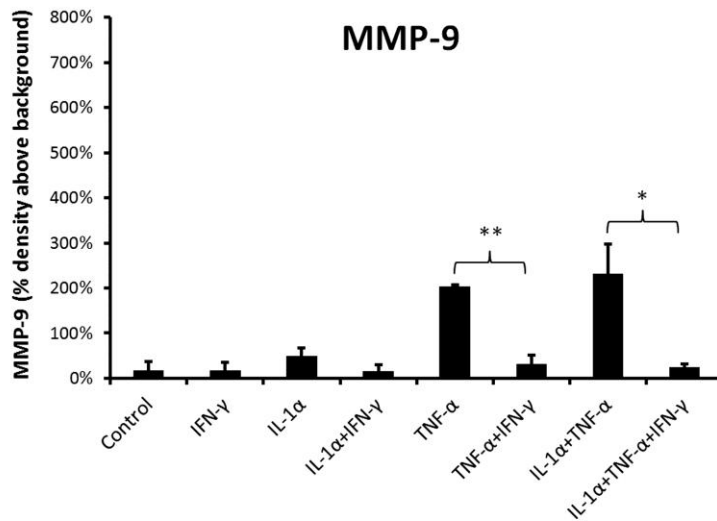
**A**



**B**



**C**



#### 4.3.2.2.3 HT-29, CaCO-2

Όπως και με την MMP-2, σε υπερκείμενα 24ωρων καλλιεργειών HT-29 ή CaCO-2 ζυμογραφικά δεν ανιχνεύθηκε δραστικότητα MMP-9. Αυτό δεν άλλαξε ούτε με την επίδραση μίας ή κάθε δυνατού συνδυασμού των κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ.

### 4.3.3 Επίδραση TGF-β1 στη Δραστικότητα MMP-2 & MMP-9 από Μυοϊνοβλάστες

Ορμώμενοι από το γεγονός ότι οι κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ αύξησαν τη βασική παραγωγή TGF-β ισομορφών από τις δύο κυτταροσειρές επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου (CaCO-2, HT-29) και εφόσον η ισομορφή TGF-β1 ήταν η επικρατούσα σε συγκέντρωση στα υπερκείμενα καλλιεργειών τους, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του TGF-β1 στην δραστικότητα MMP-9 στο υπερκείμενο καλλιεργειών SEMFs εφαρμόζοντας και πάλι ζυμογραφία με υπόστρωμα gelatin. Ακόμη, θελήσαμε να δούμε αν ο TGF-β1 τροποποιεί τη δραστικότητα MMP-2 σε αυτούς, δράση που δεν είχαν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν (IL-1α, TNF-α, IFN-γ).

#### 4.3.3.1 Η δραστικότητα MMP-2 σε υπερκείμενα υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών δεν επηρεάζεται από τον TGF-β1.

##### 4.3.3.1.1 SEMFs

Ελέγχθηκε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών συγκεντρώσεων (250- 10.000 ng/ml) TGF-β1 με επίδραση 24h. Το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό. Ενδεικτικά, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα η δραστικότητα MMP-2 ήταν στο 186±51 % πάνω από την ένταση φωτός του φόντου, με την επίδραση 250 ng/ml TGF-β1 στο 199±45 %, 1.000 ng/ml στο 182±39 % και

10.000 ng/ml στο  $181\pm 69$  %, χωρίς οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. (Εικόνα 9A και Εικόνα 9B)

#### 4.3.3.1.2 18CO

Όπως στους SEMFs, ανεπηρέαστη παρέμεινε η δραστικότητα MMP-2 από τον TGF- $\beta$ 1 σε ευρύ φάσμα φυσιολογικών συγκεντρώσεων (250- 10.000 ng/ml). Ενδεικτικά, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα η δραστικότητα MMP-2 ήταν στο  $256\pm 13$  % πάνω από την ένταση φωτός του φόντου, με την επίδραση 250 ng/ml TGF- $\beta$ 1 στο  $248\pm 19$  %, 1.000 ng/ml στο  $244\pm 9$  % και 10.000 ng/ml στο 238 %, χωρίς στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ τους και πάλι. (Εικόνα 10A και Εικόνα 10B)

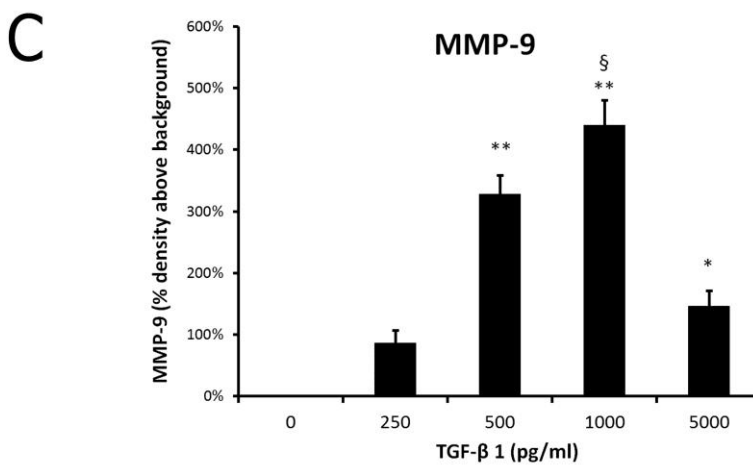
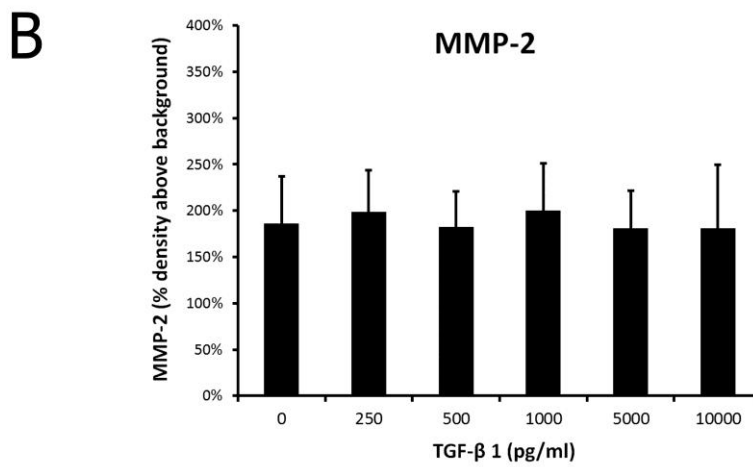
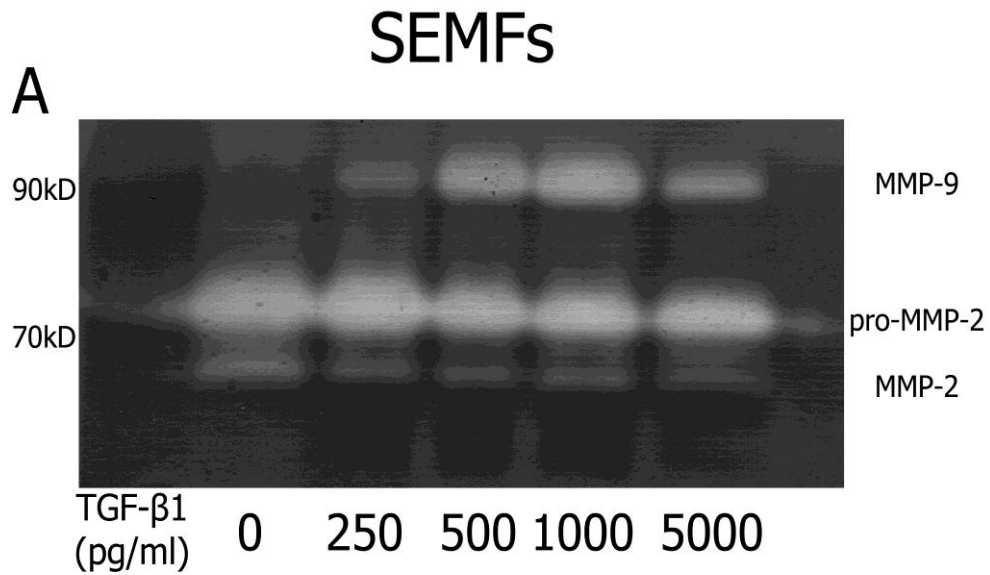
### 4.3.3.2 Ο TGF- $\beta$ 1 επάγει δοσοεξαρτώμενα δραστικότητα MMP-9 στο υπερκείμενο υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών

#### 4.3.3.2.1 SEMFs

Και σε αυτά τα πειράματα επιβεβαιώθηκε η έλλειψη δραστικότητας MMP-9 χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα. Όμως η προσθήκη TGF- $\beta$ 1 για 24h δοσοεξαρτώμενα προκάλεσε επαγωγή δραστικότητας MMP-9 σε υπερκείμενα SEMFs. Συγκεκριμένα, ήδη από την μικρή συγκέντρωση των 250 pg/ml TGF- $\beta$ 1 εμφανίστηκε μάλιστα λύση της gelatin έντασης  $87\pm 20$  % πάνω από την ένταση του φόντου. Η δραστικότητα αυξήθηκε στο  $329\pm 30$  % όταν αυξήσαμε τη συγκέντρωση του TGF- $\beta$ 1 στα 500 pg/ml ( $p < 0,01$ ) και μέγιστα στο  $441\pm 40$  % ( $p < 0,01$ ) στα 1.000 pg/ml. Υπενθυμίζεται ότι συγκέντρωση 1.000 pg/ml TGF- $\beta$ 1 αντιστοιχεί περίπου στην παραγωγή που έχουν τα HT-29 διεγχειρόμενα από συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Ο δοσοεξαρτώμενος χαρακτήρας τεκμηριώνεται από τη στατιστική σημαντικότητα  $p < 0,05$  της τιμής που αντιστοιχεί στα



1.000 pg/ml σε σχέση με τα 500 pg/ml. Με τη χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων εμφανίστηκε άμβλυνση του φαινομένου (5.000 pg/ml: 147±25 %,  $p < 0,05$ ). (Εικόνα 9A και Εικόνα 9C)



**Εικόνα 9.** Ο TGF-β1 δοσοεξαρτώμενα επάγει MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs). Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 σε υπερκείμενα 24h από SEMFs (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 επιδεικνύει σταθερή δραστηριότητα χωρίς ή με επίδραση TGF-β1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις: 0, 250, 500, 1.000 5.000 pg/ml (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν παρουσιάζεται σε SEMFs χωρίς επιδράσεις, αλλά επάγεται δοσοεξαρτώμενα από τον TGF-β1 με μέγιστη επαγωγή στο 1 ng/ml (A, C). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  σε σχέση με SEMFs χωρίς επιδράσεις. §  $p \leq 0,05$  σε σχέση με την επίδραση 500 pg/ml TGF-β1.

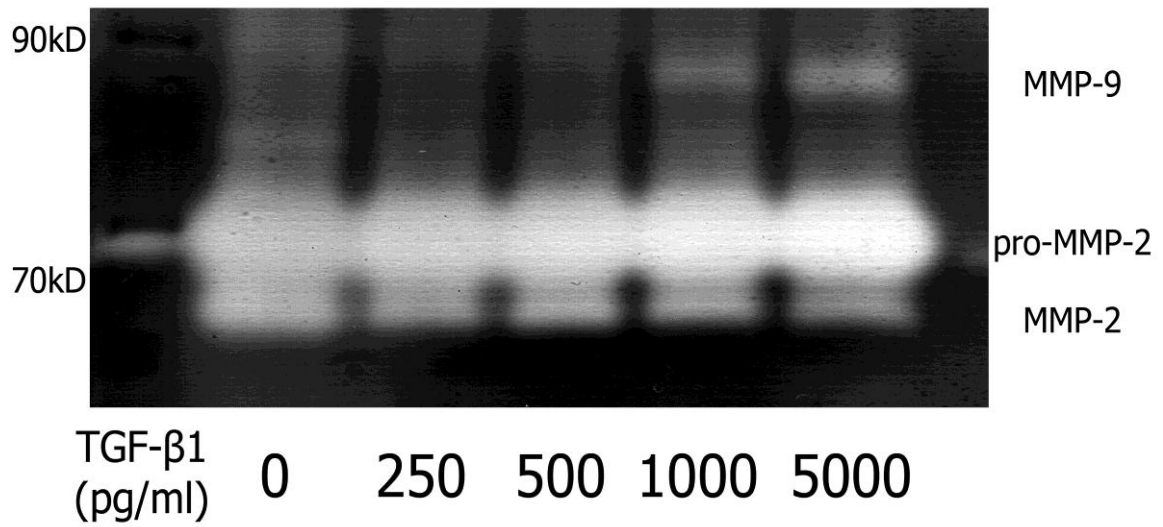
#### 4.3.3.2.2 18CO

Η δοσοεξαρτώμενη δράση του TGF-β1 πάνω στην MMP-9 επιβεβαιώθηκε με ένα πείραμα και στα **18CO**. Τα 18CO παρουσίαζαν ελαφρά διαφορετική συμπεριφορά από τους SEMFs υπό την έννοια ότι η επαγωγή δραστηριότητας MMP-9 στο υπερκείμενο άρχιζε από λίγο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TGF-β1: **1.000 pg/ml TGF-β1 αύξησαν στη δραστηριότητα MMP-9 κατά 43 % και 5.000 pg/ml κατά 102 % πάνω από το φόντο. (Εικόνα 10A και Εικόνα 10C)**

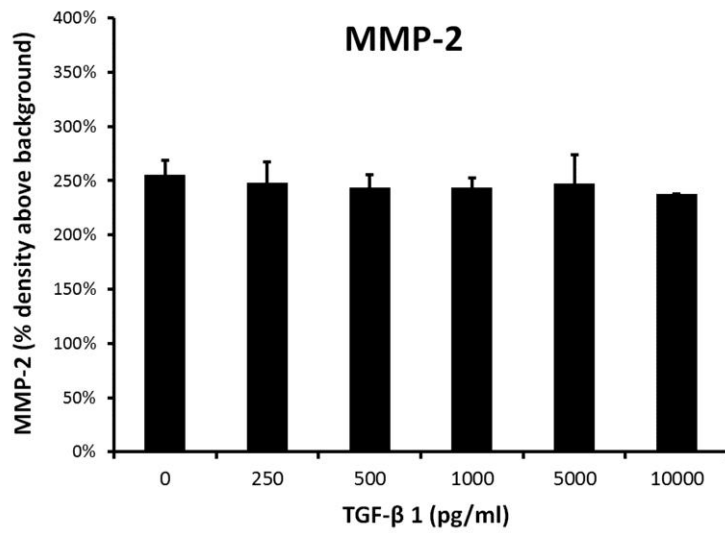
Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις στις οποίες η κυτταροσειρά 18CO και οι SEMFs απαντούσαν δεν μας εξέπληξαν, καθώς παρόμοια φαινόμενα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες, στις οποίες ινοβλάστες απομονωμένοι από διαφορετικούς ιστούς, αλλά και κυτταροσειρές ινοβλαστών παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στον TGF-β1 (Simmons et al., 2002; Vaughan et al., 2000).

# 18CO

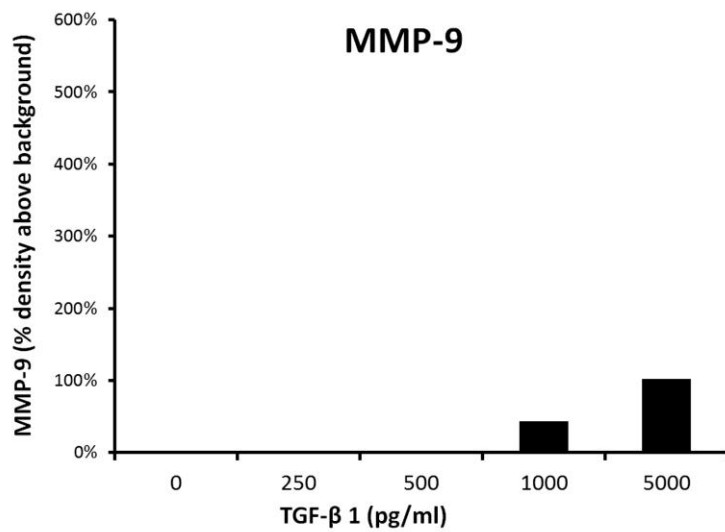
## A



## B



## C



**Εικόνα 10. Ο TGF-β1 δοσοεξαρτώμενα επάγει MMP-9 στην κυτταροσειρά κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO.** Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 σε υπερκείμενα 24h από 18CO (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 επιδεικνύει σταθερή δραστηριότητα χωρίς ή με επίδραση TGF-β1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις: 0, 250, 500, 1.000 5.000 pg/ml (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν παρουσιάζεται σε 18CO χωρίς επιδράσεις, αλλά επάγεται δοσοεξαρτώμενα από τον TGF-β1 από το 1 ng/ml (A, C). Διαφαίνεται μια δοσοεξαρτώμενη επαγωγή που όμως αρχίζει από μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (Εικόνα 9A και Εικόνα 9C).

#### 4.3.4 Επίδραση Υπερκειμένου Επιθηλιακών κυττάρων στη Δραστηριότητα MMP-2 & MMP-9 από Μυοϊνοβλάστες

Διαπιστώσαμε ότι η άμεση διέγερση με το σύνολο των τριών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) δεν αύξανε άμεσα τη δραστηριότητα MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες, λόγω της ανασταλτικής δράσης της IFN-γ στην επαγωγική δράση των IL-1α και TNF-α. Κατόπιν τούτου, αναζητήσαμε απάντηση στο ερώτημα αν τα επιθηλιακά μπορούσαν να επάγουν μέσω άλλων μορίων μεσολαβητών την έκφραση MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες. Διερευνήθηκαν οι περιπτώσεις επιθηλιακών τόσο σε περιβάλλον φλεγμονής όσο και χωρίς αυτό. Ακόμη θελήσαμε να ανιχνεύσουμε τυχόν αλλαγές στην ιδιοσυστασιακή έκφραση της MMP-2 στις πειραματικές αυτές συνθήκες, αλλαγές που δεν υπήρξαν στην περίπτωση επίδρασης με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή τον TGF-β1.

Καθώς επιθυμούσαμε στον μυοϊνοβλάστη να δράσουν μόνο διαλυτοί παράγοντες από το επιθηλιακό χωρίς την παρουσία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση του επιθηλιακού, η πειραματική προσέγγιση τροποποιήθηκε ως εξής: Αρχικά προδιεγείραμε ή όχι το επιθηλιακό επί 6h με τις τρεις

προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και εν συνεχεία αντικαθιστούσαμε το θρεπτικό μέσο που τις εμπεριείχε με θρεπτικό μέσο χωρίς αυτές. Το δεύτερο αυτό θρεπτικό μέσο αφέθηκε επί των επιθηλιακών για 18h παράγοντας Epithelial Cell Conditioned medium (ECC medium), το οποίο ακολούθως μεταφέρθηκε επί καλλιέργειας μυοϊνοβλαστών και αφέθηκε να επιδράσει σε αυτή για 24h. Εκτελέστηκαν ζυμογραφίες στα υπερκείμενα για την ανίχνευση δραστικότητας προ-MMP-2 (MB≈ 72 kD) και στην ενεργού MMP-2 (MB≈ 68 kD) και ενεργής MMP-9 (MB≈ 90 kD). Δεδομένης της έλλειψης δραστικότητας MMPs στο υπερκείμενο επιθηλιακών διεγερμένων ή μη (βλέπε 4.3.2.1.3 και 4.3.2.2.3), το σύνολο της δραστικότητας MMP-2 και MMP-9 στο υπερκείμενο οφειλόταν στους μυοϊνοβλάστες.

#### ***4.3.4.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από τα επιθηλιακά κύτταρα δεν τροποποιούν τη δραστικότητα MMP-2 από μυοϊνοβλάστες.***

##### **4.3.4.1.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs**

Επί καλλιέργειας της κυτταροσειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου CaCO-2 ετέθη υπερκείμενο που περιείχε ή όχι τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α και IFN-γ μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς επί 6h (προδιέγερση). Ακολούθως το υπερκείμενο με τις κυτταροκίνες αφαιρέθηκε και επί των CaCO-2 ετέθη θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες και αφέθηκε υπέρ αυτών επί 18h. Εν συνεχεία τα δύο αυτά είδη υπερκειμένων από προδιεγερμένα ή όχι επιθηλιακά κύτταρα (Epithelial Cell Conditioned media- ECC media) ή θρεπτικό υλικό στο δείγμα ελέγχου ετέθησαν επί καλλιεργειών SEMFs για 24h.

Ζυμογραφικά δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στη δραστικότητα MMP-2. Αναλυτικότερα, δίχως επιδράσεις η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $197 \pm 88$  % του φόντου και υπό 24ωρη

επίδραση υπερκειμένου CaCO-2 χωρίς προδιέγερση  $183\pm 76$  %. Αν τα CaCO-2 είχαν προδιεγερθεί με IL-1α η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $169\pm 35$  %, με TNF-α  $169\pm 61$  %, με IFN-γ  $209\pm 47$  % και με συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών  $210\pm 110$  %. Οι διαφορές μεταξύ των παραπάνω % ήταν στατιστικά ασήμαντες. **(Εικόνα 11A και Εικόνα 11B)**

#### 4.3.4.1.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO

Όμοια συμπεριφορά έδειξε και η κυτταροσειρά μυοϊνοβλαστών 18CO ως προς την δραστικότητα MMP-2 στην περίπτωση επίδρασης υπερκειμένου προδιεγερμένων ή όχι επιθηλιακών. Χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά CaCO-2. Χωρίς επιδράσεις η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $213\pm 4$  % του φόντου και υπό 24ωρη επίδραση υπερκειμένου CaCO-2 χωρίς προδιέγερση  $197\pm 21$  %. Αν τα CaCO-2 είχαν προδιεγερθεί με IL-1α η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $181\pm 35$  %, με TNF-α  $224\pm 18$  %, με IFN-γ  $196\pm 30$  % και με συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών  $201\pm 12$  %. Και στην περίπτωση αυτή οι διαφορές μεταξύ τους ήταν στατιστικά ασήμαντες. **(Εικόνα 12A και Εικόνα 12B)**

#### 4.3.4.1.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα επίδρασης υπερκειμένου της δεύτερης κυτταροσειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT-29 επί καλλιεργίων SEMFs. Και στην περίπτωση αυτή υπερκείμενα προδιεγερμένων ή όχι με τις τρεις κυτταροκίνες HT-29 δεν τροποποιούσαν τη δραστικότητα MMP-2 στους SEMFs.

Συγκεκριμένα, δίχως επιδράσεις η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $62\pm 11$  % του φόντου και υπό 24ωρη επίδραση υπερκειμένου HT-29 χωρίς προδιέγερση  $61\pm 10$  %. Αν τα HT-29 είχαν προδιεγερθεί με IL-1α η δραστικότητα MMP-2 ήταν  $65\pm 10$  %, με TNF-α  $78\pm 14$  %, με IFN-γ

72±12 % και με συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών 55±12 %. Και οι διαφορές μεταξύ των τιμών αυτών ήταν στατιστικά ασήμαντες. (Εικόνα 13A)

#### **4.3.4.2 Επιθηλιακά προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν δραστικότητα MMP-9 από τους μυοϊνοβλάστες**

Διαπιστώσαμε ότι οι υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες δεν εκφράζουν ιδιοσυστασιακά στο υπερκείμενο δραστικότητα MMP-9. Δραστικότητα MMP-9 διαπιστώσαμε ότι επάγεται από την άμεση επίδραση TNF-α και IL-1α. Όμως η συνύπαρξη IFN-γ στο φλεγμονώδες περιβάλλον αναιρεί τις επαγωγές που μόλις περιγράφηκαν (βλέπε 4.3.2.2). Οπότε συνδυασμός των τριών κυτταροκινών δεν έχει αποτέλεσμα στην MMP-9.

Θελήσαμε να μελετήσουμε αν έμμεσα μέσω του γειτονικού επιθηλιακού κυττάρου αυτές οι κυτταροκίνες μπορούν να επάγουν την MMP-9 στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες, ανεξάρτητα από τις άμεσες δράσεις τους. Η πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της ενότητας 4.3.4.1, ώστε να αποφευχθεί η άμεση δράση των κυτταροκινών στους μυοϊνοβλάστες: προδιέγερση των επιθηλιακών για 6h, αντικατάσταση με καθαρό θρεπτικό (χωρίς κυτταροκίνες) για 18h και κατόπιν επίδραση αυτού του ECC medium επί των μυοϊνοβλαστών.

##### **4.3.4.2.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs**

Και στη σειρά αυτή των πειραμάτων **SEMFs** χωρίς επιδράσεις δεν εξέφραζαν μπάντα λύσης gelatin στη θέση που αναμενόταν για την MMP-9 ( $\approx 90$  kD). Η ένταση σήματος ήταν 20±7 % πλέον αυτής του φόντου (στατιστικά ασήμαντη διαφορά). Διαπιστώσαμε ακόμη ότι ούτε το ECC medium αδιέγερτων CaCO-2 δεν προκαλούσε την εμφάνιση μπάντας MMP-9

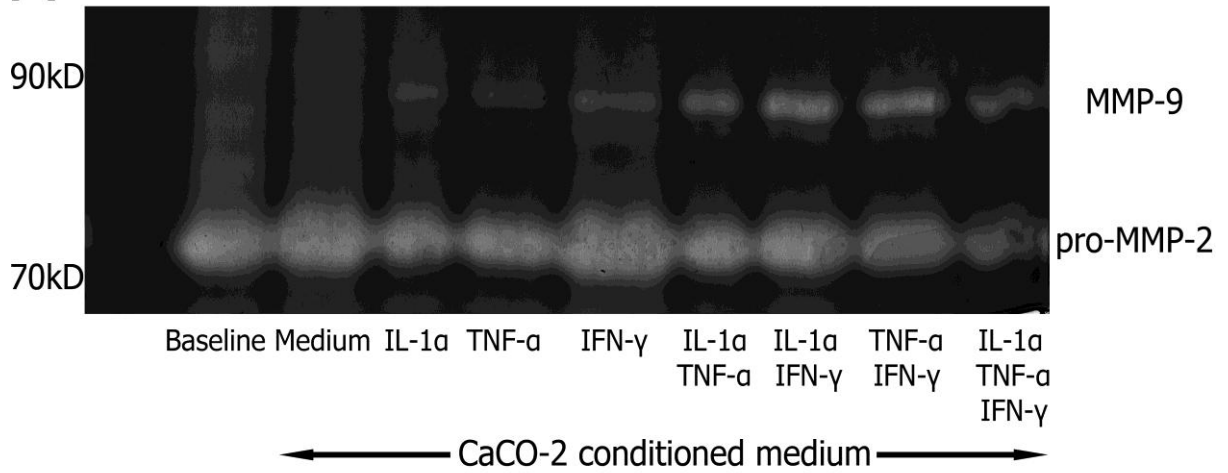
(10±6 %, στατιστικά ασήμαντη διαφορά). Όμως, αν τα CaCO-2 προεπιλάζονταν με IL-1α ή TNF-α ή IFN-γ εμφανιζόταν μπάντα λύσης gelatin στο αναμενόμενο για την MMP-9 MB (≈90 kD). Η έντασή της ήταν ασθενής (19±5, 23±4, 38±4 %). Με τη χρήση συνδυασμών των κυτταροκινών αυτών ανά δύο παρατηρήθηκε αθροιστικό αποτέλεσμα: IL-1α και TNF-α 41±8 %, IL-1α και IFN-γ 66±11 % και TNF-α και IFN-γ 71±15 %, με τις διαφορές σε σχέση με το φόντο να είναι οριακά στατιστικά ασήμαντες. **Καθαρή στατιστικά σημαντική επαγωγή MMP-9 στο 224±68 % λάβαμε με το συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών** ( $p < 0,05$  σε σχέση με απλό θρεπτικό ή ECC medium αδιέγερτων CaCO-2). Κατά συνέπεια προεπιλάση των επιθηλιακών με τις τρεις κυτταροκίνες επάγει MMP-9 στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες μέσω διαλυτών μορίων μεσολαβητών. (Εικόνα 11A και Εικόνα 11C)

**Εικόνα 11. CaCO-2 προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs).** Η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων CaCO-2 προδιεγέρθηκε επί 6 h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-α, TNF-α, IFN-γ μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς ή δεν διεγέρθηκε ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των CaCO-2 για επιπλέον 18 h, παράγοντας CaCO-2 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το CaCO-2 conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 είχε σταθερή δραστηριότητα σε SEMFs ανεξάρτητα από τις παραπάνω επιδράσεις (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν υπήρξε σε SEMFs χωρίς επιδράσεις ή υπό την επίδραση conditioned medium από αδιέγερτα CaCO-2 (A, C). Δραστηριότητα MMP-9 εμφανίστηκε μόνο όταν τα CaCO-2 είχαν προδιεγερθεί με οποιαδήποτε από τις τρεις κυτταροκίνες (A, C). Συνδυασμοί των κυτταροκινών είχαν αθροιστική δράση με το συνδυασμό και των τριών να φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα. \*  $p \leq 0,05$  σε σχέση με το Baseline. #  $p \leq 0,05$  σε σχέση με το υπερκείμενο αδιέγερτων CaCO-2 (Medium).

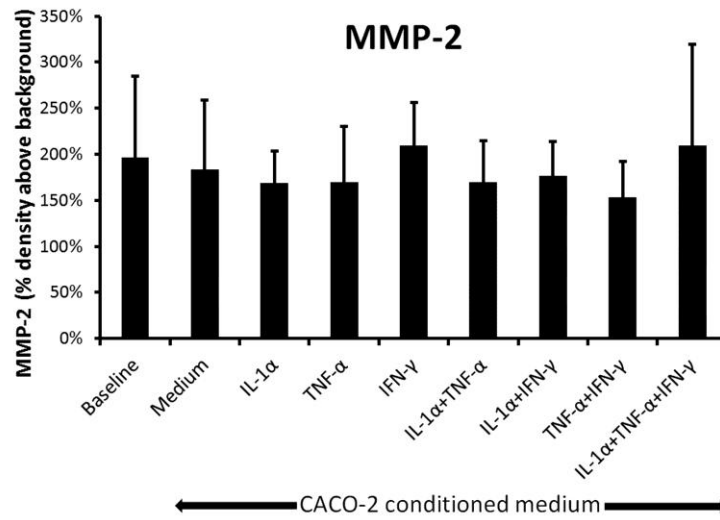


# SEMFs

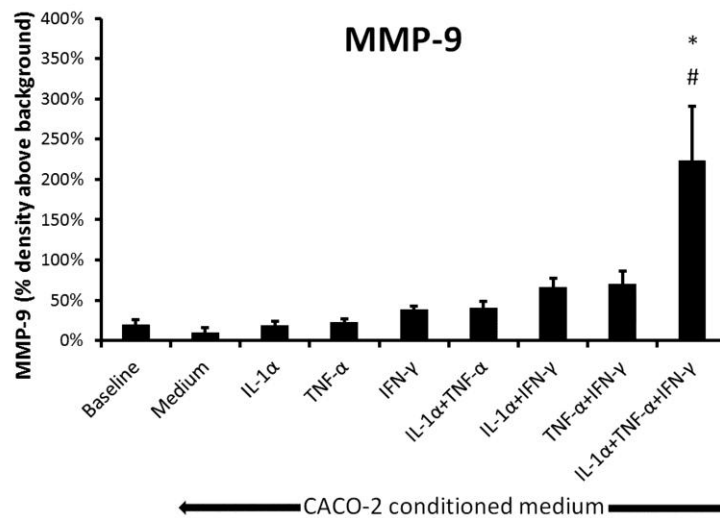
**A**



**B**



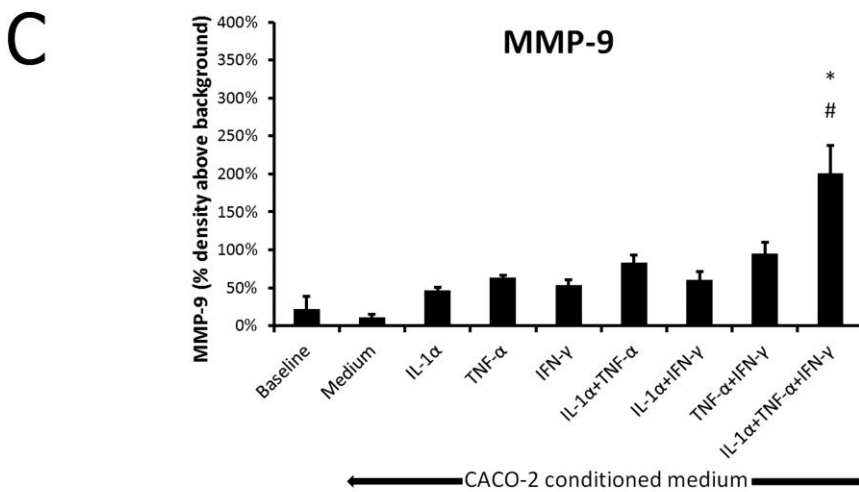
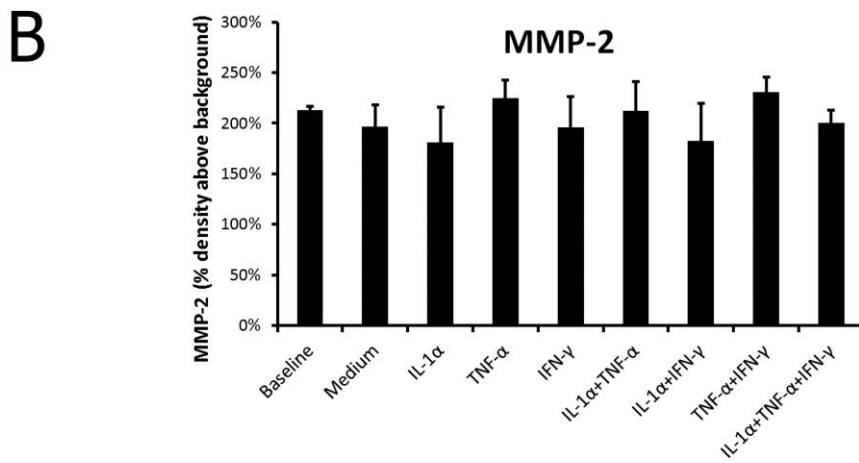
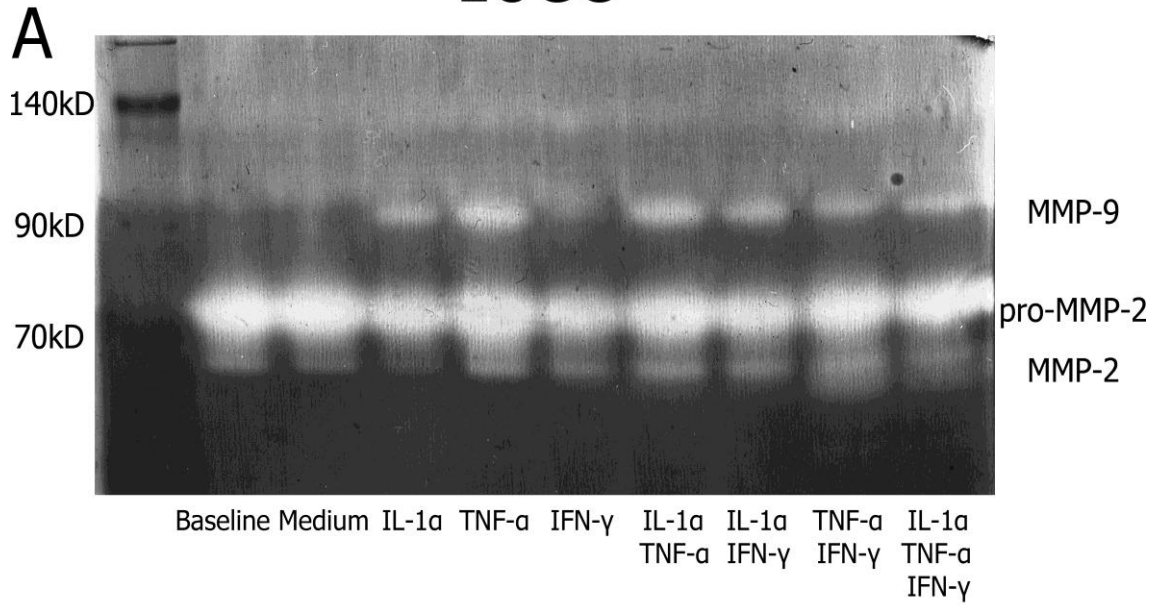
**C**



#### 4.3.4.2.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO

Θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα και στην αντίστοιχη των εντερικών μυοϊνοβλαστών κυτταροσειρά **18CO**. Όντως, η συμπεριφορά τους ήταν όμοια με αυτή των SEMFs. Και στην περίπτωση αυτή δεν υπήρχε δραστικότητα MMP-9 χωρίς επιδράσεις ή υπό την επίδραση υπερκείμενου αδιέγερτων επιθηλιακών ( $22\pm 11$  ή  $16\pm 3$  % πλέον της έντασης του φόντου αντίστοιχα). **Όμως, αν τα CaCO-2 προεπωάζονταν με IL-1α ή TNF-α ή IFN-γ εμφανιζόταν σαφής δραστικότητας MMP-9** ( $47\pm 4$ ,  $64\pm 3$ ,  $54\pm 7$  % αντίστοιχα). Με τη χρήση συνδυασμών των κυτταροκινών αυτών ανά δύο παρατηρήθηκε αθροιστικό αποτέλεσμα: IL-1α και TNF-α  $83\pm 10$  %, IL-1α και IFN-γ  $61\pm 10$  % και TNF-α και IFN-γ  $95\pm 15$  %, με τις διαφορές σε σχέση με το φόντο να είναι οριακά στατιστικά ασήμαντες. Στατιστικά σημαντική επαγωγή MMP-9 στο  $201\pm 37$  % λάβαμε με το συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών ( $p < 0,05$  σε σχέση με απλό θρεπτικό ή ECC medium αδιέγερτων CaCO-2). **(Εικόνα 12A και Εικόνα 12C)**

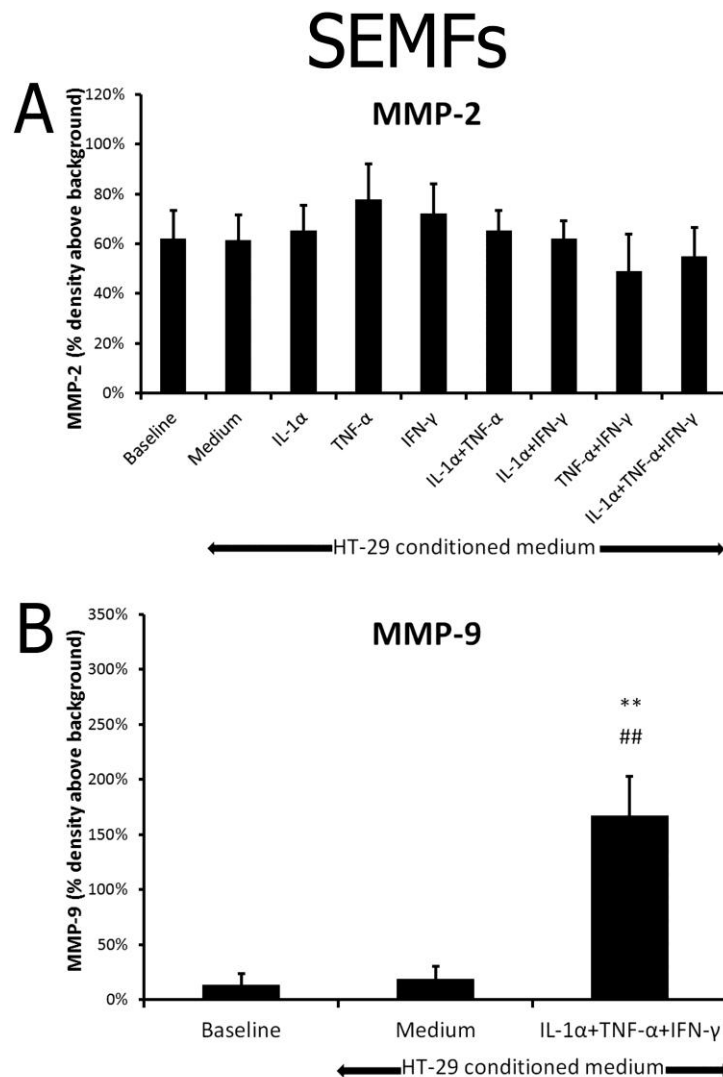
# 18CO



**Εικόνα 12. CaCO-2 προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν MMP-9 στην κυτταροσειρά κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO.** Η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων CaCO-2 προδιεγέρθηκε επί 6 h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  μόνες ή σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς ή δεν διεγέρθηκε ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των CaCO-2 για επιπλέον 18 h, παράγοντας CaCO-2 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το CaCO-2 conditioned medium ετέθη επί των 18CO για 24 h. Η δραστηριότητες MMP-2 και MMP-9 (A) ανιχνεύθηκαν ως λευκάζουσες μπάντες σε ζυμογραφία με υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B, C). Η MMP-2 είχε σταθερή δραστηριότητα σε SEMFs ανεξάρτητα από τις παραπάνω επιδράσεις (A, B). Αντίθετα δραστηριότητα MMP-9 δεν υπήρξε σε 18CO χωρίς επιδράσεις ή υπό την επίδραση conditioned medium από αδιέγερτα CaCO-2 (A, C). Δραστηριότητα MMP-9 εμφανίστηκε μόνο όταν τα CaCO-2 είχαν προδιεγερθεί με οποιαδήποτε από τις τρεις κυτταροκίνες (A, C). Συνδυασμοί των κυτταροκινών είχαν αθροιστική δράση με το συνδυασμό και των τριών να φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα. \*  $p \leq 0,05$  σε σχέση με το Baseline. #  $p \leq 0,05$  σε σχέση με το υπερκείμενο αδιέγερτων CaCO-2 (Medium).

#### 4.3.4.2.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs

Η επαγωγή της MMP-9 στους SEMFs από υπερκείμενο προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επιθηλιακών επιβεβαιώθηκε και στην περίπτωση χρήσης των HT-29 ως επιθηλιακής κυτταροσειράς προέλευσης του ECC medium. Αναλυτικότερα, η ένταση στη θέση της μπάντας που αντιστοιχεί στην MMP-9 (MB $\approx$  90 kD) στην περίπτωση θρεπτικού υλικού ή υπερκείμενου αδιέγερτων HT-29 επίσης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από το φόντο (14 $\pm$ 10 %, 19 $\pm$ 11 % αντίστοιχα). **Όμως, όταν τα HT-29 προδιεγείρονταν με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ , παρήγαγαν υπερκείμενο που καθαρά προκαλούσε επαγωγή MMP-9 στους SEMFs στο 167 $\pm$ 35 %.** Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αποτέλεσμα των SEMFs τόσο με απλό θρεπτικό όσο και με υπερκείμενο από αδιέγερτα HT-29 ( $p < 0,01$  και στις δύο περιπτώσεις), επιβεβαιώνοντας το εύρημα των ενοτήτων 4.3.4.2.1 και 4.3.4.2.2. (Εικόνα 13B)



**Εικόνα 13. HT-29 προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μοινοβλάστες (SEMFs).** Η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 προδιεγέρθηκε επί 6 h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκε ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των HT-29 για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το HT-29 conditioned medium ετέθη επί των 18CO για 24 h. Η δραστηρότητες MMP-2 και MMP-9 εκτιμήθηκαν με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (A, B). (A) Η MMP-2 είχε σταθερή δραστηρότητα σε SEMFs ανεξάρτητα από τις παραπάνω επιδράσεις. (B) Αντίθετα δραστηρότητα MMP-9 ουσιαστικά δεν υπήρξε σε HT-29 χωρίς επιδράσεις ή υπό την επίδραση conditioned medium από αδιέγερτα HT-29. Δραστηρότητα MMP-9 εμφανίστηκε μόνο όταν τα HT-29 είχαν προδιεγερθεί με τις τρεις κυτταροκίνες. \*\*  $p \leq 0,01$  σε σχέση με το Baseline. ##  $p \leq 0,01$  σε σχέση με το υπερκείμενο αδιέγερτων HT-29 (Medium).

#### *4.3.4.3 Η επαγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες από επιθηλιακά προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξαρτάται από τον υποδοχέα B των ενδοθηλινών των μυοϊνοβλαστών*

Θελήσαμε να αναζητήσουμε παράγοντα/ες που ήταν υπεύθυνοι για την επαγωγή της MMP-9 σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες από υπερκείμενο επιθηλιακών προδιεγερμένων με κυτταροκίνες. Τέτοιοι υποτέθηκε ότι είτε περιέχονταν στο υπερκείμενο ως παραγόμενοι από τα επιθηλιακά κύτταρα είτε επάγονταν από το υπερκείμενο αυτό στους μυοϊνοβλάστες και δρούσαν αυτοκρινώς. Επελέγη η επίδραση και των τριών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α και IFN-γ) έναντι μεμονωμένων ή ζευγών διότι μόνο με αυτήν λαμβάναμε στατιστικά σημαντική επαγωγή της MMP-9.

Πειραματικά επιθηλιακά διεγέρθηκαν ή με τις τρεις κυτταροκίνες ή όχι επί 6h και ακολούθως το υπερκείμενο αντικαταστάθηκε με θρεπτικό μέσο χωρίς κυτταροκίνες που παρέμεινε επί των επιθηλιακών επί 18h (ECC medium). Στα δύο αυτά είδη ECC medium ή σε απλό θρεπτικό υλικό προστέθηκαν ή όχι αντισώματα ή άλλες πρωτεΐνες ή χημικές ουσίες που αδρανοποιούσαν λειτουργικά τις ισομορφές TGF-β, τον CTGF, ολόκληρο το μηχανισμό πήξης, μόνο τον TF ή τους υποδοχείς ενδοθηλινών και ετέθησαν επί υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών για 24h με σκοπό να διαπιστωθεί αν επηρεάζουν την επαγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες. Καθώς το υπερκείμενο αδιέγερτων η διεγερμένων επιθηλιακών δεν παρουσίαζε δραστηριότητα MMPs στη ζυμογραφία με gelatin, το σύνολο της ζυμογραφικής δραστηριότητας αποδόθηκε στους μυοϊνοβλάστες.

##### *4.3.4.3.1 TGF-β*

Προηγουμένως διαπιστώσαμε ότι ο TGF-β1 προκαλούσε δοσοεξαρτώμενη επαγωγή της MMP-9 σε μυοϊνοβλάστες (βλέπε 4.3.3.2). Θελήσαμε λοιπόν να διαπιστώσουμε αν ο TGF-

$\beta 1$  ήταν ο παράγοντας που επαγόμενος από τις τρεις κυτταροκίνες (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ ) στα επιθηλιακά προκαλούσε την επαγωγή της MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες. Μάλιστα προκείμενου για τους μυοϊνοβλάστες και τα HT-29, οι συγκεντρώσεις TGF- $\beta 1$  που επιτυγχάνονταν στο υπερκείμενο HT-29 υπό την επίδραση των τριών κυτταροκινών ταυτίζονταν με τις συγκεντρώσεις που μεγιστοποιούσαν τη δραστικότητα MMP-9 σε πρωτογενείς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs). Προς το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα που συνδέεται και αδρανοποιεί και τις τρεις ισομορφές του TGF- $\beta$  (anti-ran-TGF- $\beta$ ) ή αντίσωμα ελέγχου (χωρίς επίτοπο πρόσδεσης) στα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Στις ζυμογραφίες των πειραμάτων αυτών στην αναμενόμενη θέση της MMP-9 δεν πήραμε ένταση σημαντικά διαφορετική του 0 προκείμενου για SEMFs με αντίσωμα ελέγχου ( $20 \pm 6$  %) ή υπό anti-ran-TGF- $\beta$  ( $49 \pm 18$  %). Το ίδιο ίσχυσε και για την επίδραση θρεπτικών από αδιέγερτα HT-29 με αντίσωμα ελέγχου ή anti-ran-TGF- $\beta$  προ της επίδρασής τους στους SEMFs ( $14 \pm 11$  % και  $4 \pm 22$  % αντίστοιχα). Λάβαμε και πάλι σαφείς μπάντες δραστικότητας MMP-9 υπό την επίδραση ECC medium από προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες HT-29 με αντίσωμα ελέγχου ( $132 \pm 25$  %,  $p < 0,01$  σε σχέση με το θρεπτικό και  $p < 0,05$  σε σχέση με ECC medium αδιέγερτων HT-29). Δεν υπήρξε όμως διαφορά αν στο υπερκείμενο προδιεγερμένων HT-29 προσετίθετο πριν αυτό να τεθεί υπέρ των επιθηλιακών anti-ran-TGF- $\beta$  ( $132 \pm 27$  %,  $p < 0,01$  σε σχέση με το anti-ran-TGF- $\beta$  σε θρεπτικό και  $p < 0,05$  σε σχέση με ECC medium αδιέγερτων HT-29 στο οποίο προστέθηκε anti-ran-TGF- $\beta$ ). **(Εικόνα 14A και Εικόνα 14B)**

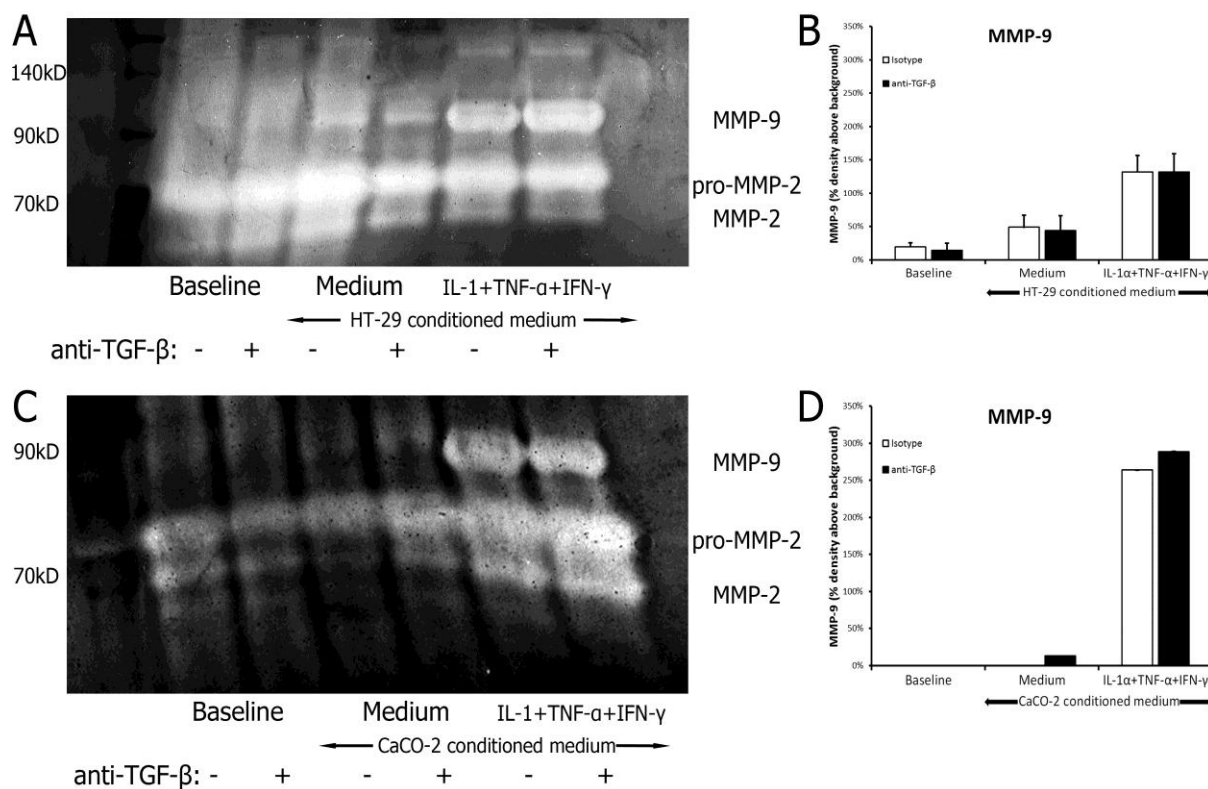
Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και προκείμενου για υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs. Συγκεκριμένα επαγωγή MMP-9 στο 264 % πλέον του φόντου παρατηρήθηκε με

υπερκείμενο από CaCO-2 προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες στο οποίο προστέθηκε non-sense ισότυπος προ της επίδρασής του στους SEMFs, ενώ το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με την προσθήκη anti-ran-TGF-β αντισώματος (289 %). (Εικόνα 14C και Εικόνα 14D)

**Εικόνα 14.** Η επαγωγή MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) από υπερκείμενα κυτταροσειρών επιθηλιακών προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν είναι εξαρτώμενη από τον TGF-β. Οι κυτταροσειρές κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 (A, B) και CaCO-2 (C, D) προδιεγέρθηκαν επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκαν ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των HT-29 για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 (A- B) ή CaCO-2 (C- D) conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Και στα τρία αυτά μέσα διέγερσης προστέθηκε πριν τεθούν υπέρ των SEMFs είτε αντίσωμα ελέγχου χωρίς επίτοπο σύνδεσης (-) είτε anti-TGF-β που αδρανοποιούσε όλες τις ισομορφές του TGF-β. Η δραστηριότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin) (A: υπερκείμενο HT-29, C: υπερκείμενο CaCO-2). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B: υπερκείμενο HT-29, D: υπερκείμενο CaCO-2). Η επαγόμενη δραστηριότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών δεν επηρεάστηκε από το anti-TGF-β.



## SEMFs

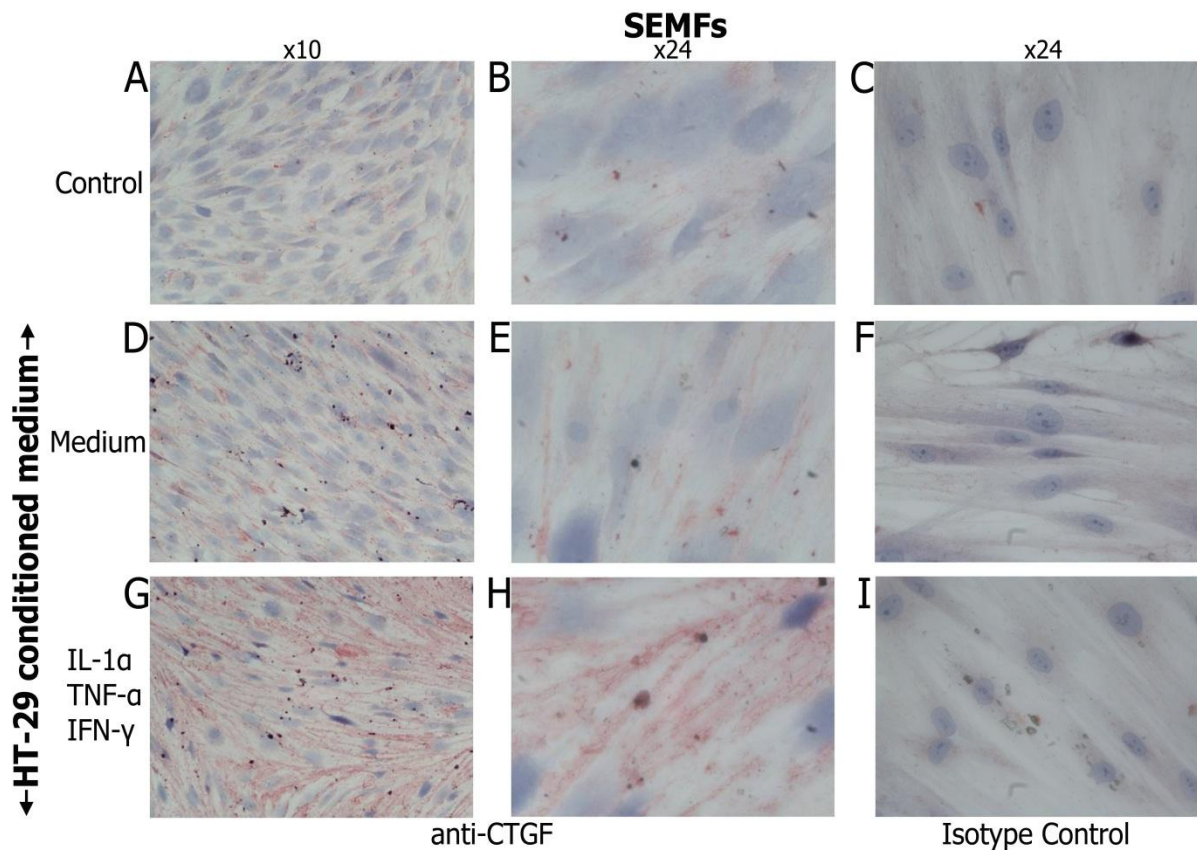


### 4.3.4.3.2 CTGF

Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα όταν δοκιμάσαμε να αδρανοποιήσουμε λειτουργικά τον CTGF, γνωστό ρυθμιστικό παράγοντα της εξωκυττάριας ουσίας και επομένως υποψήφιο να ενέχεται στην ομοίωση των μεταλλοπρωτεασών. Αν και ο CTGF δεν βρέθηκε να επάγεται από τις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ στις κυτταροσειρές επιθηλιακών (βλέπε 4.3.1.1.1.5, Εικόνα 5), πάντα υπήρχε η πιθανότητα επαγωγής του στους μυοϊνοβλάστες από άλλο επαγόμενο στα επιθηλιακά από τις τρεις κυτταροκίνες παράγοντα και στη συνέχεια αυτοκρινούς δράσης του CTGF προς την επαγωγή MMP-9. Ισχυρή υποψία προς αυτήν την κατεύθυνση δημιούργησαν τα αποτελέσματα ανοσοκυτταροχημείας CTGF σε SEMFs, οι οποίοι χωρίς επιδράσεις δεν εξέφραζαν

θετικότητα για CTGF (**Εικόνα 15A και Εικόνα 15B**) και με την επίδραση υπερκειμένου αδιέγεργτων HT-29 εξέφραζαν ασθενή (**Εικόνα 15D και Εικόνα 15E**), αλλά με την επίδραση υπερκειμένου HT-29 προδιεγερμένων με τις τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξέφραζαν έντονη θετικότητα για CTGF (**Εικόνα 15G και Εικόνα 15H**).

**Εικόνα 15.** HT-29 προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν CTGF σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs). Η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 προδιεγέρθηκε επί 6 h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ή δεν διεγέρθηκε ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των HT-29 για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Control) ή το HT-29 conditioned medium ετέθη επί των 18CO για 24 h. Η παραγωγή CTGF από τους SEMFs εκτιμήθηκε με ανοσοκυτταροχημεία. Παρουσιάζονται δύο μεγεθύνσεις: 10x (A, D, G) και 24x (B- C, E- F, H- I). Οι C, F, I αντιστοιχούν σε χρώση με αντίσωμα ελέγχου (Isotype Control), ώστε να επιβεβαιωθεί το θετικό της χρώσης στα δείγματα με αντίσωμα έναντι CTGF. Οι SEMFs χωρίς επιδράσεις δεν εξέφραζαν θετικότητα για CTGF (A- B) και με την επίδραση υπερκειμένου αδιέγεργτων HT-29 εξέφραζαν ασθενή (D- E), αλλά με την επίδραση υπερκειμένου HT-29 προδιεγερμένων με τις τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξέφραζαν έντονη θετικότητα για CTGF (G- H).

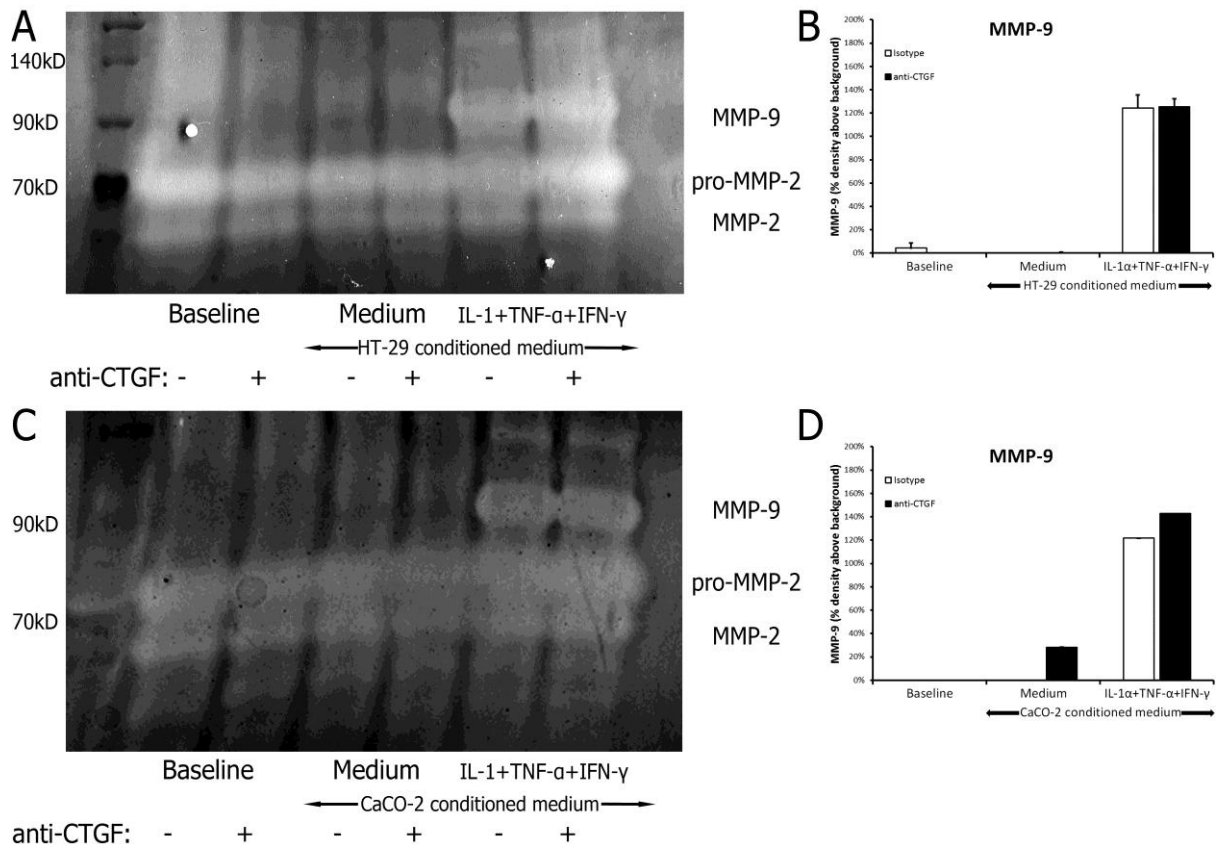


Χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα που προσδενόταν και ανέστειλε τη λειτουργία του CTGF (anti-CTGF). Όπως και παραπάνω, δεν πήραμε μάντα στατιστικά σημαντικά διαφορετική από το φόντο για το απλό θρεπτικό υλικό με αντίσωμα ελέγχου ή anti-CTGF και για το υπερκείμενο αδιέγερτων HT-29 με αντίσωμα ελέγχου ή με anti-CTGF. Σαφείς μάντες λύσης της gelatin στη θέση που αναμενόταν δράση MMP-9 λάβαμε μόνο από υπερκείμενο προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  HT-29 στα οποία προ της επίδρασης επί των SEMFs προστέθηκε αντίσωμα ελέγχου: 124 $\pm$ 11 % υπέρ της έντασης του φόντου ( $p < 0,01$  σε σχέση με όλες τις προηγούμενες επιδράσεις με αντίσωμα ελέγχου). Αυτές οι μάντες πάλι δεν ήταν διαφορετικές από το ίδιο ECC medium στο οποίο προστέθηκε anti-CTGF προ της τοποθέτησης επί των SEMFs: 125 $\pm$ 7 % (όμως και πάλι  $p < 0,01$  σε σχέση όλες τις προηγούμενες επιδράσεις με anti-CTGF). (Εικόνα 16A και Εικόνα 16B)

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και προκείμενου για υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs. Συγκεκριμένα επαγωγή MMP-9 στο 122 % πλέον του φόντου παρατηρήθηκε με υπερκείμενο από CaCO-2 προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες στο οποίο προστέθηκε αντίσωμα ελέγχου προ της επίδρασής του στους SEMFs, ενώ το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με την προσθήκη anti-CTGF αντισώματος (143 %). (Εικόνα 16C και Εικόνα 16D)

**Εικόνα 16.** Η επαγωγή MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) από υπερκείμενα κυτταροσειρών επιθηλιακών προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν είναι εξαρτώμενη από τον CTGF. Οι κυτταροσειρές κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 (A, B) και CaCO-2 (C, D) προδιεγέρθηκαν επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ή δεν διεγέρθηκαν ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των επιθηλιακών για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 (A- B) ή CaCO-2 (C- D) conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Και στα τρία αυτά μέσα διέγερσης προστέθηκε πριν τεθούν υπέρ των SEMFs είτε αντίσωμα ελέγχου χωρίς επίτοπο σύνδεσης (-) είτε anti-CTGF που αδρανοποιούσε όλες τον CTGF. Η δραστηριότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin) (A: υπερκείμενο HT-29, C: υπερκείμενο CaCO-2). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B: υπερκείμενο HT-29, D: υπερκείμενο CaCO-2). Η επαγόμενη δραστηριότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών δεν επηρεάστηκε από το anti-CTGF.

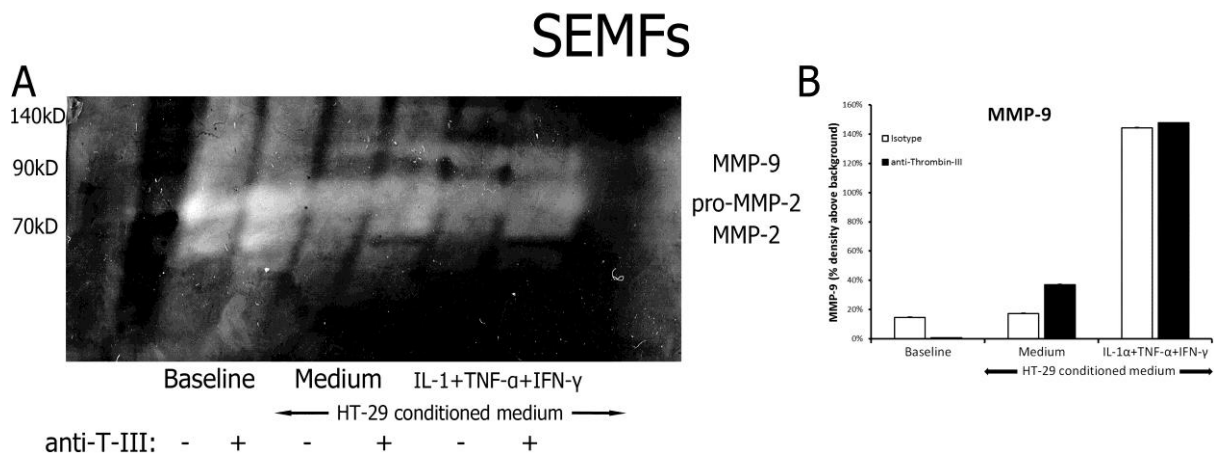
## SEMFs



### 4.3.4.3.3 Αντιθρομβίνη-III

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι παράγοντες του μηχανισμού της πήξης ενέχονται στη ρύθμιση της ισορροπίας παραγωγής και αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Με βάση αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή του μηχανισμού της πήξης στην επαγωγή της δραστηριότητας MMP-9 στους υποεπιθηλιακούς μωϊνοβλάστες από υπερκείμενο προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επιθηλιακών κυττάρων. Αυτό επιχειρήθηκε με την ταυτόχρονη αδρανοποίηση πολλαπλών παραγόντων του ενδογενούς και του εξωγενούς μονοπατιού της πήξης με προσθήκη ανθρώπινης ανασυνδυασμένης αντιθρομβίνης-III στο ECC medium προδιεγερμένων με τρεις κυτταροκίνες HT-29. Όμως ο πειραματικός αυτός χειρισμός δεν είχε επίδραση στην

επαγωγή δραστηκότητας MMP-9 στους SEMFs. Συγκεκριμένα χωρίς αντιθρομβίνη-III με τέτοιο ECC medium λάβαμε μπάντα MMP-9 144 % πλέον του φόντου, ενώ με αντιθρομβίνη-III 148 %. Οι τιμές για τις υπόλοιπες επιδράσεις ήταν πολύ κοντά στην ένταση του φόντου. (Εικόνα 17)



**Εικόνα 17.** Η επαγωγή MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) από υπερκείμενα κυτταροσειράς επιθηλιακών (HT-29) προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν είναι εξαρτώμενη από την αντιθρομβίνη-III. Η κυτταροσειρά κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 προδιεγέρθηκε επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκε ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των HT-29 για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το HT-29 conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Και στα τρία αυτά μέσα διέγερσης προστέθηκε (+) ή όχι (-) πριν τεθούν υπέρ των SEMFs αντιθρομβίνη-III (anti-T-III) που αδρανοποιούσε πολλαπλούς παράγοντες του μηχανισμού πήξης. Η δραστηκότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου. Η επαγόμενη δραστηκότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες HT-29 δεν επηρεάστηκε από την αντιθρομβίνη-III.

#### 4.3.4.3.4 Υποδοχείς ενδοθηλινών

Τέλος, διερευνήθηκε η συμμετοχή της οδού των ενδοθηλινών στο φαινόμενο της επαγωγής MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες από υπερκείμενο επιθηλιακών αν αυτά είχαν προδιεγερθεί με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ . Καθώς υπάρχουν τρεις ισότυποι ενδοθηλινών που όλοι εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και τις αντίστοιχες κυτταροσειρές και όλοι προσδέονται (με διαφορετικές συγγένειες βέβαια) και με τους δύο υπότυπους υποδοχέων ενδοθηλινών (ETR-A και ETR-B) (Ali et al., 2000; Bell and Chaplin, 1998; Eberl et al., 2000; Ignatenko et al., 2004; Peduto Eberl et al., 2003), προτιμήθηκε η χρήση επιλεκτικών συνθετικών χημικών ανταγωνιστών των υποδοχέων. Ο Azepane-1-carbonyl-Leu-D-Trp(For)-D-Trp-OH (BQ-610) επιλεκτικά αναστέλλει τον ETR-A και ο N-cis-2,6-Dimethylpiperidinocarbonyl- $\beta$ -tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)-D-Nle-OH (BQ-788) τον ETR-B.

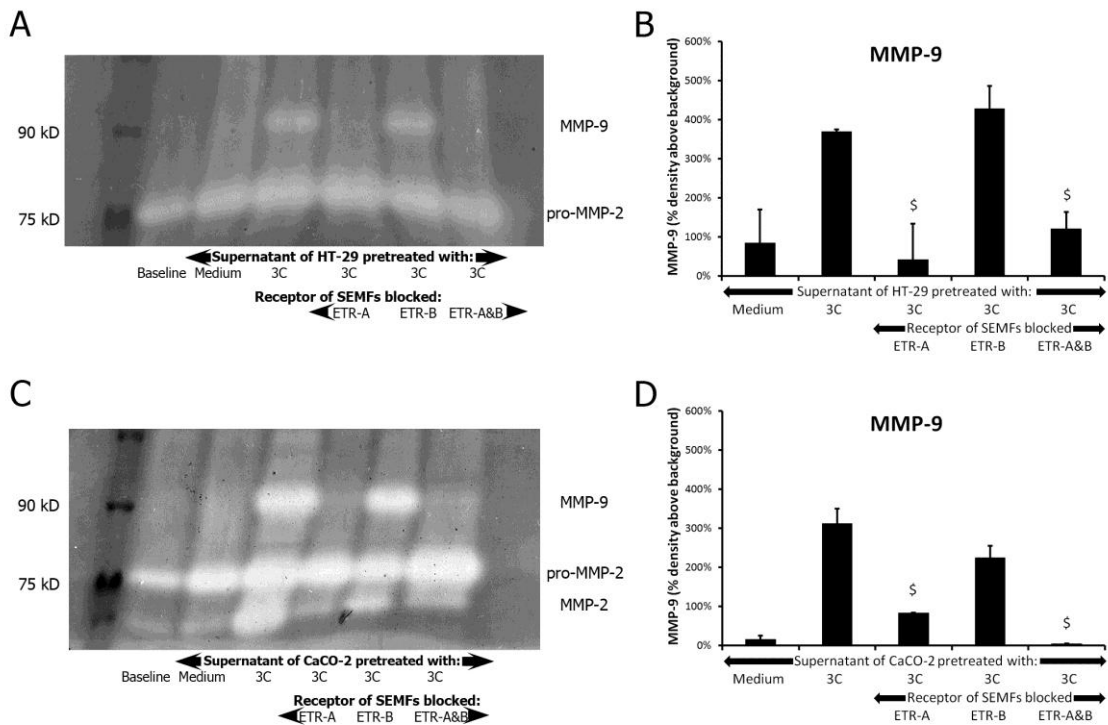
Οι αναστολείς αυτοί (έκαστος ή και οι δύο σε συνδυασμό) προστέθηκαν ή όχι σε ECC medium από αδιέγερτα ή προδιεγερμένα για 6h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες HT-29 ή σε απλό θρεπτικό υλικό και εξετάστηκαν τα αποτελέσματα στη δραστηριότητα της MMP-9 που δύνανται να παράγουν οι SEMFs. Σε συνάφεια με τα προηγούμενα αποτελέσματα αντίστοιχα προς τη θέση της μπάντας λύσης της gelatin περίπου στα 90 kD δεν παρατηρήθηκαν εντάσεις φωτός στατιστικά σημαντικά διαφορετικές από το φόντο στις επιδράσεις με απλό θρεπτικό χωρίς ή με BQ-610 ή BQ-788. Η επίδραση με υπερκείμενο από αδιέγερτα επιθηλιακά και πάλι δεν παρήγαγε τέτοια μπάντα ( $84 \pm 85$  %) σε συνάφεια προς τα προηγούμενα. **Η επίδραση ECC medium από προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες HT-29 παρήγαγε μπάντα λύσης της gelatin λόγω της MMP-9 με ένταση  $369 \pm 6$  % πλέον του φόντου ( $p < 0,05$ ) όπως και στα προηγούμενα πειράματα.** Το

ενδιαφέρον ήταν ότι η προσθήκη του χημικού επιλεκτικού αναστολέα του ETR-A (BQ-610) ανέστειλε πλήρως το φαινόμενο αυτό. Δεν υπήρχε ορατή μπάντα MMP-9 και η μετρούμενη ένταση ήταν στο  $42 \pm 92$  % πλέον του φόντου ( $p < 0,05$  σε σχέση με ECC medium από HT-29 με προδιέγερση με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ ). Αντίθετα η δραστητικότητα MMP-9 δεν τροποποιούνταν από τον αναστολέα του ETR-B (BQ-788):  $428 \pm 58$  %. Η συνύπαρξη και του δεύτερου αναστολέα δεν τροποποιούσε σημαντικά το αποτέλεσμα του πρώτου ( $221 \pm 42$ %,  $p < 0,05$ ). (Εικόνα 18A και Εικόνα 18B)

Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια στην επανάληψη των ιδίων πειραμάτων με υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs. Συγκεκριμένα επαγωγή MMP-9 στο  $349 \pm 37$  % πλέον του φόντου παρατηρήθηκε με υπερκείμενο από CaCO-2 προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες, ενώ το αποτέλεσμα αναιρούσε η αναστολή του ETR-A με την προσθήκη του BQ-610 σε αυτό το ECC medium ( $83 \pm 32$  %,  $p < 0,05$  σε σχέση με ECC medium από CaCO-2 με προδιέγερση με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ ). Και πάλι η προσθήκη μόνου του αναστολέα του ETR-B (BQ-788) δεν είχε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $254 \pm 29$  %), ενώ η προσθήκη του ίδιου αναστολέα σε αυτόν του ETR-A δεν τροποποιούσε τη δράση του ( $4 \pm 32$  %,  $p < 0,05$  σε σχέση με ECC medium από CaCO-2 με προδιέγερση με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ ). (Εικόνα 18C και Εικόνα 18D)



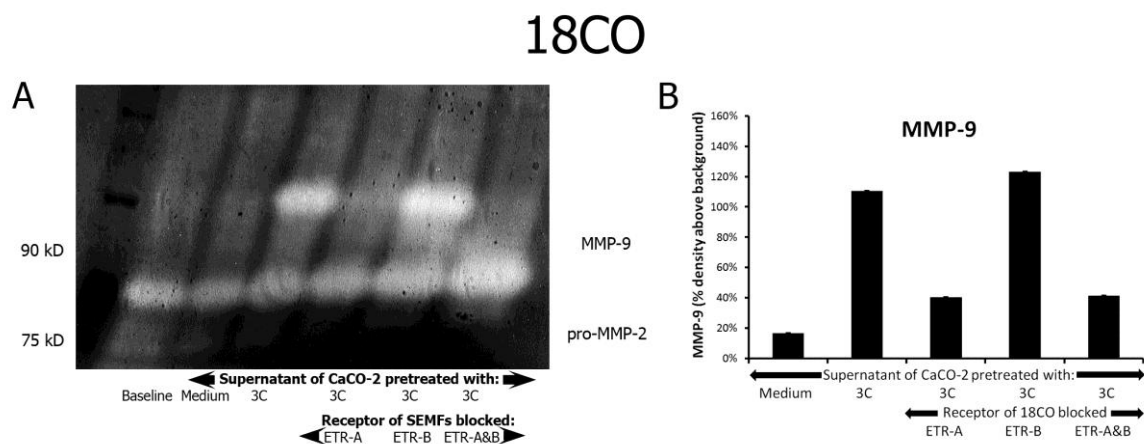
## SEMFs



**Εικόνα 18.** Η επαγωγή MMP-9 σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) από υπερκείμενα κυτταροσειρών επιθηλιακών προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξαρτάται από τον υποδοχέα ενδοθηλινών A (ETR-A) στους SEMFs. Οι κυτταροσειρές κολονικών επιθηλιακών κυττάρων HT-29 (A, B) και CaCO-2 (C, D) προδιεγέρθηκαν επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ή δεν διεγέρθηκαν ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των επιθηλιακών για επιπλέον 18 h, παράγοντας HT-29 (A- B) ή CaCO-2 (C- D) conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Στο CaCO-2 conditioned medium προδιεγερμένων με κυτταροκίνες CaCO-2 προστέθηκε ή όχι, πριν τεθεί υπέρ των SEMFs, ειδικός αναστολέας του ETR-A (BQ-610) ή του ETR-B (BQ-788) ή και οι δύο. Η δραστηριότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin) (A: υπερκείμενο HT-29, C: υπερκείμενο CaCO-2). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (B: υπερκείμενο HT-29, D: υπερκείμενο CaCO-2). Η επαγόμενη δραστηριότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών αναστάλη από τον αναστολέα του υποδοχέα ενδοθηλινών A (\$  $p < 0,05$ ).

Ανάλογο φαινόμενο αναπαράχθηκε και στην κυτταροσειρά μυοϊνοβλαστών παχέος εντέρου 18CO. Η επαγωγή MMP-9 υπό την επίδραση ECC medium από CaCO-2

προδιεγερμένα με τις τρεις κυτταροκίνες προκάλεσε την εμφάνιση μπάντας MMP-9 στη ζυμογραφία (MB≈ 90kD) έντασης 110 %, πλέον του φόντου, ενώ η συνεπίδραση αναστολέα ETR-A (BQ-610) σχεδόν ανείρεσε το φαινόμενο (44%). Αντίθετα, η επίδραση αναστολέα ETR-B (BQ-788) δεν είχε επίδραση (123%) στην επαγωγή και η συνύπαρξή του με τον αναστολέα ETR-A δεν τροποποιούσε τη δράση του δευτέρου (42%). (Εικόνα 19A και Εικόνα 19B)



**Εικόνα 19.** Η επαγωγή MMP-9 στην κυτταροσειρά κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών 18CO από υπερκείμενα της κυτταροσειράς κολονικών επιθηλιακών κυττάρων CaCO-2 προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες εξαρτάται από τον υποδοχέα ενδοθηλινών A (ETR-A) στα 18CO. Τα CaCO-2 προδιεγέρθηκαν επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκαν ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των επιθηλιακών για επιπλέον 18 h, παράγοντας CaCO-2 conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το CaCO-2 conditioned medium ετέθη επί των SEMFs για 24 h. Στο CaCO-2 conditioned medium προδιεγερμένων με κυτταροκίνες CaCO-2 προστέθηκε ή όχι, πριν τεθούν υπέρ των SEMFs, ειδικός αναστολέας του ETR-A (BQ-610) ή του ETR-B (BQ-788) ή και οι δύο. Η δραστηριότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin). Με φωτομέτρηση οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου. Η επαγόμενη δραστηριότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες CaCO-2 ανεστάλη από τον αναστολέα του υποδοχέα ενδοθηλινών A.

#### **4.3.4.4 Η MMP-9 επάγεται από υπερκείμενο προδιεγερμένων επιθηλιακών και σε μυοϊνοβλάστες απομονωμένους από έντερο ασθενών με νόσο του Crohn με μηχανισμό επίσης εξαρτώμενο από τον ETR-A**

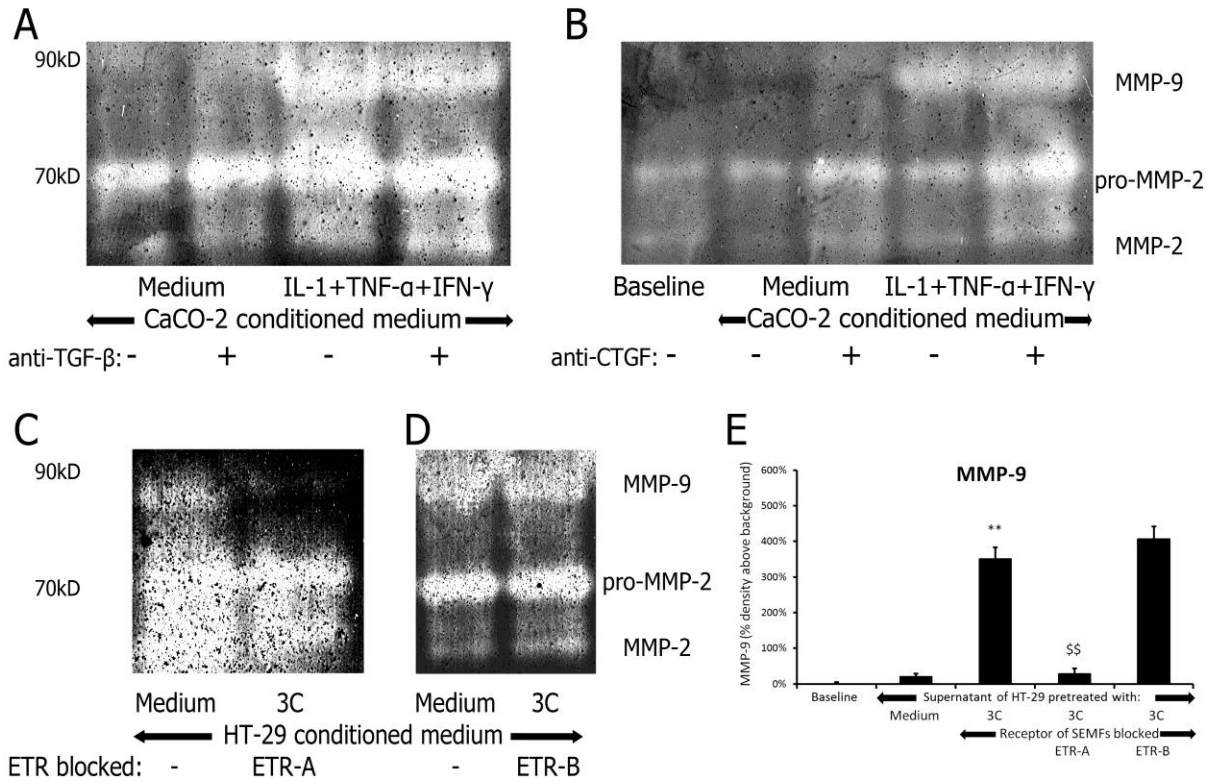
Θελήσαμε στη συνέχεια να διερευνήσουμε το αν SEMFs απομονωμένοι από φλεγμαίνοντα μη-ινωτικά τμήματα παχέος εντέρου από ασθενείς με νόσο του Crohn (CD) εκφράζουν ιδιосуστασιακά MMP-9 σε αντίθεση με αυτούς από ομάδα ελέγχου. Η υπόθεση αυτή δεν επαληθεύτηκε: παρατηρήθηκε απουσία αυθόρμητης δραστηριότητας MMP-9 και στο υπερκείμενο των SEMFs από CD όπως και σε αυτό των SEMFs από ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 20B και Εικόνα 20E**). Επιπλέον, όμοια με τους SEMFs από ομάδα ελέγχου, υπερκείμενο αδιέγερτων επιθηλιακών επίσης δεν προκαλούσε επαγωγή MMP-9 σε αυτούς (CaCO-2: **Εικόνα 20A και Εικόνα 20B**, HT-29: **Εικόνα 20E**). Όμως αν τα επιθηλιακά είχαν προδιεγερθεί με IL-1α+TNF-α+IFN-γ (3C), παρόμοια με όσα παρατηρήθηκαν σε SEMFs από ομάδα ελέγχου (ενότητα 4.3.4.2), το υπερκείμενό τους προκαλούσε επαγωγή δραστηριότητας MMP-9 στο υπερκείμενο SEMFs από CD (CaCO-2: **Εικόνα 20A και Εικόνα 20B**, HT-29: **Εικόνα 20C-Εικόνα 20E**). Ενδεικτικά για το υπερκείμενο προδιεγερμένων με 3C HT-29 αναφέρεται η τιμή 351±32% (p<0,01 σε σχέση με SEMFs χωρίς επιδράσεις ή υπό την επίδραση υπερκείμενου HT-29 που δεν είχαν προδιεγερθεί, **Εικόνα 20E**).

Όμοια με το φαινόμενο που παρατηρήθηκε στους SEMFs από ομάδα ελέγχου, η επαγωγή αυτή αποδείχθηκε ανεξάρτητη από TGF-β, CTGF, ETR-B και εξαρτώμενη από ETR-A (**Εικόνα 20**). Ενδεικτικά παρουσιάζονται πειράματα διέγερσης SEMFs από φλεγμαίνον έντερο ασθενών με CD με υπερκείμενο της κυτταροσειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου CaCO-2, τα οποία είχαν προδιεγερθεί ή όχι με (3C) και στα οποία προστέθηκε

εξουδετερωτικό αντίσωμα όλων των ισομορφών TGF-β (**Εικόνα 20A**) ή του CTGF (**Εικόνα 20B**) ή αντισώματα ελέγχου χωρίς επίτοπο. Και στις δύο περιπτώσεις το αντίσωμα δεν είχε επίδραση στην επαγωγή MMP-9, όπως συνέβη και σε SEMFs από ομάδα ελέγχου (ενότητες 4.3.6.2.1 και 4.3.6.2.2 αντίστοιχα). Όταν όμως σε υπερκείμενο προδιεγερμένων με 3C HT-29 προστέθηκε αναστολέας του ETR-A η επαγωγή MMP-9 ανεστάλη ( $p < 0,01$ , **Εικόνα 20C** και **Εικόνα 20E**), χωρίς να ισχύει το ίδιο για αναστολέα του ETR-B (**Εικόνα 20D** και **Εικόνα 20E**).

**Εικόνα 20.** Επιθηλιακές κυτταροσειρές παχέος εντέρου προδιεγερμένες με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγουν MMP-9 και σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες από ασθενείς με νόσο του Crohn (CD SEMFs) με μηχανισμό εξαρτώμενο από τον υποδοχέα ενδοθηλινών A (ETR-A). Οι επιθηλιακές κυτταροσειρές CaCO-2 (A, B) ή HT-29 (C-E) προδιεγέρθηκαν επί 6 h με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκαν ως δείγμα ελέγχου (Medium). Ακολούθως το θρεπτικό μέσο της προδιέγερσης αντικαταστάθηκε με καθαρό θρεπτικό που έμεινε επί των επιθηλιακών για επιπλέον 18 h, παράγοντας CaCO-2 (A, B) ή HT-29 (C-E) conditioned medium. Στη συνέχεια θρεπτικό υλικό (Baseline) ή το conditioned medium ετέθη επί SEMFs από φλεγμαίνοντα μη ινωτικά τμήματα CD για 24 h. Στο conditioned medium από CaCO-2 προστέθηκε ή όχι πριν τεθεί υπέρ των SEMFs εξουδετερωτικό αντίσωμα του TGF-β (anti-TGF-β, A) ή του CTGF (anti-CTGF, B). Στο conditioned medium προδιεγερμένων με κυτταροκίνες HT-29 προστέθηκε ή όχι πριν τεθεί υπέρ των SEMFs ο ειδικός αναστολέας BQ-610 του υποδοχέα ενδοθηλινών A (ETR-A, C, E) ή ο BQ-788 του ETR-B (D, E). Η δραστηριότητα MMP-9 εκτιμήθηκε με ζυμογραφία σε υπόστρωμα μετουσιωμένο κολλαγόνο (gelatin, A-D). Με φωτομέτρηση οι μπάντες MMP-9 ποσοτικοποιήθηκαν ως % υπέρ της φωτεινότητας του φόντου (E). Η επαγόμενη δραστηριότητα MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών ανεστάλη με αναστολή του ETR-A (C, E), αλλά όχι των TGF-β (A), CTGF (B) και ETR-B (D, E).

## CD SEMFs



### 4.3.5 Άμεση Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών & TGF- $\beta$ 1 στην Παραγωγή Κολλαγόνου από Μυοϊνοβλάστες

Η σύνθεση του συνόλου των διαλυτών μορφών κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες μετρήθηκε με χρωματομετρική μέθοδο μέτρησης του ενδοκυττάριου κολλαγόνου σε προϊόντα λύσης κυττάρων (cell lysates) από ένα βοθρίο πλάκας 12 βοθρίων. Εν συντομία, η μέθοδος βασιζόταν στη δέσμευση της ερυθρής χρωστικής Sirius Red στα τριπεπτίδια Γλυκίνης-X-Y του κολλαγόνου με στοιχειομετρικό τρόπο. Ακολουθούσε καθίζηση με φυγοκέντρηση του συμπλέγματος κολλαγόνου- Sirius Red και επαναδιάλυση της πελέττας σε αλκαλικό διάλυμα, το οποίο κατά συνέπεια ελάμβανε ερυθρό χρώμα έντασης ανάλογης του αρχικής ποσότητας κολλαγόνου. Η απορρόφηση φωτός αναγόταν σε συγκέντρωση

κολλαγόνου με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς από διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης βόειου κολλαγόνου I.

#### ***4.3.5.1 Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν τροποποιούν την παραγωγή κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες.***

##### **4.3.5.1.1 SEMFs**

Η ποσότητα κολλαγόνου που ανιχνεύθηκε στα cell lysates confluent καλλιέργειας πρωτογενών SEMFs παχέος εντέρου που κάλυπταν επιφάνεια 3.5 cm<sup>2</sup> (βοθρίο πλάκας 12 βοθρίων) ήταν 9,3±0,8 μg. Επίδραση των κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ μόνων ή σε κάθε δυνατό συνδυασμό δεν τροποποιεί στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αυτή. Αναλυτικότερα σε cell lysates SEMFs μετά από 24h επίδρασης με IL-1α ανιχνεύθηκε 10,1±1,9 μg (109±19 %) ολικού διαλυτού κολλαγόνου, με TNF-α 8,6±1,9 μg (93±22 %) και με IFN-γ 12±2,6 μg (129±22 %). Ακόμη και επίδραση με συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών έδωσε ενδοκυττάριο κολλαγόνο 10,4±1,7 μg (112±16 %). Οι διαφορές μεταξύ τους ήταν στατιστικά ασήμαντες. **(Εικόνα 21A)**

##### **4.3.5.1.2 18CO**

Η παραγωγή κολλαγόνου από την κυτταροσειρά εντερικών μυοϊνοβλαστών 18CO ήταν αισθητά υψηλότερη, παρατήρηση που αναμενόταν καθώς πρόκειται για κύτταρα με μεγαλύτερο κυτταρόπλασμα: υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας η παραγωγή ήταν 18,8±3,5 μg. Επίδραση των κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ μόνων ή σε κάθε δυνατό συνδυασμό ούτε σε αυτά τα κύτταρα τροποποιεί στατιστικά σημαντικά την παραγωγή αυτή. Αναλυτικότερα με IL-1α ανιχνεύθηκε 17,6±7,1 μg (93±41 %) ολικού διαλυτού κολλαγόνου, με TNF-α 16,2±3,9 μg (86±24 %) και με IFN-γ 13,2±2,4 μg (70±18 %). Επίδραση

με συνδυασμό και των τριών κυτταροκινών έδωσε ενδοκυττάριο κολλαγόνο  $19,7\pm 3,1$   $\mu\text{g}$  ( $105\pm 16$  %). **(Εικόνα 21B)**

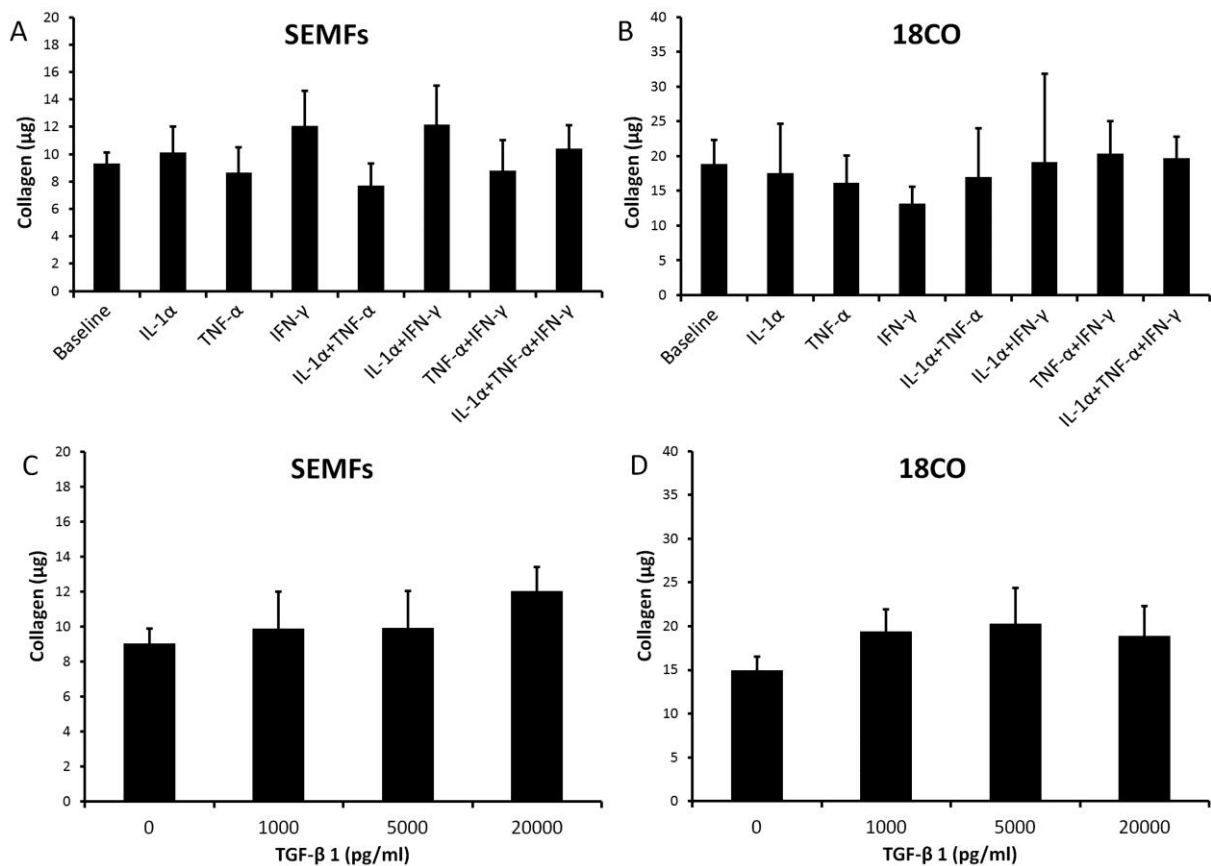
#### ***4.3.5.2 Ο TGF- $\beta$ 1 δεν τροποποιεί την παραγωγή κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες.***

##### **4.3.5.2.1 SEMFs**

Η ενδοκυττάρια παραγωγή κολλαγόνου στους SEMFs δεν αυξήθηκε ούτε με την επίδραση εξωγενούς TGF- $\beta$ 1 επί 24h. Ελέγχθηκε αν υπάρχει δόσοεξαρτώμενη απόκριση σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών συγκεντρώσεων (500- 20.000  $\text{pg/ml}$ ) χωρίς να προκύψουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές  $110\pm 21$  % στα 1.000  $\text{pg/ml}$  και  $133\pm 11$  % στα 20.000  $\text{pg/ml}$ . **(Εικόνα 21C)**

##### **4.3.5.2.2 18CO**

Ανάλογα και αρνητικά ήταν τα αποτελέσματα στα 18CO: η ενδοκυττάρια παραγωγή κολλαγόνου δεν αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά υπό την επίδραση εξωγενούς TGF- $\beta$ 1 επί 24h. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές  $129\pm 13$  % στα 1.000  $\text{pg/ml}$  και  $126\pm 18$  % στα 20.000  $\text{pg/ml}$ , που αντιστοιχούν και στην περίπτωση αυτή σε ήπιες στατιστικά ασήμαντες επιδράσεις. **(Εικόνα 21D)**



**Εικόνα 21.** Η σύνθεση κολλαγόνου από κολονικούς μυοϊνοβλάστες δεν επηρεάζεται άμεσα από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή τον TGF-β1. Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο πρωτογενών κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών SEMFs (A, C) και της αντίστοιχης κυτταροσειράς 18CO (B, D) μετρήθηκε χρωματομετρικά με τη χρωστική Sirius Red (Sircol kit). Τα κύτταρα εκτέθηκαν ή όχι (A- B: Baseline, C- D: 0) σε επιδράσεις IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή όλων των πιθανών συνδυασμών (A- B) ή σε ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων (1.000, 5.000, 20.000 pg/ml) TGF-β1 (C- D) επί 24 h. Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις.

#### 4.3.6 Επίδραση Υπερκειμένου Επιθηλιακών Κυττάρων στην Παραγωγή Κολλαγόνου από Μυοϊνοβλάστες

Ακολούθως, επιχειρήσαμε να ανιχνεύσουμε αν διαλυτοί παράγοντες από το επιθηλιακό κύτταρο τροποποιούν τη βασική παραγωγή κολλαγόνου στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες. Επιπλέον, θελήσαμε να ανιχνεύσουμε αν ο προτεινόμενος αυτός άξονας επιθηλιακού κυττάρου- υποεπιθηλιακού μυοϊνοβλάστη ανταποκρίνεται ως προς την



παραγωγή κολλαγόνου από τον δεύτερο στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) που επιδρούν στο πρώτο. Μη έχοντας ανιχνεύσει τροποποίηση της βασικής παραγωγής κολλαγόνου στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες υπό την άμεση επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή του TGF-β1, θελήσαμε, δηλαδή, να δούμε αν αυτοί ανταποκρίνονται σε διαλυτό παράγοντα παραγόμενο από το επιθηλιακό υπό ή χωρίς συνθήκες φλεγμονής.

Καθώς επιθυμούσαμε στον μυοϊνοβλάστη να δράσουν μόνο διαλυτοί παράγοντες από το επιθηλιακό χωρίς την παρουσία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση του επιθηλιακού, η πειραματική προσέγγιση ήταν η αρχική διέγερση του επιθηλιακού επί 6h με τις τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και εν συνεχεία η αντικατάστασή του με θρεπτικό μέσο χωρίς αυτές. Το θρεπτικό αυτό μέσο αφέθηκε επί των επιθηλιακών για 18h και ακολούθως το παραγόμενο Epithelial Cell Conditioned medium (ECC medium) μεταφέρθηκε επί καλλιέργειας μυοϊνοβλαστών πληρότητας 100% επί 24h. Το ενδοκυττάριο κολλαγόνο των μυοϊνοβλαστών μετρήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο Sirius Red.

#### ***4.3.6.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από επιθηλιακά κύτταρα επί των οποίων επέδρασαν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες.***

##### **4.3.6.1.1 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs**

Επί καλλιέργειας της κυτταροσειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT-29 ετέθη υπερκείμενο που περιείχε ή όχι τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α και IFN-γ επί 6h. Ακολούθως το υπερκείμενο με τις κυτταροκίνες αφαιρέθηκε και τυχόν υπολείμματά του εκπλύθηκαν με δύο προσεκτικές πλύσεις με θρεπτικό μέσο χωρίς τις

κυτταροκίνες. Επί των HT-29 ετέθη θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες και αφέθηκε επί 18h. Εν συνεχεία τα δύο αυτά ECC media ή θρεπτικό υλικό ως control ετέθησαν επί καλλιεργειών SEMFs πληρότητας 100 % για 24h. Στα cell lysates των SEMFs μετρήθηκε το ολικό διαλυτό κολλαγόνο.

Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο των SEMFs αυξήθηκε ήπια στο  $138 \pm 6$  % ( $p < 10^{-7}$ ) υπό την επίδραση υπερκείμενου αδιέγερτων HT-29, ενώ **υπό την επίδραση HT-29 προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επί 6h το ενδοκυττάριο κολλαγόνο των SEMFs διπλασιάστηκε** ( $201 \pm 11$  %,  $p < 10^{-12}$ ). Πλην της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με τη βασική παραγωγή κολλαγόνου των SEMFs που σημειώνεται παραπάνω, η διαφορά μεταξύ της δράσης υπερκείμενου αδιέγερτων και προδιεγερμένων επιθηλιακών είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 10^{-4}$ ), θεμελιώνοντας την έμμεση δράση των κυτταροκινών της φλεγμονής μέσω των επιθηλιακών κυττάρων στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες. **(Εικόνα 22A)**

#### 4.3.6.1.2 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs

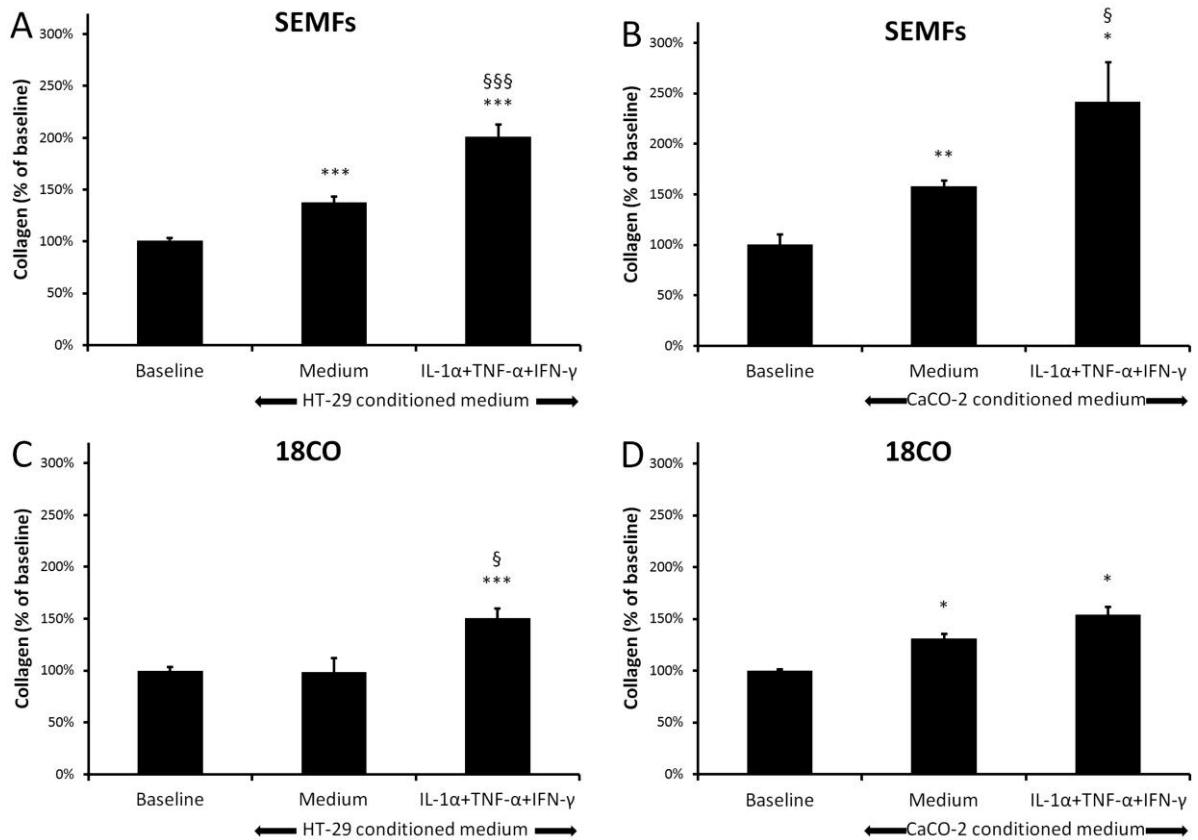
Με τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό επιβεβαιώσαμε ότι παρόμοια ήταν η επίδραση υπερκείμενων της κυτταροσειράς επιθηλιακών παχέος εντέρου CaCO-2 επί της παραγωγής κολλαγόνου από τους SEMFs. Συγκεκριμένα, υπερκείμενο αδιέγερτων επί 18h CaCO-2 αύξησε την παραγωγή κολλαγόνου στους SEMFs στο  $158 \pm 6$  % ( $p < 0,01$ ), ενώ **υπερκείμενο προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επί 6h CaCO-2 την υπερδιπλασίασε και σε αυτήν την περίπτωση** ( $242 \pm 39$  %,  $p < 0,05$ ). Και στην περίπτωση αυτή η περαιτέρω αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου λόγω της προδιέγερσης ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ). **(Εικόνα 22B)**

#### 4.3.6.1.3 Υπερκείμενο HT-29 επί των 18CO

Παρόμοια συμπεριφορά, αλλά με ηπιότερες επαγωγές, είχε η κυτταροσειρά εντερικών μυοϊνοβλαστών **18CO** ως προς την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από υπερκείμενα επιθηλιακών. Τα 18CO δεν αύξησαν την παραγωγή κολλαγόνου υπό την επίδραση υπερκείμενου αδιέγερτων **HT-29** ( $99\pm 13\%$ ), αλλά την αύξησαν στο  **$151\pm 9\%$**  ( $p < 0,001$ ) υπό την επίδραση προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επί 6h HT-29. Όπως αναμενόταν, η τιμή αυτή ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική και από την επίδραση υπερκείμενου αδιέγερτων HT-29 ( $p < 0,02$ ). (Εικόνα 22C)

#### 4.3.6.1.4 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των 18CO

Ηπιότερη, αλλά ανάλογη, ήταν και η δράση του υπερκείμενου **CaCO-2** επί της παραγωγής κολλαγόνου από τα **18CO**: υπερκείμενο αδιέγερτων CaCO-2 την αύξησε στο  $131\pm 5\%$  ( $p < 0,05$ ) και προδιεγερμένων με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  επί 6h στο  **$154\pm 7\%$**  ( $p < 0,05$ ). (Εικόνα 22D)



**Εικόνα 22.** Η σύνθεση κολλαγόνου από κολονικούς μυοϊνοβλάστες αυξάνεται από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs, A- B) και την αντίστοιχη κυτταροσειρά 18CO (C- D) μετρήθηκε χρωματομετρικά με τη χρωστική Sirius Red (Sircol kit). Οι κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές HT-29 (A, C) ή CaCO-2 (B, D) προδιεγέρθηκαν (IL-1α+TNF-α+IFN-γ) ή όχι (Medium) με συνδυασμό και των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιέργειών SEMFs (A- B) ή 18CO (C- D) επί 24 h. Η παραγωγή κολλαγόνου διπλασιάστηκε σε SEMFs υπό την επίδραση conditioned medium προδιεγερμένων με τις κυτταροκίνες επιθηλιακών (A- B). Παρόμοιες αλλά λιγότερο έντονες απαντήσεις λάβαμε και από τα 18CO (C- D). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  και \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με το Baseline. §  $p < 0,05$  και §§§  $p < 0,001$  σε σχέση με το Medium.

#### *4.3.6.2 Η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση υπερκειμένων από προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακά κύτταρα δεν εξαρτάται από TGF-β, CTGF, παράγοντες πήξης, TF και ενδοθηλίνες.*

Θελήσαμε να αναζητήσουμε παράγοντα/ες που ήταν υπεύθυνοι για την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες από υπερκείμενο επιθηλιακών διεγερμένων με κυτταροκίνες. Τέτοιοι υποτέθηκε ότι είτε περιέχονταν στο υπερκείμενο αυτό είτε επάγονταν από το υπερκείμενο αυτό στους μυοϊνοβλάστες και στη συνέχεια δρούσαν αυτοκρινώς. Επελέγη ο συνδυασμός επίδρασης υπερκειμένων των δύο κυτταροσειρών επιθηλιακών παχέος εντέρου επί πρωτογενών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών παχέος εντέρου (SEMFs) για τους περισσότερους παράγοντες που ελέγχθηκαν, δεδομένης της σαφούς απάντησης των SEMFs στο υπερκείμενο διεγερμένων επιθηλιακών (**Εικόνα 22**). Πειραματικά επιθηλιακά διεγέρθηκαν ή όχι με IL-1α, TNF-α και IFN-γ επί 6h και ακολούθως το υπερκείμενο αντικαταστάθηκε με θρεπτικό μέσο χωρίς κυτταροκίνες που παρέμεινε επί των κυττάρων επί 18h. Αυτό το υπερκείμενο (ECC medium) (ή θρεπτικό υλικό ως δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιήθηκε επί καλλιεργειών SEMFs. Στο υπερκείμενο επιθηλιακών ή στο θρεπτικό υλικό προστέθηκαν ή όχι αντισώματα ή άλλες πρωτεΐνες ή χημικές ουσίες που αδρανοποιούσαν λειτουργικά τις ισομορφές TGF-β, τον CTGF, ολόκληρο το μηχανισμό πήξης, μόνο τον TF ή τις ενδοθηλίνες, με πειραματικούς χειρισμούς όπως αυτοί που περιγράφηκαν αναλυτικότερα στην ενότητα 4.3.4.3.

#### 4.3.6.2.1 TGF

Αν και ο TGF-β1 δεν αύξανε μόνος του την παραγωγή κολλαγόνου από τους SEMFs, θελήσαμε να αποκλείσουμε τη συμμετοχή του ως απαραίτητου συμπαραγόντα στο μηχανισμό αύξησης του κολλαγόνου από υπερκείμενο διεγερμένων επιθηλιακών, δεδομένης και της επαγωγής του από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στα επιθηλιακά. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που προσδένεται και αδρανοποιεί και τις τρεις ισομορφές του (anti-ran-TGF-β) ή αντίσωμα ελέγχου χωρίς επίτοπο. Όμως, η προσθήκη του αντισώματος δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την παραγωγή κολλαγόνου σε καμία από τις επιδράσεις στους SEMFs (θρεπτικό, υπερκείμενο αδιέγερτων ή προδιεγερμένων HT-29), παρά το ότι υπήρχε μία τάση ελάττωσης. Συγκεκριμένα σε αυτά τα πειράματα η παραγωγή κολλαγόνου ανήλθε στο  $143 \pm 9$  % της βασικής με την επίδραση υπερκειμένου αδιέγερτων επιθηλιακών και παρατηρήθηκε μια στατιστικά ασήμαντη πτώση στο  $128 \pm 10$  % όταν προστέθηκε anti-ran-TGF-β. Όταν προδιεγείραμε τα επιθηλιακά με IL-1α, TNF-α και IFN-γ οι αντίστοιχες τιμές ήταν  $216 \pm 17$  % και  $206 \pm 17$  % με την ίδια τάση να καταγράφεται. **(Εικόνα 23A)**

#### 4.3.6.2.2 CTGF

Διαπιστώσαμε ότι ο CTGF, αν και δεν εκφραζόταν στα επιθηλιακά κύτταρα με ή χωρίς επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (ενότητα 4.3.1.1.1.5, Εικόνα 5), επαγόταν έντονα στους SEMFs από το υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις ίδιες κυτταροκίνες επιθηλιακών (ενότητα 4.3.4.3.2, Εικόνα 15). Εφόσον διαπιστώθηκε απόκριση των SEMFs ως προς τον CTGF σε υπερκείμενα από HT-29, θελήσαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα αν αυτός ήταν ο παράγοντας που ενέχεται στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους

μυοϊνοβλάστες. Πιθανολογήθηκε αυτοκρινής μηχανισμός λόγω μη έκφρασής του στα επιθηλιακά κύτταρα χωρίς ή με την παρουσία κυτταροκινών. Επαναλάβαμε λοιπόν πειράματα επώασης SEMFs με θρεπτικό μέσο, υπερκείμενο αδιέγερτων και προδιεγερμένων με IL-1α, TNF-α και IFN-γ επιθηλιακών στα οποία προσθέσαμε αντίσωμα που αδρανοποιούσε τον CTGF ή αντίσωμα ελέγχου χωρίς επίτοπο. Όμως και πάλι δεν προέκυψαν διαφορές στην έκκριση κολλαγόνου με και χωρίς το αντίσωμα. **(Εικόνα 23B)**

#### 4.3.6.2.3 Αντιθρομβίνη-III και TF

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι μυοϊνοβλάστες μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή κολλαγόνου αυτοκρινώς μέσω του μηχανισμού πήξης και συγκεκριμένα του TF, καθοριστικού παράγοντα του ενδογενούς μονοπατιού μηχανισμού της πήξης (Camerer et al., 2000; Kambas et al., 2011; Mitroulis et al., 2011; Pendurthi et al., 2000). Με βάση αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή του μηχανισμού της πήξης στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες ως απάντηση στην επίδραση διαλυτού/ών παραγόντων από το επιθηλιακό κύτταρο.

Όμως δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην παραγωγή κολλαγόνου μεταξύ των SEMFs στους οποίους έδρασε υπερκείμενο από HT-29 είτε αυτούσιο είτε με αντιθρομβίνη-III, πρωτεΐνη που αδρανοποιεί πλήθος παραγόντων της πήξης. Η μη στατιστικά σημαντική αλλαγή της παραγωγής κολλαγόνου ίσχυε για υπερκείμενα από αδιέγερτα ( $156 \pm 7$  % προς  $147 \pm 1$  %) ή προδιεγερμένα ( $237 \pm 17$  % προς  $238 \pm 9$  %) HT-29, αλλά και για απλό θρεπτικό ( $100 \pm 4$  % προς  $90 \pm 15$  %). **(Εικόνα 23C)**

Τα αποτελέσματα ήταν όμοια όταν αδρανοποιήσαμε τον TF, έναν συγκεκριμένο παράγοντα καθοριστικής σημασίας για την έναρξη του ενδογενούς μηχανισμού της πήξης.

Μάλιστα, η παρουσία αντισώματος που αδρανοποιεί τον TF (anti-TF) σε υπερκείμενο HT-29 προδιεγερμένων με IL-1α, TNF-α και IFN-γ έδειξε και μια-στατιστικά ασήμαντη βέβαια-τάση αύξησης του παραγόμενου κολλαγόνου από τους SEMFs (239±28 % χωρίς anti-TF, 288±4 % με anti-TF). Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην παραγωγή κολλαγόνου από SEMFs υπό την επίδραση υπερκειμένου αδιέγερτων HT-29 χωρίς (156±10 %) και με (143±8 %) anti-TF ούτε απλά με την προσθήκη anti-TF στο θρεπτικό (110±16 %). (Εικόνα 23D)

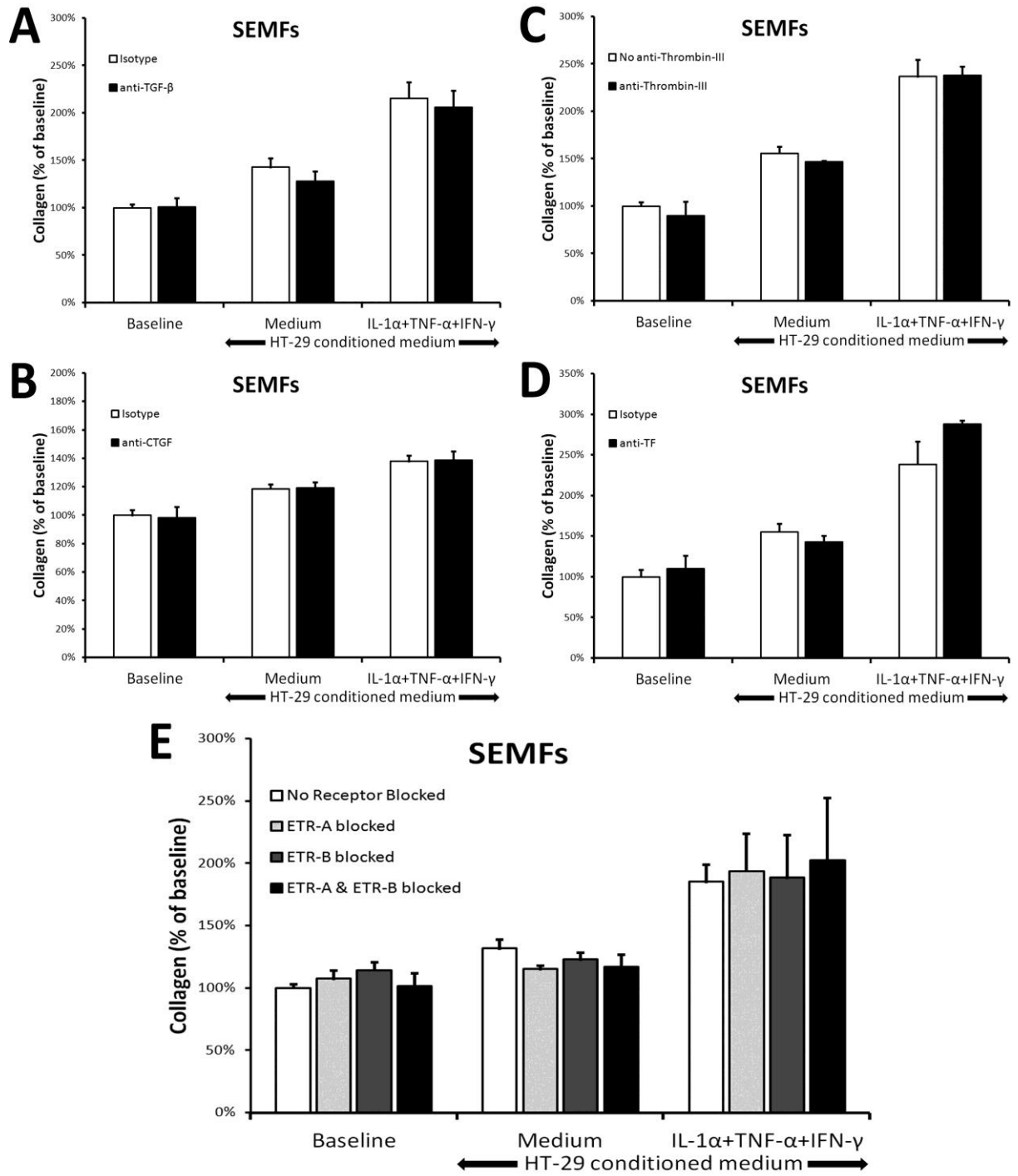
#### 4.3.6.2.4 Υποδοχείς ενδοθηλινών

Ο υποδοχέας Β ενδοθηλινών (ETR-B) ταυτοποιήθηκε ως απαραίτητος παράγοντας στην επαγωγή MMP-9 από το υπερκείμενο επιθηλιακών προδιεγερμένων με IL-1α, TNF-α και IFN-γ, ενώ ο ETR-A δεν είχε ρόλο στο φαινόμενο (ενότητα 4.3.4.3.4, Εικόνα 18 και Εικόνα 19). Θελήσαμε λοιπόν να ελέγξουμε αν οι δύο αυτοί υποδοχείς είχαν ρόλο σε φαινόμενα που οδηγούν την ισορροπία στο εντερικό τοίχωμα προς την αντίθετη πλευρά- την ίνωση. Και στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήσαμε τον συνθετικό επιλεκτικό χημικό ανταγωνιστή Azepane-1-carboxyl-Leu-D-Trp(For)-D-Trp-OH (BQ-610) του ETR-A και τον συνθετικό επιλεκτικό χημικό ανταγωνιστή N-cis-2,6-Dimethylpiperidinocarbonyl-β-tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)-D-Nle-OH (BQ-788) του ETR-B. Η επαγωγή κολλαγόνου σε SEMFS από το υπερκείμενο HT-29 προεπωασμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όμως, δεν βρέθηκε να επηρεάζεται αν οι αναστολείς αυτοί προστίθενταν στα υπερκείμενα των HT-29 (χωρίς αναστολείς: 185±14 %, BQ-610: 194±30 %, BQ-788: 189±34 %, BQ-610 και BQ-788: 203±49 %). Επίσης δεν επηρεάστηκε από τους ανταγωνιστές αυτούς η παραγωγή κολλαγόνου από τους SEMFs στις περιπτώσεις χρήσης υπερκειμένου αδιέγερτων HT-29 (χωρίς αναστολείς: 132±7 %, BQ-610: 115±3 %, BQ-788: 123±5 %, BQ-610 και BQ-788:



117±10 %) και σε περίπτωση θρεπτικού μέσου (χωρίς αναστολείς: 100±3%, BQ-610: 107±7%, BQ-788: 114±6%, BQ-610 και BQ-788: 102±10%). (Εικόνα 23E)

**Εικόνα 23.** Η αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου στους κολονικούς μυοϊνοβλάστες από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν διαμεσολαβείται από τους TGF-β, CTGF, ενδοθηλίνες ή το μηχανισμό πήξης. Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες SEMFs μετρήθηκε χρωματομετρικά με τη χρωστική Sirius Red (Sicol kit). Η κολονική επιθηλιακή κυτταροσειρά HT-29 προδιεγέρθηκε (IL-1α+TNF-α+IFN-γ) ή όχι (Medium) με συνδυασμό και των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιιεργειών SEMFs επί 24 h. Η παραγωγή κολλαγόνου (όπως παρουσιάστηκε και στην Εικόνα 22A) διπλασιάστηκε σε SEMFs υπό την επίδραση conditioned medium προδιεγερμένων ή μη με τις κυτταροκίνες HT-29. Τα αποτελέσματα αντισώματος που αδρανοποιούσε όλες τις ισομορφές TGF-β (A), τον CTGF (B), τον ιστικό παράγοντα (tissue factor- TF, D) όπως και το αποτέλεσμα της αντιθρομβίνης-III (C) και εκλεκτικών χημικών αναστολέων του υποδοχέα ενδοθηλινών (ETR) A (BQ-610) και B (BQ-788) (E) ελέγχθηκαν. Δεν διαφάνηκε επίδρασή τους στο φαινόμενο.



### *4.3.6.3 Μυοϊνοβλάστες απομονωμένοι από έντερο ασθενών με νόσο του Crohn παράγουν ιδιοσυστασιακά αυξημένο κολλαγόνο και έχουν ανάλογη απαντητικότητα στο υπερκείμενο επιθηλιακών με αυτούς ομάδας ελέγχου*

#### 4.3.6.3.1 Υψηλότερη ιδιοσυστασιακή παραγωγή κολλαγόνου

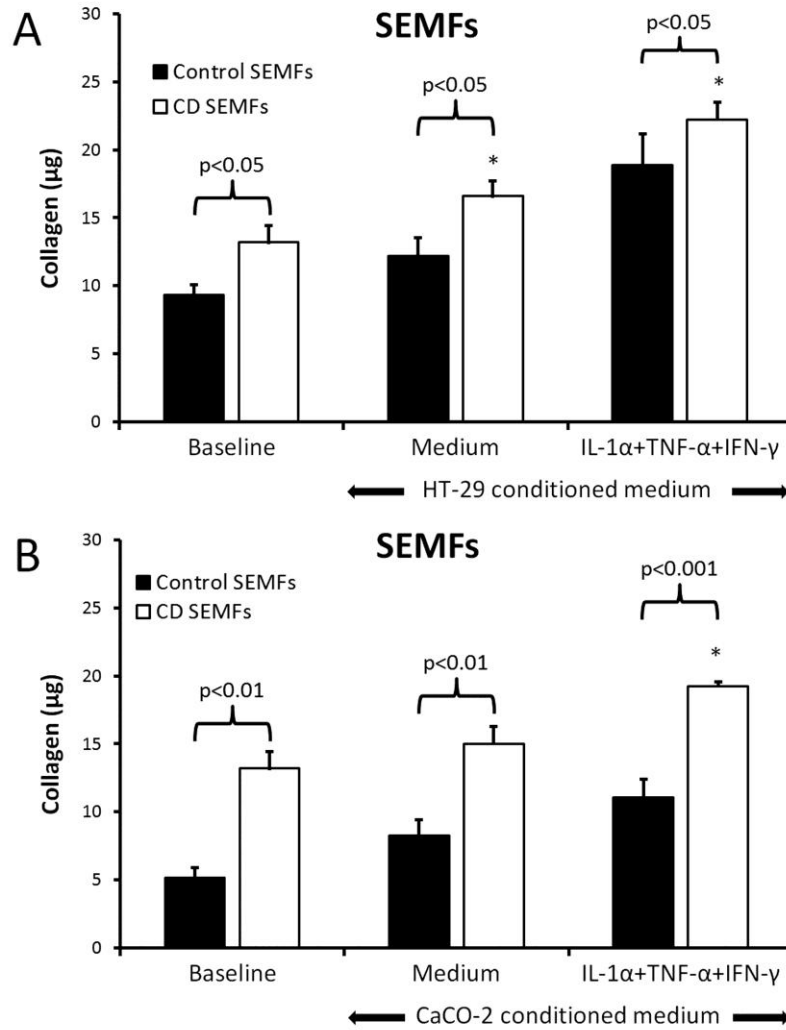
Στο θετικό εύρημα της επαγωγής κολλαγόνου από υπερκείμενο επιθηλιακών θελήσαμε να συγκρίνουμε με τη βιολογική συμπεριφορά ως προς την παραγωγή κολλαγόνου από SEMFs από φλεγμαίνοντα μη-ινωτικά τμήματα εντέρου ασθενών με CD. Έγιναν, όπως και για τους SEMFs από ομάδα ελέγχου, πειράματα με υπερκείμενο HT-29 και CaCO-2 προδιεγερμένων ή όχι με 3C. Αντίθετα με τις παρατηρήσεις ως προς την MMP-9, διαπιστώσαμε ότι υπήρχε ιδιοσυστασιακά- χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα-στατιστικά σημαντική διαφορά στη μετάφραση κολλαγόνου μεταξύ των SEMFs διαφορετικής προέλευσης (**Εικόνα 24**). Συγκεκριμένα, σε πειράματα με υπερκείμενο HT-29, SEMFs από ομάδα έλεγχου παρήγαγαν  $9.3 \pm 0.8$  μg κολλαγόνου ανά βοθρίο πλάκας 12 βοθρίων, ενώ SEMFs από CD παρήγαγαν  $13.2 \pm 1.2$  μg κολλαγόνου ( $p < 0,05$ , **Εικόνα 24A**). Το εύρημα επιβεβαιώθηκε και σε πειράματα με υπερκείμενο CaCO-2, στα οποία SEMFs από ομάδα έλεγχου παρήγαγαν  $5,2 \pm 0,8$  μg κολλαγόνου, ενώ SEMFs από CD παρήγαγαν  $13,2 \pm 1,2$  μg κολλαγόνου ( $p < 0,01$ ) (**Εικόνα 24B**).

#### 4.3.6.3.2 Επίδραση υπερκειμένου επιθηλιακών

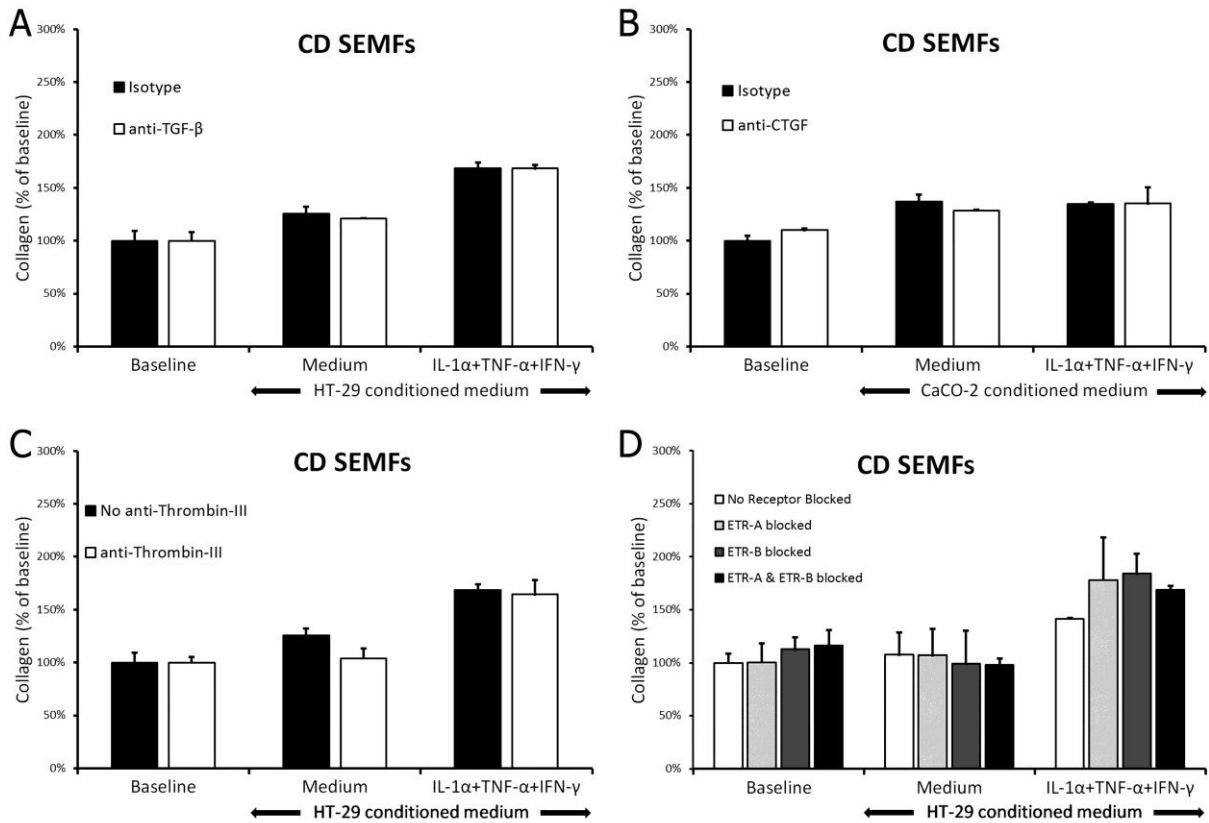
Όπως παρατηρήθηκε και στους SEMFs από ομάδα ελέγχου (ενότητα 4.3.6.1), το υπερκείμενο επιθηλιακών αύξησε πραιτέρω την παραγωγή κολλαγόνου σε SEMFs από CD. Αναλυτικότερα, υπερκείμενο HT-29 την αύξησε στο  $127 \pm 7$  % ( $p < 0,05$ ), ενώ αν τα HT-29 προδιεγείρονταν με 3C στο  $168 \pm 6$ % ( $p < 0,05$ , **Εικόνα 24A**). Υπερκείμενο CaCO-2 την αύξησε

στο  $114 \pm 9$  % ( $p < 0,05$ ), ενώ αν τα CaCO-2 προδιεγείρονταν με 3C στο  $146 \pm 2$ % ( $p < 0,05$ , **Εικόνα 24B**). Οι απόλυτες τιμές κολλαγόνου παρέμεναν με καθεμία από αυτές τις επιδράσεις υψηλότερες των αντίστοιχων SEMFs ομάδας ελέγχου όταν χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο είτε από HT-29 ( $p < 0,05$ , **Εικόνα 24A**) είτε από CaCO-2 ( $p < 0,01$  για επιδράσεις μη- προδιεγερμένων,  $p < 0,001$  για επιδράσεις προδιεγερμένων CaCO-2, **Εικόνα 24B**).

**Εικόνα 24.** Μυοϊνοβλάστες απομονωμένοι από έντερο ασθενών με νόσο του Crohn παράγουν ιδιοσυστασιακά αυξημένο κολλαγόνο και έχουν ανάλογη απαντητικότητα στο υπερκείμενο επιθηλιακών με αυτούς ομάδας ελέγχου. Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) από ομάδα ελέγχου (Control SEMFs, μαύρες ράβδοι) ή από φλεγμαίνοντα μη-ινωτικά τμήματα ασθενών με νόσο του Crohn (CD SEMFs, λευκές ράβδοι) μετρήθηκε χρωματομετρικά με τη χρωστική Sirius Red (Sircol kit). Οι κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές HT-29 (A) ή CaCO-2 (B) προδιεγέρθηκαν (IL-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ ) ή όχι (Medium) με συνδυασμό και των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιεργειών SEMFs από ομάδα ελέγχου (μαύρες ράβδοι) ή από φλεγμαίνοντα μη-ινωτικά CD (λευκές ράβδοι) επί 24 h. Η Baseline παραγωγή κολλαγόνου ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στους CD SEMFs σε σχέση με τους Control SEMFs τόσο στα πειράματα με υπερκείμενο HT-29 (A) όσο και σε αυτά με CaCO-2 (B). Υπό την επίδραση conditioned medium από HT-29 (A) ή CaCO-2 (B) προδιεγερμένα ή όχι με τις κυτταροκίνες παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του ολικού ενδοκυττάριου κολλαγόνου και στους CD SEMFs, με τις τιμές αυτές να παραμένουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες από τις τιμές των Control SEMFs για την ίδια επίδραση.  
\*  $p < 0,05$  σε σχέση με το Baseline.



Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η αύξηση του ενδοκυττάριου κολλαγόνου σε SEMFs από CD που προκαλούσε η επίδραση υπερκειμένου επιθηλιακών εξαρτώνταν από τις ισομορφές TGF-β (**Εικόνα 25A**), τον CTGF (**Εικόνα 25B**), την αντιθρομβίνη-III (**Εικόνα 25C**) ή τους υποδοχείς ενδοθηλινών (ETR-A, ETR-B, **Εικόνα 25D**). Τα αποτελέσματα του ίδιου ελέγχου ήταν αρνητικά για το αντίστοιχο φαινόμενο στους SEMFs από ομάδα ελέγχου, αλλά δεν μπορούσε εκ των προτέρων να αποκλειστεί διαφορετικός μηχανισμός αύξησης του κολλαγόνου σε SEMFs διαφορετικής προέλευσης. Επιβεβαιώσαμε όμως ότι και στους SEMFs από CD ο μηχανισμός αύξησης του κολλαγόνου ήταν ανεξάρτητος από αυτούς (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25.** Η αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου και στους κολονικούς μυοϊνοβλάστες από νόσο του Crohn από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν διαμεσολαβείται από τους TGF-β, CTGF, ενδοθηλίνες ή το μηχανισμό πήξης. Το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο σε πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) που απομονώθηκαν από φλεγμίνοντα μη-ινωτικά τμήματα εντέρου ασθενών με νόσο του Crohn (CD) μετρήθηκε χρωματομετρικά με τη χρωστική Sirius Red (Sircol kit). Η κολονική επιθηλιακή κυτταροσειρά HT-29 προδιεγέρθηκε (IL-1α+TNF-α+IFN-γ) ή όχι (Medium) με συνδυασμό και των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιιεργειών SEMFs επί 24 h. Η παραγωγή κολλαγόνου (όπως παρουσιάστηκε και στην Εικόνα 24) αυξήθηκε σε CD SEMFs υπό την επίδραση conditioned medium προδιεγερμένων ή μη με τις κυτταροκίνες κυτταροσειρών επιθηλιακών (HT-29: A, C, D, CaCO-2: B). Τα αποτελέσματα αντισώματος που αδρανοποιούσε όλες τις ισομορφές TGF-β (A), τον CTGF (B), όπως και το αποτέλεσμα της αντιθρομβίνης-III (C) και εκλεκτικών χημικών αναστολέων του υποδοχέα ενδοθηλινών (ETR) A (BQ-610) και B (BQ-788) (D) ελέγχθηκαν. Δεν διαφάνηκε επίδρασή τους στο φαινόμενο.

### 4.3.7 Επίδραση Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών & TGF-β1 στην Επούλωση Τραύματος από Μυοϊνοβλάστες

Η επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή του εξωγενούς TGF-β1 επί της διαδικασίας επούλωσης τραύματος από τους εντερικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες αξιολογήθηκε *in vitro* με τη δοκιμασία επούλωσης πληγής (scratch test). Σύντομα, σε μυοϊνοβλάστες με πληρότητα 100 % σε βοθρίο πλάκας 6 βοθρίων χαράχθηκε με άκρο ρύγχους (tip) 200 μl ευθεία γραμμή, ώστε να δημιουργηθεί οξέως στενή λωρίδα χωρίς κύτταρα. Ο χειρισμός προσομοιάζε με οξύ τραύμα στο συνεχές στρώμα των μυοϊνοβλαστών και αξιολογήθηκε η ταχύτητα επούλωσής του με μέτρηση της απόστασης μεταξύ των δύο άκρων της πληγής 30min μετά τη δημιουργία της και 48 h μετά. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά επί του δείγματος ελέγχου, δείγμα στο οποίο δεν ετέθη κάποια επίδραση (χρήση θρεπτικού μέσου). Αξιοποιώντας αποτελέσματα πρόδρομων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση FBS 5 αντί 10 %, ώστε να προσεγγιστούν συνθήκες διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών οργανισμού (και όχι αφθονία αυτών) και τα κύτταρα ταυτόχρονα να διατηρούν μία μετρήσιμη ταχύτητα κάλυψης του κενού. Για το scratch test χρησιμοποιήθηκαν μόνο πρωτογενείς υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες (SEMFs), διότι η κυτταροσειρά 18CO ακόμη και με 10 % FBS είχε πολύ αργούς ρυθμούς επούλωσης της πληγής.

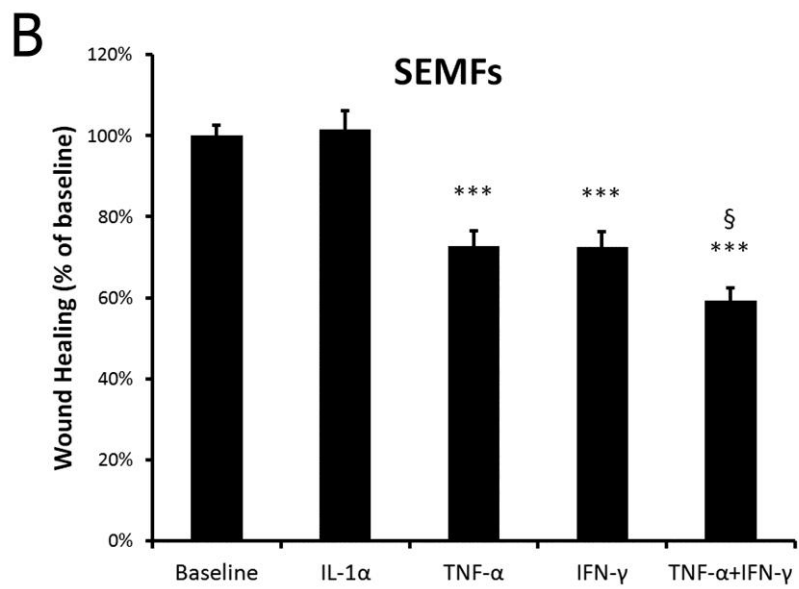
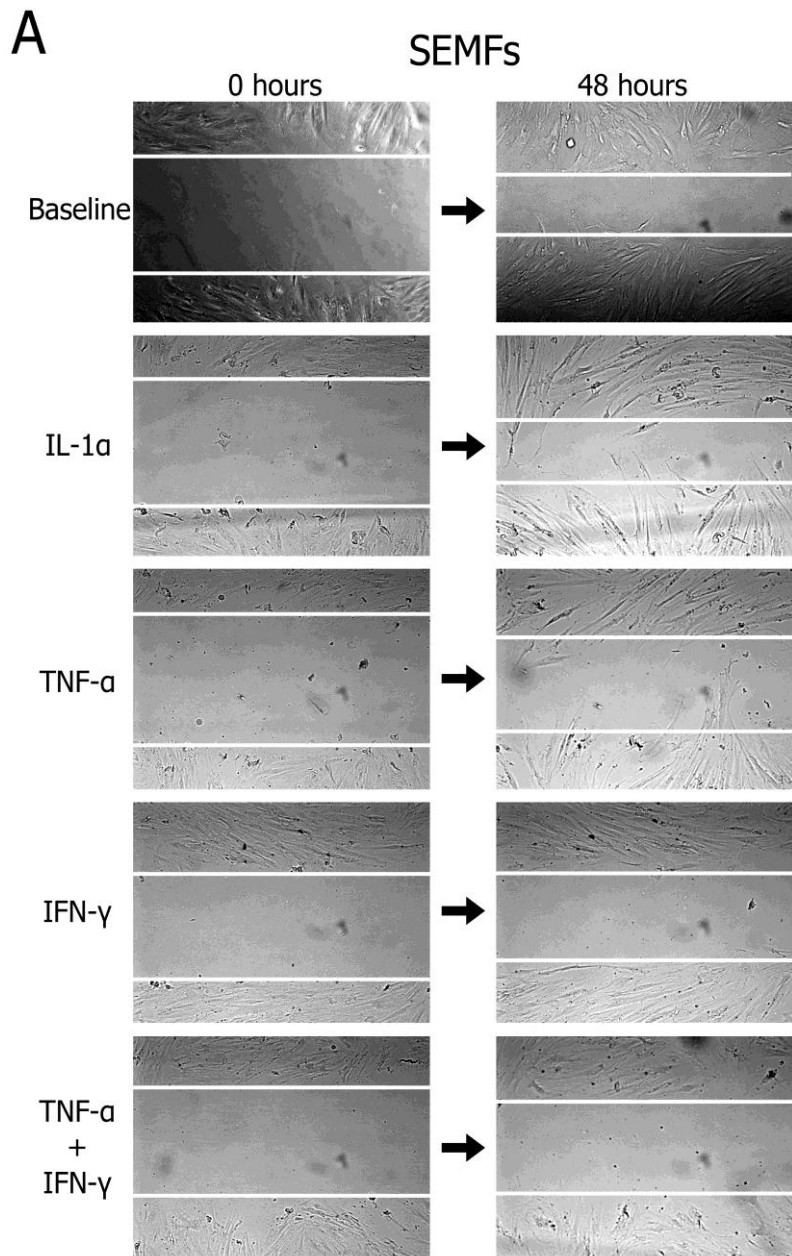
#### 4.3.7.1 Ο TNF-α και η IFN-γ επιβραδύνουν την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.

Μετά από 48 h οι SEMFs του δείγματος ελέγχου (θρεπτικό υλικό μόνον) κάλυψαν το  $46 \pm 1$  % του μηχανικού τραύματος και αυτό ορίστηκε ως  $100 \pm 3$  %. Μελετήθηκε ακολούθως η προσθήκη των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ επί της διαδικασίας

και εκφράστηκε ως ποσοστό επί του δείγματος ελέγχου. Η IL-1α δεν προκάλεσε μεταβολή στο ρυθμό επούλωσης:  $101 \pm 5$  %. Αντίθετα, ο TNF-α μείωσε την ταχύτητα επούλωσης στατιστικά σημαντικά στο  $73 \pm 4$  % ( $p < 10^{-7}$ ) και η IFN-γ στο  $72 \pm 4$  % ( $p < 10^{-6}$ ). Οι δύο κυτταροκίνες σε συνδυασμό την μείωσαν στο  $59 \pm 3$  % ( $p < 10^{-10}$ ). Η περαιτέρω αυτή μείωση ήταν στατιστικά σημαντική και ως προς την επίδραση TNF-α μόνου του ( $p < 0,04$ ) ή την επίδραση της IFN-γ μόνης της ( $p < 0,02$ ) και με αυτόν τον τρόπο τεκμηριώθηκε η αθροιστική δράση TNF-α και IFN-γ. (Εικόνα 26)

**Εικόνα 26.** Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IFN-γ επιβραδύνουν την επούλωση της πληγής από πρωτογενείς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs). Αντιπροσωπευτικές εικόνες δοκιμασίας επούλωσης πληγής (scratch test) στις 0 και στις 48 h μετά από την πρόκληση πληγής με ρύγχος (tip) 200 μl σε καλλιέργεια SEMFs με πληρότητα 100 % φαίνονται στο Α. Όπως ποσοτικοποιείται στο Β, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IFN-γ αθροιστικά επιβραδύνουν την επούλωση της πληγής. \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με θρεπτικό μέσο. §  $p < 0,05$  σε σχέση με TNF-α ή IFN-γ.

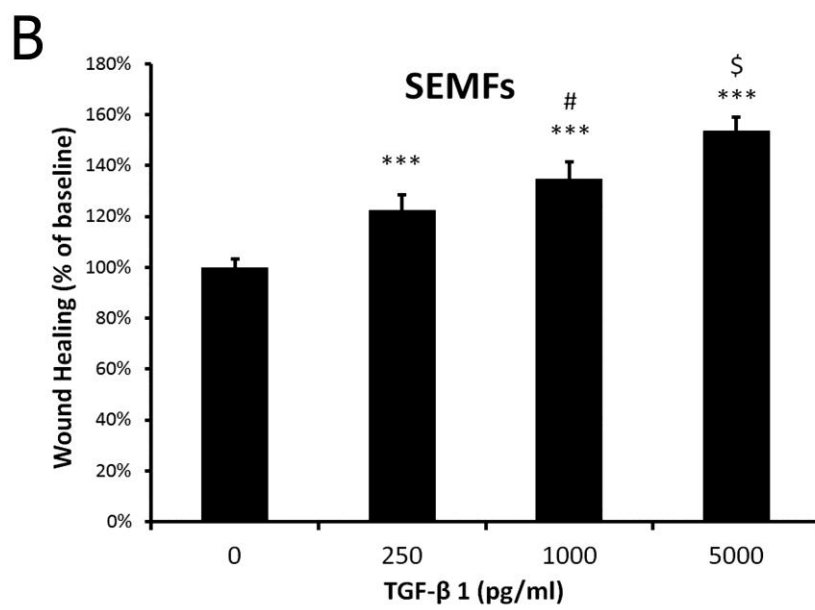
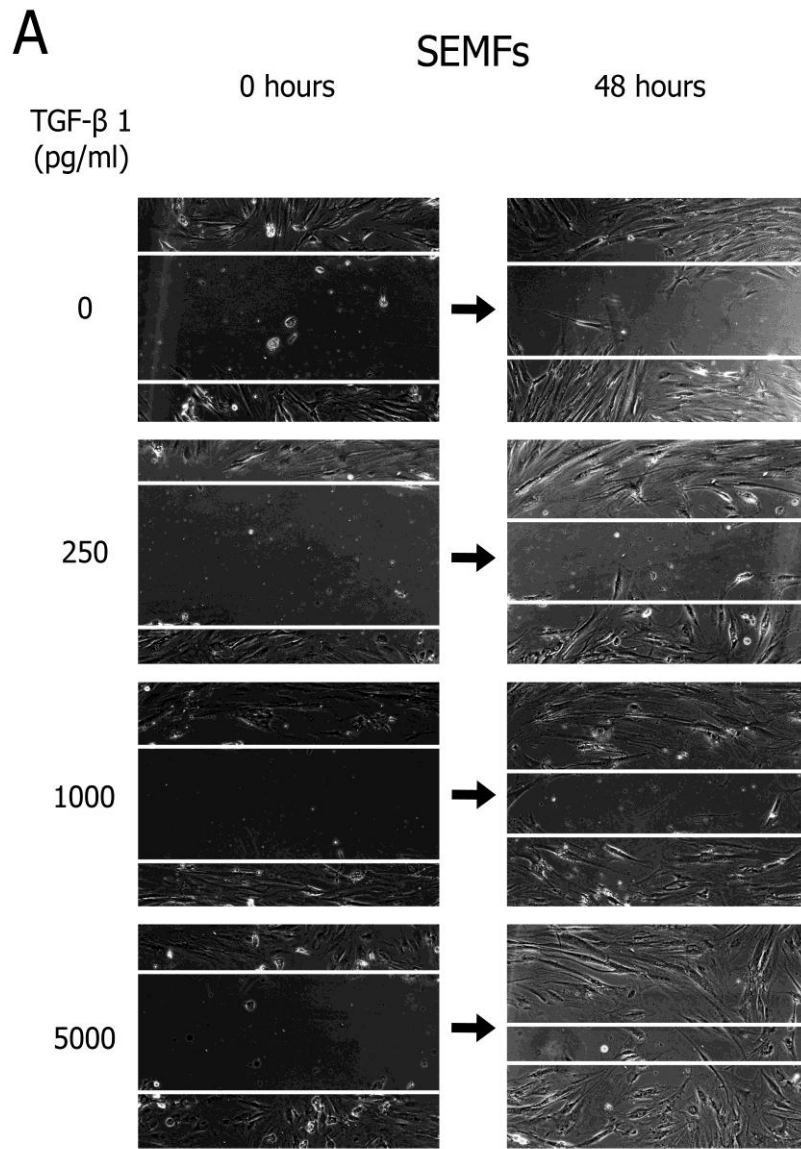




#### 4.3.7.2 Ο TGF-β1 επιταχύνει την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.

Πλέον των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IFN-γ, που μείωσαν την ικανότητα επούλωσης τραύματος από τους SEMFs, εξετάστηκε η δράση του TGF-β1, ως επαγόμενου από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες παράγοντα στο γειτονικό επιθηλιακό κύτταρο. Αντίθετα με τη δράση TNF-α και IFN-γ, ο TGF-β1 προκάλεσε αύξηση του ρυθμού επούλωσης του χάσματος κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός κάλυψης της χαραγής αυξήθηκε στο  $122 \pm 6$  % ( $p < 0,01$ ) υπό την επίδραση 250 pg/ml TGF-β1, στο  $135 \pm 7$  % ( $p < 10^{-4}$ ) υπό 1.000 pg/ml TGF-β1 και στο  $154 \pm 5$  % ( $p < 10^{-14}$ ) υπό 5.000 pg/ml TGF-β1. Ο δοσοεξαρτώμενος χαρακτήρας της επίδρασης τεκμηριώνεται με τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στο ρυθμό επούλωσης τόσο μεταξύ των 250 pg/ml και των 1.000 pg/ml όσο και μεταξύ των 1.000 pg/ml και των 5.000 pg/ml ( $p < 0,05$ ). Με τη χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων εμφανίστηκε άμβλυνση του φαινομένου (10.000 pg/ml:  $111 \pm 3$  %,  $p < 0,04$ ). (Εικόνα 27)

**Εικόνα 27. Ο TGF-β1 δοσοεξαρτώμενα επιταχύνει την επούλωση της πληγής από πρωτογενείς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs).** Αντιπροσωπευτικές εικόνες δοκιμασίας επούλωσης πληγής (scratch test) στις 0 και στις 48 h μετά από την πρόκληση πληγής με ρύγχος (tip) 200 μl σε καλλιέργεια SEMFs με πληρότητα 100 % φαίνονται στο Α. Όπως ποσοτικοποιείται στο Β, ο TGF-β1 δοσοεξαρτώμενα επιταχύνει την επούλωση της πληγής. \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με θρεπτικό μέσο. #  $p < 0,05$  σε σχέση με 250 pg/ml TGF-β 1. §  $p < 0,05$  σε σχέση με 500 pg/ml TGF-β 1.



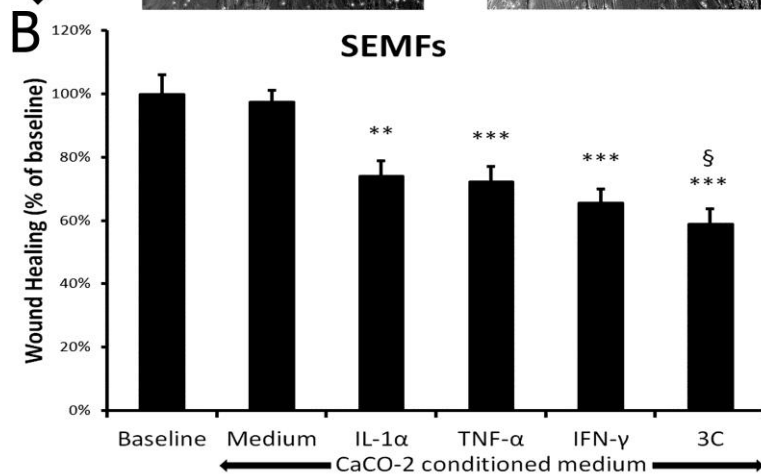
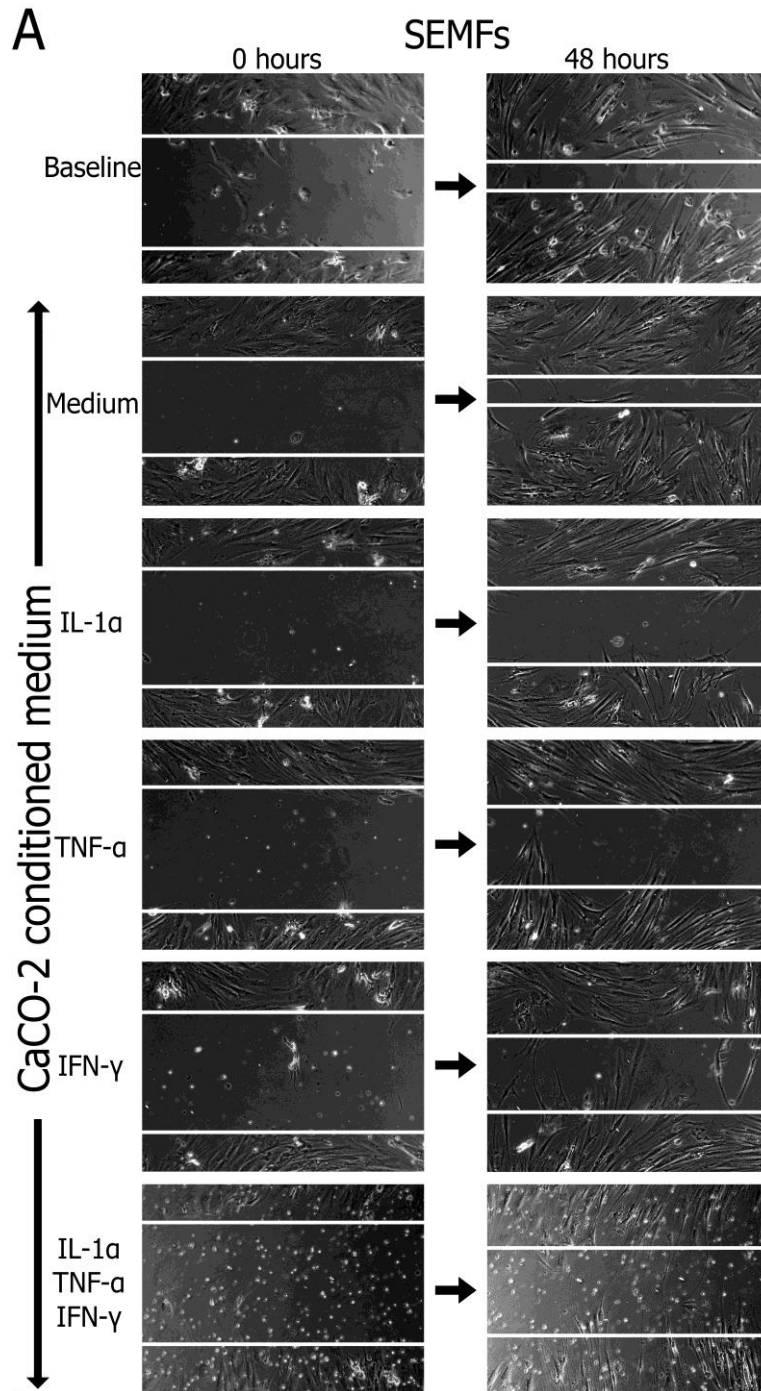
### 4.3.8 Επίδραση Υπερκειμένου Επιθηλιακών κυττάρων στην Επούλωση Τραύματος από Μυοϊνοβλάστες

Για την διερεύνηση της επίδρασης διαλυτών παραγόντων από τα επιθηλιακά στο ρυθμό επούλωσης πληγής από τους μυοϊνοβλάστες επελέγησαν πειραματικοί χειρισμοί αντίστοιχοι με αυτούς της διερεύνησης τέτοιων παραγόντων στην έκκριση κολλαγόνου και δραστικότητα MMPs από τα ίδια κύτταρα. Αναλυτικότερα, επιθυμούσαμε στους μυοϊνοβλάστες να δράσουν μόνο διαλυτοί παράγοντες από τα επιθηλιακά χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση των δευτέρων. Εξάλλου από τις τρεις κυτταροκίνες οι TNF-α και IFN-γ ευρέθησαν να έχουν άμεση δράση στην ταχύτητα επούλωσης πληγής. Για το λόγο αυτό διεγείραμε ή όχι και στην περίπτωση αυτή confluent καλλιέργειες επιθηλιακών για 6 h με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α, IFN-γ (έκαστη ή συνδυασμό και των τριών) και εν συνεχεία αντικαταστήσαμε με θρεπτικό μέσο χωρίς αυτές. Το θρεπτικό αυτό μέσο αφέθηκε επί των επιθηλιακών για 18 h και ακολούθως το παραγόμενο υπερκείμενο μεταφέρθηκε (Epithelial Cell Conditioned medium- ECC medium) επί καλλιεργειών μυοϊνοβλαστών πληρότητας 100 % για 48 h. Μετρήθηκε η ταχύτητα επούλωσης πληγής από τους μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση θρεπτικού μέσου, υπερκειμένου αδιέγερτων επιθηλιακών και υπερκειμένου διεγερμένων επιθηλιακών. Όλα τα προαναφερθέντα θρεπτικά μέσα περιείχαν 5% FBS ώστε να εξασφαλισθεί αποδεκτή κινητικότητα των μυοϊνοβλαστών.

### *4.3.8.1 Διαλυτοί παράγοντες εκκρινόμενοι από επιθηλιακά κύτταρα επί των οποίων επέδρασαν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιβραδύνουν την επούλωση από υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες.*

#### 4.3.8.1.1 Υπερκείμενο CaCO-2 επί των SEMFs

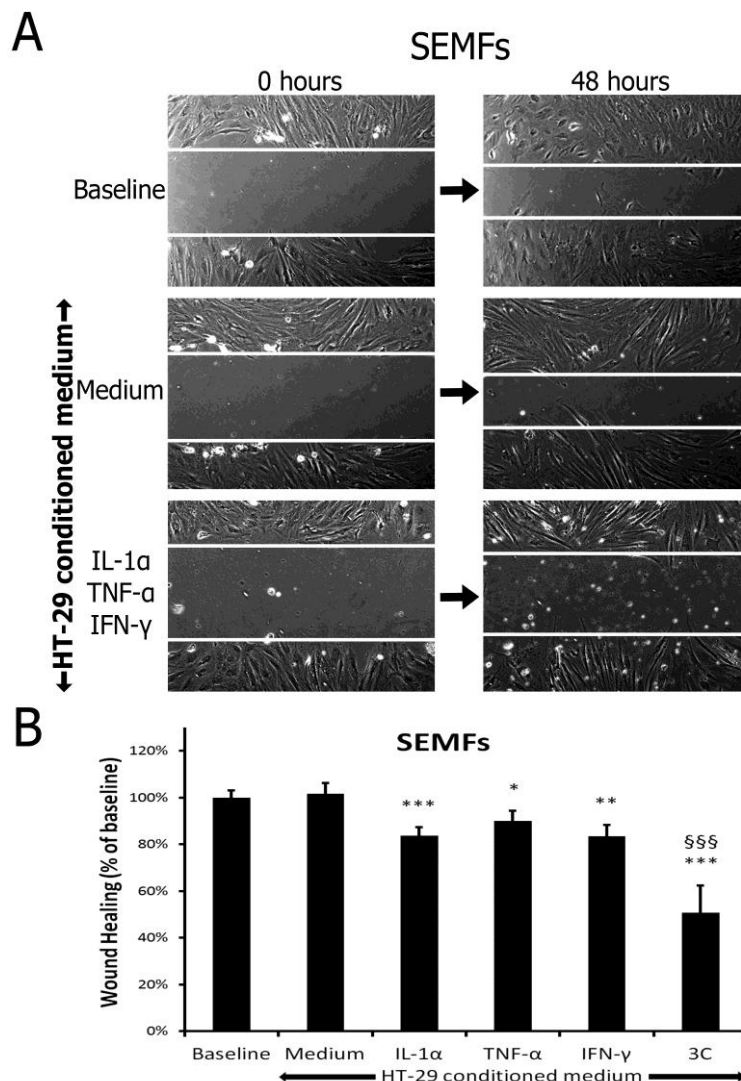
Προδιέγερση των CaCO-2 με οποιαδήποτε εκ των τριών κυτταροκινών παρήγαγε υπερκείμενο (από το οποίο οι ίδιες απουσίαζαν) που μείωνε σημαντικά την ταχύτητα επούλωσης πληγής από τους SEMFs. Αναλυτικότερα προ-επώαση επί 6 h με IL-1α προκαλούσε την παραγωγή υπερκειμένου από τα CaCO-2 που προκαλούσε επούλωση πληγής στις 48 h ίση με  $84 \pm 4$  % ( $p < 0,001$ ) αυτής που παρατηρούνταν υπό θρεπτικό μέσο. Η δράση της IFN- $\gamma$  ήταν παρόμοια ( $83 \pm 5$  %,  $p < 0,01$ ), ενώ ασθενέστερη ήταν η δράση του TNF- $\alpha$ :  $90 \pm 4$  % ( $p < 0,05$ ). Συνδυασμός και των τριών κυτταροκινών μείωσε το ρυθμό επούλωσης στο  $51 \pm 7$  % αυτού που μετρήσαμε με θρεπτικό μέσο ( $p < 10^{-9}$ ). Η τιμή αυτή ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη από τις τιμές που αναφέραμε για τις επιδράσεις με καθεμία κυτταροκίνη μόνη της ( $p < 0,001$ ), γεγονός που υπονοεί την αθροιστική δράση τους. Παρατηρούμε εδώ ότι και η IL-1α, παρότι άμεσα δεν επιβραδύνει το ρυθμό επούλωσης, έχει έμμεση ανασταλτική δράση μέσω του επιθηλιακού κυττάρου. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι υπερκείμενο αδιέγερτων επιθηλιακών δεν είχε δράση στο ρυθμό επούλωσης ( $102 \pm 4$  %). **(Εικόνα 28)**



**Εικόνα 28.** Η επούλωση πληγής από κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) επιβραδύνεται από κύτταρα της κολονικής επιθηλιακής κυτταροσειράς CaCO-2 που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Τα CaCO-2 προδιεγέρθηκαν με έκαστη ή με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκαν (Medium) επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium (χωρίς τις αρχικές κυτταροκίνες διέγερσης) που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιιεργειών SEMFs πληρότητας 100 % στις οποίες προκλήθηκε πληγή με ρύγχος (tip) 200 μl. Μετά από 48 h αξιολογήθηκε το ποσοστό επούλωσης του χάσματος για κάθε επίδραση και αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζονται στο Α. Όπως ποσοτικοποιείται στο Β, όλες οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (της IL-1α συμπεριλαμβανόμενης) έχουν και έμμεση δράση μέσω του επιθηλιακού κυττάρου και αθροιστικά επιβραδύνουν την επούλωση. \*\*  $p < 0,01$  και \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με θρεπτικό μέσο. §  $p < 0,05$  σε σχέση με conditioned medium από CaCO-2 προδιεγερμένα με οποιαδήποτε κυτταροκίνη μόνη της.

#### 4.3.8.1.2 Υπερκειμένο HT-29 επί των SEMFs

Όμοια ήταν τα αποτελέσματα και στην περίπτωση της δράσης υπερκειμένου HT-29 προδιεγερμένων ή όχι με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον ρυθμό επούλωσης της πληγής από SEMFs. Θρεπτικό αδιέγερτων HT-29 δεν επηρέασε, ενώ η IL-1α επιβράδυνε στο  $74 \pm 5$  % ( $p < 0,01$ ), ο TNF-α στο  $72 \pm 5$  % ( $p < 0,001$ ) και η IFN-γ στο  $66 \pm 4$  % ( $p < 10^{-4}$ ). Συνδυασμός και των τριών επιβράδυνε τον ρυθμό επούλωσης στο  $59 \pm 4$  % ( $p < 10^{-5}$ ) και η τιμή αυτή είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από τις τιμές που λάβαμε με την επίδραση καθεμίας κυτταροκίνης μόνης της ( $p < 0,05$ ). (Εικόνα 29)



**Εικόνα 29.** Η επούλωση πληγής από κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs) επιβραδύνεται από κύτταρα της κολονικής επιθηλιακής κυτταροσειράς HT-29 που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Τα HT-29 προδιεγέρθηκαν με έκαστη ή το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκαν (Medium) επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium (χωρίς τις αρχικές κυτταροκίνες διέγερσης) που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθη υπέρ καλλιεργειών SEMFs πληρότητας 100 % στις οποίες προκλήθηκε πληγή με ρύγχος (tip) 200 μl. Μετά από 48 h αξιολογήθηκε το ποσοστό επούλωσης του χάσματος για κάθε επίδραση και αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζονται στο A. Όπως ποσοτικοποιείται στο B, επιβεβαιώνεται και με conditioned medium από αυτήν την κυτταροσειρά επιθηλιακών ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχουν και έμμεση δράση μέσω του επιθηλιακού κυττάρου και αθροιστικά επιβραδύνουν την επούλωση. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  και \*\*\*  $p < 0,001$  σε σχέση με θρεπτικό μέσο. §§§  $p < 0,001$  σε σχέση με conditioned medium από HT-29 προδιεγερμένα με οποιαδήποτε κυτταροκίνη μόνη της.

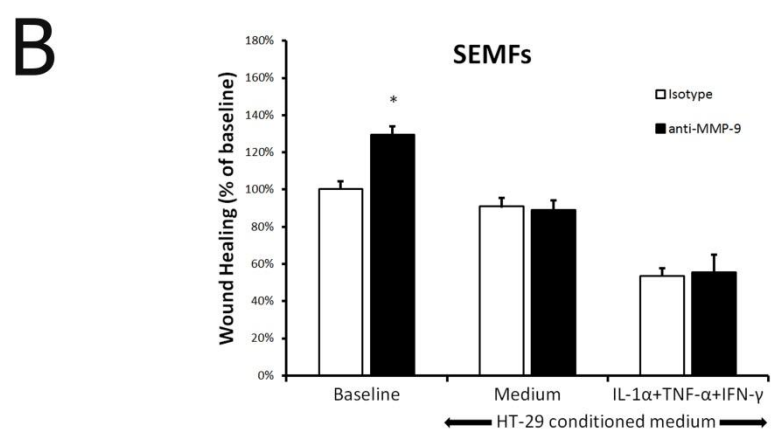
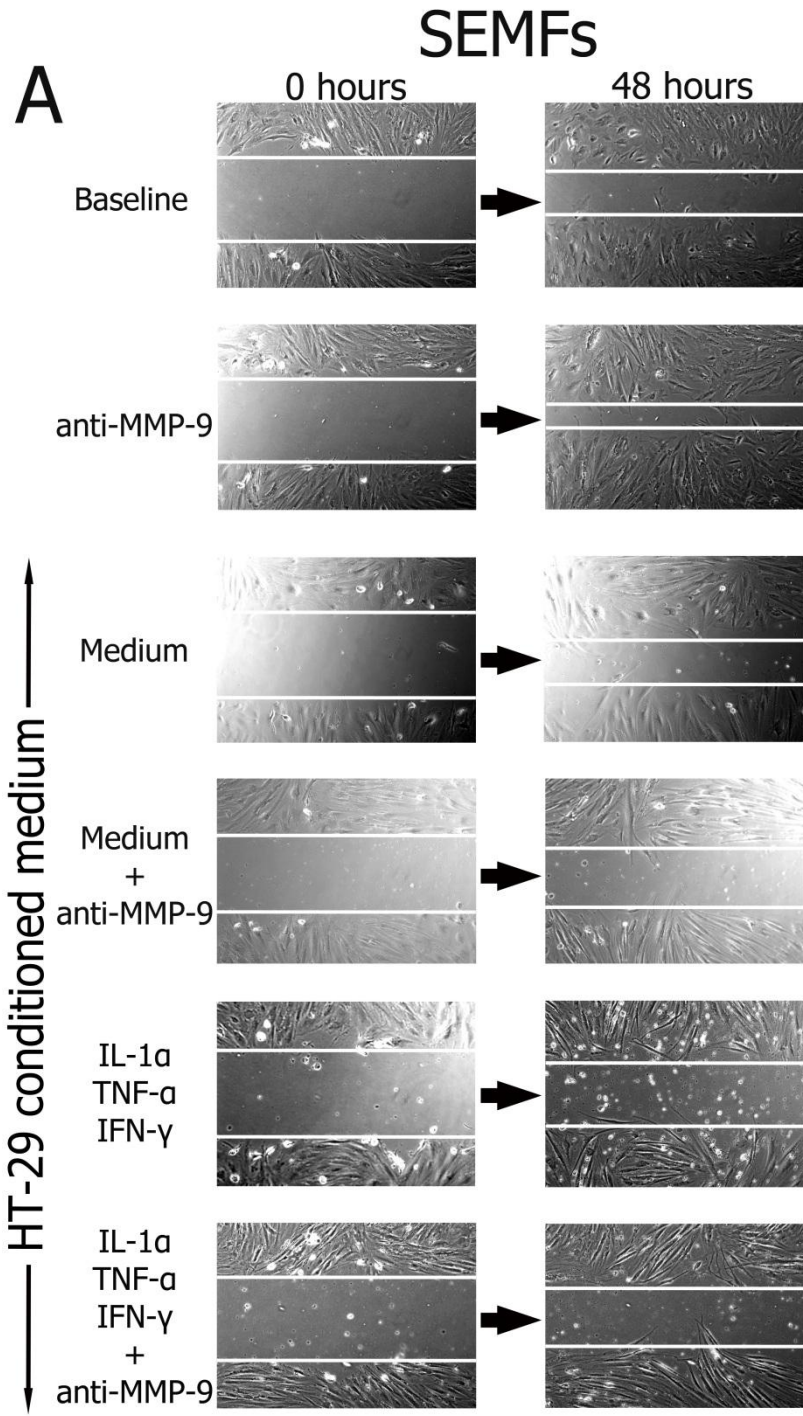


#### *4.3.8.2 Η μείωση της επούλωσης από τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες υπό την επίδραση υπερκειμένων από προδιεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακά κύτταρα δεν σχετίζεται με τη ταυτόχρονη επαγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες.*

Στην ενότητα 4.3.4.2 διαπιστώσαμε ότι το υπερκείμενο προδιεγερμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών επάγει MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες. Η MMP-9 ως μεταλλοπρωτεάση έχει καταβολική δράση πάνω στο κολλαγόνο της εξωκυττάριας ουσίας. Στην αμέσως προηγούμενη ενότητα (4.3.8.1) όμως μετρήσαμε μειωμένη επούλωση από τους SEMFs υπό την ίδια επίδραση. Αναρωτηθήκαμε λοιπόν αν το δεύτερο φαινόμενο οφείλεται στο πρώτο. Επαναλάβαμε λοιπόν τα ίδια πειράματα με ή χωρίς τη χρήση αδρανοποιητικού αντισώματος για την MMP-9.

##### 4.3.8.2.1 Υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs

Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της μείωσης της ταχύτητας επούλωσης της πληγής με προσθήκη αδρανοποιητικού της MMP-9 αντισώματος (anti-MMP-9) στο ECC medium από προδιεγερμένα με το σύνολο των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) HT-29. Συγκεκριμένα οι τιμές ήταν 54 $\pm$ 4 % με τη χρήση αντισώματος ελέγχου χωρίς επίτοπο και 55 $\pm$ 10 % με τη χρήση anti-MMP-9. Αντίθετα αυξήθηκε η ταχύτητα επούλωσης με την προσθήκη anti-MMP-9 σε θρεπτικό μέσο (130 $\pm$ 5 %,  $p < 0,05$ ), πιθανώς λόγω αναστολής της MMP-9 που το FBS περιείχε. Στην περίπτωση όμως της επίδρασης υπερκειμένου προδιεγερμένων επιθηλιακών ο μηχανισμός επιβράδυνσης της επούλωσης αποδείχθηκε ανεξάρτητος της MMP-9. **(Εικόνα 30)**



**Εικόνα 30.** Η επιβράδυνση της επούλωσης πληγής από κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες που προκαλείται από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ανεξάρτητη της MMP-9. Η κολονική επιθηλιακή κυτταροσειρά HT-29 προδιεγέρθηκε με το σύνολο των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή δεν διεγέρθηκε (Medium) επί 6 h. Ακολούθως ετέθη υπέρ αυτών θρεπτικό χωρίς κυτταροκίνες επί άλλες 18 h. Το conditioned medium (χωρίς τις αρχικές κυτταροκίνες διέγερσης) που παράχθηκε με αυτόν τον τρόπο ή θρεπτικό (Baseline) ετέθησαν υπέρ καλλιεργειών κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών (SEMFs) πληρότητας 100 % στις οποίες προκλήθηκε πληγή με ρύγχος (tip) 200 μl. Σε άλλα βοθρία προστέθηκε αδρανοποιητικό της MMP-9 αντίσωμα (anti-MMP-9) και σε άλλα αντίσωμα ελέγχου χωρίς επίτοπο. Μετά από 48 h αξιολογήθηκε το ποσοστό επούλωσης του χάσματος για κάθε επίδραση και αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζονται στο Α. Η ποσοτικοποίηση στο Β υπονοεί μηχανισμό αναστολής της επούλωσης ανεξάρτητο της MMP-9 από τα φλεγμαίνοντα επιθηλιακά. Επιτάχυνση της επούλωσης παρατηρείται μόνο αν το αδρανοποιητικό αντίσωμα προστεθεί στο θρεπτικό, πιθανώς λόγω αναστολής της MMP-9 που αυτό περιέχει λόγω του FBS. \*  $p < 0,05$  σε σχέση με θρεπτικό μέσο.

## 4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.4.1 TGF-β

#### 4.4.1.1 Εντερικός βλεννογόνος

Υπερέκφραση mRNA των TGF-β1 και -β3 και των υποδοχέων τους TβR-I και -II έχει συσχετισθεί με εντερική φλεγμονή σε ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια (inflammatory bowel disease- IBD) και συγκεκριμένα τόσο σε ελκώδη κολίτιδα (ulcerative colitis- UC) όσο και σε νόσο του Crohn (Crohn's Disease- CD) (Babyatsky et al., 1996; di Mola et al., 1999; Lawrance et al., 2001c; McCabe et al., 1993; Simmons et al., 2002). Νεότερες μελέτες εμφανίζουν το TGF-β1 mRNA και τα αντίστοιχα ενδοκυττάρια μηνυματοφόρα μόρια (φωσφορυλιωμένα SMAD 2 και 3- pSMAD -2 και -3) αυξημένα μόνο σε ινωτικά- στενωτικά τμήματα εντέρου από CD, με τα φλεγμαίνοντα μη στενωτικά να μην παρουσιάζουν το ίδιο φαινόμενο (Di Sabatino et al., 2009). Ως προς την κυτταρική εντόπιση στο εντερικό τοίχωμα, πρώιμες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα του υποβλεννογόνιου (ίδιος χιτώνας- lamina propria) εμφανίζουν έντονη ανοσοθετικότητα για τον TGF-β1 στην φλεγμονή λόγω CD (Babyatsky et al., 1996; di Mola et al., 1999). Μεταγενέστερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες δείχνουν αυξημένο τον TGF-β1 διατοιχωματικά στην ινωτική CD, ενώ μόνο στο επιθήλιο και τον υποβλεννογόνο χιτώνα στην φλεγμονώδη UC (Lawrance et al., 2001c). Επιπλέον, στην ενεργό CD τροποποιείται η έκφραση και των δύο υποδοχέων του TGF-β: TβR-I και TβR-II. Από τα επιθηλιακά κύτταρα στο ανώτερο τμήμα των κρυπτών που φυσιολογικά απαντώνται, η έκφρασή τους επεκτείνεται σε όλο το επιθήλιο και στους SEMFs (Ohtani et al., 1995). Επιπροσθέτως, στον ίδιο χιτώνα (lamina propria) εντέρου ασθενών με CD σαφώς υπάρχει συνεντόπιση της

αυξημένης έκφρασης τόσο των TGF-β1, TGF-β3 όσο και των υποδοχέων του TβR-II και TβR-III στον ίδιο χιτώνα και στα φλεγμονώδη διηθήματα και η οργανωμένη αυτή συνεντόπιση παραπέμπει σε λειτουργική ενεργοποίηση του μηχανισμού του TGF-β (di Mola et al., 1999). Η εγγενώς αυξημένη παραγωγή TGF-β1 mRNA δεν είναι ίδιον μόνο της CD, αλλά και άλλων νόσων που επιπλέκονται ή χαρακτηρίζονται από ίνωση, όπως το σκληρόδερμα (Shi-Wen et al., 2007).

Σε μοντέλα αυτοανοσίας, η επαγωγή TGF-β είναι συχνό φαινόμενο. Συγκεκριμένα, σε μοντέλο άσθματος σε ποντικούς λόγω χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού με οβαλβουμίνη αναφέρεται έντονη επαγωγή ανοσοϊστοχημικής χρώσης για TGF-β1 σε όλα τα στρώματα του αναπνευστικού βλεννογόνου- των SEMFs συμπεριλαμβανομένων (Kumar et al., 2004). Σε μοντέλο οξείας κολίτιδος προκαλούμενης από trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), η υπερέκφραση TGF-β1 με το κατάλληλο πλασμίδιο έχει δειχθεί ότι βελτιώνει κλινικά την κολίτιδα αλλά και αυξάνει την έκφραση των αντιφλεγμονωδών TGF-β1 και IL-10 στον ίδιο χιτώνα (lamina propria) (Kitani et al., 2003). Στο ίδιο μοντέλο και στο χρονικό σημείο της πρώτης εβδομάδας, τα σκορ φλεγμονής και οι ιστολογικές βλάβες ήταν ηπιότερες και ο πολλαπλασιασμός των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων ταχύτερος σε ποντίκια με γονότυπο ετεροζυγώτη για το κυριότερο ενδοκυττάριο μήνυμα SMAD3 του TGF-β (Tokumasa et al., 2004). Μάλιστα αντιρροπιστικά στην απουσία SMAD3 δεν παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα TGF-β1, ώστε να θεωρηθεί άλλος από αυτόν της ενδοκυττάριας οδού των SMADs TGF-β-εξαρτώμενος μηχανισμός υπεύθυνος, γεγονός που υποδηλώνει ένα ρόλο του TGF-β1 πιο περίπλοκο από αυτόν του απλού αντιφλεγμονώδους παράγοντα, τουλάχιστον στην οξεία εντερική φλεγμονή (Tokumasa et al., 2004). Σε *in vivo* μοντέλο χρόνιας κολίτιδος με επαναλαμβανόμενες εγχύσεις TNBS, παρατηρείται αυξημένο

TGF- $\beta$ 1 mRNA στο παχύ έντερο (Lawrance et al., 2003) και ενδοκυττάρια αναστολή της οδού του TGF- $\beta$  με «παραπλανητικά» (decoy) ολιγονουκλεοτίτιδια μειώνει την έκφραση IGF-I, egr-1, κολλαγόνου και ιστολογικά την εντερική ίνωση (Fichtner-Feigl et al., 2008).

Στο ίδιο μοντέλο έχει ευθέως δειχθεί ότι η κολίτιδα είναι ηπιότερη κλινικά και ιστολογικά σε ποντίκια knock-out για SMAD3 (Kerrigan et al., 2000). Πάντως, πλην της ίνωσης, δεν παρουσιάζεται και αυξημένη ιστολογικά φλεγμονή σε αυτά τα ποντίκια (Kerrigan et al., 2000), όπως θα αναμενόταν λόγω και της αντιφλεγμονώδους δράσης του TGF- $\beta$  (Yang et al., 1999b). Σε μοντέλο πνευμονικής ίνωσης με μπλεομυκίνη η αύξηση της έκφρασης TGF- $\beta$ 1 στην πρώιμη οξεία φάση της ιστικής φλεγμονής με κατάλληλο πλασμίδιο οδηγεί σε βελτίωση της όψιμης ίνωσης μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από την IL-10 (Kitani et al., 2003). Παραδόξως, οι Ashcroft και συν. κατέδειξαν ότι, σε αντίθεση με τις προβλέψεις που έγιναν με βάση την ικανότητα του εξωγενούς TGF- $\beta$  να βελτιώνει την επούλωση τραύματος, τα Smad3 knockout ποντίκια επιδεικνύουν επιτάχυνση δερματικής επούλωσης, με αυξημένο ποσοστό επανεπιθηλιοποίησης και μείωση της τοπικής διήθησης από μονοκύτταρα (Ashcroft et al., 1999). Εικάζεται λοιπόν η-μερική τουλάχιστον-αυτονομία φλεγμονής και ίνωσης στα απώτερα τουλάχιστον στάδια της δεύτερης. Στην ίνωση που έπεται χρονικά της κολίτιδος στο ίδιο πάντα μοντέλο του προϊνωτικού αυτού μονοπατιού προηγείται η IL-13 και ο επαγωγίσιμος υποδοχέας της IL-13R $\alpha_2$  (Fichtner-Feigl et al., 2008). Ενδείξεις υπέρ της σημασίας της υπερέκφρασης TGF- $\beta$ 1 από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα σε τέτοια μοντέλα για την πρόκληση εντερικής ίνωσης διαφαίνεται από πειράματα διαμόλυνσης του παχέος εντέρου με ιό φορέα του γονιδίου TGF- $\beta$ 1 που προκαλούσε προσωρινή υπερέκφραση του τελευταίου κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και ταυτόχρονα επέφερε διατοιχωματική εντερική ίνωση (Vallance et al., 2005). Σε μοντέλο

κολίτιδος σε αρουραίους με ενδοτοιχωματική έγχυση βακτηριακών πεπτιδογλυκανών-πολυσακχαριτών επήχθη φλεγμονή και ίνωση με αυξημένα επίπεδα TGF-β1 (van Tol et al., 1999).

#### 4.4.1.2 Επιθηλιακά & SEMFs

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά εξετάσαμε την παραγωγή προϊνωτικών παραγόντων από δύο κύρια στοιχεία του εντερικού βλεννογόνου: τα επιθηλιακά κύτταρα και τους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (subepithelial myofibroblasts- SEMFs). Ελέγχθηκαν δύο επιθηλιακές κυτταροσειρές (HT-29, CaCO-2) και βρέθηκαν να έχουν βασική έκκριση όλων των ισομορφών transforming growth factor-β (TGF-β) σε συγκεντρώσεις σημαντικά διαφορετικές από το κατώτερο όριο της μεθόδου και τον TGF-β1 να εκκρίνεται σε μεγαλύτερα ποσά. Η παραγωγή TGF-β1 αυξήθηκε όταν οι καλλιέργειες επώαστηκαν με καθεμία από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1α, TNF-α και IFN-γ ή τους πιθανούς συνδυασμούς τους (ενότητα 4.3.1.1.1, Εικόνα 2 και Εικόνα 3). Η ισομορφή TGF-β3 έπεται σε επίπεδα έκφρασης και οι κυτταροκίνες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ανάλογη επαγωγική δράση και σε αυτήν (ενότητα 4.3.1.1.1, Εικόνα 2 και Εικόνα 3). Σε μικρότερα αλλά μετρήσιμα ποσά εκκρίνεται ο TGF-β2 και επαγωγή του παρατηρείται μόνο στα HT-29 (ενότητα 4.3.1.1.1, Εικόνα 2 και Εικόνα 3). Στο σημείο αυτό αξίζει αναφοράς η προστατευτική δράση που ασκεί ο TGF-β στα ίδια τα επιθηλιακά, που δείχθηκε από τους *Planchon και συν.* ως προς την προστασία της ακεραιότητας του επιθηλιακού φραγμού έναντι της αύξησης της διαβατότητάς του που προκαλούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή βακτήρια (Planchon et al., 1994). Παραγωγή ικανών ποσοτήτων όλων των ισομορφών TGF-β έχει αναφερθεί και στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού (Kumar et al., 1997; Pelton et al., 1991; Thompson et al., 1989).

Αντίθετα με τα επιθηλιακά, παρατηρήθηκε μηδενική ή ελάχιστη έκκριση όλων των ισομορφών TGF-β από πρωτογενείς κολονικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs), που δεν τροποποιήθηκε από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (ενότητα 4.3.1.1.2.1, Εικόνα 6). Οι SEMFs έχουν αναφερθεί στο παρελθόν να εκκρίνουν μετρήσιμα ποσά όλων των ισομορφών TGF-β- μάλιστα σε διαφορετικές μεταξύ τους αναλογίες ανάλογα με την προέλευση των SEMFs από ομάδα ελέγχου, UC ή CD-, αλλά χρησιμοποιήθηκε μία έμμεση μέθοδος αναστολής του πολλαπλασιασμού της κυτταροσειράς Mv1Lu (McKaig et al., 2002), και όχι η μέθοδος επιλογής και σαφώς πιο αξιόπιστη ELISA.

Έχει αναφερθεί αυξημένη παραγωγή TGF-β1 mRNA από SEMFs απομονωμένους από ινωτικά τμήματα εντέρου ασθενών με CD και αυξημένη απόκριση αυτών σε εξωγενή TGF-β1, αλλά σε συνάφεια με τα αποτελέσματά μας δεν υπήρχαν όμοια ευρήματα σε φλεγμαίνοντα, μη ινωτικά τμήματα εντέρου (Di Sabatino et al., 2009). Επίσης, οι *Lawrance και συν.* σε αναλογία με τα ευρήματά μας δεν διαπίστωσαν απάντηση του TGF-β1 σε διέγερση με TNF-α ή IFN-γ μυοϊνοβλαστών του ιδίου χιτώνα σε μοντέλο ποντικών στους οποίους επήχθη κολίτιδα με TNBS (Lawrance et al., 2003). Σε μοντέλο όμως κολίτιδος και επακόλουθης ίνωσης με ενδοτοιχωματική έγχυση πεπτιδογλυκανών- πολυσακχαριτών παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημικά αυξημένη παραγωγή TGF-β1 στη υποεπιθηλιακή στιβάδα των SEMFs, αλλά και *in vitro* διέγερση εντερικών μυοϊνοβλαστών με συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος επάγει σε αυτούς TGF-β1 (van Tol et al., 1999).

**Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα θα μπορούσαν να είναι μια σημαντική πηγή TGF-β και ότι οι κυτταροκίνες που μετέχουν στην εντερική φλεγμονή θα μπορούσαν να αυξάνουν την παραγωγή του. mRNA όλων των ισομορφών TGF-β έχει ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά στα επιθηλιακά φυσιολογικού πεπτικού ποντικών**



(Barnard et al., 1993; Thompson et al., 1989). Οι λειτουργικές συνέπειες της τοπικής παραγωγής έχουν υπογραμμιστεί από τους *Vallance και συν.*, που έδειξαν ότι η υπερέκφραση TGF-β1 από το κολονικό επιθήλιο μπορεί να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό μεσεγχυματικών κυττάρων και να προκαλέσει εντερική ίνωση (Vallance et al., 2005), αλλά και να καταστείλει προφλεγμονώδεις οδούς στα ίδια τα επιθηλιακά κύτταρα (Walia et al., 2003). Βέβαια υπάρχουν και ευρήματα αναστολής του πολλαπλασιασμού των 18CO από τον TGF-β1, όπως συμβαίνει και με πολλά μεσεγχυματικά κύτταρα (Graham et al., 1990; Powell et al., 1999a), αλλά και το αντίθετο εύρημα για ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (κύτταρα του Ito) (Friedman, 2000). Επαγωγή TGF-β1 και -β2 έχει βρεθεί και σε συγκαλλιέργειες κερατινοκυττάρων και δερματικών μυοϊνοβλαστών (Shephard et al., 2004b; Smola et al., 1994).

## 4.4.2 TIMP-1

### 4.4.2.1 Εντερικός βλεννογόνος

Έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του επαγωγίμου ιστικού αναστολέα 1 των μεταλλοπρωτεασών (TIMP-1) σε διάφορες εντερικές νόσους (κολλαγονώδης κολίτιδα, εκκολπωματίτιδα, CD) και σε πειραματικά μοντέλα κολίτιδας (Di Sabatino et al., 2009; Gunther et al., 1999; Lawrance et al., 2003; Louis et al., 2000; Mimura et al., 2004; Santana et al., 2006; von Lampe et al., 2000) σε σύγκριση με την ελάχιστη έκφραση σε περικρυπτικούς SEMFs υπό φυσιολογικές συνθήκες (Holten-Andersen et al., 2005). Ένδειξη υπέρ της επαγωγιμότητάς του μαζί με την MMP-9 αποτελεί η αυξημένη έκφρασή τους στο πλάσμα και στο μέτωπο διείδυσης αδenoκαρκινώματος παχέος εντέρου (Holten-Andersen et al., 2005; Holten-Andersen et al., 1999). Επίσης υπάρχει το εύρημα της μειωμένης έκφρασης TIMP-1 σε ινωτικές περιοχές CD (Di Sabatino et al., 2009). Τα ευρήματα αυτά

θέτουν υπό δοκιμή την υπόθεση ότι η ίνωση δυνητικά είναι αποτέλεσμα και της αναστολής της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας από τις μεταλλοπρωτεάσες (matrix metalloproteinases- MMPs) σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή θεμέλιας ουσίας *per se*. Έχει βέβαια υποστηριχθεί ότι η επαγωγή TIMP-1 σε μοντέλα κολίτιδος δεν είναι επαρκής ώστε να αποτρέψει την πέψη της διάμεσης ουσίας και την επακόλουθη εξέγκωση εξαιτίας της δυσανάλογα μεγαλύτερης αύξησης δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεασών (MMPs) στο εντερικό τοίχωμα (Santana et al., 2006). *Ex vivo* καλλιέργειες εμβρυϊκού εντερικού ιστού μεταγράφουν TIMP-1 mRNA και η μεταγραφή του μερικά αναστέλλεται με ανοσολογική διέγερση των καλλιιεργειών (Pender et al., 1997; Salmela et al., 2002).

#### **4.4.2.2 Επιθηλιακά & SEMFs**

Κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, όπως ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, προερχόμενα από έντερο (Lawrance et al., 2003; McKaig et al., 2003), αλλά και από άλλα όργανα όπως το δέρμα (Sawicki et al., 2005), έχει επιβεβαιωθεί ότι παράγουν TIMP-1. Σε άλλα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα που συνοδεύονται από διαταραχή της ισορροπίας αναβολισμού- καταβολισμού της εξωκυττάριας ουσίας η έκκριση TIMP-1 έχει βρεθεί αυξημένη. Ένα παράδειγμα είναι οι δερματικοί ινοβλάστες από χρόνια έλκη κάτω άκρων (Cook et al., 2000). Υπερέκφραση του TIMP-1 από SEMFs απομονωμένους από ασθενείς με CD σε σχέση με αυτούς από ομάδα ελέγχου έχει επίσης αναφερθεί (McKaig et al., 2003). Σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (McKaig et al., 2003), ανιχνεύσαμε ιδιοσυστασιακή παραγωγή TIMP-1 από κολονικούς SEMFs, η οποία όμως παρέμεινε σταθερή παρά την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (ενότητα 4.3.1.1.1.4, Εικόνα 4). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με κάποιες προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν επαγωγή από TNF-α των ενδοκυττάρων TIMP-1 mRNA και πρωτεΐνης, αλλά το ίδιο

δεν δείχθηκε για το τελικό εκκρινόμενο πρωτεϊνικό προϊόν (Theiss et al., 2005; Yasui et al., 2004). Σε άλλη μελέτη, η δράση του TNF-α δείχθηκε μόνο έμμεσα μέσω του αποτελέσματος αδρανοποιητικού αντισώματος του TNF-α σε SEMFs από CD, αλλά το ίδιο αντίσωμα δεν είχε δράση στους SEMFs από ομάδα ελέγχου (Di Sabatino et al., 2007). Επίσης οι *Lawrance και συν.* βρήκαν επαγωγή TIMP-1 mRNA από TNF-α και IFN-γ σε μυοϊνοβλάστες του ιδίου χιτώνα (*lamina propria*) από ποντικούς με TNBS κολίτιδα (Lawrance et al., 2003). Έχει αναφερθεί όμως και η αντίθετη δράση του TNF-α: επαγωγή TIMP-1 *ex vivo* σε ιστοτεμάχια από βιοψίες ασθενών με CD μετά από αδρανοποίηση του TNF-α με αντίσωμα (Di Sabatino et al., 2007). Η έλλειψη επίδρασης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην δραστικότητα TIMP-1 διαπιστώθηκε και σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής με ανάστροφη ζυμογραφία (Fabunmi et al., 1996).

Οι *McKaig και συν.* βρήκαν ότι οι TGF-β1 και -β2 επάγουν TIMP-1 σε κολονικούς SEMFs από ομάδα ελέγχου (McKaig et al., 2003). Επίσης, αναφέρεται επαγωγή TIMP-1 από TGF-β1 σε εντερικούς SEMFs ανεξάρτητα από την προέλευση από ινωτικό, φλεγμαίνοντα ή εντερικό βλεννογόνο ελέγχου (Di Sabatino et al., 2009; Yasui et al., 2004).

Στα πειράματά μας οι κολονικές επιθηλιακές σειρές παρουσίασαν έκκριση ικανών ποσοτήτων TIMP-1. Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αντίθετα με τους SEMFs, αύξησαν την παραγωγή του από τα κύτταρα αυτά (ενότητα 4.3.1.1.1.4, Εικόνα 4). **Το εύρημα αυτό αποδεικνύει ότι το κολονικό επιθήλιο θα μπορούσε να είναι μια επιπρόσθετη πηγή TIMP-1 στην εντερική φλεγμονή**, γεγονός που με τη σειρά του συμβάλλει στην εντερική ίνωση. Έχουν βρεθεί και δράσεις του TIMP-1 πάνω στα ίδια τα επιθηλιακά κύτταρα: οι *Horiuchi και συν.* διαπίστωσαν ότι η εξωγενής TIMP-1 μειώνει την κινητικότητα των HT-29 (Horiuchi et al., 2003).

## 4.4.3 Μεταλλοπρωτεάσες

### 4.4.3.1 Εντερικός βλεννογόνος

Οι μεταλλοπρωτεάσες (metalloproteinases- MMPs) έχουν ενοχοποιηθεί για συμβολή στην αιτιοπαθογένεια τόσο της ίνωσης όσο και της εξέλκωσης στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια (Inflammatory bowel disease- IBD) (Bailey et al., 1994; Baugh et al., 1999; Salmela et al., 2002; von Lampe et al., 2000). Πολλές MMPs (MMP-1 -2, -3, -9, -10, -12, -14) υπερεκφράζονται στον φλεγμαίνοντα εντερικό ιστό και σε *in vivo* μοντέλα IBD (Bailey et al., 1994; Baugh et al., 1999; Lawrance et al., 2003; Louis et al., 2000; Pender et al., 1998a; Salmela et al., 2002; von Lampe et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, σε μία από τις μελέτες η συνολική δραστικότητα gelatinases σε ασθενείς με IBD αναφέρθηκε αυξημένη σε πάσχοντα και μη πάσχοντα τμήματα εντέρου σε σχέση με δείγματα ελέγχου (controls) με τα πάσχοντα να έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με μη πάσχοντα μόνο στην UC (Baugh et al., 1999). Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν την αυξημένη δραστικότητα gelatinases σε UC σε σχέση με CD σε εντερικό ιστό (Baugh et al., 1999). Η MMP-2 έχει βρεθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορρό ασθενών με CD (Kossakowska et al., 1999). Μία από τις πιο συχνά συναντούμενες και επιβεβαιωμένα επαγόμενες MMPs είναι η MMP-9, η οποία είναι υπεύθυνη για μεγάλο μέρος της επιπρόσθετης ινωδολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας που παρατηρείται στον φλεγμαίνοντα εντερικό ιστό στην IBD (Bailey et al., 1994; Baugh et al., 1999; Salmela et al., 2002). Άλλες πιο πρόσφατα διερευνημένες MMPs που είναι αυξημένες σε φλεγμαίνοντα τμήματα εντέρου με CD, αλλά μειωμένες σε ινωτικά είναι οι MMP-12 και MMP-3 (Di Sabatino et al., 2009; Di Sabatino et al., 2007).

Σε *ex vivo* καλλιέργειες εμβρυϊκού εντέρου ανιχνεύεται mRNA, πρωτεΐνη και ενζυμική δράση MMP-2, αλλά μόνο mRNA MMP-9, με την έκφραση και των δύο να είναι δυναμική, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση των mRNA, συγκεντρώσεων και δραστικότητάς τους με ανοσολογική διέγερση των καλλιεργείων με λεκτίνες (Pender et al., 1997). Ιστολογικά οι MMPs ανιχνεύονται στον ίδιο χιτώνα και η αναστολή τους βελτιώνει τις παθολογοανατομικές βλάβες που προκαλεί η ανοσολογική διέγερση με λεκτίνες στις οργανοκαλλιέργειες (Pender et al., 1997). Επώαση με IL-1 ή TNF-α των οργανοκαλλιεργείων εντέρου προκαλεί αύξηση της δραστικότητας MMP-2 (Pender et al., 1997). Σε άλλη μελέτη *ex vivo* καλλιεργείων εμβρυϊκού εντερικού ιστού οι *Salmela και συν.* βρίσκουν επαγωγή MMP-9 mRNA υπό την επίδραση συνδυασμού IL-12 και anti-CD3 αντισώματος, που όμως δεν επιβεβαιώθηκε στις μελέτες *in situ* υβριδισμού (Salmela et al., 2002).

Σε μοντέλο κολίτιδας με μεταφορά CD4+ λεμφοκυττάρων σε ανοσοανεπαρκή για ειδική ανοσολογική απάντηση SCID ποντίκια διαπιστώθηκε η επαγωγή MMP-9 στο εντερικό τοίχωμα (Medina et al., 2003; Tarlton et al., 2000). Με *in situ* ζυμογραφία στο μοντέλο αυτό οι MMPs αναδεικνύονται ως οι κυρίως υπεύθυνες πρωτεάσες για τη λύση της διάμεσης ουσίας κατά τη φλεγμονή και η συγκεκριμένη περιοχή του βλεννογόνου στην οποία επήχθη ζυμογραφική δραστηριότητα με την πειραματική αυτή κολίτιδα ήταν ο υποβλεννογόσιος στις περιοχές των κρυπτών (Tarlton et al., 2000), γεγονός που στοχοποιεί και τους SEMFs ως υπεύθυνους για την παραγωγή τους. Η σπουδαιότητα της MMP-9 στην εξέλιξη του φλεγμαίνοντος εντέρου επιβεβαιώθηκε και σε μελέτες πειραματικής οξείας κολίτιδος με νατριούχοθειϊκή δεξτράνη (dextran sodium sulphate- DSS) ή *Salmonella typhimurium*, στις οποίες αφενός παρατηρήθηκε επαγωγή δραστικότητας MMP-9 και αφετέρου η έκταση και η σοβαρότητα της βλάβης του βλεννογόνου, όπως αυτή κρίνεται από κλινικές (σωματικό

βάρος, διαρροϊκές κενώσεις, αιματοχεσία, κλινικό σκορ) και ιστολογικές (πολυμορφοπύρρηνα, σκορ φλεγμονής) παραμέτρους, σημαντικά μειώθηκε σε ποντίκια knockout για την MMP-9 (Castaneda et al., 2005; Santana et al., 2006). Βέβαια, σε χιμαιρικά ποντίκια με MMP-9 knockout μυελό των οστών η κολίτιδα παρέμενε σοβαρή, εύρημα που υπονοεί ότι ο ρόλος της MMP-9 είναι πολυπλοκότερος από αυτόν που θα προέβλεπε η έλλειψή τους στα πολυμορφοπύρρηνα (Castaneda et al., 2005). Αντίθετα όσον αφορά την MMP-2, η κολίτιδα προκαλούμενη τόσο με DSS όσο και με *Salmonella spp* επιδεινώνεται σε MMP-2 knockout ποντίκια και το αποτέλεσμα αυτό είναι εξαρτώμενο από την MMP-2 που εκκρίνουν κύτταρα του βλεννογόνου και όχι κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών με κεντρικό παθοφυσιολογικό γεγονός την αύξηση της διαπερατότητας του βλεννογόνου (Garg et al., 2006). Αυξημένη δραστηριότητα MMP-2 και MMP-9 έχει ανιχνευθεί και σε άλλο μοντέλο κολίτιδας προκαλούμενης με απτίνες σε αρουραίους, που προσομοιάζει παθολογοανατομικά με UC (Hawkins et al., 1997).

#### 4.4.3.1.1 Πιθανή θεραπευτική αξία

Παρά το γεγονός ότι TIMPs κάποτε θεωρούνταν ως υποψήφια θεραπευτικά μέσα για ασθένειες με παθοφυσιολογία μη αντιρροπούμενης δραστηριότητας MMP, μικρότεροι συνθετικοί αναστολείς είναι καλύτερα υποψήφια φάρμακα. Έχει αποδειχθεί ότι τέτοιοι μετριάζουν τη φλεγμονή του εντέρου σε ζωικά μοντέλα IBD (Di Sebastiano et al., 2001; Sykes et al., 1999). Παρά το γεγονός ότι το 2000 πολλές φαρμακευτικές εταιρείες άρχισαν κλινικές μελέτες, πολλές κλινικές δοκιμές φάσης III δεν έδειξαν κανένα όφελος επιβίωσης μετά τη θεραπεία αναστολέα MMP (Zucker et al., 2000). Ωστόσο, τα συμπεράσματα δεν είναι ακόμη σαφή ως προς την πιθανή θεραπευτική αξία αναστολέων των MMPs στην IBD. Αναστολείς MMPs θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικοί και σε άλλες ασθένειες, όπως η

περιοδοντίτιδα, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η σπειραματονεφρίτιδα, η βακτηριακή μηνιγγίτιδα, η αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή, το εμφύσημα, το ανεύρυσμα αορτής, η επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική και η αθηροσκλήρωση (Brinckerhoff and Matrisian, 2002).

#### **4.4.3.2 Επιμέρους στοιχεία του εντερικού βλεννογόνου**

Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις για τον κομβικό ρόλο των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών και την κινητοποίησή τους από τον μυελό των οστών σε συνθήκες εντερικής φλεγμονής, ώστε να εξασφαλιστεί ένας αντιρροπιστικός μηχανισμός, που είναι μεταξύ άλλων εξαρτώμενος από την έκκριση IL-10 (Bamba et al., 2006; Brittan et al., 2002). Η μειωμένη απαντητικότητα στην ανασταλτική δράση του TGF-β1 πάνω στην επίταση της έκκρισης και δραστηριότητας άλλων MMPs, όπως η MMP-12, από SEMFs απομονωμένους από ινωτικά τμήματα εντέρου από ασθενείς με αλλά όχι από φλεγμαίνοντα, μη ινωτικά τμήματα εντέρου και δείγματα ελέγχου (Di Sabatino et al., 2009) αποτελεί εύρημα που υποσημαίνει το ρόλο των SEMFs στην μειωμένη παραγωγή ενζύμων λύσης της διάμεσης ουσίας στη CD (Di Sabatino et al., 2009). Βέβαια σε προγενέστερη δημοσίευση η ίδια ερευνητική ομάδα αναφέρει σαφή αναστολή άμεσα από τον TGF-β1 της δραστηριότητας MMP-3 και MMP-12 και σε SEMFs από CD (Di Sabatino et al., 2007).

Πρώιμες μελέτες ανοσοϊστοχημείας ταυτοποίησαν τα ουδετερόφιλα ως τη μόνη πηγή MMP-9 στο φλεγμαίνον έντερο, παρά την εντόπιση της MMP-9 στο συνδετικό ιστό πλησίον των κρυπτών, που έθετε την υποψία της πιθανής εμπλοκής των SEMFs στην παραγωγή της (Bailey et al., 1994; Baugh et al., 1999). Αργότερα υπήρξαν και αναφορές παραγωγής και δραστηριότητας MMP-2 από την κυτταροσειρά επιθηλιακών HT-29 και μείωσης της δραστηριότητάς της με την επίδραση IFN-γ (Alvarado et al., 2008; Lee and Lim, 2007),

ευρήματα που εμείς και άλλοι (Paduch and Kandefers-Szerszen, 2011) δεν επιβεβαιώνουν. Επίσης τα αποτελέσματά μας ως προς την έλλειψη δραστικότητας MMP-2 και MMP-9 στα HT-29 συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα των *Horiuchi και συν.* και *Pedersen και συν.*, που δεν διαπίστωσαν μεταγραφή MMP-2 και MMP-9 mRNA με Northern Blot και PCR στα ίδια κύτταρα (Horiuchi et al., 2003; Pedersen et al., 2008). Στη βιβλιογραφία συναντούμε και άλλες αντικρουόμενες με τα παραπάνω και μεταξύ τους αναφορές ως προς τις MMP-2 και MMP-9: τα HT-29 έχουν αναφερθεί να εκφράζουν MMP-2 αλλά όχι MMP-9 (Ko et al., 2005), ενώ κατ' άλλους εκφράζουν δραστικότητα και των δύο (Li et al., 2005; Matsuoka et al., 2000).

Οι *Bawadi και συν.* μέτρησαν δραστικότητα MMP-2 και MMP-9 και οι *Vishnubhotla και συν.* πρωτεΐνη τους στην κυτταροσειρά CaCO-2, αλλά στην περίπτωση αυτή τα διαφορετικά ευρήματα μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές στη μεθοδολογία (Bawadi et al., 2005; Vishnubhotla et al., 2007). Αντίθετα οι *Kermogrant και συν.* αμφισβήτησαν, όπως και εμείς, τη δραστικότητα MMP-9 ως πραγματικό εύρημα λόγω μη ανίχνευσης του αντίστοιχου mRNA, αλλά διαπίστωσαν δραστικότητα MMP-2, σε μεταγενέστερο όμως χρονικό σημείο από εμάς (Kermogrant et al., 2001). Όμως, οι *Kruidinier και συν.* δεν βρήκαν έκφραση mRNA MMP-2 και MMP-9 στα CaCO-2 σε συμφωνία με εμάς (Kruidenier et al., 2006) και παρόμοια ήταν τα ευρήματα των *Stahtea και συν.* (Stahtea et al., 2007). Στη βιβλιογραφία συναντούμε και αναφορά επαγωγής MMP-9 πρωτεΐνης και δραστικότητας από TNF-α στα CaCO-2 (Santana et al., 2006).

Εμείς σε πολλαπλά πειράματα δεν λάβαμε δραστικότητα αντίστοιχη με τα μοριακά βάρη MMP-2 και MMP-9 σε HT-29 ή CaCO-2 χρησιμοποιώντας ακόμη και υπερκείμενα μειωμένου όγκου σε σχέση με τον συνήθως χρησιμοποιούμενο για την καλυπτόμενη από



τα HT-29 ή τα CaCO-2 επιφάνεια. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι και οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές επιθηλιακών παχέος εντέρου έχουν πλούσιο κυτταρόπλασμα. Τα παραπάνω καθιστούν την πιθανότητα εσφαλμένης μη ανίχνευσης τέτοιας δραστηριότητας από τη στιγμή δε που με την ίδια τεχνική ανιχνεύαμε σταθερά δραστηριότητα MMP-2 και MMP-9 από κύτταρα με πολύ μικρότερο κυτταρόπλασμα, όπως οι SEMFs και τα 18CO όπως αναλύεται στις ενότητες 4.3.3 και 4.3.4. Μελέτες σε πρωτογενή εντερικά επιθηλιακά κύτταρα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή ως προς τον τρόπο απομόνωσης των επιθηλιακών, λόγω των επιμολύνσεων με μεσεγχυματικά κύτταρα του ίδιου χιτώνα (lamina propria) (Pedersen et al., 2008). Άλλωστε ανοσοϊστοχημικά δεν επιβεβαιώνεται η έκφραση ούτε MMP-1 και MMP-3 σε επιθηλιακά του φλεγμαίνοντος εντέρου με πιθανότητα αυτά να συνεισφέρουν μόνο MMP-7 και MMP-10 προς λύση της βασικής μεμβράνης (Daum et al., 1999; Matthes et al., 1993; Saarialho-Kere et al., 1996; Vaalamo et al., 1998).

Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι απομονωμένοι κολονικοί ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες από φλεγμαίνοντα και μη εντερικό ιστό, εξέφραζαν MMP-2 αλλά όχι MMP-9 (Baugh et al., 1999; McKaig et al., 2003). **Σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, δείξαμε ότι SEMFs και 18CO ιδιοσυστασιακά εξέφραζαν MMP-2. Η έκφρασή της ευρέθη σταθερή υπό την επίδραση των κυτταροκινών IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή του TGF-β1** (ενότητες 4.3.2.1.1, 4.3.2.1.2, 4.3.3.1) σε πλήθος πειραμάτων αντίθετα με σποραδικές αναφορές μείωσης της δραστηριότητας MMP-2 από τον TNF-α (Theiss et al., 2005) και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Yasui και συν. για την σταθερή έκφραση MMP-2 mRNA υπό IL-1β, TNF-α και TGF-β1 (Yasui et al., 2004). Αυτό είναι αναμενόμενο με βάση και τη δομή του προμώτορα του γονιδίου, που έχει αλληλουχία ομοιάζουσα με γονίδιο ιδιοσυστασιακά εκφραζόμενο (Price et al., 2001). Δεν εντοπίσαμε επίσης αδρές διαφορές στην αναλογία

προμορφής και ενεργού μορφής, όπως οι *Baugh και συν.* (Baugh et al., 1998b). Η MMP-2 είναι ιδιοσυστασιακά εκφραζόμενο ένζυμο με έκφραση που δεν επηρεάζεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή τροφικούς παράγοντες και σε άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως τα λεία μυϊκά αορτής (Fabunmi et al., 1996), αν και έχει δείχτεί ότι σε κάποια είδη μεσεγχυματικών κυττάρων η έκκριση και δραστικότητα τους αυξάνεται από άλλους παράγοντες, όπως ο VEGF και η φιμπρονεκτίνη σε μυοϊνοβλάστες ίριδας (Hoffmann et al., 2006). Η βασική έκκριση ικανών ποσοτήτων MMP-2 από τους SEMFs υποδεικνύει ότι οι SEMFs δυναμικά ελέγχουν τη σύνθεση και αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας.

Δεν μπορούν να αποκλεισθούν όμως διαφορές σε SEMFs από άλλα όργανα ή σε άλλα *in vivo* φλεγμονώδη περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, μειωμένη έκφραση ενεργού MMP-2 έχει βρεθεί σε ινοβλάστες δέρματος από χρόνια έλκη κάτω άκρων σε σχέση με αυτούς φυσιολογικού δέρματος (Cook et al., 2000). Επιπροσθέτως, αντίθετα με τη σταθερή έκφραση MMP-2 και σε πρωτογενείς SEMFs και σε 18CO στα πειράματά μας, που συμφωνεί και με προηγούμενα ευρήματα στα 18CO (Paduch and Kandefers-Szerszen, 2011), έκφραση MMP-2 παρουσιάζεται ως επαγωγίμη σε άλλες μεσεγχυματικές κυτταρικές σειρές, όπως οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα (Fredriksson et al., 2006).

Η IL-1 έχει αναφερθεί ως ερέθισμα παραγωγής MMP-9 και από ινοβλάστες ίριδας οφθαλμού (Lu et al., 2004), σε μεσαγγειακά κύτταρα (Eberhardt et al., 2000) και σε δερματικούς ινοβλάστες (Miyagi et al., 1995) και ο TNF-α σε εμβρυϊκούς (Shan et al., 2010). Μάλιστα η επαγωγή MMP-9 (όπως και ICAM-1) υπό την επίδραση TNF-α είναι εντονότερη σε Thy-1(-) εμβρυϊκούς ινοβλάστες και στο φαινόμενο έχουν κομβικό ρόλο οι Src family kinases (SFK), ενώ το ίδιο δεν ισχύει αν ο TGF-β1 είναι το ερέθισμα (Shan et al., 2010). Αντίθετα σε πνευμονικούς ινοβλάστες οι Sasaki και συν. διαπίστωσαν έκφραση και

δραστικότητα τόσο MMP-2 όσο προ-MMP-9 με τις IL-1β και TNF-α να επάγουν μόνο την ενεργοποίηση της δεύτερης σε MMP-9 (Sasaki et al., 2000; Shan et al., 2010). Στους SEMFs και την αντίστοιχη κυτταροσειρά 18CO που προέρχονται από το παχύ έντερο διαπιστώσαμε ότι κυρίως **ο TNF-α και δευτερευόντως ο IL-1α προκαλούσαν αθροιστική επαγωγή δραστηριότητας MMP-9. Αντίθετα η τρίτη των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η IFN-γ, μόνη της δεν προκαλούσε κάποιο αποτέλεσμα, αλλά όταν προσετίθετο στις προηγούμενες δύο ανέστελλε το επαγωγικό αποτέλεσμά τους** (ενότητα 4.3.2.2, Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Ένα από τα βασικά ενδοκυττάρια μηνύματα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών- ο NF-κB- έχει προταθεί ως αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για την επαγωγή της MMP-9 (Bocker et al., 2000; Bond et al., 1998). Το καθαρό όμως αποτέλεσμα και των τριών ήταν σχεδόν μηδενικό ως προς την επαγωγή της MMP-9. Αντίθετα σε ινοβλάστες πνεύμονα το αποτέλεσμα των ιδίων τριών κυτταροκινών είναι επαγωγή της MMP-9 (Zhu et al., 2001), γεγονός που υπονοεί την ειδική συμπεριφορά των εντερικών SEMFs στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ως προς την έκκριση MMP-9. Οι *Siwik και συν.* σε ινοβλάστες καρδιάς έδειξαν την επαγωγή από IL-1β και TNF-α, και οι *Pender και συν.* σε μεσεγχυματικά κύτταρα του ίδιου χιτώνα (*lamina propria*), αλλά δεν χρησιμοποίησαν IFN-γ σε συνδυασμό με τις προηγούμενες δύο επιδράσεις (Pender et al., 2000; Siwik et al., 2000). Ανάλογη δράση των τριών αυτών κυτταροκινών βρέθηκε στην προμορφή της MMP-9 σε CD3+ και CD4+ περιφερικά λεμφοκύτταρα (Johnatty et al., 1997). Σε αρτηριακά μυϊκά κύτταρα, αρθρικούς, δερματικούς και εμβρυικούς ινοβλάστες και ινοβλάστες ίριδας τα αποτελέσματα TNF-α και IL-1α μερικώς μόνο ομοιάζουν, με δισταμένα ευρήματα για τη δράση της IL-1α, αλλαγές και στην MMP-2 (σταθερή σε SEMFs και 18CO) και το ρόλο της IFN-γ ανεπαρκώς διερευνημένο (Bond et al., 1998; Fang et al., 2006; Hoffmann et al., 2006;

Roy et al., 2011; Shan et al., 2010; Wong et al., 2001; Zhang et al., 2011). Σε άλλο είδος μεσεγγυματικών κυττάρων, μυϊκά κύτταρα λείων μυών αρτηρίας, η IL-1 φαίνεται να μην επάγει MMP-9 mRNA, αλλά μόνο μαζί με τον PDGF, και με τη δραστικότητα MMP-9 στο υπερκείμενο πάλι να επηρεάζεται σημαντικά μόνο από το σύνδυασμό τους (Fabunmi et al., 1996), γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί από την ύπαρξη σημείων πρόσδεσης τόσο για τον NF-κB όσο και τον AP-1 στον promoter της MMP-9 (Sato et al., 1993; Sato and Seiki, 1993). Η διαφορετική συμπεριφορά των διαφορετικών μεσεγγυματικών κυτταροσειρών ως προς τις MMPs και η περιπλοκότητα της σχέσης μεταξύ μεταγραφής mRNA, σύνθεσης πρωτεΐνης και έκκρισής της επισημάνθηκε νωρίς στη βιβλιογραφία (Mackay et al., 1992). Αντίστοιχο φαινόμενο στην MMP-9 από ινοβλάστες χολαγγείων είναι εξαρτώμενο από τις focal adhesion kinases (FAK) (Mon et al., 2006). Έχει δειχθεί ότι η MMP-9 επηρεάζει και την ικανότητα των επιθηλιακών να προσκολλώνται στη διάμεση ουσία και να επουλώνουν πληγή (Castaneda et al., 2005).

Ως προς τις ενδοκυττάρειες οδούς επαγωγής της MMP-9, πολλές διαφορετικές προφλεγμονώδεις και άλλες οδοί ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια. Η επαγωγή της από FGF απαιτεί σηματοδότηση μέσω της MAP/ERK κινάσης 1 (MEK1) και του ERK (Liu et al., 2002). Επαγωγή MMP-9 από EGF εξαρτάται από τις ERK/p38 κινάσες και την κινάση 3 της φωσφατιδύλ-ινοσιτόλης. Η IL-1 απαιτεί φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη και MEK1-ERK για την επαγωγή MMP-9 (Ruhul Amin et al., 2003). Ο TNF-α απαιτεί σε κάποιες περιπτώσεις την σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου FAK- growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)/SOS (παράγοντας ανταλλαγής γουανιδύλ-νουκλεοτιδίων) (Mon et al., 2006). Αν και τα αρχικά σηματοδοτικά μόρια που απαιτούνται για την επαγωγή MMP-9 διαφέρουν ανάλογα με το ερέθισμα και το κύτταρο, οι οδοί φαίνονται να συγκλίνουν προς τις MEK1-

ERK κινάσες. Ο promotor του γονιδίου της MMP-9 περιέχει θέσεις δέσμευσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1, NF-κB και Sp-1 (Sato and Seiki, 1993). Η θέση AP-1 είναι απαραίτητη για την επαγωγή από τον TNF-α, αλλά απαιτεί την συνεργική επίδραση του NF-κB ή του Sp-1.

#### **4.4.3.3 Σύστημα επιθηλιακών- SEMFs**

Το προφίλ έκφρασης gelatinases που παρατηρήσαμε είναι διαφορετικό από το προφίλ που εκφράζεται στις συγκαλλιέργειες κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών δέρματος. Απομονωμένα κερατινοκύτταρα εκφράζουν MMP-2 και MMP-9 (Sawicki et al., 2005), ενώ τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν. Απομονωμένοι δερματικοί ινοβλάστες, όπως και οι SEMFs, εκφράζουν MMP-2, αλλά η συγκαλλιέργειά τους με κερατινοκύτταρα προκαλεί έκφραση MMP-2 και MMP-9 χωρίς να απαιτούνται επιπρόσθετα φλεγμονώδη ερεθίσματα (Sawicki et al., 2005). **Εμείς ανιχνεύσαμε δραστικότητα MMP-9 στις καλλιέργειες SEMFs, μόνο αφού διεγείραμε με υπερκείμενο επιθηλιακών που είχαν προδιεγερθεί με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και το φαινόμενο ήταν όμοιο σε SEMFs από ομάδα ελέγχου και από φλεγμίνουσα μη-ινωτική CD** (ενότητα 4.3.4.2, Εικόνα 11-Εικόνα 13), παρά το ότι οι ίδιες κυτταροκίνες άμεσα δεν είχαν στατιστικά σημαντική δράση πάνω στους ινοβλάστες, λόγω της ανασταλτικής δράσης της IFN-γ επί της επαγωγής που προκαλούσαν οι IL-1α και TNF-α (ενότητα 4.3.2.2, Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Άσχετα με την κυτταρική πηγή η ύπαρξη ενός τέτοιου κυκλώματος στο έντερο θα μπορούσε να αντιπροσωπεύσει ένα μηχανισμό όπου επιθηλιακά κύτταρα εκτιθέμενα στη φλεγμονή διευκολύνουν την πρόσβαση των φλεγμονωδών κυττάρων στο επιθήλιο μέσω ινωδολυτικής δραστηριότητας των μυοϊνοβλαστών στον υποεπιθηλιακό συνδετικό ιστό. Αυτό βέβαια θα είχε κόστος την διαταραχή της ιστικής αρχιτεκτονικής και την εξέγκωση του

βλεννογόνου. Τα ευρήματα ως προς αδιέγερτες συγκαλλιέργειες επιθηλιακών με μυοϊνοβλάστες είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα υπό διαφορετικές βέβαια πειραματικές συνθήκες προσθήκης σφαιριδίων HT-29 σε θρεπτικό καλλιέργειας προσκολλημένων σε υπόστρωμα καλλιέργειας 18CO (Paduch and Kandefér-Szerszen, 2011).

#### 4.4.3.3.1 Ενδοθηλίνες

**Η επαγωγή της MMP-9 από το υπερκείμενο προδιεγερμένων επιθηλιακών διαπιστώσαμε ότι μεσολαβείται από τους υποδοχείς των ενδοθηλινών των SEMFs και συγκεκριμένα από τον υποδοχέα τύπου A (endothelin receptor A- ETR-A) με τον ETR-B να μην έχει ρόλο στο φαινόμενο και αυτό ήταν αληθές τόσο για SEMFs από ομάδα ελέγχου όσο και για SEMFs από φλεγμαίνουσα μη-ινωτική CD (ενότητα 4.3.4.3.4, Εικόνα 18 και Εικόνα 19). Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας νέας επιπρόσθετης οδού αύξησης της MMP-9 στην εντερική φλεγμονή που περιλαμβάνει τη συνεργασία μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και SEMFs μέσω του υποδοχέα ενδοθηλινών A.**

Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι σημαντική πηγή ενδοθηλινών, όπως έχει δειχθεί στο βρογχικό δένδρο (Ackerman et al., 1995; Springall et al., 1991; Vittori et al., 1992). Έκκριση ενδοθηλινών επάγεται και σε δερματικά επιθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση ποικίλων προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως IL-1, TNF-α και LPS (Corder et al., 1995; Golden et al., 1995; Yoshizumi et al., 1990; Ziesche et al., 1996), μέσω ενδοκυττάρων οδών που μερικώς τουλάχιστον ελέγχονται από τον NF-κΒ (Woods et al., 2000). Η ενδοθηλίνη δυνητικά αυξάνεται είτε στα επιθηλιακά κύτταρα είτε στους μυοϊνοβλάστες και δύναται να δρα παρακρινώς ή αυτοκρινώς. Η επιθηλιακή κυτταρική σειρά HT-29 έχει επιβεβαιωθεί ότι παράγει mRNA και εκκρίνει ενδοθηλίνες 1 και 2 (Ali et al., 2000; Bell and Chaplin, 1998;

Eberl et al., 2000; Peduto Eberl et al., 2003). Επίσης τα CaCO-2 εκφράζουν ενδοθηλίνη 1 και 3 και τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασής της ως απάντηση σε πλειάδα ερεθισμάτων (Ignatenko et al., 2004).

Επίσης έχει δειχθεί ότι η ενδοθηλίνη μόνη της ή σε συνέργεια με τον TGF-β1 μπορούν να έχουν δράση στο φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων. Για παράδειγμα, οι ενδοθηλίνες 1 και 3 αλλάζουν την αστεροειδή μορφολογία των 18CO σε δισκοειδή (Valentich et al., 1997) και αυξάνουν συνεργικά με τον TGF-β1 την παραγωγή α-SMA από ινοβλάστες δέρματος δίνοντάς τους φαινότυπο μυοϊνοβλάστη (Krieg et al., 2007). Προηγούμενες μελέτες πάνω σε πειραματική καρδιακή ίνωση προκαλούμενη από υπέρταση έδειξαν ότι ο ETR-A αυξάνει την έκφρασή του και οι ανταγωνιστές του μπορούν να εμποδίσουν την ινωδολυτική δραστικότητα σε καρδιακό ιστό (Ammarguella et al., 2002) υποσημαίνοντας τον κρίσιμο ρόλο του στην ισορροπία ίνωσης- ινωδολύσης σε ένα άλλο όργανο. Η επαγωγή της MMP-9 ευρέθη εξαρτώμενη από τον υποδοχέα A ενδοθηλινών χρησιμοποιώντας ειδικό αναστολέα και ανεξάρτητη από τον υποδοχέα B και σε αυτό το μοντέλο νόσου. Ο ρόλος των ενδοθηλινών επισημαίνεται ακόμη στη μελέτη των *Kambas και συν.* πάνω σε SEMFs υπό την επίδραση βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (bronchoalveolar lavage- BALF) από ασθενείς με βρογχοπνευμονική δυσπλασία: ανήκουν στους παράγοντες του BALF που προκαλούν επίταση της παραγωγής κολλαγόνου και αύξησης της επουλωτικής ικανότητάς τους (Kambas et al., 2011). Σε μοντέλα αθηροσκλήρωσης με εφαρμογή δακτυλίου (Reel et al., 2009), υπερτασικών αρουραίων με χορήγηση δεοξυκορτικοστερόνης (Ammarguella et al., 2002), αρουραίων υποκείμενων σε stress (Ergul et al., 2003) και μοντέλο μετεμφραγματικής ιστικής αναδιαμόρφωσης (Podesser et al., 2001) *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η χορήγηση ειδικών για τον ETR-A ή μη αναστολέων μειώνουν τη δραστικότητα

MMP-2 και MMP-9 στις εν λόγω περιοχές. Αντίστροφα η ET-1 μέσω ETR-A έχει δειχθεί να επάγει κυτταρική κίνηση μέσω MMP-2 και MMP-9 σε λεία μυϊκά κύτταρα (Kitamura et al., 2002; Rosano et al., 2001).

Ο CTGF δεν ήταν προαπαιτούμενος για την επικοινωνία μεταξύ των κολονικών επιθηλιακών κυττάρων και των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών, που είχε ως αποτέλεσμα την έκφραση MMP-9 από τα δεύτερα, αν και ο CTGF βρέθηκε επαγόμενος από τα επιθηλιακά σε φλεγμονώδες περιβάλλον στους SEMFs (Εικόνα 15). Επίσης θα μπορούσε να θεωρηθεί downstream των ενδοθηλινών σε πνευμονικούς αλλά και σε ινοβλάστες από σκληρόδερμα, καθώς έχει αναφερθεί ως γονίδιο του οποίου μειώνεται η μεταγραφική δραστηριότητα και η επακόλουθη πρωτεϊνική έκφραση ως απάντηση σε αναστολέα και των δύο υποδοχέων ενδοθηλινών (Shi-Wen et al., 2007).

Έχει διαπιστωθεί σαφής επαγωγή μεταγραφής σχετικών γονιδίων από τον ενεργοποιημένο παράγοντα VII της πήξης (Camerer et al., 2000) και, αντίστροφα, υπάρχουν ισχυρά ευρήματα προς την κατεύθυνση συμμετοχής παραγόντων πήξης και ειδικά του TF σε ανάλογες πειραματικές παρατηρήσεις σε άλλα συστήματα (Kambas et al., 2011). Η θρομβίνη ακόμη έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί ενζυμικά πολλές μεταλλοπρωτεάσες, αλλά και σε συνέργεια με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αυξάνει την μεταγραφή MMPs και μειώνει αυτή των TIMPs (Fang et al., 2006). Ακόμη υπάρχουν δεδομένα για επαγωγή CTGF και άλλων ρυθμιστικών της σύνθεσης και αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας παραγόντων από τον ενεργοποιημένο παράγοντα VII και τον TF του συστήματος πήξης σε ινοβλάστες (Pendurthi et al., 2000). Επίσης, η θρομβίνη έχει βρεθεί ως παράγοντας που διεγείρει τη δραστηριότητα MMP-9 στο υπερκείμενο κυττάρων λείου μυός αρτηρίας (Fabunmi et al., 1996). Αντίθετα, στο πειραματικό μοντέλο επιθηλιακών- SEMFs, το κύκλωμα δεν ευρέθη



εξαρτώμενο από τους παράγοντες πήξης, εφόσον η προσθήκη αντιθρομβίνης-III δεν επηρέασε το φαινόμενο (ενότητα 4.3.4.3.3, Εικόνα 17).

#### 4.4.4 Κολλαγόνο

##### 4.4.4.1 Εντερικός βλεννογόνος

Το κομβικό τελικό γεγονός που προκαλεί εντερική ίνωση είναι η υπερπαραγωγή και συσσώρευση κολλαγόνου. Νόσο μοντέλο εντερικής ίνωσης αποτελεί η κολλαγονώδης κολίτις, στην οποία όμως η ίνωση δεν επηρεάζει την ιστική αρχιτεκτονική του εντερικού υποβλεννογόνιου χιτώνα, αλλά αυξάνει το κολλαγόνο I, III, VI και την τενασκίνη του ιδίου χιτώνα (*lamina propria*) (Aigner et al., 1997; Gunther et al., 1999). Σε ινωτικό ιστό από CD έχουν δειχθεί εκσεσημασμένες επαγωγές στην έκφραση mRNA και πρωτεΐνης για τα κολλαγόνα τύπου I, III και IV, αλλά και αύξηση της αναλογίας κολλαγόνου III:I με μελέτες ανοσοϊστοχημικές, *in situ* υβριδισμού και γονιδιακής έκφρασης (Graham, 1995; Lang et al., 2009; Lawrance et al., 2001c; Pucilowska et al., 2000a; von Lampe et al., 2000). Η αύξηση της αναλογίας κολλαγόνου III:I παρατηρείται, αν και όχι τόσο εκσεσημασμένη όσο σε ινωτικά τμήματα, και σε όλες τις στιβάδες του εντέρου από φλεγμαίνοντα τμήματα CD, αλλά και- απρόσμενα- στον υποβλεννογόνο UC (Lawrance et al., 2001c; Matthes et al., 1992). Η αύξηση του λόγου αυτού δεν είναι ίδιον της ίνωσης του εντέρου και παρατηρείται τόσο στη νοσολογία άλλων οργάνων όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα (Haukirygo, 1991; Lehto et al., 1985; Merkel et al., 1988).

Σε μοντέλο επαγωγής κολίτιδας με TNBS σε ποντικούς αυξάνεται το περιεχόμενο του εντέρου σε κολλαγόνο, ειδικά στον υποβλεννογόνο, και διαταράσσεται η ιστική αρχιτεκτονική (Koon et al., 2010; Lawrance et al., 2003). Παρατηρείται αυξημένη έκφραση

κολλαγόνου I (Lawrance et al., 2003) και οι μυοϊνοβλάστες δεν περιορίζονται σε ένα λεπτό υποεπιθηλιακό στρώμα, αλλά επεκτείνονται στο χόριο (Lawrance et al., 2003). Ο προϊνωτικός ρόλος του TGF-β1 έχει προταθεί στην ινωτική διεργασία και άλλων οργάνων, με τις μελέτες να επικεντρώνονται στον πνεύμονα. Ακόμη, στο ίδιο όργανο η χρόνια υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-1, με τεχνική διαμόλυνσης (transfection) δεν καταλήγει σε πνευμονική ίνωση αν οι ποντικοί είναι knockout για το γονίδιο SMAD3 που κωδικοποιεί το κυριότερο ενδοκυττάριο μηνυματοφόρο μόριο της οδού του TGF-β (Bonniaud et al., 2005). Η αδρανοποίηση της οδού όμως δεν αλλάζει τον παθολογοανατομικό βαθμό φλεγμονής, ώστε η ίνωση να θεωρηθεί έμμεσο αποτέλεσμα της αντιφλεγμονώδους δράσης του TGF-β (Bonniaud et al., 2005). Με την αντίστροφη μεθοδολογία απόδειξης, επανειλημμένη χορήγηση TGF-β σε ποντίκια προκαλούσε υποδόρια δερματική ίνωση με αυξημένη μεταγραφή κολλαγόνου σε ινοβλάστες και εξωκυττάρια συσώρευσή του (Chujo et al., 2005).

Σε μελέτες στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων που συνδέονται με την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, χωρίς μια ισορροπημένη αύξηση της παραγωγής MMPs σε CD αλλά όχι UC, μια παρατήρηση που μπορεί να εξηγήσει γιατί ίνωση και στένωση παρατηρούνται συνήθως σε CD (Lawrance et al., 2001a). Παρόμοια ευρήματα ανισορροπίας ανάμεσα σε προϊνωτικούς και ινωδολυτικούς παράγοντες υπήρξαν σε TNBS μοντέλο κολίτιδος, όπου σημειώνονται επίσης αυξημένα επίπεδα mRNA για κολλαγόνο I (έλικα α2) και TIMP-1 μεταξύ άλλων, αλλά μόνο για μία από τις πρωτεΐνες MMPs (MMP-1) (Lawrance et al., 2003).

#### 4.4.4.2 SEMFs

Πρωτογενείς εντερικοί μυοϊνοβλάστες σε καλλιέργεια εκφράζουν διάφορες ισομορφές κολλαγόνου (Poureyron et al., 2003). Πρώιμες αναφορές αναφέρουν αυξημένη έκφραση κολλαγόνου III σε ινοβλάστες απομονωμένους από εντερικές στενώσεις ασθενών με CD και αυτή περαιτέρω επιτάθηκε από τον TGF-β1 (Stallmach et al., 1992). Οι SEMFs που προέρχονται από το φλεγμιαίνον εντερικό περιβάλλον UC ή CD παρουσιάζουν ήπια αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου και ήπια αυξημένη απαντητικότητα ως προς την παραγωγή αυτή σε TGF-β1, FGF και IGF-I (Di Sabatino et al., 2009; Lawrance et al., 2001b). Ακόμη επί τη βάση πειραματικών ευρημάτων με τη χρήση αδρανοποιητικού του TNF-α αντισώματος έχει υποστηριχθεί μια ήπια δράση της κυτταροκίνης αυτής στην παραγωγή κολλαγόνου από τους SEMFs (Di Sabatino et al., 2007). Σε 18CO οι *Simmons και συν.* υποστήριξαν ήπια επαγωγή του ενδοκυττάριου προκολλαγόνου I από τον TGF-β1 και τον IGF-I, αλλά στις αντίστοιχες εικόνες western blot σαφώς τα δείγματα εμφανώς δεν είναι ισοφορτωμένα (Simmons et al., 2002). Εξάλλου, δύο άλλες μελέτες αργότερα δεν μπόρεσαν να επιβεβαιώσουν στατιστικά σημαντική επαγωγή επαναλαμβάνοντας παρόμοια πειράματα (Koon et al., 2010; Okuno et al., 2002). Οι *Theiss και συν.* έδειξαν επαγωγή του mRNA και πρωτεΐνης του ενδοκυττάριου προκολλαγόνου I από τον TNF-α μέσω του υποδοχέα 2 του TNF-α (TNFR2) (Theiss et al., 2005). Αυξημένη μεταγραφή κολλαγόνου τύπου I υπάρχει εγγενώς και σε μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από άλλες ινωτικές νόσους όπως το σκληρόδερμα (Shi-Wen et al., 2007).

Στη μελέτη μας μετρήσαμε ολικό κολλαγόνο με τη μέθοδο Sirius Red επιθυμώντας να αξιολογήσουμε τη βασική συνιστώσα της συνολικής παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας. Δείξαμε ότι οι SEMFs σε καλλιέργεια εκκρίνουν μικρά ποσά κολλαγόνου, τα οποία είναι στα

κατώτερα όρια της μεθόδου ανίχνευσης και αυτό δεν άλλαξε με IL-1α, TNF-α, IFN-γ ή οποιοσδήποτε συνδυασμό αυτών ούτε με επίδραση εξωγενούς TGF-β1. Στραφήκαμε κατόπιν στη μέτρηση με την ίδια μέθοδο του ολικού ενδοκυττάριου κολλαγόνου. Επιβεβαιώσαμε την **αυξημένη παραγωγή ολικού κολλαγόνου ex vivo από SEMFs απομονωμένους από φλεγμαίνουσα μη-ινωτική CD** (Εικόνα 24). Διαπιστώσαμε ακόμη ότι **οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή ο εξωγενής TGF-β1 δεν τροποποίησαν στατιστικά σημαντικά την ενδοκυττάρια παραγωγή ολικού κολλαγόνου στις 24 h** (ενότητα 4.3.5.2, Εικόνα 21). Οι *Lawrance και συν.* διαπίστωσαν επαγωγή ολικού κολλαγόνου από TGF-β1 μόνο σε SEMFs προερχόμενους από φλεγμαίνον έντερο, μετρούμενου όμως με διαφορετική έμμεση ραδιολογική μέθοδο ανίχνευσης ολικής πρωτεΐνης προ και μετά την πέψη με κολλαγενάση IV (*Lawrance et al., 2001b*). Εδώ οφείλουμε να επισημάνουμε ότι θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί στη σύγκριση μεταξύ αποτελεσμάτων ειλημμένων με διαφορετικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις. Έχει επίσης αναφερθεί επαγωγή από TGF-β1 του mRNA για προκολλαγόνο I σε εντερικούς μυοϊνοβλάστες (*Han et al., 2000*), αλλά και το αντίθετο (*Martens et al., 1992*). TGF-β2 και ET-1 όμως έχουν δειχθεί ότι ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο διαμεσολαβούν μεταξύ μηχανικής έλξης του υποστρώματος της διάμεσης ουσίας και παραγωγή της αύξησης του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κολλαγόνου σε μυοϊνοβλάστες πνεύμονα (*Swartz et al., 2001; Tschumperlin et al., 2003*). Επίσης αξίζει αναφοράς η αναστολή της επαγωγής mRNA κολλαγόνου I σε εντερικούς μυοϊνοβλάστες αρουραίων από πεπτιδογλυκάνες- πολυσακχαρίτες του βακτηριακού τοιχώματος αν ανασταλεί ο TGF-β1 (*van Tol et al., 1999*). Η επαγωγή κολλαγόνου από τον TGF-β1 έχει αναφερθεί ηπιότατη και σε μυοϊνοβλάστες άλλων οργάνων, όπως σε αυτούς του μυοκαρδίου (*Eghbali et al., 1991*). Πάντως η προβολή αποτελεσμάτων από μεσεγγυματικά

κύτταρα ενός συστήματος σε άλλο συχνά αποδεικνύεται λανθασμένη, όπως δείχνουν άλλωστε και μελέτες ευθείας σύγκρισης (Martens et al., 1992).

Έχει αναφερθεί σε κυτταροσειρά ινοβλαστών από ινοσάρκωμα ότι η IFN- $\gamma$  καταστέλλει τη σύνθεση κολλαγόνου μέσω της ικανότητας των ενδοκυττάρων μηνυμάτων της Stat1 να ανταγωνίζονται με το μεταγραφικό συμπράγοντα P300 (Ghosh et al., 2001). Πιο πρόσφατα, μια εναλλακτική IFN- $\gamma$  ενδοκυττάρια σηματοδότηση προτάθηκε επί τη βάση πειραματικών ευρημάτων για τη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου για την έλικα  $\alpha 2$  του κολλαγόνου I: η οδός Jak1/CK2/YB-1 (Higashi et al., 2003). Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός που εμπλέκει και το YB-1 και το Stat1 ήταν απαραίτητος για την μεταγραφική καταστολή του γονιδίου μέσω ανταγωνισμού με το SMAD 3 για τον συμπράγοντα P300 (Higashi et al., 2003). Έτσι, TGF- $\beta$  και IFN- $\gamma$  ασκούν αντίθετες δράσεις στη σύνθεση κολλαγόνου. Στους πρωτογενείς όμως SEMFs από υγιές έντερο που χρησιμοποιήσαμε και σε χρόνο που ελέγχει άμεσες επιδράσεις δεν διαπιστώσαμε απαντήσεις ως προς μεταβολές της παραγωγής κολλαγόνου από τον TGF- $\beta$  ούτε κάποια δράση της IFN- $\gamma$ , αντίθετα με έμμεσα ευρήματα με αναστολή δράσης του T $\beta$ R-I των *Chen και συν.* σε ινοβλάστες σκληροδέρματος ως προς τον TGF- $\beta$ 1 (Chen et al., 2006; Chen et al., 2005). Πνευμονικοί ινοβλάστες έχουν διαφορετική συμπεριφορά με την IL-1 $\beta$  να επάγει, και τον TNF- $\alpha$  να αναστέλλει την παραγωγή κολλαγόνου (Elias et al., 1990; Sasaki et al., 2000). Όμοια δράση έχει ο TNF- $\alpha$  στο κολλαγόνο του καρδιακού μυός με *in vivo* μάλιστα αποτέλεσμα την διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (Bryant et al., 1998; Kubota et al., 1997) και σε ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (Hernandez et al., 2000).

#### 4.4.4.3 Σύστημα επιθηλιακών- SEMFs

Σε αντίθεση με τα αρνητικά αποτελέσματα ως προς την αύξηση παραγωγής κολλαγόνου υπό την επίδραση κυτταροκινών ή TGF-β1, παρατηρήσαμε σαφή αύξηση υπό την επίδραση υπερκειμένου επιθηλιακών, που ήταν αξιόλογη και σταθερά στατιστικά σημαντική όταν τα επιθηλιακά είχαν πριν εκτεθεί σε φλεγμονώδες περιβάλλον (ενότητα 4.3.6.1, Εικόνα 22). Το φαινόμενο ήταν όμοιο είτε χρησιμοποιούσαμε SEMFs είτε από ομάδα ελέγχου είτε από φλεγμαίνουσα μη-ινωτική CD (Εικόνα 24). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά των *Kambas και συν.* σε ένα διαφορετικό σύστημα: το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage- BALF) επίσης αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου, αλλά και την έκφραση του προϊνωτικού CTGF, από τους SEMFs (*Kambas et al., 2011*). Επίσης είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα πειραμάτων που αφορούν το δέρμα, στα οποία η συγκαλλιέργεια κερατινοκυττάρων με ινοβλάστες, προκάλεσε αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου I, IV, V, VI στους ινοβλάστες και τους προσέδιδε φαινότυπο μυοϊνοβλαστών με την έκφραση α-SMA (*Shephard et al., 2004b*). Όμως, η κυτταρική επαφή και σηματοδότηση με TGF-β1 απαιτούνταν και η IL-1α ανέστελλε το μονοπάτι αυτό στις πειραματικές συνθήκες των *Shephard και συν.* (*Shephard et al., 2004a; Shephard et al., 2004b*). Πλην της επίδρασης στο κολλαγόνο, πρόσφατα απομονωμένοι εντερικοί μυοϊνοβλάστες έχει επίσης διαπιστωθεί ότι σε συγκαλλιέργεια με επιθηλιακά αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των δευτέρων όταν βρίσκονται σε πρώιμες διαιρέσεις (*Pourreyron et al., 2003*). Το ότι στον βλεννογόνο ινωτικής CD η υπερβολική παραγωγή κολλαγόνου και άλλων παραγόντων εν πολλοίς δεν βασίζεται σε εγγενή χαρακτηριστικά των κυττάρων και δη των μυοϊνοβλαστών πιστοποιείται από το γεγονός ότι σε μελέτη γονιδιακής ανάλυσης μυοϊνοβλάστες από ινωτικό έντερο CD χωρίς επιδράσεις

γενικά δεν υπερεκφράζουν ή υποεκφράζουν την πληθώρα γονιδίων που έχουν ταυτοποιηθεί σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Εκφράζουν μόνο αυξημένο mRNA κολλαγόνου III και ένα εναλλακτικό μεταγράφημα της φιμπρονεκτίνης και κατά τα άλλα έχουν ίδια έκφραση με τους μυοϊνοβλάστες από φυσιολογικό εντερικό ιστό χωρίς επιδράσεις (Lang et al., 2009). Εμφανίζουν όμως μειωμένο mRNA για κολλαγόνο I και τον υποδοχέα του (Lang et al., 2009), εύρημα που επιβεβαιώνει την αλλαγή στην αναλογία κολλαγόνου I:III που έχει επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Διαφορές υπάρχουν και στους ινοβλάστες φλεγμαινουσών περιοχών σε σχέση με αυτούς της ομάδας ελέγχου με αυξημένη έκφραση mRNA για κολλαγόνο I και MMP-1, αλλά και μεταξύ αυτών που προέρχονται από ινωτικές και αυτών από φλεγμαινουσες περιοχές (Lang et al., 2009). Πάντως οι διαφορές αυτές δεν είναι πολλές, δεν αφορούν γονίδια που ενεργοποιούν μηχανισμούς ίνωσης- αλλά τελικά προϊόντα ίνωσης, οι περισσότερες δεν είναι ποσοτικά αξιόλογες και κατά συνέπεια απομακρύνουν από μηχανισμούς εγγενούς/επιγενετικής βλάβης μεσεγχυματικών κυττάρων ως αιτίας ίνωσης: μάλλον η επικοινωνία με άλλα κύτταρα απαιτείται για την ανάπτυξή της και προς αυτό στράφηκε η μελέτη μας.

Πάντως σύμφωνα με μία άλλη οπτική που στηρίζεται κυρίως σε ευρήματα από συστήματα μελέτης της επούλωσης πληγών δέρματος, δεν είναι απαραίτητο ότι η αύξηση του κολλαγόνου δρα μόνο σε όφελος της επούλωσης. Η λύση της ενδοκυττάριας ουσίας επιτρέπει τη μετανάστευση κυττάρων και δρομολογεί την ορθή επούλωση, μειώνοντας την πιθανότητα ανορθόδοξης, υπερβολικής ή ανεπαρκούς επούλωσης (Garner, 1998; Kratz et al., 1995). Πάντως δεν έχει ταυτοποιηθεί μοναδικός παράγοντας που να μεσολαβεί την επούλωση και επανεπιθηλιοποίηση σε τραύματα του δέρματος.

#### 4.4.4.3.1 Μεσολαβητές

Θελήσαμε να διερευνήσαμε περαιτέρω το μηχανισμό της συσσώρευσης κολλαγόνου με μελέτες εξουδετέρωσης και αναστολής. Από τα πολλά δυνητικά μόρια- μεσολαβητές ίνωσης, τρεις οδοί φάνηκαν ως πρωταρχικής σημασίας: ο TGF-β, η ET-1 και ο CTGF (Krieg et al., 2007). Στο σύστημα δερματικών κερατινοκυττάρων και δερματικών ινοβλαστών η παρουσία και του TGF-β1 και της ET-1 προαπαιτούνται για την *in vitro* φαινοτυπική αλλαγή των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες όπως αυτή αποδεικνύεται από την επαγωγή α-SMA και τη συστολή των συγκαλλιέργειών και ο GM-CSF αναστέλλει το φαινόμενο (Shephard et al., 2004a).

**Αποκαλύψαμε ότι ο TGF-β1 δεν είναι ούτε απαραίτητη ούτε ικανή από μόνη της συνθήκη για την άμεση αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από τους SEMFs υπό την επίδραση προεπωασμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επιθηλιακών και αυτό ήταν αληθές για SEMFs είτε από ομάδα ελέγχου είτε από φλεγμαίνουσα μη-ινωτική CD (ενότητα 4.3.6.2.1, Εικόνα 23)**

Ούτε η εξουδετέρωση των ETR-A ή ETR-B ή και των δύο υποδοχέων ενδοθηλινών εμπόδισαν την επαγόμενη από τα επιθηλιακά κύτταρα έκφραση κολλαγόνου (Krieg et al., 2007) (ενότητα 4.3.6.2.4, Εικόνα 23). **Επομένως, οι ενδοθηλίνες δεν αποτελούν τμήμα της επικοινωνίας μεταξύ εντερικών επιθηλιακών και SEMFs (ομάδας ελέγχου ή CD) ως προς την προϊνωτική οδό σε αντίθεση με τα ισχύοντα για την ινωδολυτική** (ενότητα 4.3.4.3.4, Εικόνα 18 και Εικόνα 19). Αντίθετα στο σύστημα SEMFs υπό την επίδραση BALF το φαινόμενο της αύξησης παραγωγής κολλαγόνου ευρέθη εξαρτώμενο από την ET-1 (Kambas et al., 2011). Επίσης η ενδοθηλίνη 1 ευρέθη επάγουσα mRNA και πρωτεΐνη των ισομορφών



κολλαγόνου I και VI σε μεσεγχυματικά κύτταρα του τετρημένου πετάλου του ηθμοειδούς και το φαινόμενο ευρέθη εξαρτώμενο και από τους δύο υποδοχείς ενδοθηλινών ETR-A και ETR-B (Rao et al., 2008). Σε μοντέλα αθηροσκλήρωσης με εφαρμογή δακτυλίου, *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η χορήγηση μη ειδικού αναστολέα και των δύο υποδοχέων ενδοθηλινών μειώνει το πάχος του ίδιου χιτώνα στις εν λόγω αρτηριακές περιοχές (Reel et al., 2009). Όμως παρόμοια αποτελέσματα δεν ίσχυσαν στην περίπτωση του συστήματός μας (ενότητα 4.3.6.2.3, Εικόνα 23). Σε άλλα πειραματικά συστήματα, όπως η ηπατική ίνωση με CCl<sub>4</sub> (Thirunavukkarasu et al., 2004) και το κεντρικό νευρικό σύστημα (He et al., 2007a; Koyama et al., 2007), η ενδοθηλίνη έχει αναφερθεί να επάγει TIMPs και με αυτό τον τρόπο να δρα προϊνωτικά. Σε καρδιαγγειακό και πνευμονικό ιστό η ET-1 επάγει τη σύνθεση κολλαγόνου μέσω του υποδοχέα ETR-A (Hafizi et al., 2004; Rodriguez-Vita et al., 2005), ενώ στο δέρμα και το ήπαρ μέσω του ETR-B (Gandhi et al., 2000; Shi-Wen et al., 2001). Υπάρχουν ενδείξεις εμπλοκής του ETR-A στη γενικότερη ρύθμιση της ομοιόστασης του της εξωκυττάριας ουσίας, ενώ του ETR-B μόνο στην παραγωγή κολλαγόνου (Guarda et al., 1993; Shi-Wen et al., 2001; Tostes et al., 2002). Χρόνια έκθεση ινοβλαστών σε ET-1 προκαλεί επαγωγή του ETR-β και επάγει σύνθεση κολλαγόνου (Iwasaki et al., 1995) και αντίστροφα η αναστολή του φαινομένου αυτού μειώνει την παραγωγή κολλαγόνου σε ηπατικούς ινοβλάστες (Chi et al., 2003).

Ο CTGF έχει βρεθεί αυξημένος σε ινοβλάστες του ορογόνου προερχόμενους από έντερο και περαιτέρω επάγεται από τον TGF-β σε αυτούς, με τον TNF-α να αναστέλλει την επαγωγή αυτή (Beddy et al., 2006). Επίσης ινοβλάστες απομονωμένοι από σκληρόδερμα εκφράζουν εγγενώς αυξημένο CTGF mRNA και πρωτεΐνη και η αναστολή των υποδοχέων ενδοθηλίνης μειώνει την παραγωγή αυτή (Shi-Wen et al., 2007). **Παρά την αύξηση του**

CTGF στους SEMFs από υπερκείμενα διεγερμένων επιθηλιακών (Εικόνα 15), δεν παρατηρήθηκαν αποτελέσματα στην παραγωγή κολλαγόνου με την εξουδετέρωσή του και αυτό ήταν αληθές για SEMFs από ομάδα ελέγχου όσο και από CD (Krieg et al., 2007) (4.3.6.2.2, Εικόνα 23).

Σε πρόσφατες μελέτες οι *Kambas και συν.* έδειξαν ότι η ενεργοποίηση από την ET-1 της οδού θρομβίνης/ TF συνεισέφερε στην πνευμονική ίνωση μέσω αυξημένης έκφρασης κολλαγόνου από μυοϊνοβλάστες. Αυτή η οδός θα μπορούσε να απενεργοποιείται με την εξουδετέρωση της θρομβίνης ή του TF (Kambas et al., 2011; Mitroulis et al., 2011). Όμως στο σύστημά μας που αφορούσε την εντερική ίνωση η εξουδετέρωση του TF ή της θρομβίνης σε SEMFs διεγερόμενους με υπερκείμενα επιθηλιακών απέτυχε να αναστείλει το φαινόμενο. Αυτό επιδεικνύει τις διαφορετικές οδούς ίνωσης στο εντερικό μικροπεριβάλλον σε σχέση με το πνευμονικό.

## 4.4.5 Κινητικότητα / Πολλαπλασιασμός SEMFs

### 4.4.5.1 Άμεσα αποτελέσματα προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή TGF-β1

Τέλος, μελετήσαμε *in vitro* με τη δοκιμασία επούλωσης πληγής το αποτέλεσμα του φλεγμονώδους περιβάλλοντος στη μετανάστευση των SEMFs. Παρατηρήσαμε ότι **οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IFN-γ καθυστερούσαν την επούλωση**, ενώ η IL-1α δεν είχε κάποιο ρόλο στο ίδιο φαινόμενο (ενότητα 4.3.7.1, Εικόνα 26). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συνάφεια με την αναφορά αύξησης του ρυθμού επούλωσης με τη χρήση αδρανοποιητικού του TNF-α αντισώματος (Di Sabatino et al., 2007). Επίσης είναι σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιεύσεις που έδειξαν ένα έλλειμμα στη δυνατότητα

επούλωσης *in vitro* από μυοϊνοβλάστες του ιδίου χιτώνα (*lamina propria*) που είχαν εκτεθεί σε φλεγμονή, καθώς είχαν απομονωθεί από εντερικό ιστό ασθενών με CD, και ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα των TNF-α και IFN-γ, αλλά μόνο σε πειράματα προσθήκης τους σε υπερκείμενο καλλιιεργειών μυοϊνοβλαστών (Di Sabatino et al., 2009; Leeb et al., 2003). Με διαφορετική μεθοδολογία και σε άλλους χρόνους, αξιολογώντας μόνο την κυτταρική κινητικότητα (με μεθοδολογία θαλάμου Boyden) και χωρίς το αιφνίδιο ερέθισμα κάλυψης κενού χώρου, μυοϊνοβλάστες από CD ή UC ή μυοϊνοβλάστες προεπωασμένοι με TNF-α ή IFN-γ έχουν αναφερθεί έχοντας μειωμένη κινητικότητα (Leeb et al., 2003).

Επιπροσθέτως, διαπιστώσαμε ότι ο TGF-β1 δόσοεξαρτώμενα επιταχύνει την επούλωση (ενότητα 4.3.7.2, Εικόνα 27). Χρησιμοποιώντας άλλη πειραματική μεθοδολογία οι Brenmoehl και συν. καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο TGF-β1 αφ' εαυτού δεν έχει δράση στην μετανάστευση ινοβλαστών του ιδίου χιτώνα, αλλά και αναστέλλει κυρίως την επαγωγική δράση του PDGF και λιγότερο άλλων κυτταροκινών, όπως οι IGF-I, EGF (Brenmoehl et al., 2009). Τα διαφορετικά ευρήματα θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν οι διαφορετικές παράμετροι φυσιολογίας που αξιολογεί η εκτίμηση της κυτταρικής μετανάστευσης και ο θάλαμος Boyden. Οι Leeb και συν. επιβεβαιώνουν τη δράση του TGF-β1 στην κινητικότητα μυοϊνοβλαστών προερχόμενων από όλο το εντερικό τοίχωμα ομάδας ελέγχου αν αυτός προστεθεί σε υπερκείμενο των ίδιων κυττάρων σε πειράματα παρόμοια αλλά όχι ίδια με τα δικά μας (Leeb et al., 2002). Συμφωνούμε με τους Di Sabatino και συν. ότι εξωγενής TGF-β1 προάγει την επούλωση πληγής από τους SEMFs και αξίζει αναφοράς το εύρημά τους ότι το ίδιο δεν επαληθεύεται σε SEMFs από ινωτικά τμήματα εντέρου CD (Di Sabatino et al., 2009). Και στην κυτταροσειρά 18CO ο TGF-β1 και ο IGF-I έχουν βρεθεί να αυξάνουν τη μετανάστευση (Koon et al., 2010). Οι Kernochan και συν. βρήκαν ότι ο PDGF

και η ET-1 μέσω του ETR-B κατά μερικούς ερευνητές (Kernochan et al., 2002) ή του ETR-A κατ' άλλους (Knowles et al., 2011) επάγουν την επούλωση πληγής από SEMFs.

Με μεθοδολογία ανάλογη με τη δική μας και σε μοντέλο με επιθηλιακά κύτταρα και μυοϊνοβλάστες πνεύμονα υπάρχει η συμβατή με τα αποτελέσματά μας αναφορά μείωσης του ρυθμού επούλωσης από αδρανοποιητικό του TGF-β αντίσωμα (Chen and Xu, 2005). Η απουσία ορισμένων άμεσων αποτελεσμάτων του TGF-β1 σε βραχύ χρόνο και η σαφής παρουσία άλλων μεταγενέστερων, χρονικά ανάλογων με αυτών που διαπιστώσαμε στην επούλωση τραύματος, επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Brenmoehl et al., 2009). Επαναλαμβανόμενο εύρημα αποτελεί η αύξηση έκφρασης του δείκτη φαινοτυπικής αλλαγής των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες σε δευτερεύοντα χρόνο >3 ημερών επώασης με TGF-β (Brenmoehl et al., 2009). Στην υπερβολική συσσώρευση ινοβλαστών και την επακόλουθη ουλοποίηση μετά από δερματικό τραυματισμό έχει δειχθεί ο ρόλος του TGF-β (Shah et al., 1994; Shah et al., 1995). Οι *Ellis και συν.* αναφέρουν ότι η κινητικότητα ινοβλαστών δέρματος επηρεάζεται διαφορετικά από καθεμία από τις ισομορφές TGF-β, αλλά και από την πληρότητα των μυοϊνοβλαστών στην καλλιέργεια: και οι τρεις ισομορφές αναστέλλουν τη μετανάστευση των ινοβλαστών δέρματος σε τρισδιάστατη πηκτή (gel) κολλαγόνου σε πληρότητα <100%, αλλά επάγεται από τον TGF-β3 μόνο σε συνθήκες καλλιέργειας πληρότητας 100% (Ellis and Schor, 1998). Αντίθετα, οι *Postlethwaite και συν.* έχουν ευρήματα ανάλογα με τα δικά μας ως προς την επαγωγή της μετανάστευσης από TGF-β1 χρησιμοποιώντας θάλαμο Boyden (Postlethwaite et al., 1987). Τα αντικρουόμενα ευρήματα μπορούν να αποδοθούν στην διαφορετική μεθοδολογία.

Στη δοκιμασία επούλωσης πληγής, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η συμβολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρά τη μειωμένη συγκέντρωση FBS. Επιθυμία μας ήταν να

τον μελετήσουμε σε συνδυασμό με την κυτταρική μετανάστευση ως σύνολο, ώστε να εξάγουμε συμπεράσματα για τη δυνατότητα και την ταχύτητα επούλωσης από τους μυοϊνοβλάστες στον φλεγμονώδη εντερικό βλεννογόνο. Αν απομονώσουμε τη συνιστώσα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οι SEMFs που προέρχονται από UC ή CD παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απαντητικότητα αυτού σε TGF-β1, FGF και IGF-I (Lawrance et al., 2001b). Οι *McKaig και συν.*, ενώ επιβεβαιώνουν το πρώτο εύρημα, διαπιστώνουν έμμεσα με τη χρήση εξουδετερωτικών των TGF-β ισομορφών αντισωμάτων ανασταλτική δράση των TGF-β ισομορφών στον πολλαπλασιασμό SEMFs από ομάδα ελέγχου και UC, αλλά όχι από CD (McKaig et al., 2002). Αντίθετα, στην κυτταροσειρά κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO ο TGF-β1 μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αφ' εαυτού αλλά και αναστέλλει την προκαλούμενη αύξησή του από τον IGF-I (Simmons et al., 2002). Επίσης οι *McKaig και συν.* εξέτασαν το αντίστροφο φαινόμενο και βρήκαν επίδραση των SEMFs μέσω TGF-β3 στην επούλωση πληγής από τα επιθηλιακά, ο οποίος όμως συμπέραναν ότι εκκρίνεται σε ικανά ποσά από τους SEMFs μέσω μιας έμμεσης δοκιμασίας αναστολής του πολλαπλασιασμού της κυτταροσειράς Mv1Lu και όχι με άμεση μέτρηση αυτού (McKaig et al., 1999). Για τον TNF-α έχει αναφερθεί ευοδωτική του πολλαπλασιασμού των εντερικών μυοϊνοβλαστών δράση μέσω του TNFR2 (Theiss et al., 2005). Για τις IL-1 και TNF-α αναφέρεται ανασταλτικός ρόλο στην προκαλούμενη από τον PDGF αύξηση του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα, αλλά επαγωγικός στη μετανάστευση των ίδιων κυττάρων (Sasaki et al., 2000). Διαφαίνεται λοιπόν και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό η διαφορετική επίδραση των κυτταροκινών ανάλογα με την προέλευση του μεσεγχυματικού κυττάρου υπό μελέτη και την ακριβή παράμετρο υπό μελέτη (πολλαπλασιασμός ή κινητικότητα). Αντίθετα με τα ευρήματα στον

πολλαπλασιασμό, η απόπτωση- δεύτερη συνιστώσα από την οποία καθορίζεται ο αριθμός των SEMFs- δεν επηρεάζεται, *in vitro* τουλάχιστον, από την προέλευση από ινωτικό ή φλεγμαίνον τμήμα CD ή ομάδα ελέγχου (Di Sabatino et al., 2009). Αυτό διαφέρει από άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Toh et al., 2006), η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Tanaka et al., 2002) και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Jelaska and Korn, 2000) στις οποίες τα μεσεγχυματικά κύτταρα δείχνουν αντίσταση στην απόπτωση. Μάλιστα η επαναλειτουργία της οδού της απόπτωσης μετά από τη χορήγηση εξωγενούς anti-TNF-α έχει προταθεί ως ένας από τους μηχανισμούς θεραπευτικής δράσης του στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Toh et al., 2006).

#### **4.4.5.2 Επίδραση επιθηλιακών**

Καταλήγοντας, δείξαμε ότι τα επιθηλιακά κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθυστερούσαν τη μετανάστευση των SEMFs (ενότητα 4.3.8.1, Εικόνα 28 και Εικόνα 29), παρά το γεγονός ότι η αύξηση του TGF-β1 *per se* που προκαλούν οι κυτταροκίνες στο υπερκείμενο επιθηλιακών θα αναμέναμε να επιταχύνει την επούλωση. Επομένως προτείνουμε ότι επιπρόσθετοι παράγοντες που τροποποιούνται από τις κυτταροκίνες στο υπερκείμενο επιθηλιακών αναστρέφουν το αποτέλεσμα αυτό. Αντίθετα από τα ευρήματά μας, οι *Kambas και συν.* ταυτοποίησαν στην περίπτωση του BALF ασθενών με βρογχοπνευμονική δυσπλασία παράγοντες που επιταχύνουν τον πολλαπλασιασμό- επούλωση και είναι εξαρτώμενοι από το μηχανισμό πήξης (Kambas et al., 2011). Επομένως η φλεγμονή δεν συμβαδίζει πάντα με αναστολή της μετανάστευσης. Συμφωνούμε πάντως με την πρόταση των *Di Sabatini και συν.* (Di Sabatino et al., 2009) ότι η αναστολή της μετανάστευσης μυοϊνοβλαστών *in vitro* δυνητικά συνεισφέρει στη παγίδευση των μυοϊνοβλαστών στις εστίες φλεγμονής του εντερικού βλεννογόνου *in vivo*.

Η τοπική αύξηση του αριθμού των μυοϊνοβλαστών με μειωμένη δυνατότητα διασποράς και αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου θα μπορούσε να αποτελεί παθοφυσιολογικό μηχανισμό εντερικής ίνωσης και θα μπορούσε να μεσολαβείται και από την αυξημένη έκφραση και φωσφορυλίωση των FAK και έκφραση  $\alpha$ -SMA (Di Sabatino et al., 2009; Leeb et al., 2003). Παραταύτα οι Leeb και συν. αντίθετα με τους Di Sabatino και συν. δεν βρήκαν ιδιοσυστασιακό έλλειμμα στη δυνατότητα μετανάστευσης SEMFs από UC ή CD, οπότε η διατήρηση της φλεγμονής ενδέχεται να είναι σημαντική για τη διατήρηση της εξέγκωσης (Di Sabatino et al., 2009; Leeb et al., 2003). Ενδέχεται όμως να υπάρχει και επιγενετικό στοιχείο ή στοιχείο τελικής διαφοροποίησης στο φαινόμενο που οφείλεται αλλά δεν προαπαιτεί διαρκώς την παρουσία προφλεγμονώδους περιβάλλοντος. Ασφαλώς στο φαινόμενο υπάρχει και χρονική συνιστώσα, με τον TGF- $\beta$ 1 άμεσα να επάγει τη μετανάστευση σε βραχείες περιόδους επώασης, αλλά να προκαλεί έμμεσες δράσεις που την επιβραδύνουν επί παρατεταμένης δράσης του (Brenmoehl et al., 2009; Leeb et al., 2002). Οι τελευταίες πιθανώς οφείλονται και στην αύξηση των FAK (Brenmoehl et al., 2009).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ισχύουν και αντίστροφα φαινόμενα επίδρασης των μυοϊνοβλαστών πάνω στα επιθηλιακά: η κυτταροσειρά κολονικών μυοϊνοβλαστών 18CO επιταχύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της επιθηλιακής κυτταροσειράς IEC-6 μέσω KGF, IGF, bFGF, HGF (Simmons et al., 1999) και το ίδιο ισχύει για το ζεύγος κολονικών μυοϊνοβλαστών του ίδιου χιτώνα (lamina propria) και της επιθηλιακής κυτταροσειράς HT-29 (Stahtea et al., 2007). Γενικά, επιθηλιακά και μυοϊνοβλάστες πιθανώς ευοδώνουν το ένα τον πολλαπλασιασμό του άλλου, τουλάχιστον χωρίς συνθήκες φλεγμονής (Simmons et al., 1999).

Θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η ινωδολυτική MMP-9 που βρήκαμε ότι επάγεται από τα επιθηλιακά σε φλεγμαίον περιβάλλον στους SEMFs (ενότητα 4.3.4.2, Εικόνα 11-Εικόνα 13) ήταν ο μηχανισμός με τον οποίο τα πρώτα επιβράδυναν την επούλωση πληγής από τα δεύτερα. Επρόκειτο για λογική υπόθεση και υπό το πρίσμα ότι η προσθήκη εξουδετερωτικού αντισώματος του TIMP-1 ή ο εξωγενής TIMP-1 ενίσχυαν την ευοδωτική δράση επί της κινητικότητας SEMFs εξουδετερωτικού του TNF-α αντισώματος (Di Sabatino et al., 2007). Όμως δε διαπιστώσαμε κάτι τέτοιο: η επιβράδυνση της επούλωση φάνηκε ανεξάρτητη από τη δραστικότητα MMP-9 του υπερκειμένου επιθηλιακών προεπωασμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (ενότητα 4.3.8.2, Εικόνα 30). Αντίθετα χωρίς συνθήκες φλεγμονής η δράση του εξουδετερωτικού αντισώματος επί της κυτταρικής κινητικότητας επιβεβαιώθηκε (ενότητα 4.3.8.2, Εικόνα 30).

Παράγοντες προερχόμενοι από τα επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα, εκτός του ότι ρυθμίζουν την επούλωση των πληγών, μέσω διέγερσης της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων από τους ιδρωτοποιούς αδένες, θύλακες των τριχών και των ορίων τραύματος, προωθούν επίσης την συρρίκνωση του κολλαγόνου με έλεγχο του αριθμού των ινοβλαστών ή της δράσης τους (Eisinger et al., 1988; Silver and Eisinger, 1988).



## 4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

**Μπορούμε να συνοψίσουμε τα κυριότερα ευρήματά μας ως εξής:**

- Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) αυξάνουν την έκκριση των TGF-β ισομορφών και TIMP-1 από τα επιθηλιακά, ενώ δεν έχουν όμοια δράση στους υποκείμενους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες (SEMFs). **(Εικόνα 31A)**
- TNF-α και η IL-1α επάγουν την δραστικότητα MMP-9 σε υπερκείμενο SEMFs και η IFN-γ αναστέλλει το φαινόμενο αυτό, ενώ δεν υπάρχουν αλλαγές στην ιδιοσυστασιακά εκφραζόμενη MMP-2. Δραστικότητα MMP-2 και MMP-9 δεν εμφανίζεται σε υπερκείμενα επιθηλιακών παχέος εντέρου. **(Εικόνα 31A)**
- Το υπερκείμενο επιθηλιακών προεπωασμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγει δραστικότητα MMP-9 στους SEMFs και το φαινόμενο εξαρτάται από τον υποδοχέα A των ενδοθηλινών. **(Εικόνα 31B)**
- Οι SEMFs που απομονώθηκαν από φλεγμαίνοντα μη-ινωτικά τμήματα παχέος εντέρου από νόσο του Crohn ιδιοσυστασιακά εξέφραζαν αυξημένα ποσά ολικού κολλαγόνου και παρόμοια απαντητικότητα με SEMFs ομάδας ελέγχου.
- Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή ο TGF-β1 δεν αυξάνουν άμεσα την παραγωγή κολλαγόνου στους SEMFs. Όμως αν τα επιθηλιακά επωαστούν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες το κάνουν με τρόπο ανεξάρτητο των TGF-β, CTGF, ενδοθηλινών και συστήματος πήξης / TF. **(Εικόνα 31B)**
- Από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν, οι TNF-α και IFN-γ άμεσα και όλες (της IL-1α συμπεριλαμβανομένης) έμμεσα μέσω δράσης στο επιθηλιακό

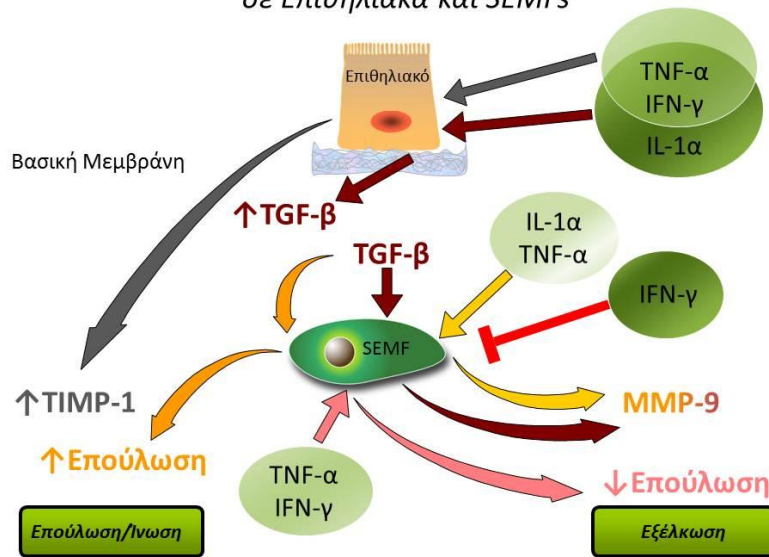
μειώνουν τη δυνατότητα των SEMFs να επουλώνουν λύση της συνέχειας του στρώματός τους. Η επαγόμενη MMP-9 όμως δεν ευθύνεται για αυτό. (Εικόνα 31)

- Εξωγενής TGF-β1 έχει ευοδωτικό για την επούλωση αποτέλεσμα. (Εικόνα 31A)

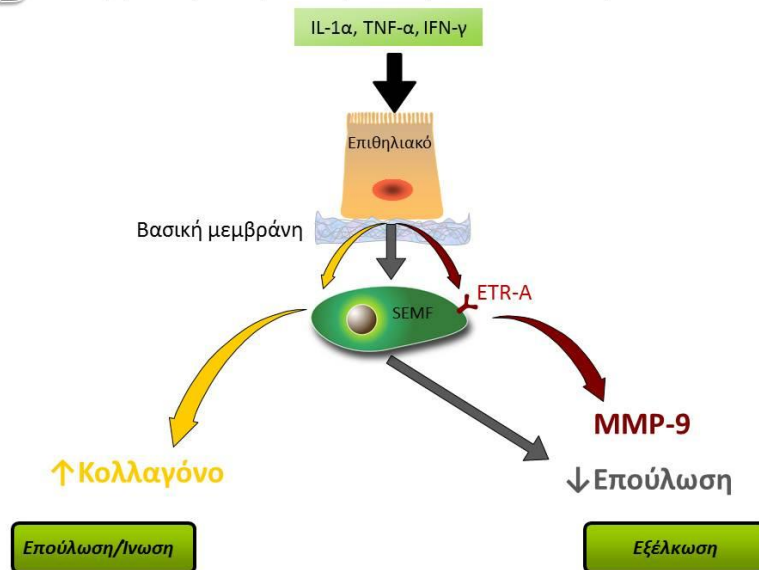
Περίληπτικά, η διδακτορική αυτή διατριβή παρέχει ενδείξεις πιθανής επικοινωνίας μεταξύ των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών.

***In vitro* διέγερση των επιθηλιακών με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που μερικά μιμείται την επίδραση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια, προκάλεσε αλλαγές στους SEMFs παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην εντερική ίνωση. Αυτές συμπεριέλαβαν την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου, την εξαρτώμενη από τον υποδοχέα ενδοθηλινών A επαγωγή της MMP-9 και την μερική αναστολή της μετανάστευσης. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την αναγκαιότητα *in vivo* επιβεβαίωσης της συνεργασίας μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και παρακείμενων μυοϊνοβλαστών στη ρύθμιση της αναδόμησης της θεμέλιας ουσίας και της επαγόμενης από τη φλεγμονή ίνωσης.**

**A** *Επιδράσεις Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών , TGF-β σε Επιθηλιακά και SEMFs*



**B** *Έμμεσες επιδράσεις Επιθηλιακών στους SEMFs*



Εικόνα 31. Απεικόνιση των κυριότερων ευρημάτων.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### References

- Abe M, Oda N, Sato Y. 1998. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J Cell Physiol* 174(2):186-193.
- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166(12):7556-7562.
- Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Buchler MW. 2000. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 20(4):296-304.
- Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. 2000. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 275(20):15220-15225.
- Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasilias EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. 2002. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 123(3):679-688.
- Ackerman V, Carpi S, Bellini A, Vassalli G, Marini M, Mattoli S. 1995. Constitutive expression of endothelin in bronchial epithelial cells of patients with symptomatic and asymptomatic asthma and modulation by histamine and interleukin-1. *J Allergy Clin Immunol* 96(5 Pt 1):618-627.
- Adams JC. 1997. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 29(6):861-865.
- Adams RB, Planchon SM, Roche JK. 1993. IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol* 150(6):2356-2363.
- Adawi A, Zhang Y, Baggs R, Rubin P, Williams J, Finkelstein J, Phipps RP. 1998. Blockade of CD40-CD40 ligand interactions protects against radiation-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 89(3):222-230.
- Adegboyega PA, Mifflin RC, DiMari JF, Saada JI, Powell DW. 2002. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch Pathol Lab Med* 126(7):829-836.

- Adelmann-Grill BC, Wach F, Cully Z, Hein R, Krieg T. 1990. Chemotactic migration of normal dermal fibroblasts towards epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Eur J Cell Biol* 51(2):322-326.
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122(4):854-866.
- Aigner T, Neureiter D, Muller S, Kuspert G, Belke J, Kirchner T. 1997. Extracellular matrix composition and gene expression in collagenous colitis. *Gastroenterology* 113(1):136-143.
- Akhurst RJ, FitzPatrick DR, Gatherer D, Lehnert SA, Millan FA. 1990. Transforming growth factor betas in mammalian embryogenesis. *Prog Growth Factor Res* 2(3):153-168.
- Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. 2000. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 47(5):685-688.
- Allan EH, Martin TJ. 1995. The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin Orthop Relat Res*(313):54-63.
- Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. 1999. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(6):693-700.
- Alvarado J, del Castillo JR, Thomas LE. 2008. Modulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase by LPS and gamma interferon bound to extracellular matrix in intestinal crypt cells. *Cytokine* 41(2):155-161.
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yague J, Panes J. 2005. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 242(5):693-700.
- Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, Sato A, Takahashi T, Homma Y, Kawakami Y. 1998. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 157(6 Pt 1):1907-1912.
- Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. 2001. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* 103(2):319-324.
- Ammarguella FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. 2002. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension* 39(2 Pt 2):679-684.

- Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA. 2005a. Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol* 40(12):1089-1099.
- Andoh A, Fujino S, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. 2002. Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 37 Suppl 14:33-37.
- Andoh A, Yasui H, Inatomi O, Zhang Z, Deguchi Y, Hata K, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. 2005b. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced granulocyte and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor release from human colonic myofibroblasts. *J Gastroenterol* 40(8):802-810.
- Andresen JL, Ehlers N. 1998. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Curr Eye Res* 17(1):79-87.
- Angel P, Szabowski A. 2002. Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem Pharmacol* 64(5-6):949-956.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348(6303):730-732.
- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. 1993. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 268(5):3463-3470.
- Arora PD, Narani N, McCulloch CA. 1999. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol* 154(3):871-882.
- Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I. 2001. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer* 85(11):1759-1763.
- Asham EH, Loizidou M, Taylor I. 1998. Endothelin-1 and tumour development. *Eur J Surg Oncol* 24(1):57-60.
- Ashcroft GS, Roberts AB. 2000. Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* 11(1-2):125-131.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. 1999. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1(5):260-266.
- Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA. 2002. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and

- PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168(7):3577-3585.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296(5573):1646-1647.
- Aubert JD, Dalal BI, Bai TR, Roberts CR, Hayashi S, Hogg JC. 1994. Transforming growth factor beta 1 gene expression in human airways. *Thorax* 49(3):225-232.
- Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. 2002. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 441(5):500-513.
- Aycock RS, Seyer JM. 1989. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect Tissue Res* 23(1):19-31.
- Babic AM, Chen CC, Lau LF. 1999. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19(4):2958-2966.
- Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. 1996. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110(4):975-984.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.
- Bailey AJ, Bazin S, Sims TJ, Le Lous M, Nicoletis C, Delaunay A. 1975. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochim Biophys Acta* 405(2):412-421.
- Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. 1994. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 47(2):113-116.
- Baldwin AS, Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
- Baley PA, Resink TJ, Eppenberger U, Hahn AW. 1990. Endothelin messenger RNA and receptors are differentially expressed in cultured human breast epithelial and stromal cells. *J Clin Invest* 85(4):1320-1323.
- Bamba S, Andoh A, Yasui H, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. 2003a. Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. *J Gastroenterol* 38(6):548-554.

- Bamba S, Andoh A, Yasui H, Makino J, Kim S, Fujiyama Y. 2003b. Regulation of IL-11 expression in intestinal myofibroblasts: role of c-Jun AP-1- and MAPK-dependent pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(3):G529-538.
- Bamba S, Lee CY, Brittan M, Preston SL, Direkze NC, Poulson R, Alison MR, Wright NA, Otto WR. 2006. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in interleukin-10 knockout colitic mice. *J Pathol* 209(2):265-273.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. 1996. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 59(2):61-83.
- Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. 2003. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 199(1):28-35.
- Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodavsky I. 1992. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6(2):123-130.
- Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA. 1994. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93(2):892-899.
- Barcellos-Hoff MH, Dix TA. 1996. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10(9):1077-1083.
- Barcellos-Hoff MH, Ehrhart EJ, Kalia M, Jirtle R, Flanders K, Tsang ML. 1995. Immunohistochemical detection of active transforming growth factor-beta in situ using engineered tissue. *Am J Pathol* 147(5):1228-1237.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449(7165):1003-1007.
- Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL. 1989. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(5):1578-1582.
- Barnard JA, Warwick GJ, Gold LI. 1993. Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology* 105(1):67-73.
- Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DH, Duckett JW, Snyder HM, Macarak EJ. 1993. Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. *J Urol* 150(2 Pt 2):642-647.
- Basson MD, Modlin IM, Flynn SD, Jena BP, Madri JA. 1992a. Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing. *Surgery* 112(2):299-307; discussion 307-298.



- Basson MD, Modlin IM, Madri JA. 1992b. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* 90(1):15-23.
- Bataille F, Klebl F, Rummele P, Straub RH, Wild P, Scholmerich J, Hofstadter F. 2003. Histopathological parameters as predictors for the course of Crohn's disease. *Virchows Arch* 443(4):501-507.
- Battaglia E, Biancone L, Resegotti A, Emanuelli G, Fronda GR, Camussi G. 1999. Expression of CD40 and its ligand, CD40L, in intestinal lesions of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 94(11):3279-3284.
- Battistini B, Botting R, Warner TD. 1995. Endothelin: a knockout in London. *Trends Pharmacol Sci* 16(7):217-222.
- Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P. 1993. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 14(2):385-399.
- Baud V, Karin M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11(9):372-377.
- Baugh MD, Evans GS, Hollander AP, Davies DR, Perry MJ, Lobo AJ, Taylor CJ. 1998a. Expression of matrix metalloproteases in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 859:249-253.
- Baugh MD, Hollander AP, Evans GS. 1998b. The regulation of matrix metalloproteinase production in human colonic fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 859:175-179.
- Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. 1999. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117(4):814-822.
- Bawadi HA, Bansode RR, Trappey A, 2nd, Truax RE, Losso JN. 2005. Inhibition of Caco-2 colon, MCF-7 and Hs578T breast, and DU 145 prostatic cancer cell proliferation by water-soluble black bean condensed tannins. *Cancer Lett* 218(2):153-162.
- Beck PL, Podolsky DK. 1999. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 5(1):44-60.
- Beck PL, Rosenberg IM, Xavier RJ, Koh T, Wong JF, Podolsky DK. 2003. Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. *Am J Pathol* 162(2):597-608.
- Becker J, Schuppan D, Muller S. 1993. Immunohistochemical distribution of collagens type I, III, IV and VI, of undulin and of tenascin in oral fibrous hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 22(10):463-467.
- Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2006. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and

- tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 93(10):1290-1296.
- Beddy DJ, Watson WR, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2004. Critical involvement of stress-activated mitogen-activated protein kinases in the regulation of intracellular adhesion molecule-1 in serosal fibroblasts isolated from patients with Crohn's disease. *J Am Coll Surg* 199(2):234-242.
- Bell KM, Chaplin DJ. 1998. The effect of oxygen and carbon dioxide on tumor cell endothelin-1 production. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S537-540.
- Bellini A, Mattoli S. 2007. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 87(9):858-870.
- Beltinger J, McKaig BC, Makh S, Stack WA, Hawkey CJ, Mahida YR. 1999. Human colonic subepithelial myofibroblasts modulate transepithelial resistance and secretory response. *Am J Physiol* 277(2 Pt 1):C271-279.
- Benezra M, Vlodaysky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-Shavit R. 1993. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 81(12):3324-3331.
- Berschneider HM, Powell DW. 1992. Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest* 89(2):484-489.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(2):197-250.
- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottinger EP. 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 14(2):187-197.
- Blalock TD, Duncan MR, Varela JC, Goldstein MH, Tuli SS, Grotendorst GR, Schultz GS. 2003. Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5):1879-1887.
- Blom IE, van Dijk AJ, Wieten L, Duran K, Ito Y, Kleij L, deNichilo M, Rabelink TJ, Weening JJ, Aten J, Goldschmeding R. 2001. In vitro evidence for differential involvement of CTGF, TGFbeta, and PDGF-BB in mesangial response to injury. *Nephrol Dial Transplant* 16(6):1139-1148.
- Bocker U, Schottelius A, Watson JM, Holt L, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB, Jobin C. 2000. Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 275(16):12207-12213.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.

- Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Silver RM. 2009. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts. *Arthritis Rheum* 60(11):3455-3464.
- Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. 2001. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 276(48):45184-45192.
- Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, Caruso R, Colantoni A, Palmieri G, Sanchez M, Strober W, MacDonald TT, Monteleone G. 2006. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology* 131(6):1786-1798.
- Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. 1998. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 435(1):29-34.
- Bonderup OK, Hansen JB, Birket-Smith L, Vestergaard V, Teglbjaerg PS, Fallingborg J. 2003. Budesonide treatment of collagenous colitis: a randomised, double blind, placebo controlled trial with morphometric analysis. *Gut* 52(2):248-251.
- Bonnaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, Lavery C, Margetts PJ, Roberts AB, Gauldie J. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 173(3):2099-2108.
- Bonnaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. 2005. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 175(8):5390-5395.
- Bottinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. 1997. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int* 51(5):1355-1360.
- Bozza M, Bliss JL, Dorner AJ, Trepicchio WL. 2001. Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4+ T cells. *J Interferon Cytokine Res* 21(1):21-30.
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. 1991. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114(6):1285-1294.
- Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. 2009. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors* 35(3):258-265.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. 1992. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339(8785):89-91.
- Brannigan AE, Watson RW, Beddy D, Hurley H, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2002. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation. *Ann Surg* 235(4):507-511.

- Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, Nouvet FJ, Bonen D, Karban A, Dassopoulos T, Karaliukas R, Beaty TH, Hanauer SB, Duerr RH, Cho JH. 2003. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 9(5):281-289.
- Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. 1994. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106(6):1455-1466.
- Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G. 2009. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 15(12):1431-1442.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2):267-283.
- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(5):507-511.
- Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR, Harding PA. 1997. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 272(32):20275-20282.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3):207-214.
- Brittan M, Chance V, Elia G, Poulson R, Alison MR, MacDonald TT, Wright NA. 2005. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 128(7):1984-1995.
- Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Goldman J, Alison MR, Wright NA. 2002. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 50(6):752-757.
- Brittan M, Wright NA. 2002. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 197(4):492-509.
- Brittan M, Wright NA. 2004. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif* 37(1):35-53.
- Brown KD, Littlewood CJ. 1989. Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. Synergy with polypeptide growth factors. *Biochem J* 263(3):977-980.
- Brown PD. 1998. Matrix metalloproteinases in gastrointestinal cancer. *Gut* 43(2):161-163.
- Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB. 1990. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3(1):35-43.

- Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Liubin MN, Purchio AF. 1989. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* 264(23):13660-13664.
- Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. 1998. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 97(14):1375-1381.
- Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. 2007. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 102(2):439-448.
- Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H. 2000. Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem* 275(9):6580-6585.
- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. 1996a. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81(1):1-41.
- Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, Iversen JG, Prydz H. 1999. Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the *egr-1* gene. *J Biol Chem* 274(45):32225-32233.
- Camerer E, Rottingen JA, Iversen JG, Prydz H. 1996b. Coagulation factors VII and X induce Ca<sup>2+</sup> oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem* 271(46):29034-29042.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. 2007. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132(4):1359-1374.
- Carroll KM, Wong TT, Drabik DL, Chang EB. 1988. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol* 254(3 Pt 1):G355-360.
- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. 1995. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 154(5):2434-2440.
- Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lamas S, Rodriguez-Pascual F. 2006. Transforming growth factor-beta receptor requirements for the induction of the endothelin-1 gene. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):700-703.
- Castaneda FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S, Kolachala VL, Rojas M, Wang L, Oprea G, Garg P, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV. 2005. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 129(6):1991-2008.
- Castiglione F, de Sio I, Cozzolino A, Rispo A, Manguso F, Del Vecchio Blanco G, Di Girolamo E, Castellano L, Ciacci C, Mazzacca G. 2004. Bowel wall thickness at abdominal ultrasound and the one-year-risk of surgery in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 99(10):1977-1983.

- Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, Gray AJ, Blanc-Brude OP, Laurent GJ. 1998. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* 333 ( Pt 1):121-127.
- Chang EB, Musch MW, Mayer L. 1990. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. *Gastroenterology* 98(6):1518-1524.
- Chen CC, Chen N, Lau LF. 2001a. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276(13):10443-10452.
- Chen J, Fabry B, Schiffrin EL, Wang N. 2001b. Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(6):C1475-1484.
- Chen WY, Grant ME, Schor AM, Schor SL. 1989. Differences between adult and foetal fibroblasts in the regulation of hyaluronate synthesis: correlation with migratory activity. *J Cell Sci* 94 ( Pt 3):577-584.
- Chen XW, Xu J. 2005. [Effects of airway epithelium injury on the transdifferentiation of sub-epithelial fibroblasts and its role in the development of airway hyperresponsiveness in asthma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 28(10):698-703.
- Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. 2002. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 62(4):1149-1159.
- Chen Y, Shi-wen X, Eastwood M, Black CM, Denton CP, Leask A, Abraham DJ. 2006. Contribution of activin receptor-like kinase 5 (transforming growth factor beta receptor type I) signaling to the fibrotic phenotype of scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 54(4):1309-1316.
- Chen Y, Shi-Wen X, van Beek J, Kennedy L, McLeod M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Wilcox-Adelman S, Goetinck PF, Eastwood M, Black CM, Abraham DJ, Leask A. 2005. Matrix contraction by dermal fibroblasts requires transforming growth factor-beta/activin-linked kinase 5, heparan sulfate-containing proteoglycans, and MEK/ERK: insights into pathological scarring in chronic fibrotic disease. *Am J Pathol* 167(6):1699-1711.
- Chi X, Anselmi K, Watkins S, Gandhi CR. 2003. Prevention of cultured rat stellate cell transformation and endothelin-B receptor upregulation by retinoic acid. *Br J Pharmacol* 139(4):765-774.
- Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. 2004. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg* 57(3):215-221.
- Chiossone DC, Simon PL, Smith PL. 1990. Interleukin-1: effects on rabbit ileal mucosal ion transport in vitro. *Eur J Pharmacol* 180(2-3):217-228.

- Chokki M, Yamamura S, Eguchi H, Masegi T, Horiuchi H, Tanabe H, Kamimura T, Yasuoka S. 2004. Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(4):470-478.
- Chowdhury A, Fukuda R, Fukumoto S. 1996. Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa and in uninvolved mucosa from ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 31(3):353-360.
- Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K. 2005. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203(2):447-456.
- Chujo S, Shirasaki F, Kondo-Miyazaki M, Ikawa Y, Takehara K. 2009. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. *J Cell Physiol* 220(1):189-195.
- Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK. 1993a. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105(1):93-101.
- Ciacci C, Mahida YR, Dignass A, Koizumi M, Podolsky DK. 1993b. Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 92(1):527-532.
- Cohan VL, Scott AL, Dinarello CA, Prendergast RA. 1991. Interleukin-1 is a mucus secretagogue. *Cell Immunol* 136(2):425-434.
- Cohen RD, Larson LR, Roth JM, Becker RV, Mummert LL. 2000. The cost of hospitalization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 95(2):524-530.
- Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. 1997. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 150(3):981-991.
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. 1998. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187(12):2009-2021.
- Cominelli F, Nast CC, Clark BD, Schindler R, Llerena R, Eysselein VE, Thompson RC, Dinarello CA. 1990a. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest* 86(3):972-980.
- Cominelli F, Nast CC, Llerena R, Dinarello CA, Zipser RD. 1990b. Interleukin 1 suppresses inflammation in rabbit colitis. Mediation by endogenous prostaglandins. *J Clin Invest* 85(2):582-586.

- Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW. 2000. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 115(2):225-233.
- Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V. 2002. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol* 18(1):51-61.
- Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR. 1995. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S56-58.
- Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. 1990. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 63(6):832-840.
- Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP. 2002. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 8(4):244-250.
- Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre JP. 2005. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 54(2):237-241.
- Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. 2006. Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 12(8):1235-1242.
- Coughlin SR. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11023-11027.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93(7):1159-1170.
- Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. 2002. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem* 277(46):44187-44194.
- Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner S. 1998. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 30(8):909-922.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164):1415-1421.
- Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. 1999. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 44(1):17-25.



- Davenport AP. 2002. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54(2):219-226.
- Dawes KE, Gray AJ, Laurent GJ. 1993. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur J Cell Biol* 61(1):126-130.
- de Coignac AB, Elson G, Delneste Y, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry JP, Berthier O, Schmitt D, Bonnefoy JY, Gauchat JF. 2000. Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur J Biochem* 267(11):3323-3329.
- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. 2008. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123(10):2229-2238.
- Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(3):288-295.
- Denys H, Derycke L, Hendrix A, Westbroek W, Gheldof A, Narine K, Pauwels P, Gespach C, Bracke M, De Wever O. 2008. Differential impact of TGF-beta and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion. *Cancer Lett* 266(2):263-274.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958):577-584.
- Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. 1998. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 58(16):3743-3750.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122(1):103-111.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146(1):56-66.
- Desmouliere A, Rubbia-Brandt L, Abdiu A, Walz T, Macieira-Coelho A, Gabbiani G. 1992. Alpha-smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by gamma-interferon. *Exp Cell Res* 201(1):64-73.
- Deutscher N, Bataille F, Hausmann M, Kiessling S, Muller-Newen G, Leeb SN, Herfarth H, Heinrich PC, Scholmerich J, Rogler G. 2006. Functional expression of the interleukin-11 receptor alpha-chain in normal colonic epithelium and colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 21(6):573-581.
- di Mola FF, Friess H, Riesle E, Koliopanos A, Buchler P, Zhu Z, Brigstock DR, Korc M, Buchler MW. 2002. Connective tissue growth factor is involved in pancreatic repair and tissue remodeling in human and rat acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg* 235(1):60-67.

- di Mola FF, Friess H, Scheuren A, Di Sebastiano P, Graber H, Egger B, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. 1999. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease. *Ann Surg* 229(1):67-75.
- Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. 2009. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut* 58(6):777-789.
- Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, Rovedatti L, Docena G, Monteleone G, Rampton DS, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT. 2007. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology* 133(1):137-149.
- Di Sebastiano P, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, Innocenti P. 2001. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 63(4):234-239.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. 1997. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388(6642):548-554.
- Dieckgraefe BK, Weems DM. 1999. Epithelial injury induces egr-1 and fos expression by a pathway involving protein kinase C and ERK. *Am J Physiol* 276(2 Pt 1):G322-330.
- Dietz DW, Laureti S, Strong SA, Hull TL, Church J, Remzi FH, Lavery IC, Fazio VW. 2001. Safety and longterm efficacy of strictureplasty in 314 patients with obstructing small bowel Crohn's disease. *J Am Coll Surg* 192(3):330-337; discussion 337-338.
- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. 1994a. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 94(1):376-383.
- Dignass AU, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. 1994b. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 202(2):701-709.
- Dignass AU, Podolsky DK. 1993. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 105(5):1323-1332.
- Dignass AU, Tsunekawa S, Podolsky DK. 1994c. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106(5):1254-1262.
- Dinarello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118(2):503-508.
- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 145(3):940-944.

- Docherty AJ, O'Connell J, Crabbe T, Angal S, Murphy G. 1992. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol* 10(6):200-207.
- Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ. 2002. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3908-3913.
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. 2001. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 502(1-2):4-10.
- Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. 2003. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125(1):178-191.
- Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gott P. 2002. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem* 12(4):197-206.
- Douglas SA, Ohlstein EH. 1997. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res* 34(3):152-164.
- Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. 1996. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15):7911-7916.
- Dubois B, Opdenakker G, Carton H. 1999. Gelatinase B in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neurol Belg* 99(1):53-56.
- Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. 1999. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *Faseb J* 13(13):1774-1786.
- Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, Wilson CL, Matrisian LM, Welgus HG, Parks WC. 1998. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest* 102(7):1321-1331.
- Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM. 2003. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery* 133(6):601-607.
- Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 165(10):5788-5797.

- Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. 2000. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 36(5 Suppl 1):S354-356.
- Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. 2001. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 133(7):1172-1180.
- Eckmann L. 2004. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 20(2):82-88.
- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105(6):1689-1697.
- Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. 1991. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res* 69(2):483-490.
- Ehnis T, Dieterich W, Bauer M, Kresse H, Schuppan D. 1997. Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin). *J Biol Chem* 272(33):20414-20419.
- Ehnis T, Dieterich W, Bauer M, Lampe B, Schuppan D. 1996. A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV (undulin). *Exp Cell Res* 229(2):388-397.
- Ehnis T, Dieterich W, Bauer M, Schuppan D. 1998. Localization of a cell adhesion site on collagen XIV (undulin). *Exp Cell Res* 239(2):477-480.
- Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. 1999. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 117(6):1271-1277.
- Ehrlich HP, White BS. 1981. The identification of alpha A and alpha B collagen chains in hypertrophic scar. *Exp Mol Pathol* 34(1):1-8.
- Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. 1999. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):L814-824.
- Eisinger M, Sadan S, Silver IA, Flick RB. 1988. Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(6):1937-1941.
- Elias JA, Freundlich B, Adams S, Rosenbloom J. 1990. Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci* 580:233-244.

- Ellis I, Grey AM, Schor AM, Schor SL. 1992. Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dermal wound healing. *J Cell Sci* 102 ( Pt 3):447-456.
- Ellis IR, Schor SL. 1998. Differential motogenic and biosynthetic response of fetal and adult skin fibroblasts to TGF-beta isoforms. *Cytokine* 10(4):281-289.
- Ergul A, Portik-Dobos V, Giulumian AD, Molero MM, Fuchs LC. 2003. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(5):H2225-2232.
- Eyden B. 2008. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 12(1):22-37.
- Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. 1996. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J* 315 ( Pt 1):335-342.
- Fang Q, Liu X, Al-Mugotir M, Kobayashi T, Abe S, Kohyama T, Rennard SI. 2006. Thrombin and TNF-alpha/IL-1beta synergistically induce fibroblast-mediated collagen gel degradation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(6):714-721.
- Farber JM. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 61(3):246-257.
- Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB, Jr. 1976. Indications for surgery in Crohn's disease: analysis of 500 cases. *Gastroenterology* 71(2):245-250.
- Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. 1985. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology* 88(6):1818-1825.
- Farrokhvar F, Swarbrick ET, Grace RH, Hellier MD, Gent AE, Irvine EJ. 2001. Low mortality in ulcerative colitis and Crohn's disease in three regional centers in England. *Am J Gastroenterol* 96(2):501-507.
- Faveeuw C, Preece G, Ager A. 2001. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 98(3):688-695.
- Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. 2000. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 119(6):1473-1482.
- Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. 1992. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 19(8):1207-1211.

- Ferri C, Bellini C, Desideri G, Di Francesco L, Baldoncini R, Santucci A, De Mattia G. 1995. Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men. *Diabetes* 44(4):431-436.
- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. 2003. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125(3):795-804.
- Ferrini MG, Vernet D, Magee TR, Shahed A, Qian A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. 2002. Antifibrotic role of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 6(3):283-294.
- Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, Kitani A, Strober W. 2007. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J Immunol* 178(9):5859-5870.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12(1):99-106.
- Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W. 2008. IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 135(6):2003-2013, 2013 e2001-2007.
- Fields GB, Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. 1987. Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. Evidence for the role of collagen structure in determining the collagenase cleavage site. *J Biol Chem* 262(13):6221-6226.
- Finch PW, Cheng AL. 1999. Analysis of the cellular basis of keratinocyte growth factor overexpression in inflammatory bowel disease. *Gut* 45(6):848-855.
- Fiocchi C. 1997. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):G769-775.
- Fish SM, Proujansky R, Reenstra WW. 1999. Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut* 45(2):191-198.
- Flanders KC. 2004. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85(2):47-64.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB. 2002. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 160(3):1057-1068.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58(2):209-214.
- Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, ter Schegget J, Struyk L. 2000. A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. *Virology* 272(1):40-49.

- Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, Sands BE. 2004. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* 53(8):1117-1122.
- Fredriksson K, Liu XD, Lundahl J, Klominek J, Rennard SI, Skold CM. 2006. Red blood cells increase secretion of matrix metalloproteinases from human lung fibroblasts in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2):L326-333.
- Freeman HJ. 2001. Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients. *Can J Gastroenterol* 15(2):89-93.
- Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. 2000. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 105(3):980-990.
- Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275(4):2247-2250.
- Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. 1994. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 72(3):283-292.
- Fukamachi H, Ichinose M, Tsukada S, Takei N, Suzuki T, Miki K, Kurokawa K, Masui T. 1994. Hepatocyte growth factor region specifically stimulates gastro-intestinal epithelial growth in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 205(2):1445-1451.
- Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Suzuki S, Kitagawa M, Hishida A. 2004. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(23):8687-8692.
- Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. 2001. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 12(5):1431-1443.
- Furuya K, Furuya S, Yamagishi S. 1994. Intracellular calcium responses and shape conversions induced by endothelin in cultured subepithelial fibroblasts of rat duodenal villi. *Pflugers Arch* 428(2):97-104.
- Gabbiani G, Ryan GB, Lamelin JP, Vassalli P, Majno G, Bouvier CA, Cruchaud A, Luscher EF. 1973. Human smooth muscle autoantibody. Its identification as antiactin antibody and a study of its binding to "nonmuscular" cells. *Am J Pathol* 72(3):473-488.
- Gallelli L, Pelaia G, D'Agostino B, Cuda G, Vatrella A, Fratto D, Gioffre V, Galderisi U, De Nardo M, Mastruzzo C, Salinaro ET, Maniscalco M, Sofia M, Crimi N, Rossi F, Caputi M, Costanzo FS, Maselli R, Marsico SA, Vancheri C. 2005. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases. *J Cell Biochem* 96(4):858-868.

- Galloway WA, Murphy G, Sandy JD, Gavrilovic J, Cawston TE, Reynolds JJ. 1983. Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components. *Biochem J* 209(3):741-752.
- Gandhi CR, Kuddus RH, Uemura T, Rao AS. 2000. Endothelin stimulates transforming growth factor-beta1 and collagen synthesis in stellate cells from control but not cirrhotic rat liver. *Eur J Pharmacol* 406(3):311-318.
- Gao Q, Meijer MJ, Kubben FJ, Sier CF, Kruidenier L, van Duijn W, van den Berg M, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. 2005. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 37(8):584-592.
- Garcia MI, Ghiani M, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vassart G. 2009. LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Dev Biol* 331(1):58-67.
- Garg P, Rojas M, Ravi A, Bockbrader K, Epstein S, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. 2006. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. *J Immunol* 177(6):4103-4112.
- Garner WL. 1998. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. *Plast Reconstr Surg* 102(1):135-139.
- Garside P, Bunce C, Tomlinson RC, Nichols BL, Mowat AM. 1993. Analysis of enteropathy induced by tumour necrosis factor alpha. *Cytokine* 5(1):24-30.
- Garside P, Hutton AK, Severn A, Liew FY, Mowat AM. 1992. Nitric oxide mediates intestinal pathology in graft-vs.-host disease. *Eur J Immunol* 22(8):2141-2145.
- Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. 1992. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6):2317-2320.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370(6490):555-557.
- Geboes KP, Cabooter L, Geboes K. 2000. Contribution of morphology for the comprehension of mechanisms of fibrosis in inflammatory enterocolitis. *Acta Gastroenterol Belg* 63(4):371-376.
- Ghahary A, Shen Q, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. 1998. Induction of transforming growth factor beta 1 by insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 174(3):301-309.
- Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Chen S, Varga J. 2001. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta.



- Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 276(14):11041-11048.
- Ghosh S, Humphreys K, Papachrysostomou M, Ferguson A. 1997. Detection of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in whole gut lavage fluid: a novel method of studying intestinal fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(5):505-508.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Giaid A, Hamid QA, Springall DR, Yanagisawa M, Shinmi O, Sawamura T, Masaki T, Kimura S, Corrin B, Polak JM. 1990. Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumours. *J Pathol* 162(1):15-22.
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 90(2):456-461.
- Girometti R, Zuiani C, Toso F, Brondani G, Sorrentino D, Avellini C, Bazzocchi M. 2008. MRI scoring system including dynamic motility evaluation in assessing the activity of Crohn's disease of the terminal ileum. *Acad Radiol* 15(2):153-164.
- Glick AB, Weinberg WC, Wu IH, Quan W, Yuspa SH. 1996. Transforming growth factor beta 1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb. *Cancer Res* 56(16):3645-3650.
- Goke M, Zuk A, Podolsky DK. 1996. Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):G729-740.
- Golden CL, Kohler JP, Nick HS, Visner GA. 1995. Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(5):503-512.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2):111-122.
- Goraca A. 2002. New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul* 36(4):161-167.
- Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, Grotendorst G, Trojanowska M. 2002. TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(4):F707-716.
- Graham MF. 1995. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—an update. *Inflamm Bowel Dis* 1(3):220-227.

- Graham MF, Bryson GR, Diegelmann RF. 1990. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 99(2):447-453.
- Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. 1988. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 94(2):257-265.
- Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, Aufses AH, Jr. 1988. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut* 29(5):588-592.
- Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. 2005. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129(2):626-638.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7:d793-807.
- Grinnell F, Zhu M, Carlson MA, Abrams JM. 1999. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res* 248(2):608-619.
- Grotendorst GR. 1997. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3):171-179.
- Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. 1993. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 27(12):2130-2134.
- Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ. 1998. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* 18(8):4761-4771.
- Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. 1998a. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 92(4):1342-1349.
- Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. 1998b. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102(11):2002-2010.
- Gunther U, Schuppan D, Bauer M, Matthes H, Stallmach A, Schmitt-Graff A, Riecken EO, Herbst H. 1999. Fibrogenesis and fibrolysis in collagenous colitis. Patterns of procollagen types I and IV, matrix-metalloproteinase-1 and -13, and TIMP-1 gene expression. *Am J Pathol* 155(2):493-503.
- Guo X, Okada K, Fujita N, Ishikawa S, Komatsu N, Saito T. 1996. Inhibitory effect of BQ-123 on endothelin-1-stimulated mitogen-activated protein kinase and cell growth of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 19(1):23-30.

- Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. 1999. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis* 146(2):351-359.
- Hafizi S, Wharton J, Chester AH, Yacoub MH. 2004. Profibrotic effects of endothelin-1 via the ETA receptor in cultured human cardiac fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 14(4-6):285-292.
- Hagood JS, Lasky JA, Nesbitt JE, Segarini P. 2001. Differential expression, surface binding, and response to connective tissue growth factor in lung fibroblast subpopulations. *Chest* 120(1 Suppl):64S-66S.
- Hagood JS, Mangalwadi A, Guo B, MacEwen MW, Salazar L, Fuller GM. 2002. Concordant and discordant interleukin-1-mediated signaling in lung fibroblast thy-1 subpopulations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(6):702-708.
- Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbala P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M. 2005. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 167(2):365-379.
- Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. 2001. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 49(2):190-198.
- Halttunen T, Marttinen A, Rantala I, Kainulainen H, Maki M. 1996. Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* 111(5):1252-1262.
- Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriet P, DeClerck YA. 1996. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem* 271(41):25498-25505.
- Han DS, Li F, Holt L, Connolly K, Hubert M, Miceli R, Okoye Z, Santiago G, Windle K, Wong E, Sartor RB. 2000. Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(5):G1011-1022.
- Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E. 1999. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274(38):27161-27167.
- Hanauer SB. 2003. Crohn's disease: step up or top down therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17(1):131-137.
- Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 359(9317):1541-1549.

- Hartsough MT, Mulder KM. 1995. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 270(13):7117-7124.
- Hartsough MT, Mulder KM. 1997. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 75(1):21-41.
- Hastie AT, Kraft WK, Nyce KB, Zangrilli JG, Musani AI, Fish JE, Peters SP. 2002. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production: human asthmatic epithelial cells stimulate collagen type III production by human lung myofibroblasts after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 165(2):266-272.
- Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG. 1987. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 262(21):10048-10052.
- Haukipuro K. 1991. Synthesis of collagen types I and III in re-incised wounds in humans. *Br J Surg* 78(6):708-712.
- Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, Nedelman MA, Harvey CJ, Klein HJ, Rozmiarek H, Kennedy AR, Lichtenstein GR, Billings PC. 1997. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci* 42(9):1969-1980.
- Hay ED. 1993. Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 5(6):1029-1035.
- Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A. 2002. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatology* 49(43):133-135.
- Hayashida T, Poncelet AC, Hubchak SC, Schnaper HW. 1999. TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression. *Kidney Int* 56(5):1710-1720.
- He S, Prasanna G, Yorino T. 2007a. Endothelin-1-mediated signaling in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(8):3737-3745.
- He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L. 2007b. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 39(2):189-198.
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36(10):1117-1121.
- Hecht G, Koutsouris A, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. 1992. Clostridium difficile toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* 102(2):416-423.
- Held HD, Wendel A, Uhlig S. 1997. Phosphodiesterase inhibitors prevent endothelin-1-induced vasoconstriction, bronchoconstriction, and thromboxane release in perfused rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 231(1):22-25.

- Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, Thoren P, Hansson GK. 2006. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1):136-142.
- Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, Zini JM, Bar Shavit R, Tobelem G. 1994. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J* 303 ( Pt 1):227-231.
- Hernandez I, de la Torre P, Rey-Campos J, Garcia I, Sanchez JA, Munoz R, Rippe RA, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. 2000. Collagen alpha1(I) gene contains an element responsive to tumor necrosis factor-alpha located in the 5' untranslated region of its first exon. *DNA Cell Biol* 19(6):341-352.
- Herrlinger KR, Witthoef T, Raedler A, Bokemeyer B, Krummenerl T, Schulzke JD, Boerner N, Kueppers B, Emmrich J, Mescheder A, Schwertschlag U, Shapiro M, Stange EF. 2006. Randomized, double blind controlled trial of subcutaneous recombinant human interleukin-11 versus prednisolone in active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 101(4):793-797.
- Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. 2000. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 47(1):57-62.
- Heusinger-Ribeiro J, Fischer B, Goppelt-Struebe M. 2004. Differential effects of simvastatin on mesangial cells. *Kidney Int* 66(1):187-195.
- Hibi T, Ogata H. 2006. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 41(1):10-16.
- Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I. 2003. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3. *J Biol Chem* 278(44):43470-43479.
- Hinterleitner TA, Saada JI, Berschneider HM, Powell DW, Valentich JD. 1996. IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl-secretion in T84 cells. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):C1262-1268.
- Hinz B, Gabbiani G. 2003. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 14(5):538-546.
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. 2001. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159(3):1009-1020.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170(6):1807-1816.
- Hoang B, Trinh A, Birnbaumer L, Edwards RA. 2007. Decreased MAPK- and PGE2-dependent IL-11 production in Galpha2-/- colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6):G1511-1519.

- Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. 1999. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18(5):1345-1356.
- Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. 1997. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 99(6):1380-1389.
- Hoffmann S, He S, Ehren M, Ryan SJ, Wiedemann P, Hinton DR. 2006. MMP-2 and MMP-9 secretion by rpe is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes. *Retina* 26(4):454-461.
- Hollander D. 1988. Crohn's disease--a permeability disorder of the tight junction? *Gut* 29(12):1621-1624.
- Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. 1986. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 105(6):883-885.
- Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM, Leask A. 2003. Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem* 278(43):41728-41733.
- Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. 2001. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 276(14):10594-10601.
- Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS. 2005. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer* 113(2):198-206.
- Holten-Andersen MN, Murphy G, Nielsen HJ, Pedersen AN, Christensen IJ, Hoyer-Hansen G, Brunner N, Stephens RW. 1999. Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer. *Br J Cancer* 80(3-4):495-503.
- Holtmann MH, Douni E, Schutz M, Zeller G, Mudter J, Lehr HA, Gerspach J, Scheurich P, Galle PR, Kollias G, Neurath MF. 2002. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol* 32(11):3142-3151.
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. 2003. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 200(5):568-576.
- Horvai AE, Xu L, Korzus E, Brard G, Kalafus D, Mullen TM, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK. 1997. Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4):1074-1079.

- Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ. 1998. Expression of growth factors and remodelling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* 53(1):21-27.
- Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. 1992. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* 267(26):18797-18804.
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306(5701):1568-1571.
- Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G, Laurent GJ, Chambers RC. 2001. Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 159(4):1383-1395.
- Huang CL, Ives HE. 1987. Growth inhibition by protein kinase C late in mitogenesis. *Nature* 329(6142):849-850.
- Hugot JP. 2004. Genetic origin of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 10 Suppl 1:S11-15.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599-603.
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379(6568):821-823.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11-25.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. 1996. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 106(4):729-733.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K. 1995. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105(2):280-284.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. 1993. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4(6):637-645.

- Ignatenko NA, Zhang H, Watts GS, Skovan BA, Stringer DE, Gerner EW. 2004. The chemopreventive agent alpha-difluoromethylornithine blocks Ki-ras-dependent tumor formation and specific gene expression in Caco-2 cells. *Mol Carcinog* 39(4):221-233.
- Ihn H. 2002a. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14(6):681-685.
- Ihn H. 2002b. The role of TGF-beta signaling in the pathogenesis of fibrosis in scleroderma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50(5):325-331.
- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 322 ( Pt 3):809-814.
- Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A. 1997. Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156(2 Pt 1):631-636.
- Inagaki H, Bishop AE, Eimoto T, Polak JM. 1992. Autoradiographic localization of endothelin-1 binding sites in human colonic cancer tissue. *J Pathol* 168(3):263-267.
- Inagaki H, Bishop AE, Yura J, Polak JM. 1991. Localization of endothelin-1 and its binding sites to the nervous system of the human colon. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7:S455-457.
- Inagaki Y, Okazaki I. 2007. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56(2):284-292.
- Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A. 2004. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 66(2):597-604.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8):2863-2867.
- Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-652.
- Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. 1992. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 103(5):1587-1595.
- Ishibashi KI, Imamura T, Sharma PM, Huang J, Ugi S, Olefsky JM. 2001. Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest* 107(9):1193-1202.



- Ishibashi M, Fujita M, Nagai K, Kako M, Furue H, Haku E, Osamura Y, Yamaji T. 1993. Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 76(2):378-383.
- Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R. 1998. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 53(4):853-861.
- Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. 2002. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169(5):2643-2647.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. 2003. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130(12):2779-2791.
- Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. 1995. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 270(12):6997-7003.
- Jaureguiberry MS, di Nunzio AS, Dattilo MA, Bianciotti LG, Vatta MS. 2004. Endothelin 1 and 3 enhance neuronal nitric oxide synthase activity through ETB receptors involving multiple signaling pathways in the rat anterior hypothalamus. *Peptides* 25(7):1133-1138.
- Jaworski J, Biedermann IW, Lapinska J, Szklarczyk A, Figiel I, Konopka D, Nowicka D, Filipkowski RK, Hetman M, Kowalczyk A, Kaczmarek L. 1999. Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem* 274(40):28106-28112.
- Jelaska A, Korn JH. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43(10):2230-2239.
- Jiang ZY, Zhou QL, Chatterjee A, Feener EP, Myers MG, Jr., White MF, King GL. 1999. Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48(5):1120-1130.
- Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, Sartor RB. 1997. Evidence for altered regulation of I kappa B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 158(1):226-234.
- Jobin C, Sartor RB. 2000. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(3):C451-462.
- Jobson TM, Billington CK, Hall IP. 1998. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest* 101(12):2650-2657.

- Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC. 1997. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 158(5):2327-2333.
- Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. 1999. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 289(1):535-542.
- Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. 1999. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci* 4:D303-309.
- Jonk LJ, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P, Kruijer W. 1998. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273(33):21145-21152.
- Jordana M, Schulman J, McSharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, Gauldie J. 1988. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis* 137(3):579-584.
- Joyce NC, Haire MF, Palade GE. 1987. Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology* 92(1):68-81.
- Juan CC, Au LC, Yang FY, Yang DM, Ho LT. 2008. An endothelin type A receptor-expressing cell to characterize endothelin-1 binding and screen antagonist. *Anal Biochem* 379(1):27-31.
- Juan CC, Fang VS, Hsu YP, Huang YJ, Hsia DB, Yu PC, Kwok CF, Ho LT. 1998. Overexpression of vascular endothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertensive rat model. *J Hypertens* 16(12 Pt 1):1775-1782.
- Juan CC, Fang VS, Huang YJ, Kwok CF, Hsu YP, Ho LT. 1996. Endothelin-1 induces insulin resistance in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 227(3):694-699.
- Juan CC, Shen YW, Chien Y, Lin YJ, Chang SF, Ho LT. 2004. Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(5):E948-954.
- Juliano RL, Haskill S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120(3):577-585.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95(1):55-65.

- Kaartinen V, Mononen I, Voncken JW, Noronkoski T, Gonzalez-Gomez I, Heisterkamp N, Groffen J. 1996. A mouse model for the human lysosomal disease aspartylglycosaminuria. *Nat Med* 2(12):1375-1378.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. 1999. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 31(1):34-45.
- Kaiser GC, Polk DB. 1997. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 112(4):1231-1240.
- Kambas K, Chrysanthopoulou A, Kourtzelis I, Skordala M, Mitroulis I, Rafail S, Vradelis S, Sigalas I, Wu YQ, Speletas M, Kolios G, Ritis K. 2011. Endothelin-1 signaling promotes fibrosis in vitro in a bronchopulmonary dysplasia model by activating the extrinsic coagulation cascade. *J Immunol* 186(11):6568-6575.
- Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD. 2008. C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 180(11):7368-7375.
- Kamikubo Y, Nakahara Y, Takemoto S, Hamuro T, Miyamoto S, Funatsu A. 1997. Human recombinant tissue-factor pathway inhibitor prevents the proliferation of cultured human neonatal aortic smooth muscle cells. *FEBS Lett* 407(1):116-120.
- Kanzaki T, Olofsson A, Moren A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Heldin CH. 1990. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61(6):1051-1061.
- Kapetanakis S, Drygiannakis I, Kazakos K, Papanas N, Kolios G, Kouroumalis E, Verettas DA. 2010. Serum TGF-beta2 and TGF-beta3 are increased and positively correlated to pain, functionality, and radiographic staging in osteoarthritis. *Orthopedics* 33(8).
- Karlsson L, Lindahl P, Heath JK, Betsholtz C. 2000. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development* 127(16):3457-3466.
- Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. 2005. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 22(2):111-122.
- Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McElree C, Delahunty T, Dadufalza VD, Krugliak P, Rotter JI. 1989. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 97(4):927-931.
- Kaufman J, Sime PJ, Phipps RP. 2004. Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis. *J Immunol* 172(3):1862-1871.

- Kawamura M, Ohgawara H, Naruse M, Suzuki N, Iwasaki N, Naruse K, Hori S, Demura H, Omori Y. 1992. Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes Care* 15(10):1396-1397.
- Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T. 1995. Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol Cell Biol* 15(8):4225-4231.
- Kay EP, Lee MS, Seong GJ, Lee YG. 1998. TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res* 17(3):286-293.
- Kaye GI, Lane N, Pascal RR. 1968. Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. II. Fine structural aspects of normal rabbit and human colon. *Gastroenterology* 54(5):852-865.
- Kaye GI, Pascal RR, Lane N. 1971. The colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. 3. Replication and differentiation in human hyperplastic and adenomatous polyps. *Gastroenterology* 60(4):515-536.
- Kedinger M, Simon-Assmann P, Bouziges F, Arnold C, Alexandre E, Haffen K. 1990. Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with intestinal embryonic epithelium. *Differentiation* 43(2):87-97.
- Kedinger M, Simon-Assmann P, Haffen K. 1987. Growth and differentiation of intestinal endodermal cells in a coculture system. *Gut* 28 Suppl:237-241.
- Keil A, Blom IE, Goldschmeding R, Rupprecht HD. 2002. Nitric oxide down-regulates connective tissue growth factor in rat mesangial cells. *Kidney Int* 62(2):401-411.
- Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. 2001. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 22(7):1035-1042.
- Kernochan LE, Tran BN, Tangkijvanich P, Melton AC, Tam SP, Yee HF, Jr. 2002. Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut* 50(1):65-70.
- Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. 2000. Matrix turnover. *J Orthod* 27(3):227-233.
- Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B. 2001. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem* 276(39):36575-36585.
- Khalil N. 1999. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1(15):1255-1263.

- Khalil N, Corne S, Whitman C, Yacyshyn H. 1996a. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(2):252-259.
- Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. 1996b. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(2):131-138.
- Kiessling S, Muller-Newen G, Leeb SN, Hausmann M, Rath HC, Strater J, Spottl T, Schlottmann K, Grossmann J, Montero-Julian FA, Scholmerich J, Andus T, Buschauer A, Heinrich PC, Rogler G. 2004. Functional expression of the interleukin-11 receptor alpha-chain and evidence of antiapoptotic effects in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 279(11):10304-10315.
- Kilshaw PJ. 1985. Induction of class II MHC antigens in cultured epithelial cells from rat gut. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78(3):326-328.
- Kim YH, Kim MH, Kim BJ, Kim JJ, Chang DK, Son HJ, Rhee PL, Rhee JC. 2009. Inhibition of cell proliferation and invasion in a human colon cancer cell line by 5-aminosalicylic acid. *Dig Liver Dis* 41(5):328-337.
- Kimura M, Tani K, Miyata J, Sato K, Hayashi A, Otsuka S, Urata T, Sone S. 2005. The significance of cathepsins, thrombin and aminopeptidase in diffuse interstitial lung diseases. *J Med Invest* 52(1-2):93-100.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science* 280(5366):1036-1037.
- Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. 2004a. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 53(5):701-709.
- Kirkegaard T, Pedersen G, Saermark T, Brynskov J. 2004b. Tumour necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) activity in human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 135(1):146-153.
- Kirstein M, Sanz L, Quinones S, Moscat J, Diaz-Meco MT, Saus J. 1996. Cross-talk between different enhancer elements during mitogenic induction of the human stromelysin-1 gene. *J Biol Chem* 271(30):18231-18236.
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86(4):1243-1254.
- Kitamura A, Kagami S, Urushihara M, Kondo S, Yoshizumi M, Tamaki T, Kuroda Y. 2002. Endothelin-1 is a potent stimulator of alpha1beta1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 299(4):555-561.
- Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. 2003. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10

- secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 198(8):1179-1188.
- Kjeldsen J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Junker P. 1995. Seromarkers of collagen I and III metabolism in active Crohn's disease. Relation to disease activity and response to therapy. *Gut* 37(6):805-810.
- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. 1993. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268(14):10425-10432.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218(2):325-329.
- Klingel R, Ramadori G, Schuppan D, Knittel T, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H. 1993. Coexpression of extracellular matrix glycoproteins undulin and tenascin in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephron* 65(1):111-118.
- Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. 1996. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271(3):1544-1550.
- Knittel T, Odenthal M, Schuppan D, Schwogler S, Just M, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. 1992. Synthesis of undulin by rat liver fat-storing cells: comparison with fibronectin and tenascin. *Exp Cell Res* 203(2):312-320.
- Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, Bhalla A, Dashwood MR, Yang S, Taylor I, Winslet MC, Abraham DJ, Loizidou M. 2011. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts. *Int J Cancer*.
- Ko CH, Shen SC, Lee TJ, Chen YC. 2005. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 4(2):281-290.
- Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Fukui T, Takeda T. 1990. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med* 88(6):614-618.
- Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. 1998. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S84-89.
- Kojima K, Nihei Z. 1995. Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer. *Surg Oncol* 4(6):309-315.
- Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107(12):1529-1536.
- Kolios G, Wright KL, Linehan JD, Robertson DA, Westwick J. 2000. Interleukin-13 inhibits nitric oxide production in human colonic mucosa. *Hepatogastroenterology* 47(33):714-717.

- Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. 1988. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 238(2):249-252.
- Koon HW, Shih D, Karagiannides I, Zhao D, Fazelbhoj Z, Hing T, Xu H, Lu B, Gerard N, Pothoulakis C. 2010. Substance P modulates colitis-associated fibrosis. *Am J Pathol* 177(5):2300-2309.
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY, Chen X. 2007. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39):15418-15423.
- Kossakowska AE, Medlicott SA, Edwards DR, Guyn L, Stabbler AL, Sutherland LR, Urbanski SJ. 1999. Elevated plasma gelatinase A (MMP-2) activity is associated with quiescent Crohn's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 878:578-580.
- Koumas L, Smith TJ, Phipps RP. 2002. Fibroblast subsets in the human orbit: Thy-1+ and Thy-1- subpopulations exhibit distinct phenotypes. *Eur J Immunol* 32(2):477-485.
- Kouroumalis A, Nibbs RJ, Aptel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG. 2005. The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. *J Immunol* 175(8):5403-5411.
- Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M, Rafail S, Kambas K, Mitroulis I, Panagoutsos S, Passadakis P, Vargemezis V, Magotti P, Qu H, Mollnes TE, Ritis K, Lambris JD. 2010. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood* 116(4):631-639.
- Kovacina KS, Steele-Perkins G, Purchio AF, Lioubin M, Miyazono K, Heldin CH, Roth RA. 1989. Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor-beta 1 precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 160(1):393-403.
- Koyama Y, Baba A, Matsuda T. 2007. Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rat brain. *Neuroscience* 147(3):620-630.
- Kratz G, Jansson K, Gidlund M, Haegerstrand A. 1995. Keratinocyte conditioned medium stimulates type IV collagenase synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol* 133(6):842-846.
- Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. 2007. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 2:S4.
- Kruidenier L, MacDonald TT, Collins JE, Pender SL, Sanderson IR. 2006. Myofibroblast matrix metalloproteinases activate the neutrophil chemoattractant CXCL7 from intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 130(1):127-136.

- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. 1997. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 81(4):627-635.
- Kulkarni AB, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor- $\beta$  1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 143(1):3-9.
- Kumar RK. 2001. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? *Pharmacol Ther* 91(2):93-104.
- Kumar RK, Herbert C, Foster PS. 2004. Expression of growth factors by airway epithelial cells in a model of chronic asthma: regulation and relationship to subepithelial fibrosis. *Clin Exp Allergy* 34(4):567-575.
- Kumar RK, Herbert C, Yang M, Koskinen AM, McKenzie AN, Foster PS. 2002. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 32(7):1104-1111.
- Kumar RK, Maronese SE, O'Grady R. 1997. Serum-free culture of mouse tracheal epithelial cells. *Exp Lung Res* 23(5):427-440.
- Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. 1987. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor  $\beta$  inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 142(3):775-782.
- Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. 1990. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 50(11):3257-3261.
- Lacy ER. 1988. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 10 Suppl 1:S72-77.
- Lakos G, Takagawa S, Chen SJ, Ferreira AM, Han G, Masuda K, Wang XJ, DiPietro LA, Varga J. 2004. Targeted disruption of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* 165(1):203-217.
- Lang M, Schlechtweg M, Kellermeier S, Brenmoehl J, Falk W, Scholmerich J, Herfarth H, Rogler G, Hausmann M. 2009. Gene expression profiles of mucosal fibroblasts from strictured and nonstrictured areas of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 15(2):212-223.
- Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Nielsen OH, Binder V. 1996. Changes in extent of ulcerative colitis: a study on the course and prognostic factors. *Scand J Gastroenterol* 31(3):260-266.
- Lariviere R, Thibault G, Schiffrin EL. 1993. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21(3):294-300.



- Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M. 1998. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 275(2 Pt 1):L365-371.
- Lauth M, Wagner AH, Cattaruzza M, Orzechowski HD, Paul M, Hecker M. 2000. Transcriptional control of deformation-induced preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Mol Med (Berl)* 78(8):441-450.
- Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. 2001a. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 10(5):445-456.
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. 2001b. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 7(3):226-236.
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. 2001c. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 7(1):16-26.
- Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S. 2003. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology* 125(6):1750-1761.
- Lawrence DA. 1996. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 7(3):363-374.
- Leask A, Abraham DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J* 18(7):816-827.
- Leask A, Holmes A, Abraham DJ. 2002. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 4(2):136-142.
- Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. 2003. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 278(15):13008-13015.
- Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ. 2009. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal* 3(2):89-94.
- Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194(6):809-821.
- Lee JW, Wang P, Kattah MG, Youssef S, Steinman L, DeFea K, Straus DS. 2008. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 181(9):6536-6545.

- Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T. 1990. Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem* 265(18):10446-10450.
- Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. 1991. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem* 266(28):19034-19039.
- Lee SJ, Lim KT. 2007. UDN glycoprotein inhibits activator protein-1 and matrix metalloproteinase-9 via blocking of oxygen radicals in HT-29 cells. *Mol Cell Biochem* 304(1-2):13-23.
- Lee YC, Juan CC, Fang VS, Hsu YP, Lin SH, Kwok CF, Ho LT. 1998. Evidence that endothelin-1 (ET-1) inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes mainly through ETA receptors. *Metabolism* 47(12):1468-1471.
- Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. 2002. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 20(2):81-91.
- Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, Scholmerich J, Gelbmann CM, Rogler G. 2003. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 125(5):1341-1354.
- Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. 1985. Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med (Berl)* 185(2):95-106.
- Leng SX, Elias JA. 1997. Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production. *J Immunol* 159(5):2161-2168.
- Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 154(9):4379-4389.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr. 1991. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325(14):997-1001.
- Leroy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM. 1989. A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. Is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum* 32(7):817-825.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. 2002. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70(4):845-857.
- Levin ER. 1995. Endothelins. *N Engl J Med* 333(6):356-363.
- Li DQ, Tseng SC. 1995. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 163(1):61-79.

- Li G, Lubin FD, McGee DW. 2004.  $\alpha 3\beta 1$  integrin induced suppression of the Caco-2 epithelial cell IL-1 signaling pathway leading to NF-(kappa)B activation. *Cell Immunol* 231(1-2):30-39.
- Li H, He B, Que C, Weng B. 1996. Expression of TGF-beta 1, PDGF and IGF-1 mRNA in lung of bleomycin-A5-induced pulmonary fibrosis in rats. *Chin Med J (Engl)* 109(7):533-536.
- Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. 1994. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 24(2):183-188.
- Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL. 1998. Effect of chronic treatment with two different ET(A) selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 11(5):554-562.
- Li L, Huang YH, Li Y, Wang FQ, Shang BY, Zhen YS. 2005. Antitumor activity of anti-type IV collagenase monoclonal antibody and its lidamycin conjugate against colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 11(29):4478-4483.
- Li X, Madison BB, Zacharias W, Kolterud A, States D, Gumucio DL. 2007. Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol Genomics* 29(3):290-301.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2):329-333.
- Lichtenstein GR, Olson A, Travers S, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Hanauer SB, Sandborn WJ. 2006. Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 101(5):1030-1038.
- Lin J, Liliensiek B, Kanitz M, Schimanski U, Bohrer H, Waldherr R, Martin E, Kauffmann G, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. Molecular cloning of genes differentially regulated by TNF-alpha in bovine aortic endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 38(3):802-813.
- Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS. 1995. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg* 222(2):146-154.
- Lipper S, Kahn LB, Reddick RL. 1980. The myofibroblast. *Pathol Annu* 15(Pt 1):409-441.
- Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. 2003a. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta ) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 278(13):11721-11728.

- Liu JF, Crepin M, Liu JM, Barritault D, Ledoux D. 2002. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 293(4):1174-1182.
- Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh AA, Tellez C, Williams S, Jung YD, Fan F, Takeda A, Akagi M, Bar-Eli M, Gallick GE, Ellis LM. 2003b. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res* 63(13):3632-3636.
- Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. 1999. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol* 163(7):4049-4057.
- Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. 1998. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med* 188(3):475-482.
- Loftus EV, Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126(6):1504-1517.
- Lollini PL, D'Errico A, De Giovanni C, Landuzzi L, Frabetti F, Nicoletti G, Cavallo F, Giovarelli M, Grigioni WF, Nanni P. 1995. Systemic effects of cytokines released by gene-transduced tumor cells: marked hyperplasia induced in small bowel by gamma-interferon transfectants through host lymphocytes. *Int J Cancer* 61(3):425-430.
- Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. 2001. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 49(6):777-782.
- Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El Yafi F, Colombel JF, Belaiche J. 2003. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 52(4):552-557.
- Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, Boniver J, Belaiche J, Malaise M. 2000. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 120(2):241-246.
- Louvard D, Kedinger M, Hauri HP. 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu Rev Cell Biol* 8:157-195.
- Low FN, McCluggage SG. 1984. Microdissection by ultrasonication: scanning electron microscopy of the epithelial basal lamina of the alimentary canal in the rat. *Am J Anat* 169(2):137-147.
- Lu Y, Fukuda K, Liu Y, Kumagai N, Nishida T. 2004. Dexamethasone inhibition of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(9):2998-3004.

- Lund PK, Zimmermann EM. 1996. Insulin-like growth factors and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10(1):83-96.
- Lutz M, Knaus P. 2002. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14(12):977-988.
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106(5):1659-1665.
- Ma C, Chegini N. 1999. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF-beta1. *Mol Hum Reprod* 5(10):950-954.
- Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. 1999a. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 7(6):477-485.
- Ma TY. 1997. Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 214(4):318-327.
- Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. 2005. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(3):G422-430.
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. 2004. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(3):G367-376.
- Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. 1999b. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1):G965-974.
- Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M, Tarnawski A. 2000. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech* 51(2):156-168.
- Maccioni F, Bruni A, Viscido A, Colaiacomo MC, Cocco A, Montesani C, Caprilli R, Marini M. 2006. MR imaging in patients with Crohn disease: value of T2- versus T1-weighted gadolinium-enhanced MR sequences with use of an oral superparamagnetic contrast agent. *Radiology* 238(2):517-530.
- MacEwan DJ. 2002. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135(4):855-875.
- Machesney M, Tidman N, Waseem A, Kirby L, Leigh I. 1998. Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. *Am J Pathol* 152(5):1133-1141.
- Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, Farina AR, Nason AM, Hartzler JL, Thorgeirsson UP. 1992. Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis* 12(3-4):168-184.

- Mackman N. 2009. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:136-139.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. 1990. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 265(28):17238-17245.
- Madara JL, Stafford J. 1989. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 83(2):724-727.
- Madge LA, Pober JS. 2000. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275(20):15458-15465.
- Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307(5710):734-738.
- Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Goke M, Gray T, Podolsky DK, Hawkey CJ. 1997a. Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1):G1341-1348.
- Mahida YR, Galvin AM, Gray T, Makh S, McAlindon ME, Sewell HF, Podolsky DK. 1997b. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 109(2):377-386.
- Mahida YR, Wu K, Jewell DP. 1989. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30(6):835-838.
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. 1971. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173(996):548-550.
- Malek AM, Greene AL, Izumo S. 1993. Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13):5999-6003.
- Mallat A, Fouassier L, Preaux AM, Gal CS, Raufaste D, Rosenbaum J, Dhumeaux D, Jouneaux C, Mavier P, Lotersztajn S. 1995. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J Clin Invest* 96(1):42-49.
- Manousou P, Kolios G, Drygiannakis I, Pyrovolaki K, Bourikas L, Papadaki HA, Kouroumalis E. 2008. Expression of a splice variant of CXCR3 in Crohn's disease patients; indication for a lymphocyte--epithelial cell interaction. *J Gastroenterol Hepatol* 23(12):1823-1833.

- Marano CW, Lewis SA, Garulacan LA, Soler AP, Mullin JM. 1998. Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol* 161(3):263-274.
- Maric I, Poljak L, Zoricic S, Bobinac D, Bosukonda D, Sampath KT, Vukicevic S. 2003. Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats. *J Cell Physiol* 196(2):258-264.
- Marsen TA, Weber F, Egink G, Suckau G, Baldamus CA. 1999. Cyclosporin A induces prepro endothelin-1 gene transcription in human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 379(1):97-106.
- Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. 1992. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut* 33(12):1664-1670.
- Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. 2001. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 28(3):261-265.
- Martin P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81.
- Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol* 27(5):1091-1097.
- Massague J. 1999. Wounding Smad. *Nat Cell Biol* 1(5):E117-119.
- Massague J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19(8):1745-1754.
- Masuda M, Nakamura S, Murakami T, Komiyama Y, Takahashi H. 1996. Association of tissue factor with a gamma chain homodimer of the IgE receptor type I in cultured human monocytes. *Eur J Immunol* 26(10):2529-2532.
- Mathieu MN, Hamroun D, Pouzeratte Y, Guerineau NC, Guillon G, Chevillard C. 1998. Adrenal steroid-secreting cells express endothelin-1. *Endocr Res* 24(3-4):743-747.
- Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. 1991. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(13):3221-3237.
- Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum E, Kim YS. 1990. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* 98(5 Pt 1):1199-1207.

- Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Chung KH. 2000. Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 20(6B):4331-4338.
- Matthes H, Herbst H, Schuppan D, Stallmach A, Milani S, Stein H, Riecken EO. 1992. Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 102(2):431-442.
- Matthes H, Stallmach A, Matthes B, Herbst H, Schuppan D, Riecken EO. 1993. [Indications for different collagen metabolism in Crohn disease and ulcerative colitis]. *Med Klin (Munich)* 88(4):185-192.
- Mauch C, Eckes B, Hunzelmann N, Oono T, Kozłowska E, Krieg T. 1993. Control of fibrosis in systemic scleroderma. *J Invest Dermatol* 100(1):92S-96S.
- Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C. 2006. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 4(6):1323-1330.
- Maximow AA, Bloom W. 1930. *A text-book of histology*. Philadelphia: Saunders.
- May GR, Sutherland LR, Meddings JB. 1993. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104(6):1627-1632.
- McAlindon ME, Gray T, Galvin A, Sewell HF, Podolsky DK, Mahida YR. 1998. Differential lamina propria cell migration via basement membrane pores of inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 115(4):841-848.
- McCabe RP, Secrist H, Botney M, Egan M, Peters MG. 1993. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 66(1):52-58.
- McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. 1999. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol* 163(10):5693-5699.
- McGaha T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE, Bona C. 2001. Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R alpha and transforming growth factor-beta genes. *J Invest Dermatol* 116(1):136-143.
- McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR. 1993. Transforming growth factor-beta and IL-1 beta act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 151(2):970-978.
- McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR. 1995. The regulation of IL-6 secretion from IEC-6 intestinal epithelial cells by cytokines and mucosally important antigens. *Adv Exp Med Biol* 371A:229-232.
- McGee DW, Vitkus SJ. 1996. IL-4 enhances IEC-6 intestinal epithelial cell proliferation yet has no effect on IL-6 secretion. *Clin Exp Immunol* 105(2):274-277.



- McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. 2002. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(1):C172-182.
- McKaig BC, Makh SS, Hawkey CJ, Podolsky DK, Mahida YR. 1999. Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):G1087-1093.
- McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. 2003. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 162(4):1355-1360.
- McKay DM, Croitoru K, Perdue MH. 1996. T cell-monocyte interactions regulate epithelial physiology in a coculture model of inflammation. *Am J Physiol* 270(2 Pt 1):C418-428.
- McKay DM, Singh PK. 1997. Superantigen activation of immune cells evokes epithelial (T84) transport and barrier abnormalities via IFN-gamma and TNF alpha: inhibition of increased permeability, but not diminished secretory responses by TGF-beta2. *J Immunol* 159(5):2382-2390.
- McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. 2009. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 136(7):2074-2091.
- McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR, Owens GK. 1993. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 91(1):94-98.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. 2001. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276(47):43503-43508.
- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289(5482):1202-1206.
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100(4):1160-1167.
- Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A, Malagelada JR. 2003. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(1):G116-122.
- Merkel JR, DiPaolo BR, Hallock GG, Rice DC. 1988. Type I and type III collagen content of healing wounds in fetal and adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 187(4):493-497.

- Mifflin RC, Saada JI, Di Mari JF, Adegboyega PA, Valentich JD, Powell DW. 2002. Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(4):C824-834.
- Milani S, Grappone C, Pellegrini G, Schuppan D, Herbst H, Calabro A, Casini A, Pinzani M, Surrenti C. 1994. Undulin RNA and protein expression in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 20(4 Pt 1):908-916.
- Mimura T, Bateman AC, Lee RL, Johnson PA, McDonald PJ, Talbot IC, Kamm MA, MacDonald TT, Pender SL. 2004. Up-regulation of collagen and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in colonic diverticular disease. *Dis Colon Rectum* 47(3):371-378; discussion 378-379.
- Mitani H, Takimoto M, Bandoh T, Kimura M. 2000. Increases of vascular endothelin-converting enzyme activity and endothelin-1 level on atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 387(3):313-319.
- Mitroulis I, Kambas K, Anyfanti P, Doulas M, Ritis K. 2011. The multivalent activity of the tissue factor-thrombin pathway in thrombotic and non-thrombotic disorders as a target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets* 15(1):75-89.
- Miyagi E, Yasumitsu H, Hirahara F, Nagashima Y, Minaguchi H, Miyazaki K, Umeda M. 1995. Marked induction of gelatinases, especially type B, in host fibroblasts by human ovarian cancer cells in athymic mice. *Clin Exp Metastasis* 13(2):89-96.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7(12):1191-1204.
- Miyazono K, Heldin CH. 1989. Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature* 338(6211):158-160.
- Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH. 1993. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 8(1):11-22.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *Embo J* 10(5):1091-1101.
- Miyazono K, Thyberg J, Heldin CH. 1992. Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. *J Biol Chem* 267(8):5668-5675.
- Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T, Hamaguchi M. 2006. A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor-alpha-dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. *Cancer Res* 66(13):6778-6784.
- Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. 2008. TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1:S50-53.

- Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Monteleone I, Fina D, Caruso R, Gioia V, Ballerini S, Federici G, Bernardini S, Pallone F, MacDonald TT. 2005. Post-transcriptional regulation of Smad7 in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 129(5):1420-1429.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. 2001. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 108(4):601-609.
- Monteleone G, Mann J, Monteleone I, Vavassori P, Bremner R, Fantini M, Del Vecchio Blanco G, Tersigni R, Alessandrini L, Mann D, Pallone F, MacDonald TT. 2004a. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem* 279(6):3925-3932.
- Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. 2004b. Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol* 25(10):513-517.
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. 1991. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67(5):901-908.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705(2):69-89.
- Moore R, Carlson S, Madara JL. 1989. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol* 257(2 Pt 1):G274-283.
- Moraitis S, Langdon SP, Miller WR. 1997. Endothelin expression and responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 33(4):661-668.
- Moraitis S, Miller WR, Smyth JF, Langdon SP. 1999. Paracrine regulation of ovarian cancer by endothelin. *Eur J Cancer* 35(9):1381-1387.
- Moren A, Olofsson A, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. 1994. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J Biol Chem* 269(51):32469-32478.
- Mori Y, Chen SJ, Varga J. 2003. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48(7):1964-1978.
- Mortensen LH. 1999. Endothelin and the central and peripheral nervous systems: a decade of endothelin research. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(12):980-984.
- Moses HL, Coffey RJ, Jr., Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J. 1987. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J Cell Physiol Suppl* 5:1-7.
- Motomura Y, Khan WI, El-Sharkawy RT, Verma-Gandhu M, Verdu EF, Gaudie J, Collins SM. 2006. Induction of a fibrogenic response in mouse colon by overexpression of monocyte chemoattractant protein 1. *Gut* 55(5):662-670.

- Mott JD, Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16(5):558-564.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. 2002. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82(1-2):85-91.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114(Pt 24):4359-4369.
- Mowat AM, Hutton AK, Garside P, Steel M. 1993. A role for interleukin-1 alpha in immunologically mediated intestinal pathology. *Immunology* 80(1):110-115.
- Mowat AM, Widmer MB. 1995. A role for IL-4 in immunologically mediated enteropathy. *Clin Exp Immunol* 99(1):65-69.
- Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PE, Roncal CA, Glushakova OY, Chiodo VA, Atkinson MA, Hauswirth WW, Flotte TR, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. 2005. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16(12):3651-3660.
- Muller M, Albrecht S, Golfert F, Hofer A, Funk RH, Magdolen V, Flossel C, Luther T. 1999. Localization of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells. *Exp Cell Res* 248(1):136-147.
- Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2005. Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg* 242(6):880-887, discussion 887-889.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51(5):1376-1382.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96(3):319-328.
- Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. 2000. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 275(5):3687-3692.
- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. 1993. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 34(12):1705-1709.
- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. 1995. Distribution and density of TNF immunoreactivity in chronic inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 371B:1327-1330.

- Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. 1991. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 32(8):913-917.
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. 1991. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 277 ( Pt 1):277-279.
- Murphy G, Koklitis P, Carne AF. 1989. Dissociation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from enzyme complexes yields fully active inhibitor. *Biochem J* 261(3):1031-1034.
- Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR. 1999. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 274(9):5830-5834.
- Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL, Varesio L. 1990. Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood* 76(12):2466-2469.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. 1987. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science* 237(4820):1333-1336.
- Naftalin RJ, Pedley KC. 1999. Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J Physiol* 514 ( Pt 1):211-227.
- Nagarajan RP, Chen F, Li W, Vig E, Harrington MA, Nakshatri H, Chen Y. 2000. Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappaB. *Biochem J* 348 Pt 3:591-596.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274(31):21491-21494.
- Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R. 1989. Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158(3):880-883.
- Nakamura K, Sasaki S, Moriguchi J, Morimoto S, Miki S, Kawa T, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M. 1999. Central effects of endothelin and its antagonists on sympathetic and cardiovascular regulation in SHR-SP. *J Cardiovasc Pharmacol* 33(6):876-882.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389(6651):631-635.

- Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. 1999. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104(1):5-11.
- Negrete H, Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. 1995. Role for transforming growth factor beta in thromboxane-induced increases in mesangial cell fibronectin synthesis. *Diabetes* 44(3):335-339.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18(5):1135-1149.
- Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. 1996. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 56(4):663-668.
- Neurath MF, Vehling D, Schunk K, Holtmann M, Brockmann H, Helisch A, Orth T, Schreckenberger M, Galle PR, Bartenstein P. 2002a. Noninvasive assessment of Crohn's disease activity: a comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography, hydromagnetic resonance imaging, and granulocyte scintigraphy with labeled antibodies. *Am J Gastroenterol* 97(8):1978-1985.
- Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. 2002b. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 195(9):1129-1143.
- Niessner M, Volk BA. 1995. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101(3):428-435.
- Niland S, Cremer A, Fluck J, Eble JA, Krieg T, Sollberg S. 2001. Contraction-dependent apoptosis of normal dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 116(5):686-692.
- Nishimura S, Takahashi M, Ota S, Hirano M, Hiraishi H. 1998. Hepatocyte growth factor accelerates restitution of intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 33(2):172-178.
- Niu JO, Munshi UK, Siddiq MM, Parton LA. 1998. Early increase in endothelin-1 in tracheal aspirates of preterm infants: correlation with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 132(6):965-970.
- Noiri E, Hu Y, Bahou WF, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS. 1997. Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 272(3):1747-1752.
- Nusrat A, Delp C, Madara JL. 1992. Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. *J Clin Invest* 89(5):1501-1511.

- Nusrat A, Parkos CA, Bacarra AE, Godowski PJ, Delp-Archer C, Rosen EM, Madara JL. 1994. Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J Clin Invest* 93(5):2056-2065.
- Nusse R. 2003. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130(22):5297-5305.
- O'Kane S, Ferguson MW. 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1):63-78.
- O'Neill LA, Greene C. 1998. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63(6):650-657.
- Oemar BS, Luscher TF. 1997. Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(8):1483-1489.
- Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF. 1997. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 95(4):831-839.
- Ogawa K, Chen F, Kim YJ, Chen Y. 2003. Transcriptional regulation of tristetraprolin by transforming growth factor-beta in human T cells. *J Biol Chem* 278(32):30373-30381.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):603-606.
- Ohneda K, Ulshen MH, Fuller CR, D'Ercole AJ, Lund PK. 1997. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 112(2):444-454.
- Ohnishi A, Yamaguchi K, Kusuhara M, Abe K, Kimura S. 1989. Mobilization of intracellular calcium by endothelin in Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2):489-495.
- Ohtani H, Kagaya H, Nagura H. 1995. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta receptors I and II in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 30 Suppl 8:76-77.
- Oikawa T, Kushuhara M, Ishikawa S, Hitomi J, Kono A, Iwanaga T, Yamaguchi K. 1994. Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 69(6):1059-1064.

- Okada H, Inoue T, Suzuki H, Strutz F, Neilson EG. 2000. Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6:44-46.
- Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, Bamba T. 2002. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol* 37(3):317-324.
- Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J, Hakim J, de Prost D. 1998. Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 91(8):2698-2703.
- Olman MA. 2003. Epithelial cell modulation of airway fibrosis in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(2):125-128.
- Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG. 2010. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 92(11):1587-1596.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22(10):571-579.
- Opgenorth TJ. 1995. Endothelin receptor antagonism. *Adv Pharmacol* 33:1-65.
- Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. 1992. Endothelin-converting enzymes. *Faseb J* 6(9):2653-2659.
- Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM, Alvestrand A, Ahlborg G. 1997. Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans. *Acta Physiol Scand* 161(2):211-220.
- Paduch R, Kandefers-Szerszen M. 2011. Expression and activation of proteases in co-cultures. *Exp Toxicol Pathol* 63(1-2):79-87.
- Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P. 1999. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 30(4):968-976.
- Parker FG, Barnes EN, Kaye GI. 1974. The pericryptal fibroblast sheath. IV. Replication, migration, and differentiation of the subepithelial fibroblasts of the crypt and villus of the rabbit jejunum. *Gastroenterology* 67(4):607-621.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4(8):617-629.
- Parry GC, Mackman N. 2000. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest* 105(11):1547-1554.



- Pascal RR, Kaye GI, Lane N. 1968. Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. I. Autoradiographic studies of normal rabbit colon. *Gastroenterology* 54(5):835-851.
- Paul S, Rimando AM, Lee HJ, Ji Y, Reddy BS, Suh N. 2009. Anti-inflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2(7):650-657.
- Pawar S, Kartha S, Toback FG. 1995. Differential gene expression in migrating renal epithelial cells after wounding. *J Cell Physiol* 165(3):556-565.
- Peacock AJ, Dawes KE, Shock A, Gray AJ, Reeves JT, Laurent GJ. 1992. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(5):492-499.
- Pedersen G, Saermark T, Kirkegaard T, Brynskov J. 2008. Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clin Exp Immunol*.
- Peduto Eberl L, Bovey R, Juillerat-Jeanneret L. 2003. Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 88(5):788-795.
- Pelton RW, Johnson MD, Perkett EA, Gold LI, Moses HL. 1991. Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 mRNA and protein in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5(6):522-530.
- Pender SL, Braegger C, Gunther U, Monteleone G, Meuli M, Schuppan D, Macdonald TT. 2003. Matrix metalloproteinases in necrotising enterocolitis. *Pediatr Res* 54(2):160-164.
- Pender SL, Breese EJ, Gunther U, Howie D, Wathen NC, Schuppan D, MacDonald TT. 1998a. Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* 115(3):573-583.
- Pender SL, Fell JM, Chamow SM, Ashkenazi A, MacDonald TT. 1998b. A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. *J Immunol* 160(8):4098-4103.
- Pender SL, MacDonald TT. 2004. Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. *Curr Opin Pharmacol* 4(6):546-550.
- Pender SL, Salmela MT, Monteleone G, Schnapp D, McKenzie C, Spencer J, Fong S, Saarialho-Kere U, MacDonald TT. 2000. Ligation of alpha4ss1 integrin on human intestinal mucosal mesenchymal cells selectively Up-regulates membrane type-1 matrix metalloproteinase and confers a migratory phenotype. *Am J Pathol* 157(6):1955-1962.
- Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. 1997. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 158(4):1582-1590.

- Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV. 2000. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 275(19):14632-14641.
- Pendurthi UR, Alok D, Rao LV. 1997. Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23):12598-12603.
- Perreault N, Sackett SD, Katz JP, Furth EE, Kaestner KH. 2005. Foxl1 is a mesenchymal Modifier of Min in carcinogenesis of stomach and colon. *Genes Dev* 19(3):311-315.
- Philip S, Bulbule A, Kundu GC. 2004. Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. *Glycoconj J* 21(8-9):429-441.
- Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. 2000. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 32(4):565-576.
- Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R, Bottinger EP, Roberts AB. 2001. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 276(23):19945-19953.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. 1997. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 137(6):1445-1457.
- Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. 2009. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* 4(10):e7475.
- Pinson DM, LeClaire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell SW. 1992. Regulation by transforming growth factor-beta 1 of expression and function of the receptor for IFN-gamma on mouse macrophages. *J Immunol* 149(6):2028-2034.
- Planchon S, Fiocchi C, Takafuji V, Roche JK. 1999. Transforming growth factor-beta1 preserves epithelial barrier function: identification of receptors, biochemical intermediates, and cytokine antagonists. *J Cell Physiol* 181(1):55-66.
- Planchon SM, Martins CA, Guerrant RL, Roche JK. 1994. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J Immunol* 153(12):5730-5739.
- Playford RJ, Boulton R, Ghatei MA, Bloom SR, Wright NA, Goodlad RA. 1996. Comparison of the effects of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor on gastrointestinal proliferation and hormone release. *Digestion* 57(5):362-367.

- Podesser BK, Siwik DA, Eberli FR, Sam F, Ngoy S, Lambert J, Ngo K, Apstein CS, Colucci WS. 2001. ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3):H984-991.
- Podolsky DK. 1993. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* 264(2 Pt 1):G179-186.
- Podolsky DK. 1997. Healing the epithelium: solving the problem from two sides. *J Gastroenterol* 32(1):122-126.
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347(6):417-429.
- Polosa R, Puddicombe SM, Krishna MT, Tuck AB, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. 2002. Expression of c-erbB receptors and ligands in the bronchial epithelium of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 109(1):75-81.
- Pontrelli P, Ursi M, Ranieri E, Capobianco C, Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G. 2006. CD40L proinflammatory and profibrotic effects on proximal tubular epithelial cells: role of NF-kappaB and lyn. *J Am Soc Nephrol* 17(3):627-636.
- Poritz LS, Rowe WA, Koltun WA. 2002. Remicade does not abolish the need for surgery in fistulizing Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 45(6):771-775.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. 1987. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165(1):251-256.
- Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenheim NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Petersen LC. 1998. Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 273(11):6228-6232.
- Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. 2001. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195(2):229-235.
- Pourreyron C, Dumortier J, Ratineau C, Nejjari M, Beatrix O, Jacquier MF, Remy L, Chayvialle JA, Scoazec JY. 2003. Age-dependent variations of human and rat colon myofibroblasts in culture: Influence on their functional interactions with colon cancer cells. *Int J Cancer* 104(1):28-35.
- Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. 2005. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(1):G2-7.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. 1999a. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):C1-9.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. 1999b. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 277(2 Pt 1):C183-201.

- Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. 2011. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* 73:213-237.
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. 1999. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 340(18):1398-1405.
- Price SJ, Greaves DR, Watkins H. 2001. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276(10):7549-7558.
- Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, Lund PK. 2000a. IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(6):G1307-1322.
- Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. 2000b. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(4):G653-659.
- Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. 2000. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *Faseb J* 14(10):1362-1374.
- Purchio AF, Cooper JA, Brunner AM, Lioubin MN, Gentry LE, Kovacina KS, Roth RA, Marquardt H. 1988. Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor. *J Biol Chem* 263(28):14211-14215.
- Raab G, Klagsbrun M. 1997. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1333(3):F179-199.
- Rafail S, Ritis K, Schaefer K, Kourtzelis I, Speletas M, Doumas M, Giaglis S, Kambas K, Konstantinides S, Kartalis G. 2008. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNFalpha involvement. *Thromb Res* 122(3):366-375.
- Rampton DS, Hawkey CJ. 1984. Prostaglandins and ulcerative colitis. *Gut* 25(12):1399-1413.
- Rao VR, Krishnamoorthy RR, Yorio T. 2008. Endothelin-1 mediated regulation of extracellular matrix collagens in cells of human lamina cribrosa. *Exp Eye Res* 86(6):886-894.
- Rapaport SI, Rao LV. 1995. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74(1):7-17.
- Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N. 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 168(9):4361-4371.

- Reddi AH, Cunningham NS. 1990. Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 11:33-34.
- Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. 2008. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 118(10):3453-3461.
- Redecha P, Tilley R, Tencati M, Salmon JE, Kirchhofer D, Mackman N, Girardi G. 2007. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 110(7):2423-2431.
- Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, Howarth PH. 1997. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 156(2 Pt 1):642-647.
- Reed CC, Waterhouse A, Kirby S, Kay P, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. 2005. Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene* 24(6):1104-1110.
- Reel B, Oktay G, Ozkal S, Islekel H, Ozer E, Ozsarlak-Sozer G, Cavdar Z, Akhisaroglu ST, Kerry Z. 2009. MMP-2 and MMP-9 alteration in response to collaring in rabbits: the effects of endothelin receptor antagonism. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 14(4):292-301.
- Regan MC, Flavin BM, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. 2000. Stricture formation in Crohn's disease: the role of intestinal fibroblasts. *Ann Surg* 231(1):46-50.
- Rege TA, Hagood JS. 2006. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *Faseb J* 20(8):1045-1054.
- Reguly T, Wrana JL. 2003. In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends Cell Biol* 13(5):216-220.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. 1996. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 39(5):684-689.
- Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. 1995. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 108(1):40-50.
- Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. 1996. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 111(6):1706-1713.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. 1993. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 94(1):174-181.

- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. 1998. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 13(5):893-906.
- Richman PI, Tilly R, Jass JR, Bodmer WF. 1987. Colonic pericrypt sheath cells: characterisation of cell type with new monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 40(6):593-600.
- Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Wilson SJ, Djukanovic R, Dent G, Holgate ST, Davies DE. 2001. The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(3):385-391.
- Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. 2007. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 56(1):130-139.
- Rieder F, Fiocchi C. 2009. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6(4):228-235.
- Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD. 2006. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* 177(7):4794-4802.
- Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL. 1975. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 30(3):311-316.
- Roberts AB. 1998. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 24(2-3):111-119.
- Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. 2003. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 995:1-10.
- Roberts AB, Sporn MB. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8(1):1-9.
- Rockey DC. 1995. Characterization of endothelin receptors mediating rat hepatic stellate cell contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 207(2):725-731.
- Rockey DC, Cello JP. 1993. Evaluation of the gastrointestinal tract in patients with iron-deficiency anemia. *N Engl J Med* 329(23):1691-1695.
- Rockey DC, Chung JJ. 1996. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 98(6):1381-1388.
- Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. 2003. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res* 92(12):1288-1295.
- Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-Lopez E, Plaza JJ, Egido J. 2005. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth

factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97(2):125-134.

- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. 2005. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 294:23-29.
- Rodriguez P, Heyman M, Candalh C, Blaton MA, Bouchaud C. 1995. Tumour necrosis factor-alpha induces morphological and functional alterations of intestinal HT29 cl.19A cell monolayers. *Cytokine* 7(5):441-448.
- Roelen BA, Cohen OS, Raychowdhury MK, Chadee DN, Zhang Y, Kyriakis JM, Alessandrini AA, Lin HY. 2003. Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4):C823-830.
- Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. 1998. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115(2):357-369.
- Rokutan K, Sakai A, Teramoto F, Kido Y, Shizuka F, Kishi K. 1994. Epidermal growth factor-induced mitogen signals in cultured intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 29 Suppl 7:59-62.
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. 1996a. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 2(3):287-292.
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. 1996b. Plasminogen and wound healing. *Nat Med* 2(7):725.
- Romer J, Lund LR, Eriksen J, Pyke C, Kristensen P, Dano K. 1994. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 102(4):519-522.
- Rosano L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. 2001. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 61(22):8340-8346.
- Rottingen JA, Enden T, Camerer E, Iversen JG, Prydz H. 1995. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem* 270(9):4650-4660.
- Rousset M. 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68(9):1035-1040.
- Roy S, Samanta K, Chakraborti T, Chowdhury A, Chakraborti S. 2011. Role of TGF-beta1 and TNF-alpha in IL-1beta mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: involvement of an aprotinin sensitive protease. *Arch Biochem Biophys* 513(1):61-69.

- Rubanyi GM, Polokoff MA. 1994. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46(3):325-415.
- Ruf W, Mueller BM. 1996. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol* 3(5):379-384.
- Ruf W, Mueller BM. 1999. Tissue factor signaling. *Thromb Haemost* 82(2):175-182.
- Ruhl A, Hurst S, Collins SM. 1994. Synergism between interleukins 1 beta and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 107(4):993-1001.
- Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. 2003. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. *Genes Cells* 8(6):515-523.
- Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. 1990. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 99(4):956-963.
- Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R, Coenegrachts JL, Coremans G. 1984. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut* 25(6):665-672.
- Ruwhof C, van Wamel AE, Egas JM, van der Laarse A. 2000. Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 208(1-2):89-98.
- Saarialho-Kere UK. 1998. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl:S47-54.
- Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Puolakkainen P, Airola K, Parks WC, Karjalainen-Lindsberg ML. 1996. Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 148(2):519-526.
- Saharinen J, Taipale J, Keski-Oja J. 1996. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *Embo J* 15(2):245-253.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348(6303):732-735.
- Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, Pender SL. 2002. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. *Gut* 51(4):540-547.
- Salmela MT, Pender SL, Reunala T, MacDonald T, Saarialho-Kere U. 2001. Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions of patients with dermatitis herpetiformis. *Gut* 48(4):496-502.



- Salvati VM, Bajaj-Elliott M, Poulsom R, Mazzarella G, Lundin KE, Nilsen EM, Troncone R, MacDonald TT. 2001. Keratinocyte growth factor and coeliac disease. *Gut* 49(2):176-181.
- Sampaio AL, Rae GA, Henriques MM. 2000. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. *J Leukoc Biol* 67(2):189-195.
- Sanders KM, Ordog T, Ward SM. 2002. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(5):G747-756.
- Sands BE, Arsenault JE, Rosen MJ, Alsahli M, Bailen L, Banks P, Bensen S, Bousvaros A, Cave D, Cooley JS, Cooper HL, Edwards ST, Farrell RJ, Griffin MJ, Hay DW, John A, Lidofsky S, Olans LB, Peppercorn MA, Rothstein RI, Roy MA, Saletta MJ, Shah SA, Warner AS, Wolf JL, Vecchio J, Winter HS, Zawacki JK. 2003. Risk of early surgery for Crohn's disease: implications for early treatment strategies. *Am J Gastroenterol* 98(12):2712-2718.
- Sands BE, Winston BD, Salzberg B, Safdi M, Barish C, Wruble L, Wilkins R, Shapiro M, Schwertschlag US. 2002. Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16(3):399-406.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124(13):2659-2670.
- Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Diaz-Gonzalez F, Farre E, Salas A, Radomski MW, Quintero E. 2006. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol* 12(40):6464-6472.
- Sappino AP, Dietrich PY, Skalli O, Widgren S, Gabbiani G. 1989. Colonic pericryptal fibroblasts. Differentiation pattern in embryogenesis and phenotypic modulation in epithelial proliferative lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 415(6):551-557.
- Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. 1990. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 63(2):144-161.
- Sasaki M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, Kagaya M, Shioya T, Miura M. 2000. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators Inflamm* 9(3-4):155-160.
- Sato H, Kita M, Seiki M. 1993. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control

- elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 268(31):23460-23468.
- Sato H, Seiki M. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8(2):395-405.
- Sato M, Shegogue D, Gore EA, Smith EA, McDermott PJ, Trojanowska M. 2002. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 118(4):704-711.
- Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. 2000. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 27(1):149-154.
- Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. 1997. Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Haemost* 78(3):1138-1141.
- Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. 1996. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 75(3):389-392.
- Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. 1990. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* 111(2):757-763.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55(6):749-753.
- Savendahl L, Underwood LE, Haldeman KM, Ulshen MH, Lund PK. 1997. Fasting prevents experimental murine colitis produced by dextran sulfate sodium and decreases interleukin-1 beta and insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 138(2):734-740.
- Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. 2005. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem* 269(1-2):209-216.
- Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. 1997. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 386(6625):616-619.
- Schildmeyer LA, Braun R, Taffet G, DeBiasi M, Burns AE, Bradley A, Schwartz RJ. 2000. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *Faseb J* 14(14):2213-2220.
- Schmid RM, Adler G. 2000. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 118(6):1208-1228.

- Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. 1994. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 425(1):3-24.
- Schmitz H, Barmeyer C, Gitter AH, Wullstein F, Bentzel CJ, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD. 2000. Epithelial barrier and transport function of the colon in ulcerative colitis. *Ann N Y Acad Sci* 915:312-326.
- Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, D'Orazi G, Murphy AN, Bird RE, Hoythya M, Fuerst TR, French DL, et al. 1993. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 156(2):235-246.
- Schor AM, Rushton G, Ferguson JE, Howell A, Redford J, Schor SL. 1994. Phenotypic heterogeneity in breast fibroblasts: functional anomaly in fibroblasts from histologically normal tissue adjacent to carcinoma. *Int J Cancer* 59(1):25-32.
- Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. 1995. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108(5):1434-1444.
- Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Krutzsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE. 1995. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270(13):7304-7310.
- Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol* 70(12):8624-8629.
- Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. 1993. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 122(4):923-932.
- Schuppan D, Cantaluppi MC, Becker J, Veit A, Bunte T, Troyer D, Schuppan F, Schmid M, Ackermann R, Hahn EG. 1990. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem* 265(15):8823-8832.
- Schuppan D, Freitag T. 2004. Fistulising Crohn's disease: MMPs gone awry. *Gut* 53(5):622-624.
- Schuppan D, Hahn EG. 2000. MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* 47(1):12-14.
- Scotton CJ, Krupiczkoj MA, Konigshoff M, Mercer PF, Lee YC, Kaminski N, Morser J, Post JM, Maher TM, Nicholson AG, Moffatt JD, Laurent GJ, Derian CK, Eickelberg O, Chambers RC. 2009. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* 119(9):2550-2563.
- Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Thelmo WL. 1980. The myofibroblast: biologic, pathologic, and theoretical considerations. *Pathol Annu* 15(Pt 1):443-470.
- Seifert WF, Wobbes T, Hendriks T. 1996. Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. *Gut* 39(1):114-119.

- Selman M, Pardo A. 2002. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* 3:3.
- Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142(3):873-881.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1994. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 107 ( Pt 5):1137-1157.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108 ( Pt 3):985-1002.
- Shan B, Hagood JS, Zhuo Y, Nguyen HT, MacEwen M, Morris GF, Lasky JA. 2010. Thy-1 attenuates TNF-alpha-activated gene expression in mouse embryonic fibroblasts via Src family kinase. *PLoS One* 5(7):e11662.
- Shanahan F. 2002. Crohn's disease. *Lancet* 359(9300):62-69.
- Shao R, Shi Z, Gotwals PJ, Koteliansky VE, George J, Rockey DC. 2003. Cell and molecular regulation of endothelin-1 production during hepatic wound healing. *Mol Biol Cell* 14(6):2327-2341.
- Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. 2004a. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost* 92(2):262-274.
- Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. 2004b. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol* 164(6):2055-2066.
- Sheppard D, Cohen DS, Wang A, Busk M. 1992. Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *J Biol Chem* 267(24):17409-17414.
- Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15(6):2707-2719.
- Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, Black CM, Abraham DJ. 2001. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116(3):417-425.
- Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, Fonseca C, du Bois RM, Martin GR, Black CM, Abraham DJ. 2000. Autocrine overexpression of CTGF

maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res* 259(1):213-224.

Shi-Wen X, Renzoni EA, Kennedy L, Howat S, Chen Y, Pearson JD, Bou-Gharios G, Dashwood MR, du Bois RM, Black CM, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. 2007. Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts. *Matrix Biol* 26(8):625-632.

Shi-Wen X, Rodriguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, du Bois RM, Denton CP, Black CM, Abraham DJ, Leask A. 2006. Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. *Mol Cell Biol* 26(14):5518-5527.

Shi J, Aono S, Lu W, Ouellette AJ, Hu X, Ji Y, Wang L, Lenz S, van Ginkel FW, Liles M, Dykstra C, Morrison EE, Elson CO. 2007. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1 $\beta$  secretion. *J Immunol* 179(2):1245-1253.

Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685-700.

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 94(5):585-594.

Shichiri M, Hirata Y, Emori T, Ohta K, Nakajima T, Sato K, Sato A, Marumo F. 1989. Secretion of endothelin and related peptides from renal epithelial cell lines. *FEBS Lett* 253(1-2):203-206.

Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. 1991. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 87(5):1867-1871.

Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, Kono M. 1999. Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF- $\beta$ 1. *Int J Cancer* 82(3):449-458.

Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Danave I, Dillehay DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS, Kudryk B, Kreutzer DL, Rickles FR. 1998. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* 152(2):399-411.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359(6397):693-699.

Silver IA, Eisinger M. 1988. Influence of an epidermal cell extract on skin healing and scar formation. *Int J Tissue React* 10(6):381-385.

- Silverstein MD, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Feagan BG, Nietert PJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. 1999. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology* 117(1):49-57.
- Sime PJ, Marr RA, Gauldie D, Xing Z, Hewlett BR, Graham FL, Gauldie J. 1998. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 153(3):825-832.
- Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. 2002. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(3):G809-818.
- Simmons JG, Pucilowska JB, Lund PK. 1999. Autocrine and paracrine actions of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1):G817-827.
- Simo P, Bouziges F, Lissitzky JC, Sorokin L, Kedinger M, Simon-Assmann P. 1992. Dual and asynchronous deposition of laminin chains at the epithelial-mesenchymal interface in the gut. *Gastroenterology* 102(6):1835-1845.
- Simon-Assmann P, Bouziges F, Freund JN, Perrin-Schmitt F, Kedinger M. 1990. Type IV collagen mRNA accumulates in the mesenchymal compartment at early stages of murine developing intestine. *J Cell Biol* 110(3):849-857.
- Simon-Assmann P, Kedinger M. 1993. Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin Cell Biol* 4(3):221-230.
- Simoncini T, Apa R, Reis FM, Miceli F, Stomati M, Driul L, Lanzone A, Genazzani AR, Petraglia F. 1999. Human umbilical vein endothelial cells: a new source and potential target for corticotropin-releasing factor. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8):2802-2806.
- Simonson MS, Dunn MJ. 1990. Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* 85(3):790-797.
- Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. 2000. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 86(12):1259-1265.
- Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G. 1989. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60(2):275-285.
- Smith JM, Johanesen PA, Wendt MK, Binion DG, Dwinell MB. 2005. CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(2):G316-326.

- Smith TJ, Sempowski GD, Wang HS, Del Vecchio PJ, Lippe SD, Phipps RP. 1995. Evidence for cellular heterogeneity in primary cultures of human orbital fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 80(9):2620-2625.
- Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 115(6):1260-1267.
- Smola H, Thiekotter G, Baur M, Stark HJ, Breitskreutz D, Fusenig NE. 1994. Organotypic and epidermal-dermal co-cultures of normal human keratinocytes and dermal cells: Regulation of transforming growth factor alpha, beta1 and beta2 mRNA levels. *Toxicol In Vitro* 8(4):641-650.
- Sokolovsky M. 1995. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol Ther* 68(3):435-471.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372(6503):231-236.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2:177-185.
- Sorensen BB, Freskgard PO, Nielsen LS, Rao LV, Ezban M, Petersen LC. 1999. Factor VIIa-induced p44/42 mitogen-activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274(30):21349-21354.
- Sorrentino D. 2008. Role of biologics and other therapies in stricturing Crohn's disease: what have we learnt so far? *Digestion* 77(1):38-47.
- Sorrentino D, Terrosu G, Avellini C, Beltrami CA, Bresadola V, Toso F. 2006. Prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease by infliximab. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18(4):457-459.
- Sorrentino D, Terrosu G, Avellini C, Maiero S. 2007. Infliximab with low-dose methotrexate for prevention of postsurgical recurrence of ileocolonic Crohn disease. *Arch Intern Med* 167(16):1804-1807.
- Springall DR, Howarth PH, Counihan H, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. 1991. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet* 337(8743):697-701.
- Stack WA, Mann SD, Roy AJ, Heath P, Sopwith M, Freeman J, Holmes G, Long R, Forbes A, Kamm MA. 1997. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 349(9051):521-524.

- Stahtea XN, Roussidis AE, Kanakis I, Tzanakakis GN, Chalkiadakis G, Mavroudis D, Kletsas D, Karamanos NK. 2007. Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. *Int J Cancer* 121(12):2808-2814.
- Stallmach A, Hahn U, Merker HJ, Hahn EG, Riecken EO. 1989. Differentiation of rat intestinal epithelial cells is induced by organotypic mesenchymal cells in vitro. *Gut* 30(7):959-970.
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. 1992. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 102(6):1920-1929.
- Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, Graf K. 2004. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res* 63(1):87-97.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Stewart CE, Rotwein P. 1996a. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76(4):1005-1026.
- Stewart CE, Rotwein P. 1996b. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J Biol Chem* 271(19):11330-11338.
- Stojilkovic SS, Catt KJ. 1996. Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells. *Front Neuroendocrinol* 17(3):327-369.
- Stoker M, Gherardi E. 1991. Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1072(1):81-102.
- Stoll S, Garner W, Elder J. 1997. Heparin-binding ligands mediate autocrine epidermal growth factor receptor activation in skin organ culture. *J Clin Invest* 100(5):1271-1281.
- Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, Nichols B, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ, Leask A. 2002. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *Faseb J* 16(14):1949-1951.
- Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, Martin GR, Black CM, Abraham D. 2001. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 108(2):241-250.
- Stricklin GP, Welgus HG. 1986. Physiological relevance of erythroid-potentiating activity of TIMP. *Nature* 321(6070):628.
- Strieter RM. 2002. Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165(9):1206-1207; discussion 1207-1208.



- Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. 1997. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 18(2):61-64.
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Muller G. 2001. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59(2):579-592.
- Suemori S, Ciacci C, Podolsky DK. 1991. Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines. *J Clin Invest* 87(6):2216-2221.
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118(2):534-544.
- Sukegawa A, Narita T, Kameda T, Saitoh K, Nohno T, Iba H, Yasugi S, Fukuda K. 2000. The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* 127(9):1971-1980.
- Sumida A, Hasegawa Y, Okamoto M, Hashimoto N, Imaizumi K, Yatsuya H, Yokoi T, Takagi K, Shimokata K, Kawabe T. 2008. TH1/TH2 immune response in lung fibroblasts in interstitial lung disease. *Arch Med Res* 39(5):503-510.
- Supakar PC, Jung MH, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. 1995. Nuclear factor kappa B functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kappa B activity increases during the age-dependent desensitization of the liver. *J Biol Chem* 270(2):837-842.
- Suzuki T, Moraes TJ, Vachon E, Ginzberg HH, Huang TT, Matthay MA, Hollenberg MD, Marshall J, McCulloch CA, Abreu MT, Chow CW, Downey GP. 2005. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(3):231-247.
- Swartz MA, Tschumperlin DJ, Kamm RD, Drazen JM. 2001. Mechanical stress is communicated between different cell types to elicit matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6180-6185.
- Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, Bird J. 1999. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 13(11):1535-1542.
- Synnerstad I, Ekblad E, Sundler F, Holm L. 1998. Gastric mucosal smooth muscles may explain oscillations in glandular pressure: role of vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology* 114(2):284-294.
- Szotowski B, Antoniuk S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2005. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 96(12):1233-1239.

- Tagoe CE, Marjanovic N, Park JY, Chan ES, Abeles AM, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. 2008. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 181(4):2813-2820.
- Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. 1994. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* 124(1-2):171-181.
- Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. 1998. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 75:87-134.
- Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J. 2003. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 121(1):41-50.
- Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. 1990. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 33(5):306-310.
- Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, Yamashita K, Masaki T. 1989. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 264(14):7856-7861.
- Tanabe H, Ayabe T, Maemoto A, Ishikawa C, Inaba Y, Sato R, Moriichi K, Okamoto K, Watari J, Kono T, Ashida T, Kohgo Y. 2007. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochem Biophys Res Commun* 358(1):349-355.
- Tanaka T, Yoshimi M, Maeyama T, Hagimoto N, Kuwano K, Hara N. 2002. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur Respir J* 20(2):359-368.
- Tangkijvanich P, Tam SP, Yee HF, Jr. 2001. Wound-induced migration of rat hepatic stellate cells is modulated by endothelin-1 through rho-kinase-mediated alterations in the acto-myosin cytoskeleton. *Hepatology* 33(1):74-80.
- Taniguchi T, Kakkar AK, Tuddenham EG, Williamson RC, Lemoine NR. 1998. Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor-factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 58(19):4461-4467.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. 1997. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 337(15):1029-1035.
- Tarlton JF, Whiting CV, Tunmore D, Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH, Bland PW. 2000. The role of up-regulated serine proteases and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of a murine model of colitis. *Am J Pathol* 157(6):1927-1935.
- Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y. 1997. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 78(1):200-204.

- Terada M, Kelly EA, Jarjour NN. 2004. Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling? *Am J Respir Crit Care Med* 169(3):373-377.
- Thannickal VJ, Aldweib KD, Rajan T, Fanburg BL. 1998. Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):437-441.
- Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. 2005. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 280(43):36099-36109.
- Thirunavukkarasu C, Yang Y, Subbotin VM, Harvey SA, Fung J, Gandhi CR. 2004. Endothelin receptor antagonist TAK-044 arrests and reverses the development of carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats. *Gut* 53(7):1010-1019.
- Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. 1989. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol* 108(2):661-669.
- Toh ML, Marotte H, Blond JL, Jhumka U, Eljaafari A, Mouglin B, Miossec P. 2006. Overexpression of synoviolin in peripheral blood and synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and continued elevation in nonresponders to infliximab treatment. *Arthritis Rheum* 54(7):2109-2118.
- Tokumasa A, Katsuno T, Tanaga TS, Yokote K, Saito Y, Suzuki Y. 2004. Reduction of Smad3 accelerates re-epithelialization in a murine model of colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 317(2):377-383.
- Tostes RC, Touyz RM, He G, Ammarguella F, Schiffrin EL. 2002. Endothelin A receptor blockade decreases expression of growth factors and collagen and improves matrix metalloproteinase-2 activity in kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 39(6):892-900.
- Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li DJ, et al. 1988. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 41(2):287-296.
- Triebel S, Blaser J, Reinke H, Knauper V, Tschesche H. 1992. Mercurial activation of human PMN leucocyte type IV procollagenase (gelatinase). *FEBS Lett* 298(2-3):280-284.
- Truong LD, Rangdaeng S, Cagle P, Ro JY, Hawkins H, Font RL. 1990. The diagnostic utility of desmin. A study of 584 cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 93(3):305-314.
- Tschumperlin DJ, Shively JD, Kikuchi T, Drazen JM. 2003. Mechanical stress triggers selective release of fibrotic mediators from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(2):142-149.

- Tsukamoto T, Matsui T, Nakata H, Ito M, Natazuka T, Fukase M, Fujita T. 1991. Interleukin-1 enhances the response of osteoblasts to platelet-derived growth factor through the alpha receptor-specific up-regulation. *J Biol Chem* 266(16):10143-10147.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334(6179):260-262.
- Turpeenniemi-Hujanen T. 2005. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87(3-4):287-297.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8(9):726-736.
- Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y. 1997. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57(10):2055-2060.
- Ulloa L, Doody J, Massague J. 1999. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397(6721):710-713.
- Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. 1998. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol* 152(4):1005-1014.
- Valentich JD, Popov V, Saada JI, Powell DW. 1997. Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 272(5 Pt 1):C1513-1524.
- Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, Gauldie J, Collins SM. 2005. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(1):G116-128.
- Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. 2004. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis* 10(1):55-60.
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96(8):2673-2681.
- Van Den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. 2003. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 270(18):3739-3749.
- van der Flier LG, Clevers H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71:241-260.

- Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegebarth A, De Palo M, Anti M, Van Gijn ME, Suijkerbuijk S, Van de Wetering M, Marra G, Clevers H. 2007. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132(2):628-632.
- van der Rest M, Garrone R. 1991. Collagen family of proteins. *Faseb J* 5(13):2814-2823.
- Van Deventer SJ. 1997. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 40(4):443-448.
- van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. 1997. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 113(2):383-389.
- van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM, Clevers H. 2005. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 7(4):381-386.
- van Essen EH, de Jonge E. 2011. Selective decontamination of the digestive tract (SDD): is the game worth the candle? *Semin Respir Crit Care Med* 32(2):236-242.
- van Tol EA, Holt L, Li FL, Kong FM, Rippe R, Yamauchi M, Pucilowska J, Lund PK, Sartor RB. 1999. Bacterial cell wall polymers promote intestinal fibrosis by direct stimulation of myofibroblasts. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):G245-255.
- van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, van der Laarse A. 2001. The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 218(1-2):113-124.
- Vaquero E, Molero X, Tian X, Salas A, Malagelada JR. 1999. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. *Gut* 45(2):269-277.
- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. 1987. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247(3):597-604.
- Vassalli JD, Saurat JH. 1996. Cuts and scrapes? Plasmin heals! *Nat Med* 2(3):284-285.
- Vaughan DE. 1998. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in cardiovascular disease. *J Investig Med* 46(8):370-376.
- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257(1):180-189.
- Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, Maes T, Dhulst A, Louis R, Foidart JM, Noel A, Pauwels R. 2003. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J Immunol* 171(2):1016-1022.

- Vermeire S. 2004. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18(3):569-575.
- Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A. 2000. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 275(39):30226-30231.
- Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. 2003. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 278(3):1585-1593.
- Vetuschi A, Sferra R, Latella G, D'Angelo A, Catitti V, Zanninelli G, Continenza MA, Gaudio E. 2006. Smad3-null mice lack interstitial cells of Cajal in the colonic wall. *Eur J Clin Invest* 36(1):41-48.
- Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, Bulic M, Ramesh A, Guzman G, Cho M, Glover SC. 2007. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Invest* 87(11):1149-1158.
- Vita N, Lefort S, Brouillaud MJ, Magazin M, Guillemot JC, Ferrara P. 1993. Functional linkage of the Gro beta and IL-8 receptors on the surface of human neutrophils. *Eur Cytokine Netw* 4(3):197-204.
- Vittori E, Marini M, Fasoli A, De Franchis R, Mattoli S. 1992. Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* 146(5 Pt 1):1320-1325.
- von Gersdorff G, Susztak K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D, Bottinger EP. 2000. Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 275(15):11320-11326.
- von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. 2000. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47(1):63-73.
- Vu TH, Werb Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14(17):2123-2133.
- Waite KA, Eng C. 2003. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4(10):763-773.
- Walia B, Wang L, Merlin D, Sitaraman SV. 2003. TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2. *Faseb J* 17(14):2130-2132.
- Waller DA, Thomas NW, Self TJ. 1988. Epithelial restitution in the large intestine of the rat following insult with bile salts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 414(1):77-81.

- Wang A, Yokosaki Y, Ferrando R, Balmes J, Sheppard D. 1996. Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(5):664-672.
- Wang DL, Tang CC, Wung BS, Chen HH, Hung MS, Wang JJ. 1993. Cyclical strain increases endothelin-1 secretion and gene expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2):1050-1056.
- Wang DL, Wung BS, Peng YC, Wang JJ. 1995. Mechanical strain increases endothelin-1 gene expression via protein kinase C pathway in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 163(2):400-406.
- Wang S, Denichilo M, Brubaker C, Hirschberg R. 2001. Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 60(1):96-105.
- Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. 2002. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 106(12):1543-1549.
- Wang Y, Simonson MS, Pouyssegur J, Dunn MJ. 1992. Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *Biochem J* 287 ( Pt 2):589-594.
- Wardle TD, Turnberg LA. 1994. Potential role for interleukin-1 in the pathophysiology of ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 86(5):619-626.
- Waschke KA, Villani AC, Vermeire S, Dufresne L, Chen TC, Bitton A, Cohen A, Thomson AB, Wild GE. 2005. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. *Am J Gastroenterol* 100(5):1126-1133.
- Wegrowski J, Lafuma C, Lefaix JL, Daburon F, Robert L. 1988. Modification of collagen and noncollagenous proteins in radiation-induced muscular fibrosis. *Exp Mol Pathol* 48(3):273-285.
- Welgus HG, Stricklin GP. 1983. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J Biol Chem* 258(20):12259-12264.
- Wells RG. 2000. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(5):G845-850.
- Wen FQ, Kohyama T, Liu X, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Kobayashi T, Abe S, Spurzem JR, Rennard SI. 2002. Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor-beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(4):484-490.
- Wengrower D, Zanninelli G, Pappo O, Latella G, Sestieri M, Villanova A, Faitelson Y, Pines M, Goldin E. 2004. Prevention of fibrosis in experimental colitis by captopril: the role of tgf-beta1. *Inflamm Bowel Dis* 10(5):536-545.
- West-Mays JA, Cook JR, Sadow PM, Mullady DK, Bargagna-Mohan P, Strissel KJ, Fini ME. 1999. Differential inhibition of collagenase and interleukin-1alpha gene expression in

- cultured corneal fibroblasts by TGF-beta, dexamethasone, and retinoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5):887-896.
- Weston BS, Wahab NA, Mason RM. 2003. CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 14(3):601-610.
- Whelan G, Farmer RG, Fazio VW, Goormastic M. 1985. Recurrence after surgery in Crohn's disease. Relationship to location of disease (clinical pattern) and surgical indication. *Gastroenterology* 88(6):1826-1833.
- Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R. 2010. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 31(3):110-119.
- Willemsen LE, Schreurs CC, Kroes H, Spillenaar Bilgen EJ, Van Deventer SJ, Van Tol EA. 2002. A coculture model mimicking the intestinal mucosa reveals a regulatory role for myofibroblasts in immune-mediated barrier disruption. *Dig Dis Sci* 47(10):2316-2324.
- Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM. 2005. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 132(23):5317-5328.
- Wilson AJ, Gibson PR. 1997. Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. *Clin Sci (Lond)* 93(2):97-108.
- Wilson CL, Matrisian LM. 1996. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 28(2):123-136.
- Wissink S, van Heerde EC, Schmitz ML, Kalkhoven E, van der Burg B, Baeuerle PA, van der Saag PT. 1997. Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 272(35):22278-22284.
- Woessner JF, Jr. 1995. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol* 248:510-528.
- Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM, Wang XF. 1999. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 19(3):1821-1830.
- Wong WR, Kossodo S, Kochevar IE. 2001. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc* 100(6):377-382.
- Woods M, Wood EG, Mitchell JA, Warner TD. 2000. Signal transduction pathways involved in cytokine stimulation of endothelin-1 release from human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 36(5 Suppl 1):S407-409.



- Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G, Kouroumalis E. 2005. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 50(5):935-941.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78(3):473-485.
- Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. 1998. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S360-363.
- Xu SW, Howat SL, Renzoni EA, Holmes A, Pearson JD, Dashwood MR, Bou-Gharios G, Denton CP, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. 2004. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem* 279(22):23098-23103.
- Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. 2000. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol* 164(12):6174-6179.
- Yamashita J, Ogawa M, Egami H, Matsuo S, Kiyohara H, Inada K, Yamashita S, Fujita S. 1992. Abundant expression of immunoreactive endothelin 1 in mammary phyllodes tumor: possible paracrine role of endothelin 1 in the growth of stromal cells in phyllodes tumor. *Cancer Res* 52(14):4046-4049.
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. 1996. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271(6):3221-3228.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163):411-415.
- Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MW, Brunner G. 1999a. Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay. *Am J Pathol* 154(1):105-111.
- Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. 1999b. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *Embo J* 18(5):1280-1291.
- Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF. 1990. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation* 82(1):188-195.
- Yasin S, Costa A, Navarra P, Pozzoli G, Kostoglou-Athanassiou I, Forsling M, Grossman A. 1994. Endothelin-1 stimulates the in vitro release of neurohypophyseal hormones,

- but not corticotropin-releasing hormone, via ETA receptors. *Neuroendocrinology* 60(6):553-558.
- Yasui H, Andoh A, Bamba S, Inatomi O, Ishida H, Fujiyama Y. 2004. Role of fibroblast growth factor-2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion* 69(1):34-44.
- Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE, Khalil N. 1999. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol* 155(3):841-851.
- Yeruva S, Ramadori G, Raddatz D. 2008. NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. *Int J Colorectal Dis* 23(3):305-317.
- Yin W, Smiley E, Germiller J, Mecham RP, Florer JB, Wenstrup RJ, Bonadio J. 1995. Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* 270(17):10147-10160.
- Yoshida K, Yasujima M, Kohzuki M, Kanazawa M, Yoshinaga K, Abe K. 1992. Endothelin-1 augments pressor response to angiotensin II infusion in rats. *Hypertension* 20(3):292-297.
- Yoshioka K, Deng T, Cavigelli M, Karin M. 1995. Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):4972-4976.
- Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, Yamashita T, Oh-hashii Y, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. 1990. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 166(1):324-329.
- Youakim A, Ahdieh M. 1999. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):G1279-1288.
- Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. 1993. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 104(3):749-758.
- Yu CC, Hsu MJ, Kuo ML, Chen RF, Chen MC, Bai KJ, Yu MC, Chen BC, Lin CH. 2009. Thrombin-induced connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts requires the ASK1/JNK/AP-1 pathway. *J Immunol* 182(12):7916-7927.
- Yue J, Mulder KM. 2000. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 275(45):35656.

- Zaph C, Troy AE, Taylor BC, Berman-Booty LD, Guild KJ, Du Y, Yost EA, Gruber AD, May MJ, Greten FR, Eckmann L, Karin M, Artis D. 2007. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446(7135):552-556.
- Zareie M, McKay DM, Kovarik GG, Perdue MH. 1998. Monocyte/macrophages evoke epithelial dysfunction: indirect role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* 275(4 Pt 1):C932-939.
- Zeeh JM, Mohapatra N, Lund PK, Eysselein VE, McRoberts JA. 1998. Differential expression and localization of IGF-I and IGF binding proteins in inflamed rat colon. *J Recept Signal Transduct Res* 18(4-6):265-280.
- Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. 2005. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280(9):8094-8100.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56(1):61-72.
- Zhan X, Bates B, Hu XG, Goldfarb M. 1988. The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 8(8):3487-3495.
- Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR. 1999. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest* 79(4):395-405.
- Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR. 1993. Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 41(2):245-251.
- Zhang Y, Dong J, He P, Li W, Zhang Q, Li N, Sun T. 2011. Genistein Inhibit Cytokines or Growth Factor-Induced Proliferation and Transformation Phenotype in Fibroblast-Like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*.
- Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas P, Jr., Datto MB, Frederick JP, Wang XF, Warburton D. 2002. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(3):L585-593.
- Zhou Y, Hagood JS, Murphy-Ullrich JE. 2004. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am J Pathol* 165(2):659-669.
- Zhu YK, Liu X, Ertl RF, Kohyama T, Wen FQ, Wang H, Spurzem JR, Romberger DJ, Rennard SI. 2001. Retinoic acid attenuates cytokine-driven fibroblast degradation of extracellular matrix in three-dimensional culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(5):620-627.

- Ziesche R, Petkov V, Williams J, Zakeri SM, Mosgoller W, Knofler M, Block LH. 1996. Lipopolysaccharide and interleukin 1 augment the effects of hypoxia and inflammation in human pulmonary arterial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22):12478-12483.
- Zimmermann EM, Sartor RB, McCall RD, Pardo M, Bender D, Lund PK. 1993. Insulinlike growth factor I and interleukin 1 beta messenger RNA in a rat model of granulomatous enterocolitis and hepatitis. *Gastroenterology* 105(2):399-409.
- Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. 1994. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93(2):536-542.
- Zucker S, Cao J, Chen WT. 2000. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 19(56):6642-6650.
- Zucker S, Vacirca J. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23(1-2):101-117.
- Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* 122(1):21-29.

## 6 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A	amphotericin B
AF488	Alexafluor 488
ALK	activin receptor-like kinases
AP-1	activator protein-1
ASCA	anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies
BAL	bronchoalveolar lavage
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumin
CCL	C-C motif ligand
CCL	C-C motif ligand
CD	Crohn's disease
CD40L	CD40 ligand
Co-SMAD	co-mediator SMAD
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
COX-2	cyclooxygenase-2
CTGF	connective tissue growth factor
CXCL	C-X-C motif ligand
Dkk	Dickkopf-related protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DSS	dextran sodium sulphate
DTPA	diethylene triamine pentaacetic acid
DTT	Dithiothreitol
ECC	epithelial cell-conditioned
ECE	endothelin converting enzyme
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
egr-1	early growth response gene-1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA-78	epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ETR	endothelin receptor
FAK	focal adhesion kinases
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor

GADD45	growth arrest and DNA damage 45
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDF	growth and differentiation factor
GLP-2	glucagon-like peptide 2
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GVHD	graft-versus-host disease
hbEGF	heparin binding EGF-like
HBSS	Hank's balanced salt solution
HGF	hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxidase
IBD	inflammatory bowel disease
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
Ig	Immunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
iNOS	inducible NO synthetase
I-SMAD	inhibitory SMADs
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KGF	keratinocyte growth factor
LAP	latency associated protein
Lgr5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
LIF	leukemia inhibitory factor
LLTGF- $\beta$	large latent TGF- $\beta$
LTBP	latent TGF- $\beta$ binding protein
L-TGF- $\beta$	latent TGF- $\beta$
MAD	mother's against decapentaplegic
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCLK	myosin light-chain kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
MEK1	MAP/ERK kinase 1
MEM	minimum essential medium
MIP2 $\alpha$	macrophage inflammatory protein 2-alpha
MIS	Mullerian inhibiting substance
MMP	matrix metalloproteinase
MRI	magnetic resonance imaging
MRP-8	myeloid-related protein-8
MT-MMP	membrane type-matrix metalloproteinases

NF-κB	nuclear factor-kappa B
NGS	normal goat serum
NIH	national institute of health
NK	natural killer
NLS	nuclear localisation signal
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OD	optical density
Olfm4	olfactomedin 4
P	Penicillin
PAI	plasminogen activator inhibitor
PAR	protease-activated receptors
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PET	positron emission tomography
PFA	Paraformaldehyde
PGE <sub>2</sub> R	prostaglandin E <sub>2</sub> receptor
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
RGD	αααααααααα αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
R-SMAD	receptor-activated SMAD
RT	reverse transcription
S	Streptomycin
SARA	SMAD anchor for receptor activation
SBE	SMAD binding element
SCF	Skp1, Cullins, F-box proteins
SDF-1α	stromal derived factor-1α
SDS	sodium dodecyl sulphate
SEMF	subepithelial myofibroblast
SFK	Src family kinases
SFRP	secreted frizzled-related protein
Shh	Sonic hedgehog homolog
SLTGF-β	small latent TGF-β
STAT	signal transducers and activators of transcription
Taq	Thermus aquaticus
TARC	thymus and activation regulated chemokine
TBE	Tris/ Borate/ EDTA
TBS	Tris-buffered saline

TCF4	T cell factor 4
TEF	transcription enhancer factor
TF	tissue factor
TGF	transforming growth factor
Th	T helper
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TLR	Toll-like receptors
Tm	annealing temperature
TMB	tetramethylbenzidine
TNBS	trinitrobenzene sulfonic acid
TNFR	TNF- $\alpha$ receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
tPA	tissue plasminogen activator
TSP	Thrombospondin
TTP	tris-tetra-proline
T $\beta$ R	TGF- $\beta$ receptor
UC	ulcerative colitis
UPA	urokinase plasminogen activator
uPAR	uPA receptor
V	Vancomycin
VEGF	vascular endothelial growth factor
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin



## 7 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### 7.1 Εισαγωγή

Οι εντερικοί υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες (subepithelial myofibroblasts- SEMFs) είναι μεσεγχυματικά κύτταρα θετικά για α-ακτίνης λείων μυϊκών ινών (α-smooth muscle actin- α-SMA) που βρίσκονται στο σημείο επαφής του εντερικού επιθηλίου και του ίδιου χιτώνα (lamina propria). Ινίδια συνδετικού ιστού σχηματίζουν ένα διακριτό φραγμό που ονομάζεται βασική μεμβράνη, μέσω των οποίων οι SEMFs και το επιθήλιο μπορούν να αλληλεπιδρούν με διαλυτούς παράγοντες και εκτείνοντας ψευδοπόδια.

Αρχικά στοιχεία έδειξαν ότι οι SEMFs συμμετέχουν στην επούλωση των πληγών και την επακόλουθη ιστική αναδιαμόρφωση του εντέρου, συμπεριλαμβανόμενης και της επιπλοκής της ίνωσης. Ο βλεννογόνος που υπέρκειται των στενώσεων στη νόσο του Crohn (Crohn's Disease- CD) υπερεκφράζει mRNA των προϊνωτικών TGF-β και του ιστικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases- TIMP-1), ενώ τα τοπικά μεσεγχυματικά κύτταρα υπερπαραγάγουν κολλαγόνο I και III. Πρώιμες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι, πλην των φλεγμονωδών κυττάρων του ίδιου χιτώνα (lamina propria), τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου παρουσιάζουν επίσης έντονη ανοσοδραστικότητα για TGF-β1 στη φλεγμονή λόγω CD. Αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανόμενου του TGF-β, επιτάχυναν τη μετανάστευση των εντερικών μυοϊνοβλαστών του ίδιου χιτώνα (lamina propria), αλλά η παραγωγή του δεν βασιζόταν σε αυτοκρινείς βρόχους. Συνεπώς, φαίνεται ότι η επικοινωνία μεταξύ SEMFs και άλλων τύπων

κυττάρων είναι απαραίτητη στη διαδικασία επούλωσης των πληγών και τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα είναι πιθανοί υποψήφιοι.

Μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases- MMPs) έχουν εμπλακεί στην αναδιαμόρφωση των ιστών και στην εξέλκωση σε ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια (inflammatory bowel disease- IBD) και πολλές MMPs υπερεκφράζονται σε φλεγμαίνοντα εντερικό ιστό από IBD και σε αντίστοιχα ζωικά μοντέλα. Η σημασία της MMP-9 στην εξέλκωση του φλεγμαίνοντος εντέρου επιβεβαιώθηκε σε μελέτες πειραματικής κολίτιδος με νατριούχοθειϊκή δεξτράνη, όπου η έκταση και η σοβαρότητα της βλάβης του εντερικού επιθηλίου ήταν σημαντικά μειωμένη σε ποντίκια που δεν διέθεταν το γονίδιο της MMP-9. Σε αρχικές ανοσοϊστοχημικές μελέτες τα ουδετερόφιλα προσδιορίστηκαν ως η μόνη πηγή της MMP-9 στο φλεγμαίνον έντερο, παρά τον εντοπισμό ανοσοδραστικότητας MMP-9 και στο συνδετικό ιστό που γειτνιάζει με τις κρύπτες, γεγονός που προτείνει την πιθανή εμπλοκή των SEMFs.

Τα επιθηλιακά κύτταρα έχει προταθεί ότι ελέγχουν τις εν λόγω διαδικασίες. Υποστηρικτικά στοιχεία προήλθαν από παρατηρήσεις σε άλλους ιστούς, όπως το δέρμα και οι πνεύμονες. Στο δέρμα, τα κερατινοκύτταρα είναι εν μέρει υπεύθυνα για την επαγωγή της  $\alpha$ -SMA σε ινοβλάστες μέσω TGF- $\beta$  και ενδοθηλίνης-1 (endothelin-1, ET-1). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κερατινοκυττάρων και των υποκείμενων ινοβλαστών, επίσης, φαίνεται να διαφοροποιούν τα επίπεδα δύο βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας: MMP-2 και MMP-9. Στους πνεύμονες, υπό συνεχή συμπίεση, τα επιθηλιακά κύτταρα αυξάνουν τη γονιδιακή έκφραση και την έκκριση ET και TGF- $\beta$ 2. Θρεπτικό μέσο από επιθηλιακά κύτταρα υπό τάση επάγει την ενσωμάτωση της προλίνης σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (κυρίως κολλαγόνο) σε ανθρώπινους

ινοβλάστες των πνευμόνων χωρίς αυτοί να βρίσκονται υπό τάση μέσω οδών που εμπλέκουν ET και TGF-β2.

## 7.2 Ευρήματα

ELISA σε υπερκείμενα 24ώρου των κολονικών επιθηλιακών κυτταροσειρών HT-29 και CaCO-2 έδειξαν αξιόλογη έκκριση TGF-β1. Η προσθήκη των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α, TNF-α και IFN-γ στα θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας αύξησε σημαντικά την παραγωγή του TGF-β1 με την IL-1α να αποτελεί το πιο ισχυρό ερέθισμα. Οι συνδυασμοί των κυτταροκινών είχαν αθροιστική δράση, με την παραγωγή TGF-β να είναι μέγιστη όταν στα επιθηλιακά κύτταρα επέδρασαν και οι τρεις κυτταροκίνες. Οι άλλες δύο ισομορφές TGF-β (TGF-β2 και TGF-β3) επίσης εκκρίνονταν από αδιέγερτα επιθηλιακά κύτταρα σε σημαντικές ποσότητες και η παραγωγή τους αυξανόταν υπό την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών με παρόμοιο τρόπο. Πρωτογενείς SEMFs παχέος εντέρου και η αντίστοιχη κυτταροσειρά 18CO έκκριναν πολύ μικρές ποσότητες TGF-β1 και TGF-β3 στις 24 ώρες καλλιέργειας και δεν απαντούσαν σε IL-1α, TNF-α και IFN-γ, μεμονωμένων ή σε κάθε πιθανό συνδυασμό. Δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε παραγωγή TGF-β2 σε πρωτογενείς SEMFs ή σε 18CO, ακόμα και μετά από διέγερση με τις τρεις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μεμονωμένες ή σε κάθε πιθανό συνδυασμό.

Ακόμη, διαπιστώσαμε ότι και οι δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες του TIMP-1, ενός άλλου μεσολαβητή της ίνωσης στο υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας 24ώρου. Η επίδραση TNF-α και IFN-γ, αλλά όχι IL-1α, αύξησαν σημαντικά την έκκριση TIMP-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίδραση με δύο ή και με τις τρεις κυτταροκίνες περαιτέρω αύξησε την παραγωγή TIMP-1. Πρωτογενείς SEMFs και 18CO

επίσης είχαν βασική έκκριση σημαντικών συγκεντρώσεων TIMP-1, αλλά, παραδόξως, δεν απαντούσαν σε διέγερση με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ , μεμονωμένων ή σε συνδυασμό επί 24 ώρες- ευρήματα παρόμοια με αυτά που αφορούν τον TGF- $\beta$ .

Επιπλέον, εξετάσαμε την παρουσία των gelatinases MMP-2 και MMP-9 στο υπερκείμενο καλλιέργειας SEMFs. Ανιχνεύθηκαν με ζυμογραφία σε υπόστρωμα gelatin ως ζώνες λύσης της gelatin και διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό βάρος τους (MMP-2: 70 kDa, MMP-9: 100 kDa). Πρωτογενείς SEMFs και τα 18CO παρουσίαζαν δραστικότητα MMP-2 στο υπερκείμενο 24ωρης κυτταροκαλλιέργειας χωρίς κανένα επιπλέον ερέθισμα, αλλά αυτό δεν ίσχυε για την MMP-9. Επίδραση σε πρωτογενείς SEMFs και 18CO με TNF- $\alpha$  ή IL-1 $\alpha$  για 24h προκαλούσε δραστικότητα MMP-9 στα υπερκείμενα και ο συνδυασμός και των δύο είχε αθροιστική επίδραση. Η IFN- $\gamma$  δεν είχε καμία επίδραση από μόνη της, αλλά, όταν προσετίθετο σε TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ή το συνδυασμό τους, κατέστρεψε τη δραστικότητα MMP-9 στα υπερκείμενα. Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός και των τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ ) δεν προκαλούσε σημαντική δραστικότητα MMP-9. Επιπλέον, οι κυτταροκίνες αυτές μεμονωμένα ή σε κάθε δυνατό συνδυασμό δεν είχαν επίδραση στην MMP-2. Υπερκείμενα επιθηλιακών κυττάρων δεν έδειξαν λυτική δραστηριότητα gelatin, παρά τη διέγερση με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , μεμονωμένων ή σε συνδυασμό.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το αποτέλεσμα υπερκείμενου καλλιέργειών επιθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες μυοϊνοβλαστών. Μόνο αν καλλιέργειες CaCO-2 προεπώζονταν για 6 ώρες με IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, επαγόταν δραστικότητα MMP-9 σε SEMFs και 18CO, αλλά με τις κυτταροκίνες αυτές να μην ενεργούν άμεσα στους μυοϊνοβλάστες. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν με την κυτταροσειρά HT-29. Ως εκ

τούτου, η παραγωγή MMP-9 στους μυοϊνοβλάστες πυροδοτήθηκε από διαλυτό μεσολαβητή προερχόμενο από επιθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν στις κυτταροκίνες. Τα αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα όταν χρησιμοποιήθηκαν SEMFs από φλεγμαίνοντα μη ινωτικά τμήματα παχέος εντέρου από CD.

Ακολούθως, εξετάσαμε αν ο TGF-β ήταν υπεύθυνος για την επαγωγή της MMP-9 στους SEMFs από υπερκείμενο επιθηλιακών προεπωασμένων με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι εξωγενής TGF-β1 προκαλούσε επαγωγή δραστηριότητας MMP-9 σε πρωτογενείς SEMFs με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, η εξουδετέρωση όλων των ισομορφών TGF-β δεν επηρέασε σημαντικά την επαγωγή MMP-9 σε SEMFs υπό το προαναφερθέν ερέθισμα. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με υπερκείμενο από CaCO-2 ή όταν χρησιμοποιήθηκαν SEMFs από CD ή η κυτταροσειρά 18CO.

Στους πνεύμονες, η παραγωγή της ET-1 από διεγερμένα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την επαγωγή δραστηριότητας MMP-9 από συγκαλλιεργούμενους ινοβλάστες δέρματος. Ως εκ τούτου, θέσαμε το ερώτημα κατά πόσο η επαγωγή της MMP-9 ήταν εξαρτώμενη από ενδοθηλίνες. Δείξαμε ότι η αναστολή του υποδοχέα ενδοθηλινών (ET receptor, ETR)-A σε καλλιέργειες SEMFs εμποδίζει την επαγωγή της MMP-9 από υπερκείμενο προδιεγερμένων επιθηλιακών. Αντιθέτως, η ειδική αναστολή του ETR-B δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη MMP-9. Επιπλέον, δεν υπήρχε επιπλέον επίδραση στην MMP-9, όταν αναστέλλονταν και ο ETR-A και ο ETR-B. Το φαινόμενο μπορούσε να αναπαραχθεί σε SEMFs από CD.

Διερευνήσαμε περαιτέρω πτυχές της επικοινωνίας μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των μυοϊνοβλαστών ως προς την αναδιαμόρφωση του συνδετικού ιστού, όπως η

παραγωγή κολλαγόνου. Αρχικά, μετρήσαμε την παραγωγή κολλαγόνου σε μυοϊνοβλάστες απουσία ή παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η μέθοδος Sircol χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική αθροιστική μέτρηση των περισσότερων τύπων κολλαγόνου. SEMFs και 18CO είχαν ελάχιστη έκκριση συνολικού κολλαγόνου στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών σε προκαταρκτικά πειράματα. Κατά συνέπεια, μελετήσαμε τη συνολική παραγωγή κολλαγόνου, μετρώντας το ολικό ενδοκυττάριο κολλαγόνο. Η επίδραση IL-1α, TNF-α και IFN-γ, μόνων, σε ζεύγη ή όλων δεν είχε σημαντική επίδραση στη σύνθεση του κολλαγόνου στις 24 ώρες. Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι διέγερση με TGF-β1, έναν προϊνωτικό παράγοντα που σχετίζεται με εντερική ίνωση, επιφέρει μία ελάχιστη, στατιστικά ασήμαντη αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου στις 24 ώρες. Βρήκαμε, όμως, ότι SEMFs από CD παρήγαγαν ιδιοσυστασιακά αυξημένο κολλαγόνο *ex vivo* σε σύγκριση με SEMFs απομονωμένους από ομάδα ελέγχου.

Ακολούθως, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης υπερκείμενου επιθηλιακών στην παραγωγή κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες και διαπιστώθηκε ότι αυτό αύξησε σημαντικά την παραγωγή κολλαγόνου. Η παρατηρούμενη επίδραση ήταν μέτριας έντασης όταν χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο αδιέγερτων επιθηλιακών. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο προδιεγερμένων με τις τρεις κυτταροκίνες επιθηλιακών, παρατηρήσαμε έντονη αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου. Παρόμοια αλλά λιγότερο έντονα ήταν τα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά 18CO αντί πρωτογενών SEMFs.

Επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε τους προερχόμενους από τα επιθηλιακά κύτταρα παράγοντες που ευθύνονταν για την αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου στους SEMFs. Ο TGF-β παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα και η παραγωγή του αυξανόταν από τις τρεις

κυτταροκίνες. Ως εκ τούτου, ήταν πιθανός υποψήφιος μεσολαβητής. Ωστόσο, η εξουδετέρωση και των τριών μορφών του TGF-β στα ECC δεν επηρέασε την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου σε SEMFs από ομάδα ελέγχου ή CD. Ως εκ τούτου, ο TGF-β δεν ήταν απαραίτητο μηνυματοφόρο μόριο για την επαγωγή της αύξησης της σύνθεσης κολλαγόνου στους SEMFs από υπερκείμενο επιθηλιακών. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του ιστικού παράγοντα (tissue factor- TF) και του ενεργού παράγοντα VII της πήξης (factor VII- FVII) επάγει τον προϊνωτικό CTGF σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Επιπλέον, στους SEMFs έχει αποδειχθεί η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου με αυτοκρινή τρόπο μέσω έκκρισης CTGF και TF. Εμείς δείξαμε την επαγωγή CTGF σε πρωτογενείς SEMFs υπό την επίδραση υπερκείμενου επιθηλιακών, ειδικά αν τα επιθηλιακά κύτταρα προεπωάζονταν με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η έκφραση CTGF εξαρτάται από την παρουσία της θρομβίνης και TF, και μειώνεται υπό την επίδραση αντιθρομβίνης III. Η παραγωγή TF και επακόλουθα κολλαγόνου επίσης εξαρτάται από την σηματοδότηση ET-1. Έτσι, μελετήσαμε την υπόθεση ότι οι CTGF, TF, θρομβίνη ρυθμίζουν την προϊνωτική σηματοδότηση στο αποτελούμενο από δύο κύτταρα σύστημά μας. Ωστόσο, η εξουδετέρωση του CTGF ή η χρήση αντιθρομβίνης-III δεν εμπόδισε την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου από SEMFs απομονωμένους από ομάδα ελέγχου ή CD υπό υπερκείμενο διεγερμένων επιθηλιακών. Το ίδιο ήταν αληθές για την εξουδετέρωση του TF σε διεγερμένους όμοια SEMFs από ομάδα ελέγχου. Ανταγωνιστές των υποδοχέων ενδοθηλινών επίσης δεν είχαν καμία επίδραση στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου σε SEMFs από ομάδα ελέγχου ή CD.

Η κινητικότητα/ μετανάστευση των SEMFs εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία επούλωσης πληγής και ποσοτικοποιήθηκε ως ποσοστό της επούλωσης *in vitro*. Η προσθήκη εξωγενούς

TGF-β1 σε πρωτογενείς καλλιέργειες SEMFs βρέθηκε να αυξάνει την κινητικότητα/μετανάστευση των SEMFs με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε αντίθεση, TNF-α και IFN-γ μείωσαν το ρυθμό επούλωσης. Σε συνδυασμό, αυτές οι κυτταροκίνες άσκησαν αθροιστική δράση. Η IL-1α δεν μετέβαλε τη μετανάστευση ούτε μόνη της ούτε όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με καθεμία ή και με τις δύο προηγούμενες κυτταροκίνες.

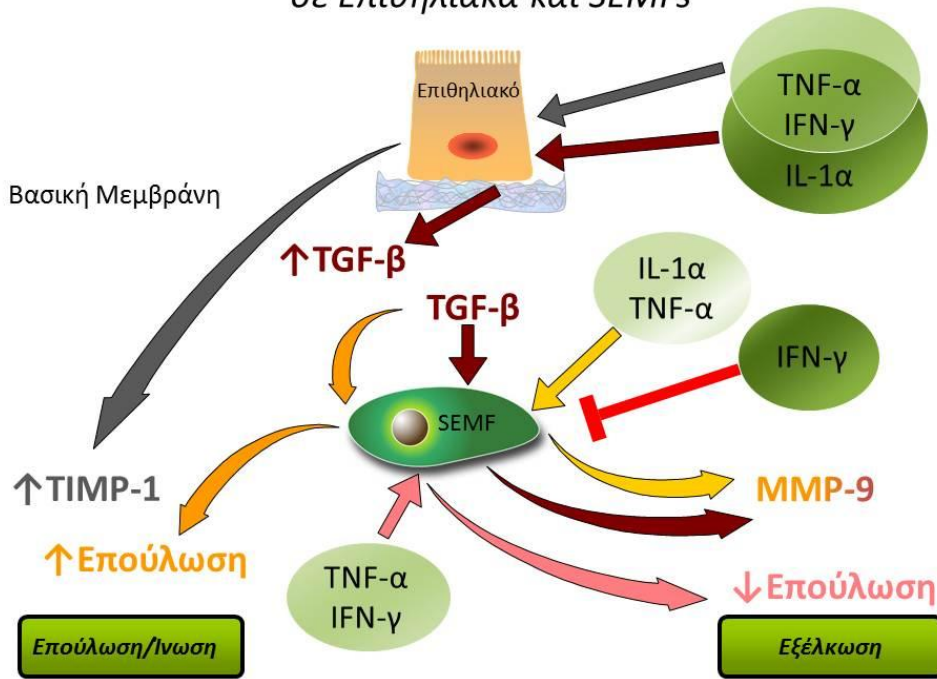
Για να μελετήσουμε τις πιθανές επιδράσεις των επιθηλιακών κυττάρων και σε αυτή τη βιολογική διεργασία, χρησιμοποιήσαμε υπερκείμενο επιθηλιακών για να διεγείρουμε πρωτογενείς SEMFs. Όταν αυτό προερχόταν από CaCO-2 στα οποία δεν είχαν επιδράσει προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ο ρυθμός επούλωσης δεν μεταβαλλόταν. Η κινητικότητα/μετανάστευση των SEMFs μειώθηκε όταν τα CaCO-2 είχαν προεπωαστεί για 6 ώρες με IL-1α, TNF-α ή IFN-γ, και αυτό επιβράδυνε την επούλωση σημαντικά. Η προεπάση των επιθηλιακών και με τις τρεις κυτταροκίνες είχε ως αποτέλεσμα ισχυρότερη αναστολή της επούλωσης, παρά την απουσία των αρχικών προφλεγμονωδών ερεθισμάτων. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο HT-29 επί των SEMFs. Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι προφλεγμονώδη ερεθίσματα θα μπορούσαν να αναστείλουν τη μετανάστευση των SEMFs τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μέσω των επιθηλιακών κυττάρων μέσω διαλυτού/ών παράγοντα/ων. Επιπλέον, η επίδραση του εντερικού επιθηλίου στην επούλωση των πληγών από τους παρακείμενους SEMFs διέφερε από εκείνη που προβλέπεται από την επαγωγή TGF-β: το τελικό αποτέλεσμα ενδεχομένως διαμορφώνεται και από άλλους παράγοντες πλην του TGF-β που εκκρίνουν τα επιθηλιακά.



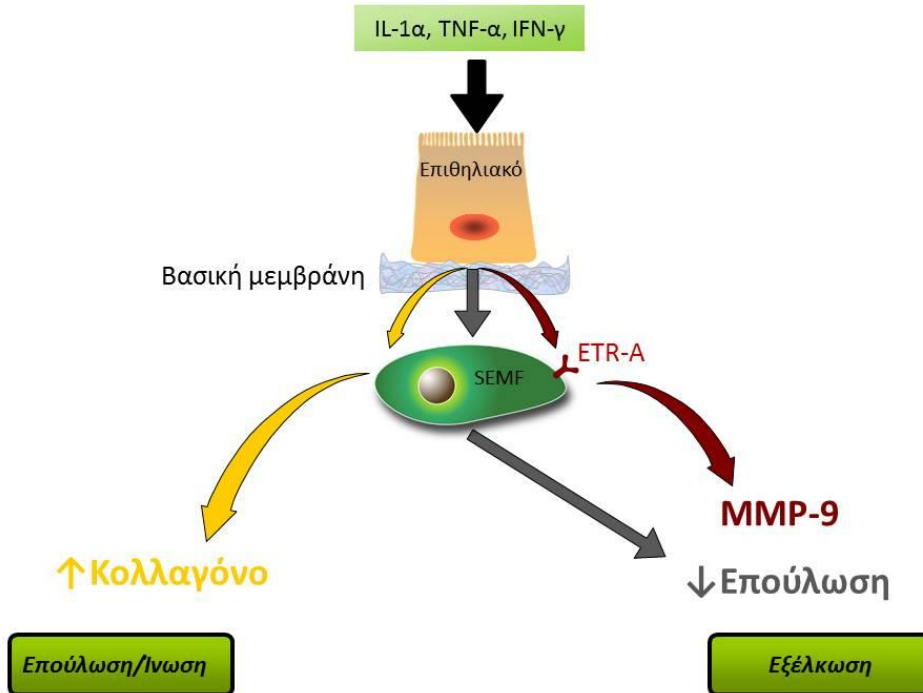
## 7.3 Συμπεράσματα

Αυτή η μελέτη παρέχει ενδείξεις δυναμικής επικοινωνίας μεταξύ των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και των SEMFs. *In vitro* διέγερση των επιθηλιακών με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που μερικώς μιμείται την επιθηλιακή βλάβη στην εντερική φλεγμονή, προκάλεσε αλλαγές στους SEMFs παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην εντερική ίνωση. Αυτές συμπεριλάμβαναν αύξηση του κολλαγόνου, επαγωγή της MMP-9 που εξαρτιόταν από τον υποδοχέα ενδοθηλινών A και μείωση της μετανάστευσης. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την περαιτέρω μελέτη και την *in vivo* επιβεβαίωση της επικοινωνίας μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και παρακείμενων SEMFs στη ρύθμιση της αναμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας και της ίνωσης που προκαλεί η εντερική φλεγμονή.

Επιδράσεις Προφλεγμονωδών Κυτταροκινών, TGF-β σε Επιθηλιακά και SEMFs



Έμμεσες επιδράσεις Επιθηλιακών στους SEMFs



# 8 EXTENDED SUMMARY

## 8.1 Introduction

Intestinal subepithelial myofibroblasts (SEMFs) are alpha-smooth muscle actin-positive mesenchymal cells located at the interface between the intestinal epithelium and lamina propria. Connective tissue fibrils form a distinct connective tissue barrier called the basal lamina, through which SEMFs and the epithelium can interact through soluble factors or pseudopods.

Early evidence suggested that SEMFs participated in wound healing and subsequent intestinal tissue remodelling, including fibrosis. Mucosa overlying Crohn's Disease (CD) strictures overexpress profibrotic TGF- $\beta$  transcripts and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) proteins, while resident mesenchymal cells overproduce collagen I and III. Early immunohistochemistry studies showed that, beyond lamina propria inflammatory cells, intestinal epithelial cells also exhibit intense immunoreactivity for TGF- $\beta$ 1 during CD-associated inflammation. Growth factors, including TGF- $\beta$ , accelerated migration of intestinal lamina propria myofibroblasts but its production was not dependent on autocrine loops. Therefore it seems that a crosstalk between SEMFs and other cell types is essential in the wound-healing process and neighbouring epithelial cells are putative candidates.

MMPs have been implicated in tissue remodelling and ulceration in inflammatory bowel disease (IBD) and many matrix metalloproteinases (MMPs) are overexpressed in inflamed

IBD human tissues and animal IBD models. The importance of MMP-9 in inflammatory bowel ulceration was confirmed in studies of dextran sodium sulphate colitis where the extent and severity of intestinal epithelial injury were significantly attenuated in MMP-9-deficient mice. Initial immunohistochemistry studies identified neutrophils as the sole source of MMP-9 in inflamed bowels, despite the localisation of MMP-9 immunoreactivity in the connective tissue adjacent to the crypts, which suggests the possible involvement of SEMFs.

Epithelial cells have been proposed to control the aforementioned processes. Supporting evidence originated from observations in other tissues, such as the skin and the lungs. In the skin, keratinocytes are partially responsible for the induction of  $\alpha$ -SMA in fibroblasts via TGF- $\beta$  and endothelin-1 (ET-1). Interactions between keratinocytes and the underlying fibroblasts also seem to modulate the levels of two key enzymes involved in extracellular matrix remodelling: MMP-2 and MMP-9. In the lungs, under continuous compressive stress, epithelial cells upregulate gene expression and secretion of ET and TGF- $\beta$ 2. Conditioned media from mechanically stressed epithelial cells induce the incorporation of proline into matrix proteins (mostly collagen) by unstressed normal human lung fibroblasts via pathways that involve ET and TGF- $\beta$ 2.

## 8.2 Findings

ELISA on untreated HT-29 and CaCO-2 colonic epithelial cell line supernatants of 24 h showed substantial amounts of TGF- $\beta$ 1. The addition of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  into the cell culture media significantly increased the production of TGF- $\beta$ 1 with IL-1 $\alpha$  being the most potent stimulus. Combinations of cytokines had an

additive impact, with TGF- $\beta$  production being highest when colonic epithelial cells were treated with all three cytokines (3C). The other two TGF- $\beta$  isoforms (TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3) were also secreted by non-stimulated colonic epithelial cells in considerable amounts and upregulated pro-inflammatory cytokines in a similar manner. Primary SEMFs and the 18CO cell line secreted very small quantities of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 after 24 h in culture and were not responsive to IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , added in isolation or in every possible combination. We were unable to detect any TGF- $\beta$ 2 production in primary SEMF or 18CO cultures, even after stimulation with a cocktail of all three pro-inflammatory cytokines.

Furthermore, we found that both colonic epithelial cell lines secreted substantial amounts of TIMP-1- another mediator of fibrosis- into the cell culture supernatant at 24h. Treatment with TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , but not IL-1 $\alpha$ , significantly increased TIMP-1 secretion in both cell lines. Treating with two or all three cytokines together also resulted in a further increase in TIMP-1 production. Primary SEMFs and 18CO cells also exhibited basal TIMP-1 secretion, but, surprisingly, it was unresponsive to stimulation with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , in isolation or in combination at 24h, which was similar to TGF- $\beta$  production.

Moreover, we examined the presence of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in the cell culture supernatant of colonic SEMFs. They were detected with gelatin zymography as gelatinolytic bands and discriminated by their molecular weights (MMP-2: 70 kDa, MMP-9: 100 kDa). Primary SEMFs and 18CO cells secreted MMP-2 into the cell culture supernatant without any additional stimulus after 24h in culture but this was not true for MMP-9. Stimulation of primary SEMFs and 18CO cells with TNF- $\alpha$  or IL-1 $\alpha$  for 24h induced MMP-9 activity in their supernatants and combination of both had an additive effect. IFN- $\gamma$  had no effect on its own, but when added to TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  or both it suppressed MMP-9 activity in

SEMF supernatants. Therefore, the combination of all three pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ ) did not significantly induce MMP-9 activity. Furthermore, those cytokines in isolation or in every possible combination had no effect on MMP-2 activity. Colonic epithelial cell lines showed no gelatinolytic activity despite stimulation with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , in isolation or in combination.

We subsequently explored the effect of epithelial cell-conditioned media on SEMF cultures. Epithelial cell-conditioned (ECC) media from CaCO-2 cultures pretreated for 6h with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , alone or in combination, induced substantial amounts of MMP-9 activity in SEMFs and 18CO cells, but at the absence of those cytokines acting directly on myofibroblasts. Similar results were obtained with the HT-29 cell line. Therefore, MMP-9 production by myofibroblasts was triggered by a soluble mediator derived from cytokine-treated epithelial cells. Results were identical when SEMFs from inflammatory non-fibrotic CD colonic tissue segments were utilised.

We next examined if TGF- $\beta$  was responsible for the induction of MMP-9 activity in SEMFs treated with ECC medium. This hypothesis was based on the observation that exogenous TGF- $\beta$ 1 can induce MMP-9 activity in primary SEMF cultures in a dose-dependent manner. However, neutralisation of all TGF- $\beta$  isoforms did not significantly affect MMP-9 production by SEMF cultures stimulated with ECC media. Results were similar if CaCO-2 ECC media or CD SEMFs 18CO cells were used.

In the lungs, production of ET-1 by stimulated bronchial epithelial cells was suspected to induce MMP-9 activity in co-cultured skin fibroblasts. Therefore, we assayed whether MMP-9 upregulation was dependent on endothelin. We demonstrated that specific endothelin

receptor A (ETR-A) inhibition in SEMF cultures blocked the induction of MMP-9 by ECC media. In contrast, specific inhibition of endothelin receptor B (ETR-B) had no effect on induced MMP-9 production. Furthermore, there was no additional effect on MMP-9 inhibition when both ETR-A and ETR-B were blocked. This phenomenon could be reproduced on CD SEMFs.

We further explored possible cooperation between epithelial cells and myofibroblasts in other aspects of connective tissue remodelling, such as collagen production. First, we assessed collagen production by myofibroblasts treated in the absence or presence of pro-inflammatory cytokines. The Sircol assay was used to measure the majority of collagen types cumulatively. SEMFs and 18CO cells secreted minimal amounts of total collagen in cell culture supernatants in preliminary experiments, so we studied total collagen production by measuring total intracellular collagen. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  treatment alone, in pairs or 3C did not have a significant effect on collagen synthesis at 24 h. Interestingly, stimulation with TGF- $\beta$ 1, a profibrotic mediator associated with intestinal fibrosis produced a minimal, non-significant increase in collagen production at 24h. However, we found that CD SEMFs inherently produced more collagen *ex vivo* compared to those isolated from control group.

We next proceeded to study the effect of ECC media on collagen production in myofibroblasts. ECC media significantly increased collagen production in primary SEMFs. The observed effect was moderate when we used conditioned medium of untreated epithelial cells. In contrast, when we used ECC media of epithelial cells pretreated with 3C, we observed a pronounced increase of collagen production. Similar but less pronounced effects were found when 18CO cells were used as the responding myofibroblasts.

We attempted to identify the epithelial cell-derived factors responsible for the increase in collagen synthesis by SEMFs. TGF- $\beta$  was produced by epithelial cells and upregulated by 3C; therefore, it was a probable candidate. However, neutralisation of all three forms of TGF- $\beta$  in the ECC media did not affect the induction of collagen production by control or CD SEMFs. Therefore, TGF- $\beta$  was not a prerequisite messenger for the induction of collagen synthesis induction by ECC media in treated SEMFs. Previous studies demonstrated that an interaction between TF and activated FVII could induce pro-fibrotic CTGF in human keratinocytes. In addition, SEMFs have been shown to upregulate collagen production in an autocrine manner via the secretion of CTGF and TF. Here, we demonstrated the production of CTGF by primary SEMF cultures following treatment with ECC media, especially if colonic epithelial cells were treated with pro-inflammatory cytokines. CTGF expression is dependent on the presence of thrombin and TF, and is abolished by anti-thrombin-III treatment. TF production and subsequent collagen production is dependent on ET-1 receptor signalling. Thus, we explored the hypothesis that CTGF, TF or thrombin regulate pro-fibrotic signalling in our two-cell system of intestinal fibrosis. However, neutralisation of CTGF or adding antithrombin-III did not block of collagen production by ECC stimulated control or CD SEMFs. The same stood true for neutralization TF in similarly treated control SEMFs. In addition endothelin receptor antagonism had no effect on the induction of collagen production on control or CD SEMFs.

SEMF mobility/ migration was assessed with the wound-healing scratch assay and quantified as the percentage of wound repair *in vitro*. Addition of exogenous TGF- $\beta$ 1 in primary SEMF cultures was found to promote SEMF mobility/migration in a dose-dependent manner. In contrast TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  reduced wound healing. In combination, these cytokines



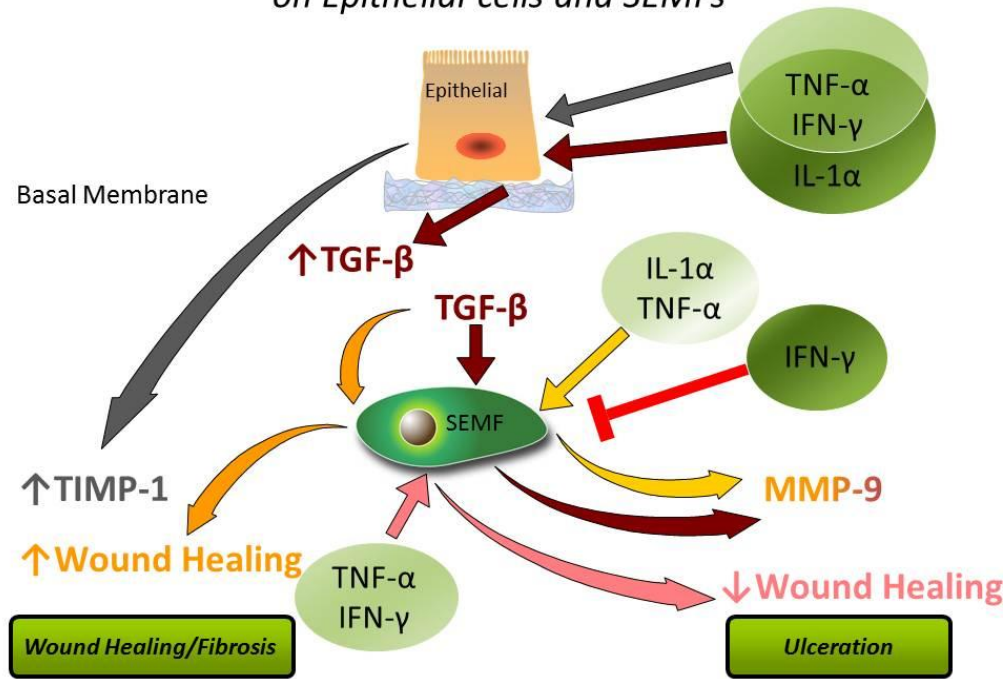
exerted an additive effect. IL-1 $\alpha$  did not alter migration either when added alone or when used in combination with TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ .

To study the potential impact of epithelial cells on this process, we used ECC media to stimulate primary SEMFs. ECC media derived from non-stimulated CaCO-2 cells had no effect on wound healing. Alternatively, SEMF mobility/migration was reduced if CaCO-2 were pretreated for 6 h with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , and subsequently wound closure was significantly slowed. Stimulating the epithelial cell cultures with all three cytokines resulted in stronger inhibition of wound closure despite the absence of the initial pro-inflammatory stimuli. Similar results were obtained if HT-29 ECC was used for SEMF treatment. Thus, it appears that pro-inflammatory stimuli could inhibit the migratory potential of SEMFs both directly and indirectly through epithelial cell-derived soluble factors. Moreover, the effect of intestinal epithelial cells on wound healing by adjacent SEMFs differed from that predicted for TGF- $\beta$  induction; i.e., the net effect of crosstalk might involve other factors.

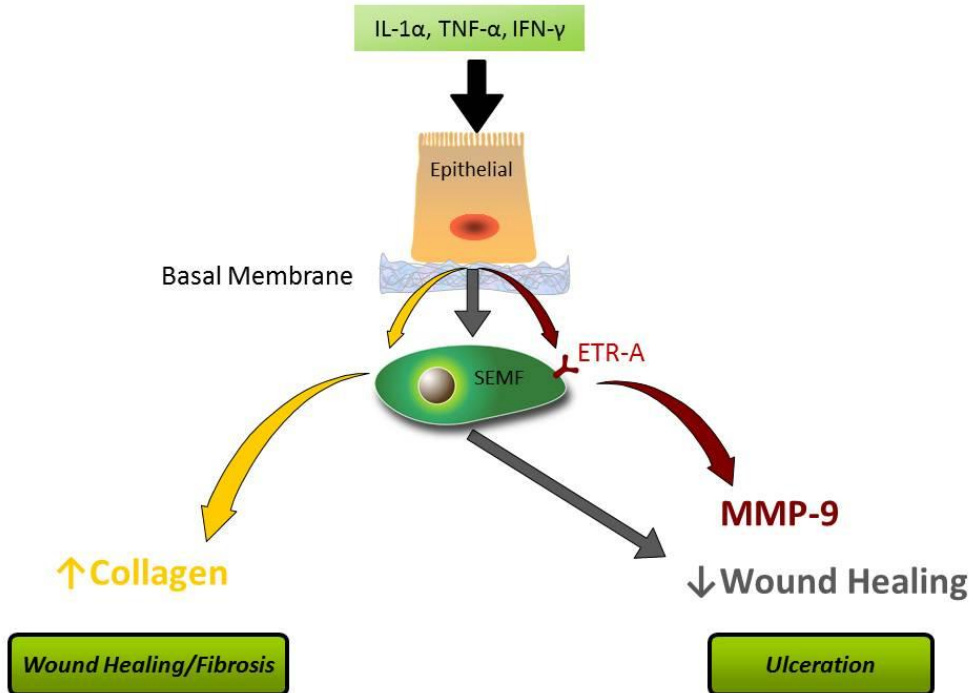
## 8.3 Conclusions

This study provides indications of potential crosstalk between intestinal epithelial cells and SEMFs. *In vitro* stimulation of epithelial cells with pro-inflammatory cytokines, which partially mimics epithelial cell injury during intestinal inflammation, provoked changes in SEMFs similar to those observed during intestinal fibrosis. These changes included the upregulation of collagen, endothelin receptor A-dependent induction of MMP-9 and inhibition of migration. Our results support the necessity for further investigation and *in vivo* validation of cooperation between epithelial cells and adjacent myofibroblasts in the regulation of extracellular matrix remodelling and inflammation-induced intestinal fibrosis.

*Effects of Proinflammatory Cytokines and TGF- $\beta$  on Epithelial cells and SEMFs*



*Indirect effects of Epithelial cells on SEMFs*



## 9 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### 9.1 Υπόβαθρο και στόχοι

Τα επιθηλιακά κύτταρα και οι παρακείμενοι υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί συμμετέχοντες στην παθοφυσιολογία της εντερικής φλεγμονής και ίνωσης αντίστοιχα. Ερευνήσαμε την πιθανή επικοινωνία μεταξύ υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών παχέος εντέρου και επιθηλιακών κυττάρων, επικεντρωμένοι σε μονοπάτια φλεγμονής του βλεννογόνου που ενδεχομένως πυροδοτούν εντερική ίνωση.

### 9.2 Μέθοδοι

Μελετήσαμε την επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) σε ανθρώπινες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές και των υπερκειμένων τους σε πρωτογενείς ανθρώπινους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες παχέος εντέρου και στην αντίστοιχη κυτταροσειρά 18CO ως προς την παραγωγή TGF- $\beta$  ισομορφών και TIMP-1, τη σύνθεση κολλαγόνου, τη δραστικότητα των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 και την μετανάστευση/κινητικότητα των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών.

### 9.3 Αποτελέσματα

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες αύξησαν την έκκριση των προϊόντων TGF- $\beta$  και TIMP-1 σε επιθηλιακά κύτταρα, αλλά δεν είχαν όμοια επίδραση σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες. Οι TNF- $\alpha$  και IL-1 $\alpha$  προκάλεσαν επαγωγή MMP-9 δραστικότητας σε υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες, αλλά η IFN- $\gamma$  ανέστειλε αυτό το φαινόμενο. Επιθηλιακά

κύτταρα προδιεγερμένα με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκάλεσαν δραστικότητα MMP-9 στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες, η οποία εξαρτιόταν από σηματοδότηση του υποδοχέα A των ενδοθηλινών της μεμβράνης τους. Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα αν προεπώζονταν με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες διπλασίαζαν τη συνολική παραγωγή κολλαγόνου στους υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες, αλλά η επίδραση αυτή ήταν ανεξάρτητη των TGF-β, CTGF, TF και ενδοθηλινών. Υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες απομονωμένοι από ασθενείς με νόσο του Crohn επέδειξαν όμοιες απαντήσεις, με την εξαίρεση της ιδιοσυστασιακά αυξημένης βασικής παραγωγής κολλαγόνου. Η μετανάστευση/ κινητικότητα των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών μειώθηκε άμεσα από τον TNF-α και την IFN-γ, αλλά αυξήθηκε από τον TGF-β1. Ωστόσο, επώαση με υπερκείμενο επιθηλιακών προδιεγερμένων με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μείωσε τη μετανάστευση/ κινητικότητα των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών.

## 9.4 Συμπεράσματα

Η μελέτη μας καταδεικνύει ότι τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα δυνητικά απαντούν σε φλεγμονώδες περιβάλλον προκαλώντας λειτουργίες των υποκείμενων μυοϊνοβλαστών παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε εντερική ίνωση.

# 10 ABSTRACT

## 10.1 Background and Aims

Colonic epithelial cells and adjacent subepithelial myofibroblasts have been identified as important counterparts in the pathophysiology of intestinal inflammation and fibrosis, respectively. We investigated the possible crosstalk between colonic subepithelial myofibroblasts and colonic epithelial cells, while focusing on the mucosal inflammation pathways that potentially trigger intestinal fibrosis.

## 10.2 Methods

We studied the effects of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) on human colonic epithelial cell lines and the effects of epithelial cell-conditioned media on primary human colonic subepithelial myofibroblasts along with the corresponding 18CO cell line. Readouts included production of TGF- $\beta$  isoforms and TIMP-1, total collagen synthesis, matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 activity and SEMF migration/mobility.

## 10.3 Results

Pro-inflammatory cytokines upregulated generation of profibrotic TGF- $\beta$  and TIMP-1 in colonic epithelial cells but had no effect on subepithelial myofibroblasts. TNF- $\alpha$  or IL-1 $\alpha$  induced MMP-9 activity in subepithelial myofibroblasts, but IFN- $\gamma$  inhibited that phenomenon. Colonic epithelial cells pretreated with pro-inflammatory cytokines induced MMP-9 production by subepithelial myofibroblasts, which was dependent on endothelin

receptor A signalling in subepithelial myofibroblasts. Moreover, colonic epithelial cells treated with pro-inflammatory cytokines doubled total collagen production in subepithelial myofibroblasts, but this effect was independent of TGF- $\beta$ , CTGF, TF and endothelin. Subepithelial myofibroblasts isolated from Crohn's disease patients showed similar responses, with the exception of increased basal collagen production. Subepithelial myofibroblast migration/mobility was directly reduced by TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , but increased by TGF- $\beta$ 1. However, conditioned media from epithelial cells pretreated with pro-inflammatory cytokines decreased migration/mobility of subepithelial myofibroblasts.

## 10.4 Conclusions

Our study indicates that colonic epithelial cells may respond to an inflammatory milieu by inducing myofibroblast functions similar to those observed during intestinal fibrosis.

## **11 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:**

### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ / ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

## 11.1 Ανηρτημένες Ανακοινώσεις σε

### Πανελλήνια Συνέδρια

1. Δρυγιαννάκης Ι., Βαλάτας Β., Κολιός Γ., Κουρούμαλης Η. ***In vitro* μελέτη της επίδρασης των κολονικών επιθηλιακών κυττάρων στη λειτουργία των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών.** 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Καλαμάτα (27- 29 Μαΐου 2011).
2. Δρυγιαννάκης Ι., Μανούσου Π., Μπουρίκας Λ., Νότας Γ., Κολιός Γ., Κουρούμαλης Η. **Η οκτρεοτίδη καταστέλλει την οδό των ισομορφών TGF-β στην κολονική επιθηλιακή κυτταρική σειρά CaCO-2.** 26ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογίας Συνέδριο, Αθήνα (09- 12 Νοεμβρίου 2006).

## 11.2 Ανηρτημένες Ανακοινώσεις σε Διεθνή

### Συνέδρια

1. Kolios G., Drygiannakis I., Valatas V., Kouroumalis E. **Epithelial Cells Modulate Colonic Subepithelial Myofibroblast Functions *in vitro*.** 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, France (5- 9 July 2011).
2. Drygiannakis I., Valatas V., Notas G., Bourikas L., Manousou P., Kolios G., Kouroumalis E. **Crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts regulates bowel fibrosis in Crohn's disease.** 17th United European Gastroenterology Week/ World Congress of Gastroenterology, London, UK (21- 25 November 2009).



3. **Drygiannakis I., Kolios G., Bourikas L., Manousou P., Notas G., Kouroumalis E.**  
**Differential effect of octreotide on the expression and secretion of TGF-beta by primary human colonic subepithelial myofibroblasts (SEMFs) and colonic epithelial cell lines; a regulatory effect of proinflammatory cytokines.** 15th United European Gastroenterology Week, Paris, France (27- 31 October 2007).
4. **Drygiannakis I., Manousou P., Bourikas L., Notas G., Kolios G., Kouroumalis E.**  
**Octreotide suppresses the TGF-beta pathway in CACO-2 colonic epithelial cells.** Gut 2006;55:A205., 14th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany (21-25 October 2006).

## 11.3 Δημοσίευση σε Διεθνές Επιστημονικό Περιοδικό καταχωρημένο στο Medline

**Ioannis Drygiannakis, Vassilis Valatas, Ourania Sfakianaki, Leonidas Bourikas, Pinelopi Manousou, Konstantinos Kambas, Konstantinos Ritis, George Kolios, Elias Kouroumalis.** *Epub 11 May 2012.* **Pro-inflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis.** Journal of Crohn's and Colitis; doi: [10.1016/j.crohns.2012.04.008](https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.04.008)

## 11.4 Αντίγραφα Ανακοινώσεων & Δημοσίευσης



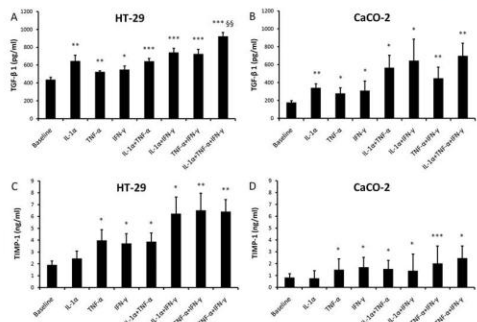
# IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΛΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΜΥΟΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ.



I. Δρυγιαννάκης<sup>1</sup>, Β. Βαλάτσας<sup>1</sup>, Γ. Κολιός<sup>2</sup>, Η. Κουρούμαλης<sup>1</sup>

1Γαστρεντερολογικό Εργαστήριο, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Κρήτης, και 2Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης.

**Σκοπός:** Η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδραση επιθηλιακών κυττάρων (ΚΕΚ) και εντερικών υποεπιθηλιακών μυοινοβλάστων (SEMFs)



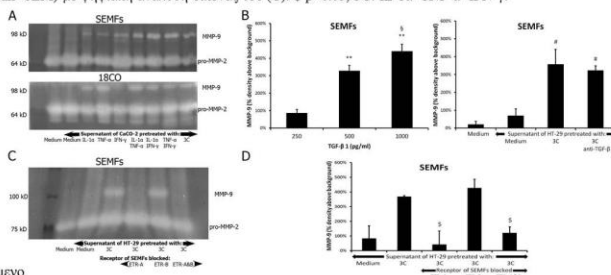
**Figure 1.** Οι TGF-β1 (A, B) και TIMP-1 (C, D) μελετήθηκαν στο υπερκείμενο καλλιέργειών HT-29 και CaCO-2 με ELISA. \* p<0.05, \*\* p<0.01 και \*\*\* p<0.001 συγκριτικά με βασική έκκριση. §§ p<0.01 συγκριτικά με τον συνδυασμό 2 κυτταροκινών.

**Μεθόδους:** Μελετήσαμε την επίδραση δύο ανθρώπινων κυτταροσφαιρών καρκίνου του παχέος εντέρου, των HT-29 και CaCO-2, σε καλλιέργειες απομονωμένων ανθρώπινων SEMFs και στην κυτταροσφαίρα μυοινοβλάστων 18CO. ΚΕΚ καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς την παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1α, TNF-α και IFN-γ). Υπερκείμενα καλλιεργημένων κολονικών επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για την διέγερση SEMFs με σκοπό τη μελέτη του μηχανισμού μετανάστευσής τους και της παραγωγής MMP και κολλαγόνου.

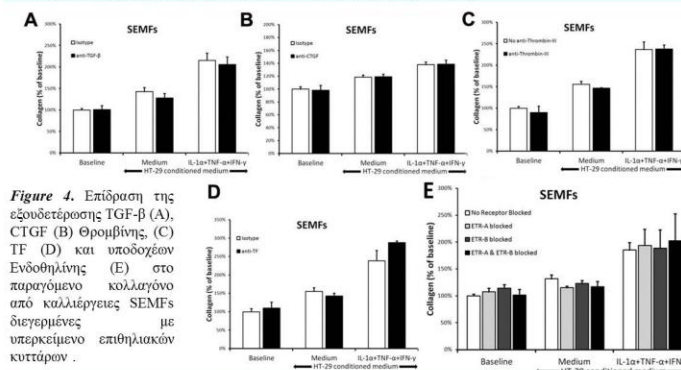
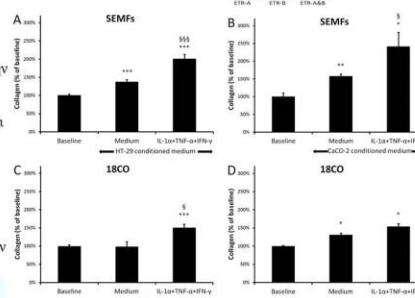
**Αποτελέσματα:**

1. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αυξάνουν την παραγωγή των προιτωτικών μεσολαβητών, TGF-β (Fig. 2A, B) και TIMP-1 (Fig. 2C, D) από τα ΚΕΚ χωρίς να έχουν επίδραση στους μυοινοβλάστες.
2. ΚΕΚ διεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (3C) αυξάνουν την παραγωγή MMP-9 από SEMFs και 18CO (Fig. 2A). Ο μηχανισμός είναι ανεξάρτητος του TGF-β των επιθηλιακών κυττάρων (Fig. 2B) άλλα εξαρτάται από την δράση του υποδοχέα της Ενδοθηλίνης-A στους SEMFs (Fig. 2C, D).
3. Υπερκείμενο καλλιεργικών ΚΕΚ αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου από τους SEMFs και η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη εάν τα ΚΕΚ διεγερθούν με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Fig. 3). Η διεργασία αυτή είναι ανεξάρτητη από τους TGF-β (Fig. 4A), τον CTGF (Fig. 4B), την θρομβίνη (Fig. 4C), τον TF (Fig. 4D), και την ενδοθηλίνη (Fig. 4E), αλλά ο υπεύθυνος μεσολαβητής δεν εντοπίστηκε.
4. Τα ΚΕΚ κατόπιν διέγερσης με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθυστερούν σημαντικά την μετανάστευση των SEMFs, διαδικασία που ενδεχομένως παίζει ρόλο στην συγκράτηση των SEMFs στις εστίες φλεγμονής με συνέπεια την ίνωση (Fig. 5A,B).

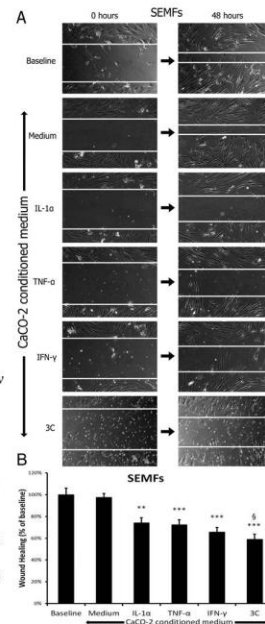
**Figure 2.** (A) Ανίχνευση MMP-2 και MMP-9 σε καλλιέργειες SEMFs και 18CO με gelatin zymography, (B) Παραγωγή MMP-9 από καλλιέργειες SEMFs ποσοτικοποιημένη με ψηφιακή ανάλυση εικόνας (mean±SEM), \*\* p<0.01 συγκριτικά με βασική έκκριση, # p<0.05 συγκριτικά με υπερκείμενο από μη-διεγερμένα HT-29. (C) Επίδραση αναστολής του υποδοχέα Ενδοθηλίνης A & B. (D) Ποσοτικοποίηση (mean±SEM) με ψηφιακή ανάλυση εικόνας του (C). § p<0.05, 3C: IL-1α+TNF-α+IFN-γ.



**Figure 3.** Παραγωγή κολλαγόνου από καλλιέργειες SEMFs υπό την επίδραση υπερκείμενου καλλιεργικών επιθηλιακών κυττάρων διεγερμένων ή όχι με προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες \* p<0.05, \*\* p<0.01, και \*\*\* p<0.001 συγκριτικά με βασική έκκριση, § p<0.05 και §§§ p<0.001 συγκριτικά με υπερκείμενο μη-διεγερμένων επιθηλιακών.



**Figure 4.** Επίδραση της εξουδετέρωσης TGF-β (A), CTGF (B) Θρομβίνης, (C) TF (D) και υποδοχών Ενδοθηλίνης (E) στο παραγόμενο κολλαγόνο από καλλιέργειες SEMFs διεγερμένες με υπερκείμενο επιθηλιακών κυττάρων.



**Figure 5.** Μελέτη της μετανάστευσης κατά την επούλωση τραύματος. (A) Διαδοχικές μικροφωτογραφίες κατόπιν μηχανικού τραυματισμού επί καλλιεργικών SEMF υψηλής συρροής. (B) Ποσοτικοποίηση με Mean±SEM από τρία ανεξάρτητα πειράματα. \*\* p<0.01, και \*\*\* p<0.001 συγκριτικά με βασικές τιμές, § p<0.05 συγκριτικά με αποτελέσματα από CaCO-2 διεγερμένα με μία κυτταροκίνη.

**Συμπέρασμα:** Η ίνωση χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές της λειτουργίας των SEMFs, δηλαδή την αύξηση της παραγωγής των MMP, του κολλαγόνου και της αναστολής της μετανάστευσής τους. Για πρώτη φορά καταδεικνύεται πως όλες αυτές οι αλλαγές βρίσκονται υπό τον έλεγχο των υπερκείμενων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων.



## Η ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΗ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ ΟΔΟ ΤΟΥ TGF-β ΣΤΗΝ ΚΟΛΟΝΙΚΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΣΕΙΡΑ CACO-2.

I. Δρυγιαννάκης, Π. Μανούσου, Α. Μπουρίκας, Γ. Νότας, Γ. Κολιός, Η. Κουρούμυλης  
Ερευνητικό Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο



### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενώ η έντονη εντερική φλεγμονή είναι αρχικό φαινόμενο στη νόσο του Crohn, η *εντερική ίνωση* είναι όμημη επιπλοκή που οδηγεί σε εντερική στένωση. Τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου είναι σε μια σταθερή «επικοινωνία» με τα κύτταρα των εσωτερικών εντερικών στρωμάτων και παράγουν εγγενείς ή μετά από διέγερση τοκικά προφλεγμονωδών κυτταροκινών και υποδοχών τους, καθώς επίσης και αντιφλεγμονώδεις και πρωινωτικούς παράγοντες. Η οκτρεοτίδη είναι ανάλογο συμμοστατατίνης μακρύτερου χρόνου ήμιας ζωής με διάφορες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Ο Transforming Growth Factor-β (TGF-β) είναι ένας σημαντικός αντιφλεγμονώδης και πρωινωτικός παράγοντας. Οι τρεις ισομορφές του ανθρωπίνου TGF-β (1, 2 και 3) δεσμεύονται ως ομοδιμερή σε ένα διμερές υποδοχέα του TGF-β του τύπου II (TβR-II). Συνεχώς ενεργές κινάσες του ενδοκυττάρου τμήματος του TβR-II φωσφορυλιώνουν σερίνες και θρεονίνες του ενδοκυττάρου GS τομέα δύο TβR-I, ο οποίος ακολουθώντας μετακινείται με έναν τρόπο ώστε ο TβR-I να μπορεί ακολούθως να χρησιμοποιήσει τον φωσφορυλιωμένο GS τομέα και το βρόχο L45 για να αλληλεπιδράσει με τη βασική δομή «ταπέτσης» και το βρόχο L3 ενός Smad-δέκτη (R-Smads: Smad 2 και Smad 3). Το καρβοξυτελικό μοτίβο SXK των τελευταίων φωσφορυλιώνεται και η αμοιβαία ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ της αμινο- και της καρβοξυ-τελικής περιοχής αίρεται. Τα R-Smads συνδέονται έπειτα ως μονομερή ή διμερή με τη θετικά φορτισμένη «ταπέτση» επιφάνειας της καρβοξυτελικής περιοχής του Smad 4 (co-Smad). Χάρη σε μια περιοχή πλούσια σε λυσίνες που εκτεθειμένη στο διαλυτή αμινοτελικό άκρο του Smad 3 και σε μια περιοχή που αλληλεπιδρά με τις νουκλεοτρίνες του Smad 2, αυτά εισέρχονται στον πυρήνα. Το Smad 3 δεσμεύεται σε ειδικές περιοχές του DNA ή σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη χάρη σε μία β-πητυχή της αμινοτελικής περιοχής του. Το πιο κοινό μεταγράφημα του Smad 2 εικόζεται ότι δεσμεύεται στο DNA μέσω του Smad 4. Ένας μεγάλος αριθμός ενεργοποιητών ή αναστατών πρωτεϊνικής έκφρασης συνδέεται στο σύμπλεγμα DNA-R-Smad-Smad 4.

Το Smad-7 είναι ένα ανασταλτικό Smad που δεσμεύει τις πρωτείνες Smurf 1 και 2 και σημαίνει τον TβR-II για πρωτοέκλυση. Το Smad 6 μβλιν έχει παρόμοιο ρόλο, μερικώς μέσω δεσμεύσης του στο Smad 4.

Μελέτησαμε την απάντηση της οδού του TGF-β σε προσομοίωση φλεγμονής και σε οκτρεοτίδη σε δύο επιθηλιακές κυτταροσειρές του παχέος εντέρου.

### ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

**Κυτταροκαλλέργειες.** Οι ανθρωπίνες κολονικές επιθηλιακές σειρές HT-29 και CACO-2 αγοράστηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Ζωικών Κυτταροκαλλεργιών (ECACC, Ηνωμένο Βασίλειο-ΗΒ), καλλιεργήθηκαν σε ειδικές επιφάνειες 75cm<sup>2</sup> (NUNC, A/S, Δανία) χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά υλικά McCoy's και MEM αντίστοιχα, εμπλουτισμένα με 10% εμβρυϊκό βοσείο ορό (FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη 100 mg/ml, στρεπτομικίνη 100mg/ml, αμφοτερικίνη-B 2.5 mg/ml, GIBCO, ΗΒ). Τα κύτταρα διαφυλάσσονται χρησιμοποιώντας θρυμνική 0,25% EDTA 1mM (GIBCO, ΗΒ) μετά από δύο συνόμενες πλύσεις με HBSS με αντιβιοτικά χωρίς σερόιο και μπιπρίνη. Στις διαφύσεις 18-23 για τα CACO-2 και 17-19 για τα HT-29 κύτταρα στρώθηκαν σε πλάτη εξ-φραζών (NUNC, A/S, Δανία). Μόλις έφθασαν σε πληρότητα 70-80%, αντικαταστάμε με θρεπτικό υλικό χωρίς FBS για 16-24 ώρες και έπειτα με 1,5ml του ίδιου με η χωρίς μίγμα τριών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (3C) (ιντερλευκίνη-1α: 10 ng/ml, TNF-α: 50 ng/ml, ιντερφερόνη-γ: 300 U/ml) (RDSystems, ΗΒ) ή με οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> ή 10<sup>-8</sup> M, που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις οκτρεοτίδης στις οποίες τα επιθηλιακά κύτταρα εκτίθενται μετά από συνθηματικές, δοσολογίες.

**Διηλεκτρική αντήρηση πολυμεράσης αντιστροφής μεταγραφής (RT-PCR).** Το RNA απομονώθηκε με το αντήροστικό TRIzol (Invitrogen, ΗΠΑ) και ακολουθώντας ετήθη υπό την επίδραση DNAsης (Invitrogen, ΗΠΑ) για να αποδομηθεί το ενδογενές DNA. Κατόπιν με τη βοήθεια της Superscript II

Αντήρησης Μεταγράφσης(Invitrogen, ΗΠΑ) ελήφθη συμπληρωματικό DNA (cDNA) σύμφωνα με τα συσταγόμενα πρωτόκολλα. Τα dNTPs αγοράστηκαν από τη Roche, Γερμανίας τα oligo(dT)12-18 και οι εκκινητές από την Invitrogen, ΗΠΑ και οι ανασταλείς ριבונוκλικής (RNAsin) από την Promega, ΗΠΑ. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε έπειτα σε ολισθητικές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) με τεσσάρων εκκινητές ειδικούς για RNA (Invitrogen, ΗΠΑ): ένα ζευγάρι για ένα σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο- GAPDH- σε κατανάλιο κύκλωμα της συνιστώμενης συγκέντρωσης και ένα ζευγάρι για ισομορφές TGF-β ή Smads 2, 3, 4, 6 και 7. Οι PCR βελτιστοποιήθηκαν ως προς τους κύκλους και τις θερμοκρασίες. Η Ταq DNA πολυμεράση και τα dNTPs αγοράστηκαν από τη Roche, Γερμανίας. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν ποσοτικά με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού ImageJ έκδοσης 1.34n (NIH, ΗΠΑ) και εκφράστηκαν ως αναλογία της μέσης έντασης της μπάρας που αντιστοιχεί σε TGF-β ή SMAD προς τη μέση ένταση μπάρας του GAPDH, μετά από αφαίρεση της έντασης του υποβιβίου από καθεμιά.

**ELISA.** Η συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης στα υπερκείμενα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (BioRad, ΗΒ). Ημιαυτοματοποιημένες ανθρώπινες DuoSet ELISAs (RnDSystems, ΗΒ) χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η έκκριση ισομορφών TGF-β (1, 2 και 3) στα υπερκείμενα. Εκφράζονται ως μέση ανά εκατομμύριο ολικής πρωτεΐνης. Τα δείγματα εξεταστήκαν σε διπλάτες. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### TGF-β mRNA

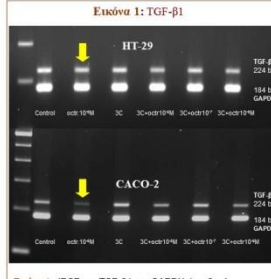
HT-29 και CACO-2 κατέδειξαν μια βασική παραγωγή TGF-β1 mRNA (εικόνα 1).  
Μια αξιοπρόσεκτη αύξηση TGF-β1 mRNA παρατηρήθηκε μετά από 4 ώρες επίδρασης 3C σε CACO-2, αλλά όχι σε HT-29 (εικόνα 1).  
Στον ίδιο χρόνο επίδρασης με οκτρεοτίδη κατέστησε σημαντικά τη βασική μεταγραφή TGF-β1 σε CACO-2, αλλά όχι σε HT-29 (εικόνα 1).  
Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η οκτρεοτίδη είχε μια ελάχιστη επίδραση στην προκλήθεισα επαγωγή TGF-β1 mRNA (εικόνα 1).  
Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το TGF-β2 mRNA στις 24 ώρες επίδρασης (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).  
Αντίθετα, το TGF-β3 mRNA επέδειξε σαφώς από τις 3C και στις δύο κυτταροσειρές στις 6 ώρες επίδρασης, ένα πολύ χαμηλότερη βασική παραγωγή TGF-β3 mRNA βρέθηκε, ειδικά στα CACO-2 (εικόνα 2).  
Η οκτρεοτίδη μόνι της είχε μια σαφή κατασταλτική δράση στη βασική μεταγραφή TGF-β3 mRNA και στις δύο κυτταροσειρές, ενώ λιγότερο σαφής καταστολή από την οκτρεοτίδη παρατηρήθηκε παρουσία 3C. Η χαμηλή παραγωγή ημ διεγερμένων HT-29 σε αντίθεση με τα CACO-2 είναι αξιοπρόσεκτη (γράφημα 1).

#### SMAD mRNA

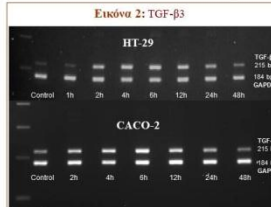
Μη διεγερμένα CACO-2 εξέφραζαν SMAD 2 mRNA που επαγόταν από 3C και καταστέλλονταν σαφώς από οκτρεοτίδη στο 33% (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).  
Τα mRNA των SMAD 3 (εικόνα 3) και SMAD 4 (γράφημα 2) επάχθηκαν από 3C και καταστάθηκαν από οκτρεοτίδη στα CACO-2.  
Η οκτρεοτίδη είχε μια δσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στην προκλήθεισα από 3C επαγωγή SMAD 4 στις 24 ώρες στα CACO-2 (γράφημα 2).  
Τα mRNA των SMAD 6 και 7 επηρεάστηκαν λιγότερο σαφώς από τις 3C αλλά καταστάθηκαν σαφώς από την οκτρεοτίδη στα CACO-2 (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).  
Επίδραση της οκτρεοτίδης στην έκφραση SMAD mRNA σε HT-29 δεν παρατηρήθηκε (στοιχεία δεν παρουσιάζονται).

#### ELISA για TGF-β

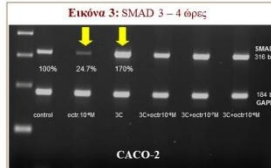
Αν και τα CACO-2 παρουσίασαν μια σημαντική καταστολή της οδού του TGF-β mRNA υπό οκτρεοτίδη σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M, η μέτρηση των ισομορφών TGF-β με ELISA στα υπερκείμενα απροσδόκητα αποκάλυψε επαγωγή και όχι καταστολή σε επίπεδο πρωτεΐνης. Μάλιστα η έκκριση TGF-β1 είναι υψηλότερη υπό οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M από ό,τι υπό την επίδραση 3C, ειδικά σε πρώια χρονικά σημεία (γράφημα 3).  
Οι άλλες δύο ισομορφές εκκρίθηκαν κάτω από τα όρια ανίχνευσης (31,25 ng/ml).



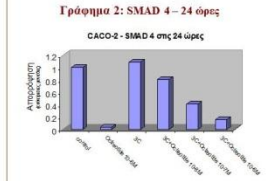
Εικόνα 1. dPCR για TGF-β1 και GAPDH (σταθερά εκφραζόμενο) mRNA στα HT-29 και CACO-2 στις 6 και 4 ώρες επίδρασης αντίστοιχα. Τα βέλη δείχνουν την καταστολή υπό οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M μόνο στα CACO-2.



Εικόνα 2. dPCR για TGF-β3 και GAPDH (σταθερά εκφραζόμενο) mRNA στα HT-29 και CACO-2 με IL-1α (10 ng/ml), TNF-α (50 ng/ml) και IFN-γ (300 U/ml)- 3C-επίδραση. Παρατηρήθηκε επώδυνη στις 6 ώρες.



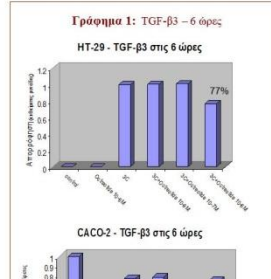
Εικόνα 3. dPCR για SMAD 3 και GAPDH (σταθερά εκφραζόμενο) mRNA στα CACO-2 στις 4 ώρες επίδρασης. Καθαρή καταστολή από την οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M στο 24,7% και επαγωγή κατά 70% από 3C.



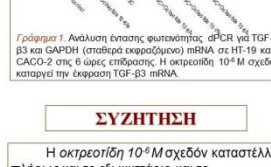
Γράφημα 2. Ανάλυση έντασης φωτεινότητας dPCR για TGF-β3 και GAPDH (σταθερά εκφραζόμενο) mRNA σε CACO-2 στις 24 ώρες επίδρασης. Η οκτρεοτίδη, 10<sup>-6</sup> M μόνι σχεδόν αναίρη την έκφραση SMAD 4 mRNA, ενώ έχει δσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα όταν συνδυάζεται με 3C.



Γράφημα 3. ELISA για TGF-β1 από CACO-2 στις 12, 24 και 48 ώρες. Η οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M μόνο επάγει την έκκριση TGF-β1 υψηλότερα και περισσότερο από τις 3C.



Γράφημα 1. TGF-β3 στις 6 ώρες HT-29 - TGF-β3 στις 6 ώρες



Γράφημα 1. Ανάλυση έντασης φωτεινότητας dPCR για TGF-β3 και GAPDH (σταθερά εκφραζόμενο) mRNA σε HT-29 και CACO-2 στις 6 ώρες επίδρασης. Η οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M σχεδόν καταργεί την έκφραση TGF-β3 mRNA.

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M σχεδόν καταστέλλει πλήρως και το εξωκυττάριο και το ενδοκυττάριο τμήμα της οδού του TGF-β ως προς το mRNA στην κολωνική επιθηλιακή σειρά CACO-2. Αυτή η συγκέντρωση είναι στα επίπεδα της IC50 των υποδοχών συμμοστατατίνης 1 και 4, ενώ είναι 100-10.000 μεγαλύτερη από την IC50 των 2, 3 and 5. Το αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης σε αυτή τη συγκέντρωση πάνω στην προσομοίωση φλεγμονής με 3C στην ίδια κυτταροσειρά είναι ελάχιστο ως προς τα mRNA των TGF-β3 και SMAD 3, αλλά παρατηρήθηκε στην περίπτωση του mRNA του SMAD 4, όπου δσοεξαρτώμενες δράσεις παρατηρούνται. Το SMAD 4 φαίνεται να είναι ο κύριος σύνδεσμος μεταξύ φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών, όπως επίσης και πρωινωτικών οδών στην κυτταροσειρά CACO-2.

Αντίθετα, τα HT-29 φαίνονται να απαντούν σε 3C (επαγωγή) και οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M (καταστολή) μόνο ως προς το TGF-β3 mRNA. Σε αντίθεση το SMAD 4 εδω φαίνεται να μην απαντά στα ανωτέρω ερεθίσματα ως προς το mRNA. Το ίδιο ισχύει και για τα υπολοίπα mRNA της οδού.

Προς έκπληξη μας, η έκκριση πρωτεΐνης TGF-β1 στα CACO-2 επάγειται ισχυρά, ειδικά σε αρχικά χρονικά σημεία, από την οκτρεοτίδη 10<sup>-6</sup> M, ενώ οι 3C εδωγουν έντονα την έκκριση πρωτεΐνης TGF-β1 αργότερα. Η οκτρεοτίδη φαίνεται να έχει ήπια κατασταλτική δράση πάνω στην επαγωγή από τις 3C του TGF-β1 αργότερα (48 ώρες).

**Συμπεράσματα.** Η οκτρεοτίδη σχεδόν καταργεί την έκφραση mRNA της οδού του TGF-β στην κολωνική επιθηλιακή σειρά CACO-2, αλλά όχι στην HT-29. Το αποτέλεσμα της οκτρεοτίδης στην επαγωγή φλεγμονής από τις 3C είναι καθαρό στην περίπτωση του mRNA του SMAD 4. Επομένως, το SMAD 4 θα μπορούσε να είναι το κεντρικό συνδετικό σημείο της οδού του TGF-β προς τις φλεγμονώδεις οδούς στο εντερικό επιθήλιο.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ollas G, Viollet C, Kusserow H et al. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 2004; 89: 1057-1091.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGFβ signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
- Moustakas A, Souchevinsky S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-β signal transduction. *J Cell Science* 2001; 114: 4359-4369.
- Planchon S, Focchi C, Takafuji Y et al. Transforming Growth Factor-β Preserves Epithelial Barrier Function: Identification of Receptors, Biochemical Intermediates, and Cytokine Antagonists. *J Cell Physiology* 1999; 181: 55-66.



# Epithelial cells modulate colonic subepithelial myofibroblast functions *in vitro*.



George Kolios<sup>1</sup>, Ioannis Drygiannakis<sup>2</sup>, Vassilis Valatas<sup>2</sup>, Elias Kouroumalis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Greece  
<sup>2</sup>Gastroenterology Laboratory, Medical Department, University of Crete, Greece

**Introduction:** Colonic subepithelial myofibroblasts (SEMFs) are key cells in the process of gut injury and repair.  
**Aim:** To investigate possible cross-talk between colonic epithelial cells and colonic subepithelial myofibroblasts (SEMFs) *in vitro*.

## Methods

We studied the effects of epithelial cell conditioned media (ECCM) from two human colonic epithelial cells lines the HT-29, CaCO-2 on cultures of freshly isolated human SEMFs and the colonic myofibroblast cell line 18CO.

## Results

Pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) increased profibrotic mediator production by epithelial cells such as TGF $\beta$  and TIMP-1 but had no effect on SEMF cultures (Fig. 1). ECCM from epithelial cells pre-treated with pro-inflammatory cytokines induced MMP-9 production by SEMFs via an endothelin-A receptor dependent manner (Fig. 2). ECCM from epithelial cells increased total collagen production by SEMFs and the effect was enhanced if epithelial cells were pre-treated with pro-inflammatory cytokines (Fig.3). The process was found to be TGF $\beta$ , CTGF, TF and endothelin independent (Fig. 4). However, ECCM from epithelial cells pre-treated with pro-inflammatory cytokines significantly inhibited SEMF migration (Fig. 5).

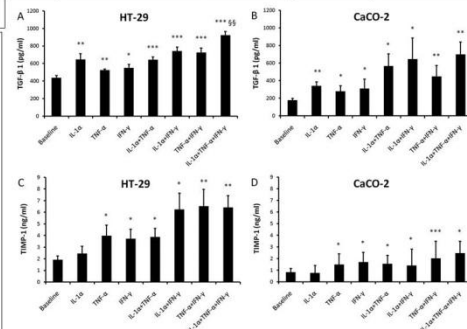


Figure 1. Proinflammatory cytokines increase TGF- $\beta$ 1 and TIMP-1 production by colonic epithelial cells. TGF- $\beta$ 1 (A, B) and TIMP-1 (C, D) production by HT-29 and CaCO-2 were measured in cell culture supernatant by ELISA. The effect of cytokine stimulation for 24 hours is shown. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 significance from baseline production.

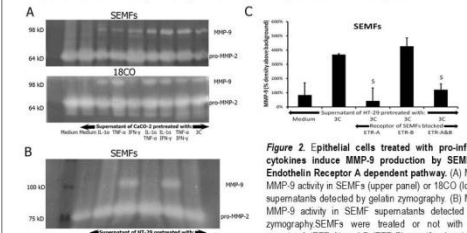
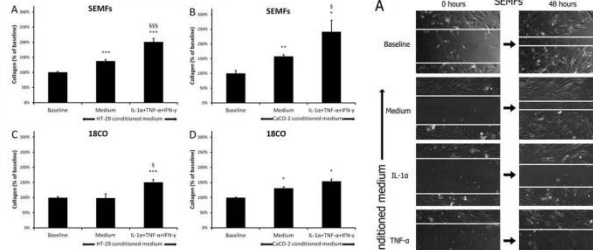


Figure 2. Epithelial cells treated with pro-inflammatory cytokines induce MMP-9 production by SEMFs via an Endothelin Receptor A dependent pathway. (A) MMP-2 and MMP-9 activity in SEMFs (upper panel) or 18CO (lower panel) supernatants detected by gelatin zymography. (B) MMP-2 and MMP-9 activity in SEMF supernatants detected by gelatin zymography. SEMFs were treated or not with endothelin receptor A (EtrA) and B (EtrB) specific chemical blockers and then stimulated with conditioned medium from HT-29 cultures pretreated with the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$  (3C). (C) Zymography gel representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (C) Densitometry analysis quantification of MMP-9 activity shown in (C). Values are mean $\pm$ SEM of three independent experiments, §p<0.05 represents significance from 3C-pretreated HT-29 conditioned medium values.

Figure 3. Collagen production by SEMFs is upregulated by colonic epithelial cells exposed to pro-inflammatory cytokines. Total endocellular collagen content of primary SEMFs (A, B) and the 18CO cell line (C, D) left untreated or stimulated for 24 hours with ECC medium. ECC medium was obtained by HT-29 (A, C) and CaCO-2 (B, D) cell lines that were left untreated or were pre-treated with a combination of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ ). The cytokine-stimulus was removed from the ECC medium after 6 hours of stimulation. Results are mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 represent significance from baseline values. §p<0.05 and §§§p<0.001 represent significance from values obtained by stimulation with untreated ECC medium.



## Conclusion

The study shows that epithelial cell injury, mediated via stimulation with pro-inflammatory cytokines, can induce myofibroblast functions related to intestinal fibrosis and suggests a possible cross-talk of these two cell types in the context of extracellular matrix remodelling.

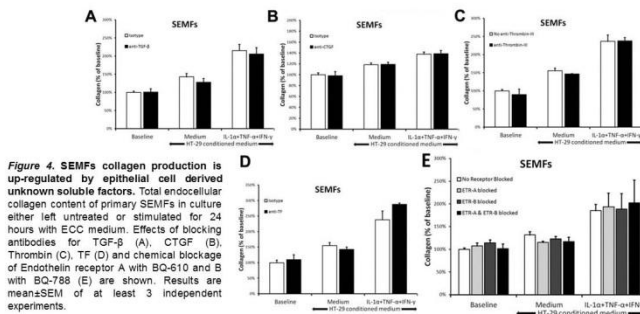


Figure 4. SEMFs collagen production is up-regulated by epithelial cell derived unknown soluble factors. Total endocellular collagen content of primary SEMFs in culture either left untreated or stimulated for 24 hours with ECC medium. Effects of blocking antibodies for TGF- $\beta$  (A), CTGF (B), Thrombin (C), TF (D) and chemical blockage of Endothelin receptor A with BQ-610 and B with BQ-788 (E) are shown. Results are mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments.

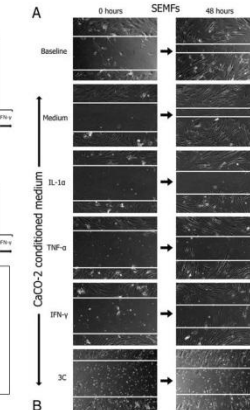
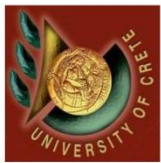


Figure 5. The effect of CaCO-2 ECC medium on SEMF wound healing assay. (A) Representative figures of confluent primary SEMF cultures at 0 (left column) and 48 (right column) hours following a scratch with a 200 $\mu$ l pip. ECC obtained from CaCO-2 cultures was used as stimulus. CaCO-2 cells were either left untreated or were pre-treated with proinflammatory cytokines (B) Mean SEM values of values obtain from three independent experiments are shown. \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 represent significance from baseline values. §p<0.05 represents significance from values obtained by stimulation of CaCO-2 with individual cytokines.



# Crosstalk between Colonic Epithelial cells and Subepithelial Myofibroblasts Regulates Bowel Fibrosis in Crohn's Disease.

Drygiannakis Ioannis<sup>1</sup>, Valatas Vasilios<sup>1</sup>, Notas George<sup>1</sup>, Bourikas Leonidas<sup>1</sup>, Manousou Pinelopi<sup>1</sup>, Kolios George<sup>2</sup>, Kouroumalis Elias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Gastroenterology, Medical Department, University of Crete, Heraklion, Greece

<sup>2</sup> Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Greece



**INTRODUCTION:** Link between intestinal inflammation—an initial phenomenon at Crohn's disease—and fibrosis—a late stage complication—partly lies in the disruption of balanced crosstalk between non-classic partners in intestinal inflammation.

**AIMS & METHODS:** To delineate profibrotic crosstalk between Intestinal Epithelial cells and Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs) in regard to ulceration and fibrosis, two human colonic epithelial cell lines (HT-29, CaCO-2), primary SEMFs and the colonic myofibroblast cell line (18CO) were treated with pro-inflammatory cytokines IL-1α, TNF-α, IFN-γ (3C) and TGF-β 1. SEMFs and 18CO were also treated with HT-29 or CaCO-2 supernatants. The three TGF-β isoforms and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 (TIMP-1) were measured with ELISAs. Matrix Metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2,-9) activities were assessed by zymography with gelatin. Furthermore, wound healing in confluent SEMFs and 18CO was measured in 2 and 3 days. Statistical significance was estimated with T-Test.

**RESULTS:** TGF-β1 secretion by HT-29 and CaCO-2 under the influence of IL-1α, TNF-α, and IFN-γ was at least doubled, with a similar pattern regarding the other 2 isoforms. SEMFs and 18CO barely secreted measurable levels of TGF-β and no induction effect by 3C was observed. HT-29 and CaCO-2 supernatants (even 3C-treated) did not show any MMP-9 activity. MMP-9 activity in SEMFs and 18CO supernatants was induced by TGF-β1 and conditioned medium from 3C-treated HT-29 or CaCO-2. There was MMP-9 induction by IL-1α, TNF-α and suppression when IFN-γ is added. MMP-2 activity remained stable. TIMP-1 secretion was increased in HT-29 and CaCO-2 by 3C, while there was no effect on SEMFs or 18CO. Wound healing by SEMFs was faster when TGF-β1 was added. TNF-α, IFN-γ and HT-29 or CaCO-2 conditioned medium had an opposite effect.

**CONCLUSION:** Myofibroblasts produce active MMP-9 secretion stimulated probably via activated epithelial cells-secreted TGF-β1, while epithelial cells exert a negative feedback control to MMP-9 activation via TIMP-1 production. In addition, wound healing in SEMFs is favored by TGF-β1 and inhibited by epithelial cells-secreted soluble mediators. These observations set the grounds of crosstalk between colonic epithelial cells and adjacent subepithelial myofibroblasts regarding the balance between bowel fibrosis and ulceration.

## INTRODUCTION

Natural history of Crohn's disease is characterized by three largely overlapping phenotypes:

- > Inflammatory (non-strictureing, non-penetrating).
- > Stenotic (strictureing).
- > Fistulising (penetrating).

During these pathophysiologic processes colonic Epithelial cells are in a constant crosstalk with cells of inner intestinal layers and produce a variety of pro-inflammatory and profibrotic mediators. Adjacent Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs) are among the potential targets.

We set up an *in vitro* model in order to explore crosstalk between the two cell types and identify possible pathways that could lead to different disease phenotypes.

Figure 1

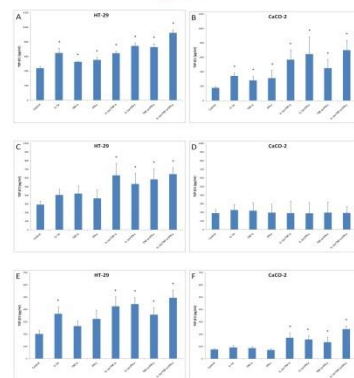


Figure 1. Both quiescent HT-29 (A, C, E) and CaCO-2 (B, D, F) epithelial cell lines secrete all TGF-β isoforms: 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F), as measured by ELISA at 24 hours. IL-1α, TNF-α and IFN-γ effectively increase production of all isoforms by HT-29 (A, C, E) and isoforms 1 (B) and 2 (D) by CaCO-2. Results of 3 experiments are shown. Statistical significance versus control by \*T-test (p<0.05) is represented by \*.

## MATERIALS & METHODS

### Colonic Subepithelial Myofibroblast Isolation

Subepithelial myofibroblasts were isolated from endoscopically obtained biopsies of normal colon and cultured using DMEM with glucose 4.5g/l and Fetal Bovine Serum 10% (FBS) plus antibiotics (penicillin 100U/ml, streptomycin 100mg/ml, amphotericin B 2.5mg/ml - P/S/A), as previously described (1).

### Cell culture - Experiments

Two human colon cancer epithelial cell lines (HT-29, CaCO-2) and the colonic subepithelial myofibroblasts cell line 18CO (ECACC), and HT-29 were cultured in 75cm<sup>2</sup> flasks (NUNC, Denmark) using McCoy's 5A, MEM, MEM Alpha media respectively (Gibco, UK), enriched with 10% FBS plus P/S/A. Experiments on SEMFs were performed at passages 3-8. Interleukin-1α (IL-1α) at 10ng/ml, Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) at 10ng/ml, Interferon-γ (IFN-γ) at 300U/ml, human recombinant TGF-β 1 (RnD Systems, UK) were used on cells deprived of FBS for 16 hours.

### ELISA

Commercially available (RnD Systems, UK) human ELISAs were used to estimate concentrations of the three TGF-β isoforms and TIMP-1 in cell culture supernatants.

### Gelatin Zymography

Enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 was assessed by gelatin zymography performed as previously described (2, 3). MMP-9 was identified as an area of gelatinolytic activity at 90kD approximately and pro- and active MMP-2 at about 70kD, indicated by a proper MW marker (Invitrogen, Germany).

### Wound Healing

A scratch with a 200µl tip was performed on confluent SEMF culture. After 30', inverted microscope photos at several fixed wound points were taken. Keeping magnification stable, new inverted microscope photos were taken after 48 and 72 hours. Average scratch width at 0, 48, 72 hours per well determined % wound closure. Results were normalized by dividing per control wound closure. (4)

Figure 2

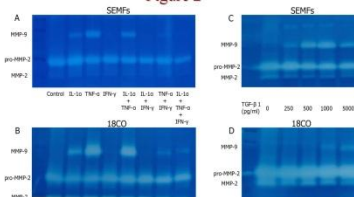


Figure 2. MMP-9 zymographic activity in SEMF (A, C) and 18CO (B, D) 24 hours supernatants is induced and amplified by IL-1α, TNF-α, IFN-γ (A, B) or TGF-β 1 (C, D). MMP-9 activity is triggered by IL-1α and TNF-α (A, B), and by TGF-β 1 in a dose dependent manner (C, D) in both cell types. MMP-2 suppresses MMP-9 induction caused by TNF-α, IFN-γ in both cell types (A, B) and 18CO (D). Figures representation of 3 experiments are shown.

## RESULTS

### Th1 cytokines induce TGF-β secretion by epithelial cells

✓ Th1 cytokines significantly increased secretion of TGF-β 1 by epithelial cell lines at 24h at both epithelial cell lines tested. In HT-29 IL-1α increased TGF-β 1 production by 148±10% (p<10<sup>-3</sup>) at 24h, TNF-α by 120±2% (p=0.05) and IFN-γ by 126±7% (p<0.02). CaCO-2 (cell line from a non-metastatic neoplasm) showed a lower basal secretion and a greater increase in TGF-β 1 secretion: 192±14% by IL-1α (p<0.005), 158±22% by TNF-α (p=0.05) and 175±44% for IFN-γ (p=0.05). The combination of all three (3C) further increased TGF-β 1 secretion to 211±4% in HT-29 (p<10<sup>-13</sup>) and 395±20% in CaCO-2 (p<10<sup>-3</sup>). (Figures 1A, 1B)

✓ In general, TGF-β 2 and 3 followed the same pattern of induction by 3C, except of TGF-β 2 in CaCO-2 (Figures 1C to 1F).

✓ Both primary SEMFs and 18CO had a very low basal TGF-β 1 and 3 production (47±12 and 41±20 pg/ml respectively for SEMFs, 75±10 and 86±33 pg/ml respectively for 18CO). TGF-β 2 secretion was below the ELISA detection limit (32.5 pg/ml). There was no impact of IL-1α, TNF-α, IFN-γ used alone or in combinations. (data not shown)

✓ IL-1α and TNF-α induce MMP-9 activity by SEMFs, while IFN-γ blocks this effect

✓ Both untreated and 3C treated SEMFs and 18CO culture supernatants at 24 hours show pro-MMP-2 and MMP-2 activity (70kD).

✓ On the contrary, untreated SEMFs and 18CO do not show any MMP-9 activity (90 kD). TNF-α and IL-1α clearly induce MMP-9 activity in both cell lines. IFN-γ *per se* does not have any effect, but when added in medium containing IL-1α, TNF-α or both it almost eliminates any MMP-9 activity. (Figures 2A, 2B)

### TGF-β 1 induces MMP-9 activity by SEMFs

✓ Exogenous TGF-β 1 induces dose dependently MMP-9 activity by both SEMFs and 18CO in a dose dependent manner (Figures 3C, 3D).

✓ Supernatant of Th1 treated epithelial cells induces MMP-9 activity on SEMFs

✓ CaCO-2 were treated with IL-1α, TNF-α, IFN-γ alone or in all possible combinations for 6 hours. Then supernatant was removed and cells were extensively washed. Fresh cytokine-free supernatant in wells was set for another 18 hours. The effect of this conditioned medium- which showed no MMP-2 or -9 activity *per se* (data not shown)- on SEMFs (Figure 3A) and 18CO (Figure 3B) was studied. MMP-9 activity appeared only when CaCO-2 had been pretreated with one or more of the 3 cytokines. However MMP-2 activity remained unchanged (Figure 3)

✓ Colonic epithelial cells, but not SEMFs, increase TIMP-1 secretion in response to IL-1α or TNF-α

✓ HT-29, CaCO-2, primary SEMFs and 18CO have a basal TIMP-1 secretion (1.908±0.337, 0.822±0.106, 1.152±0.303 and 0.427±0.106 ng/ml respectively) at 24h. A 24h treatment of SEMFs and 18CO with TNF-α or IFN-γ alone induced a statistically significant increase in HT-29 (208±23% p=0.03, 199±22% p=0.04 respectively) and CaCO-2 (182±31%

Figure 3

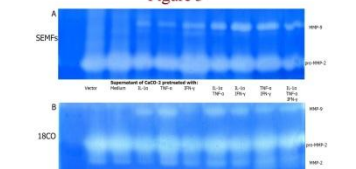


Figure 3. Supernatant of 3C-treated epithelial cells induces MMP-9 activity on SEMFs (A) and 18CO (B) even with TGF-β2 supernatant with no MMP-2 or -9 activity *per se* (data not shown). Figure representation of 3 experiments are shown.

Figure 4

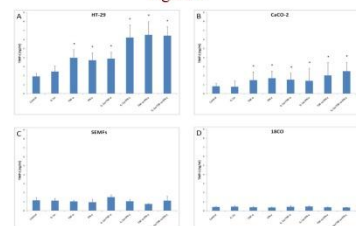


Figure 4. Colonic epithelial cell lines HT-29 (A, C) and CaCO-2 (B, D) primary SEMFs (A, C) and the corresponding cell line 18CO (B, D) all demonstrate a basal TIMP-1 secretion. Supernatants from untreated SEMFs, HT-29 and CaCO-2 supernatants produced by epithelial cells (A, B) do not significantly increase TIMP-1 secretion. However, TIMP-1 secretion is increased by TNF-α, IFN-γ in both cell types (A, B) and 18CO (D). Figures representation of 3 experiments are shown.

p=0.04, 208±44% p=0.04 respectively). TNF-α plus IFN-γ has an additive effect (341±22% p=0.001 and 247±15% p<10<sup>-4</sup>). (Figures 4A, 4B)

✓ Unexpectedly, primary SEMFs and 18CO produce lower TIMP-1 concentrations and are completely unresponsive to Th1 cytokines (Figures 4C, 4D).

✓ TNF-α and IFN-γ decrease wound healing in SEMFs, while TGF-β 1 favors it

✓ At 48 hours scratch test on SEMFs, TNF-α and IFN-γ were found to slow the wound healing process at 73±4% (p<10<sup>-7</sup>) and 72±4% (p<10<sup>-3</sup>) respectively. IL-1α had no effect (101±5%). TNF-α plus IFN-γ had an additive negative effect: 59±3%, which was statistically significant compared to TNF-α (p=0.03) and IFN-γ (p=0.02) alone. (Figure 5)

✓ TGF-β 1 was found to accelerate wound healing in a dose dependent way. Significant acceleration started at 250 pg/ml (122±6%, p<0.001). At 5 ng/ml scratch closure was maximal (154±5%, p<10<sup>-13</sup>). Further increasing TGF-β 1 rescinded that effect. (Figure 6)

✓ Supernatant of Th1 treated epithelial cells decreases wound healing by SEMFs

✓ SEMFs treatment with supernatant of untreated epithelial cells did not slow down wound healing. On the contrary, if epithelial cells had been pretreated for 6 hours with 3C wound closure is slower: 59±3% for CaCO-2 (p<10<sup>-3</sup>) (Figure 7A) and 60±7% for HT-29 (p<10<sup>-3</sup>) (Figure 7B) supernatant.

Figure 5

Figure 6

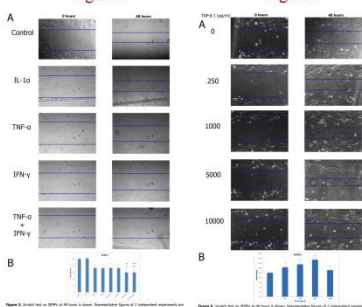
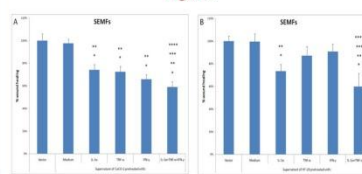


Figure 5. Scratch test on SEMFs at 48 hours. Only CaCO-2 (B) or HT-29 (D) are pretreated with 3C cytokines, these wound healing by SEMFs is shown. A: \* denotes statistical significance versus control by T-Test. \*\* denotes CaCO-2 induction with no pretreatment. \*\*\* versus HT-29 pretreated CaCO-2. In Figure 6: \* denotes statistical significance versus control by T-Test. \*\* versus HT-29 medium with no pretreatment. \*\*\* versus HT-29 pretreated CaCO-2. \*\*\*\* versus HT-29 pretreated CaCO-2. Thus, additive effect of the three Th1 cytokines to lower wound healing is noted.

Figure 7



## DISCUSSION - CONCLUSION

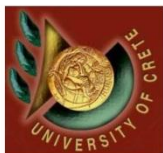
Epithelial cells respond to Th1 cytokines by producing profibrotic mediators such as TGF-β 1 and TIMP-1. Fibrinolytic MMP-9 was induced in SEMFs by IL-1α and TNF-α, but the addition of IFN-γ clearly suppressed it.

Despite the above profibrotic effects of the Th1 associated cytokines on each type cell alone, we report an existing crosstalk between these two cell types through our experiments on SEMFs with epithelial cell conditioned media. Using this approach, we discovered that Th1-pretreated epithelial cells delay healing responses and increase MMP-9 production by SEMFs.

The above results in our *in vitro* model suggest that when Th1 cytokines predominate, epithelial cells and SEMFs cooperate in a way that possibly favours the inflammatory and penetrating disease phenotype. However, further experiments may help elucidate the cytokine requirements for shaping a predominantly fibrotic response and the development of the stenotic (strictureing) phenotype.

### REFERENCES

1. Kouroumalis A, Nibbs RJ, Aptel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG. J Immunol 2005;175:5403-5411.
2. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Anal Biochem 1994;218:325-329.
3. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. J Orthod 2000;27:227-233.
4. Liang CC, Park AY, Guan JL. Nat Protoc 2007;2:329-333.



# Differential Effect of Octreotide on the Expression & Secretion of TGF-β by Primary Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs) & Colonic Epithelial Cell Lines; A Regulatory Effect of Proinflammatory Cytokines.



I. Drygiannakis, G. Kolios, L. Bourikas, P. Manousou, G. Notas, E. Kouroumalis

Department of Gastroenterology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

**INTRODUCTION:** TGF-β isoforms have anti-inflammatory and profibrotic roles. Octreotide, a somatostatin analogue, is alleged to play a regulatory role in intestinal inflammation. Colonic epithelial cells are in a constant crosstalk with Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs) that produce in turn a variety of cytokines. SEMFs' role in bowel fibrosis is well established.  
**AIMS & METHODS:** Primary SEMFs were isolated using biopsies from normal colonic mucosa from individuals underwent colonoscopy, as previously described (1). Informed consent was obtained in all cases. Cultures of colonic epithelial cell lines HT-29 and CACO-2 and SEMFs were stimulated with three pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF-α, IFN-γ) and/or octreotide. TGF-β isoforms mRNA expression and protein secretion were assessed by semi-quantitative duplex RT-PCR and ELISA, respectively. Wilcoxon test was used to assess statistical significance.  
**RESULTS:** Unstimulated HT-29 and CACO-2 transcribed and secreted basal amounts of TGF-β isoforms. Octreotide alone (10<sup>-11</sup>M) down-regulated mRNA of TGF-β isoforms in CACO-2, but not in HT-29, while octreotide, at pharmacological concentrations (10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup>M), had no significant effect on 3C-induced TGF-β mRNA in CACO-2 or HT-29. TGF-β 1 protein secretion by CACO-2 was promptly and remarkably increased by cytokine stimulation (p<0.01 at both 12 and 24 hours). Maximal induction occurred by the combination of TNF-α and IFN-γ. Interestingly, the subtherapeutic concentration of 10<sup>-11</sup>M, at which no binding to somatostatin receptors (SSTs) is observed, caused a significant induction of TGF-β 1 secretion, up to the levels of the 3C induction. While 3C also induced TGF-β 1 secretion in HT-29 as well, such an induction by octreotide 10<sup>-11</sup>M was not observed in intestinal epithelial cell line. A milder induction of TGF-β 1 secretion by 3C was observed in primary SEMF (1) cultures, also starting at 12 hours, while a subtle induction by octreotide 10<sup>-6</sup> is recorded at later time points.  
**CONCLUSION:** SEMFs and epithelial cells are major sources of profibrotic and anti-inflammatory TGF-β 1 in colonic mucosa promptly after stimulation with inflammatory cytokines. The differential regulation of this secretion by different stimuli might have a central role in intestinal inflammation and fibrosis. Somatostatin might have a role on that phenomenon via receptors different than the 5 Somatostatin Receptors (SSTs).

## INTRODUCTION RESULTS DISCUSSION

While intense intestinal inflammation is an initial phenomenon at Crohn's disease, intestinal fibrosis is a late stage complication leading to debilitating bowel strictures. Colonic epithelial cells are in a constant crosstalk with cells of inner intestinal layers and produce in turn a variety of pro-inflammatory chemokines and chemokine receptors, as well as anti-inflammatory and profibrotic mediators. Octreotide is a somatostatin analogue of longer half-life with various anti-inflammatory properties.

Transforming Growth Factor-β (TGF-β) is a major anti-inflammatory in addition to being an indisputable profibrotic factor. The three human TGF-β isoforms (1, 2 and 3) bind as homodimers to a dimer of TGF-β receptors of type II (TβR-II). Constantly active kinases of TβR-II intracellular domain phosphorylate serines and threonines of the intracellular GS domain of two TβR-I proteins, which is moved in a way that TβR-I can now use its phosphorylated GS domain and its L45 loop to interact with the basic pocket and L3 of a receptor (R)-Smad (2 and 3). The C-terminal SXS motif of the latter is phosphorylated and mutual inhibitory interaction between the amino- and the carboxyl- domain is relieved. R-Smads are then linked as monomers or dimers to the positively charged surface pocket of C-domain of one Smad4 (co-SMAD) protein and enter the cell nucleus. Smad3 binds to DNA Smad binding elements or to G/C rich regions thanks to a β-hairpin motif of its N-end domain. The most common splice variant of Smad-2 is postulated to bind to DNA via Smad-4. A large number of gene activators or repressors is co-bound to the DNA. R-Smad-Smad4 complex. Smad-7 is an inhibitory Smad that binds to Smurf 1 and 2 proteins. Smad 6 is alleged to have a similar role.

We studied the response of the TGF-β pathway to induced inflammation and octreotide in two colonic epithelial cell lines and primary human colonic subepithelial myofibroblasts.

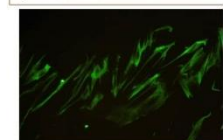


Figure 3: Myofibroblasts - Vimentin

Figure 3: Isolated human colonic subepithelial myofibroblast at passage 3 stained with immunofluorescent monoclonal antibody against human vimentin.

## MATERIALS & METHODS

**Cell cultures.** The human colon cancer epithelial cell lines HT-29 and CACO-2 cells were purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK), cultured in 75cm<sup>2</sup> flasks (NUNC, A/S, Denmark) using McCoy's and MEM media respectively, enriched with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotics (P/S/F: 100 mg/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 2.5 mg/ml Amphotericin B, all purchased from GIBCO, UK). Cells were passaged using Trypsin (0.25% EDTA 1mM (GIBCO, UK) after two brief washes with HBSS with antibiotics without Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>. CACO-2 at passages 18-23 and HT-29 at passages 17-19 were cultured on six-well plates (NUNC, A/S, Denmark). In a confluence of 70-80%, we replaced their culture medium with FBS free one for 16-24 hours and then with 1.5 ml per well of the same medium alone or with a mixture of three pro-inflammatory cytokines (Interleukin-1α: 10 ng/ml, Tumor Necrosis Factor-α: 50 ng/ml, Interferon-γ: 300 U/ml) (RnD Systems, UK) or with octreotide (Sigma-Aldrich, US) or with a mixture of 3C plus octreotide.

**Colonic Subepithelial Myofibroblast Isolation.** Endoscopic biopsy samples were collected in cold HBSS plus P/S/F: 50 ng/ml gentamycin/ 40 ng/ml vancomycin and kept in ice. Samples were washed initially for 3-5 min (X3) with HBSS and then (X3) in Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> free HBSS. They were transferred in Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> free HBSS with 1mM DTT (Sigma) and incubated in it on gentle shaking at room temperature for 10 minutes. Then DTT was gently washed off with Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> free HBSS (X3). Afterwards, biopsy samples were incubated in 1mM EDTA (Sigma) in Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> free HBSS for three 30-min periods at 37°C. In the end of each 30-min period supernatants were aborted. Denuded colonic tissue was finally incubated in RPMI plus P/S/F at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

**Duplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (dRT-PCR).** RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). RNA was then treated with DNase (Invitrogen, USA) to dispose of DNA left and then Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) according to protocols supplied by Invitrogen. dNTPs used were purchased from Roche, Germany. oligo(dT)12-18 primers from Invitrogen, USA, and Ribonuclease inhibitors (RNAsin) from Promega, USA. cDNA transcribed was then used in polymerase chain reactions with four RNA-specific primers (Invitrogen, USA) a pair for a housekeeping gene: GAPDH. In a suitable fraction of the recommended concentration and a pair for TGF-β isoforms 1, 2 and 3. dPCR reactions were optimized as to cycles and annealing temperatures. Taq DNA polymerase and dNTPs were supplied from Roche, Germany. Results were quantitatively assessed by using ImageJ version 1.34n (NIH, USA) and expressed as ratio of mean bar intensity corresponding to TGF-β divided by GAPDH intensity, after subtracting the background intensity from each.

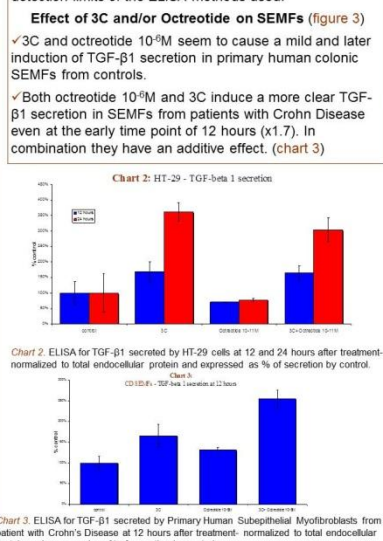
**Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** Semi hand-made human DuoSet ELISAs (RnD Systems, UK) were used to estimate the secretion of TGF-β isoforms in supernatants. Results were normalized by dividing with total endocellular protein content (obtained using Pierce DTT-CHAPS lysis buffer). This was calculated using the Bradford method (BioRad, UK). Samples were tested in duplicates or triplicates. Bars represent mean and bars standard deviation. Secreted proteins are expressed as a percentages of control samples.

**Basal Secretion**

- Both intestinal epithelial cell lines tested- CACO-2 and HT-29- and Primary Human Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs) from both control and patients with Crohn's Disease demonstrated a basal transcription of all TGF-β isoforms' mRNA and a basal protein secretion of TGF-β 1 isoform.
- Effect of 3C and/or Octreotide on CACO-2**
  - Though TGF-β 1 mRNA induction by the three pro-inflammatory cytokine mixture (3C: IL-1α, TNF-α and IFN-γ) in CACO-2 cell line was mild, it was a timely prompt effect starting after 4 hours of treatment and maximizing after 6 hours. A concomitant induction of TGF-β 1 protein secretion was doubled at the early time point of 12 hours and increased by x2.5 at 24 hours (chart 1). This may be attributed chiefly to TNF-α and IFN-γ (chart 1).
  - While octreotide 10<sup>-6</sup>M - a concentration that ascertains binding on all 5 somatostatin receptors- clearly suppresses TGF-β 1 mRNA (figure 1 - green arrow), no significant impact is observed on TGF-β 1 protein secretion.
  - Interestingly, octreotide at the subtherapeutic concentration of 10<sup>-11</sup>M slightly induces TGF-β 1 secretion: approximately x1.3 at 12 hours and x1.5 at 24 hours (chart 1). Octreotide 10<sup>-11</sup>M seems to partially block 3C action (chart 1).
  - TGF-β 2 and 3 mRNA is also clearly suppressed by octreotide 10<sup>-6</sup>M. The protein secretions of these two isoforms are below the lower detection limit of the ELISA methods used.
- Effect of 3C and/or Octreotide on HT-29**
  - 3C clearly induced TGF-β 1 secretion in HT-29 as well: x1.7 at 12 hours and x3.6 at 24 hours (chart 2). Similarly to CACO-2 TNF-α and IFN-γ seem to have a maximal effect (chart 2). Effects of 3C on mRNA are milder.
  - In contrast to CACO-2 no effect of octreotide 10<sup>-11</sup>M was observed in this colonic epithelial cell line. The above result was confirmed by the lack of impact on TGF-β 1 induction by 3C of octreotide 10<sup>-11</sup>M. (chart 2)
  - Differential response of HT-29 to octreotide is confirmed by the fact that in contrast to CACO-2 octreotide 10<sup>-6</sup>M does not suppress TGF-β 1 mRNA expression (figure 1 - yellow arrow).
  - Interestingly, TGF-β 3 mRNA transcription seems to be clearly induced by 3C (figure 2). Similarly to CACO-2, protein secretions of isoforms 2 and 3 are below the detection limits of the ELISA methods used.

**Effect of 3C and/or Octreotide on SEMFs (figure 3)**

- 3C and octreotide 10<sup>-6</sup>M seem to cause a mild and later induction of TGF-β 1 secretion in primary human colonic SEMFs from controls.
- Both octreotide 10<sup>-6</sup>M and 3C induce a more clear TGF-β 1 secretion in SEMFs from patients with Crohn Disease even at the early time point of 12 hours (x1.7). In combination they have an additive effect. (chart 3)



Both intestinal epithelial cells and their immediate neighbors- subepithelial myofibroblasts- seem to be a major source of profibrotic and anti inflammatory TGF-β.

Octreotide 10<sup>-6</sup>M almost silences the mRNA expression of all TGF-β isoforms in CACO-2 cell line. This is not true for another colonic epithelial cell line: HT-29. This concentration is at the IC50 levels of somatostatin receptors 1 and 4, while 10<sup>-2</sup>-10<sup>-4</sup>-times superior to the IC50 of SST2, SST3, SST5. Surprisingly, the effect of that concentration in TGF-β 1 protein secretion is unimportant in both cell lines.

On the other hand for both cell lines an inflammation simulation by IL-1α, TNF-α and IFN-γ promptly activates the anti-inflammatory and in long terms profibrotic TGF-β pathway. This is more prominent in TGF-β 1 protein secretion, though the mRNA induction of TGF-β 3 seems to be important in HT-29 cells.

Octreotide at the concentration 10<sup>-11</sup>M - in which no binding to known SSTs exists- seems to trigger an immediate TGF-β 1 response in CACO-2 cells but does not do so in HT-29. This might be done by receptors other than SSTs.

Pro-inflammatory stimuli also seem to provoke profibrotic TGF-β 1 secretion by subepithelial myofibroblasts.

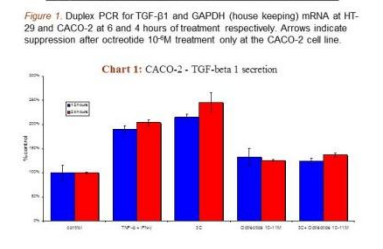
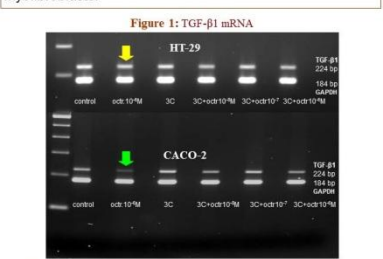


Chart 1: ELISA for TGF-β 1 secreted by CACO-2 cells at 12 and 24 hours after treatment-normalized to total endocellular protein and expressed as % of secretion by control.

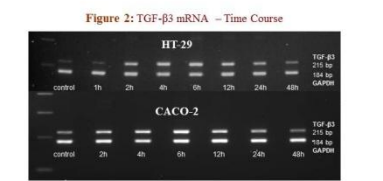


Chart 2: ELISA for TGF-β 1 secreted by Primary Human Subepithelial Myofibroblasts from a patient with Crohn's Disease at 12 hours after treatment-normalized to total endocellular protein and expressed as % of secretion by control.

## REFERENCES

- Kouroumalis A, Nibbs RJ, Apfel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG, J Immunol 2005;175:5403-5411.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H et al. Regulation and function of somatostatin receptors. J Neurochem 2004; 89: 1057-1091.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003; 113: 685-700.
- Moustakas A, Souchevskiy S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-β signal transduction. J Cell Science 2001; 114: 4359-4369.
- Planchon S, Ficchi C, Takafuji Y et al. Transforming Growth Factor-β 1 Preserves Epithelial Barrier Function: Identification of Receptors. Biochemical Intermediates, and Cytokine Antagonists. J Cell Physiology 1999; 181: 55-66.



# OCTREOTIDE SUPPRESSES THE TGF- $\beta$ PATHWAY IN CACO-2 COLONIC EPITHELIAL CELLS.

I. Drygiannakis, P. Manousou, L. Bourikas, G. Notas, G. Kolios, E. Kouroumalis  
Department of Gastroenterology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece



## INTRODUCTION

While intense intestinal inflammation is an initial phenomenon at Crohn's disease, intestinal fibrosis is a late stage complication leading to debilitating bowel strictures. Colonic epithelial cells are in a constant crosstalk with cells of inner intestinal layers and produce inherently or after stimulation a variety of pro-inflammatory chemokines and chemokine receptors, as well as anti-inflammatory and profibrotic mediators. Octreotide is a somatostatin analogue of longer half-life with various anti-inflammatory properties.

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a major anti-inflammatory in addition to being an indisputable profibrotic factor. The three human TGF- $\beta$  isoforms (1, 2 and 3) bind as homodimers to a dimer of TGF- $\beta$  receptors of type II (T $\beta$ R-II). Constantly active kinases of T $\beta$ R-II intracellular domain phosphorylate serines and threonines of the intracellular GS domain of two T $\beta$ R-I proteins, which is moved in a way that T $\beta$ R-I can now use its phosphorylated GS domain and its L45 loop to interact with the basic pocket and L3 of a receptor Smad (R-Smads: Smad 2 and Smad 3). The C-terminal SXS motif of the latter is phosphorylated and mutual inhibitory interaction between the amino- and the carboxyl- domain is relieved. R-Smads are then linked as monomers or dimers to the positively charged surface pocket of C-domain of one Smad 4 (co-SMAD) protein. Thanks to a lysine rich region of Smad-3 solvent exposed aminoterminal end and to a nucleoporin-interacting site of C-domain of Smad-2, R-Smads enter the cell nucleus. Smad 3 binds to DNA Smad binding elements or to G/C rich regions thanks to a  $\beta$ -hairpin motif of its N-end domain. The most common splice variant of Smad-2 is postulated to bind to DNA via Smad-4. A large number of gene activators or repressors is co-bound to the DNA- R-Smad- Smad 4 complex. Smad-7 is an inhibitory Smad that binds to Smurf 1 and 2 proteins and marks T $\beta$ R-I for degradation through Smurf-1 action. Smad 6 is alleged to have a similar role, partially via binding to Smad 4.

We studied the response of the TGF- $\beta$  pathway to induced inflammation and octreotide in two colonic epithelial cell lines.

## MATERIALS & METHODS

**Cell cultures.** The human colon cancer epithelial cell lines HT-29 and CACO-2 cells were purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK), cultured in 75cm<sup>2</sup> flasks (NUNC A/S, Denmark) using McCoy's 5 and MEM media respectively, enriched with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotics (100 mg/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2.5 mg/ml Amphotericin B, all purchased from GIBCO, UK). Cells were passaged using Trypsin 0.25% EDTA 1mM (GIBCO, UK) after two brief washes with HBSS with antibiotics without Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>. CACO-2 at passages 18-23 and HT-29 at passages 17-19 were passaged on six-well plates (NUNC A/S, Denmark). After reaching a confluence of 70-80%, we replaced their culture medium with FBS free one for 16-24 hours and then with 1.5 ml per well of the same medium alone or with a mixture of three pro-inflammatory cytokines (3C) mimicking inflammatory stimuli (Interleukin-1 $\alpha$ : 10 ng/ml, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : 50 ng/ml, Interferon- $\gamma$ : 300 U/ml) (RnD Systems, UK) or with octreotide 10<sup>-6</sup> M (Sigma-Aldrich, US) or with a mixture of 3C plus octreotide at concentrations 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> or 10<sup>-8</sup> M, corresponding to octreotide to cytokines epithelial cells are exposed after usual dosage.

**Duplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (dRT-PCR).** RNA was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen, USA). RNA was then treated with DNase (Invitrogen, USA) to dispose of DNA left and then Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) according to protocols recommended. cDNTPs used were purchased from Roche, Germany.

oligo(dT)12-18 primers from Invitrogen, USA, and Ribonuclease inhibitors (RNasin) from Promega, USA. cDNA transcribed was then used in polymerase chain reactions with four RNA-specific primers (Invitrogen, USA): a pair for a housekeeping gene- GAPDH- in a suitable fraction of the recommended concentration and a pair for TGF- $\beta$  isoforms or Smads 2, 3, 4, 6, 7. dPCR reactions were optimized as to cycles and annealing temperatures. Taq DNA polymerase and cDNTPs were supplied from Roche, Germany. Results were quantitatively assessed by using ImageJ version 1.34n (NIH, USA) and expressed as ratio of mean bar intensity corresponding to TGF- $\beta$  or SMAD divided by GAPDH intensity, after subtracting the background intensity from each.

**Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** Total protein concentration in supernatants was calculated using the Bradford method (Biorad, UK). Semi hand-made human Duoset ELISAs (RnD Systems, UK) were used to estimate the secretion of TGF- $\beta$  isoforms (1, 2 and 3) in supernatants- expressed as parts per million of total protein. Samples were tested in duplicates. Bars represent mean and bars standard deviation.

## RESULTS

### TGF- $\beta$ mRNA

Untreated HT-29 and CACO-2 cells demonstrated a basal TGF- $\beta$  mRNA expression (figure 1).

A noticeable TGF- $\beta$ 1 mRNA increase was observed after 4 hours of treatment with 3C in CACO-2, but not in HT-29 cells (figure 1).

At the same time points treatment with octreotide significantly suppressed the basal TGF- $\beta$ 1 transcription in CACO-2, but not in HT-29 cells (figure 1).

Interestingly, octreotide had a minimal effect on the 3C-induced TGF- $\beta$ 1 mRNA expression (figure 1).

Similar results were observed for TGF- $\beta$ 2 mRNA at 24 hours (data not shown).

In contrast, TGF- $\beta$ 3 mRNA was clearly induced by 3C in both cell lines at 6 hours, while much lower basal TGF- $\beta$ 3 mRNA production was found, especially in CACO-2 (figure 2).

Octreotide added alone had a definite suppressive effect on basal TGF- $\beta$ 3 mRNA in both cell lines, while less clear suppression by octreotide was observed in the presence of 3C. The low production of HT-29 controls in contrast to CACO-2 is noticeable (chart 1).

### SMAD mRNA

Untreated CACO-2 expressed SMAD 2 transcripts that were induced by 3C and clearly suppressed by octreotide to 33% (data not shown).

SMAD 3 (figure 3) and SMAD 4 (chart 2) transcripts were induced by 3C and suppressed by octreotide in CACO-2.

Octreotide had a dose dependent inhibition on the 3C-induced SMAD 4 production at 24 hours in CACO-2 (chart 2).

SMADs 6 and 7 mRNAs were less clearly affected by 3C but were definitely suppressed by octreotide in CACO-2 (data not shown).

Effect of octreotide on SMADs expression in HT-29 was not observed (data not shown).

### TGF- $\beta$ ELISAs

Although CACO-2 cells showed significant TGF- $\beta$  path mRNA suppression after octreotide 10<sup>-6</sup> M treatment, protein measurement of TGF- $\beta$  isoforms with ELISA in culture supernatants unexpectedly revealed that TGF- $\beta$ 1 secretion is stimulated and not suppressed by octreotide 10<sup>-6</sup> M. TGF- $\beta$ 1 secretion is higher than 3C, especially in earlier time points (chart 3).

The other two isoforms were secreted below the detection limits of the assays (31.25 pg/ml) (data not shown).

Figure 1: TGF- $\beta$

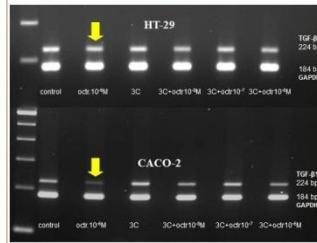


Figure 1. Duplex PCR for TGF- $\beta$ 1 and GAPDH (house keeping) mRNA at HT-29 and CACO-2 at 6 and 4 hours of treatment respectively. Arrows indicate suppression after octreotide 10<sup>-6</sup> M treatment only at the CACO-2 cell line.

Figure 2: TGF- $\beta$ 3 - Time Course

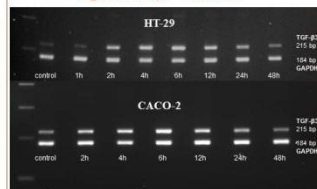


Figure 2. Duplex PCR for TGF- $\beta$ 3 and GAPDH (house keeping) mRNA at HT-29 and CACO-2 at a time course treatment with IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (50 ng/ml), and IFN- $\gamma$  (300 U/ml)- 3C- treatment. Noticeable induction at 6 hours is observed.

Figure 3: SMAD 3 - 4 hours

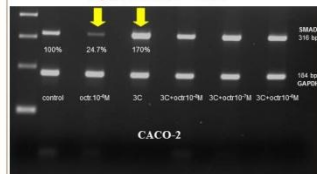


Figure 3. Duplex PCR for SMAD3 and GAPDH (house keeping) mRNA at HT-29 and CACO-2 at 4 hours of treatment. Clear suppression by octreotide 10<sup>-6</sup> M to 24.7% and induction by 70% by the mixture of 3 pro-inflammatory cytokines.

Chart 2: SMAD 4 - 24 hours

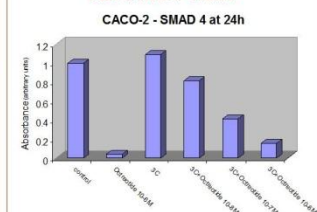


Chart 2. Denitometry analysis of duplex PCR for TGF- $\beta$ 3 and GAPDH (house keeping) mRNA at CACO-2 at 24 hours of treatment. Octreotide 10<sup>-6</sup> M alone almost abolishes SMAD 4 mRNA expression, while it has a dose dependent effect when it is combined with 3C.

Chart 3

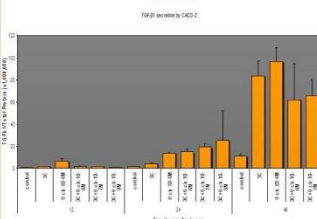


Chart 3. ELISA for TGF- $\beta$ 1 protein production by CACO-2 at 12, 24 and 48 hours of treatment. Octreotide 10<sup>-6</sup> M alone stimulates TGF- $\beta$ 1 production earlier and more than 3C do.

Chart 1: TGF- $\beta$  - 6 hours

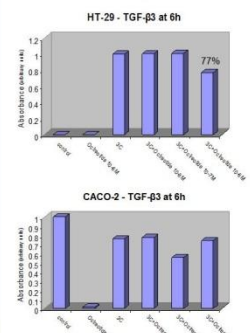


Chart 1. Denitometry analysis of duplex PCR for TGF- $\beta$ 3 and GAPDH (house keeping) mRNA at HT-19 and CACO-2 at 6 of treatment. Octreotide 10<sup>-6</sup> M almost abolishes TGF- $\beta$ 3 mRNA expression.

## DISCUSSION

Octreotide 10<sup>-6</sup> M almost silences both the extracellular and the intracellular part of the TGF- $\beta$  mRNA pathway in CACO-2 colonic epithelial cell line. This concentration is at the IC50 levels of somatostatin receptors 1 and 5 (SST1 and SST4), while 10<sup>-10</sup>-times superior to the IC50 of SST2, SST3 and SST5. Result of octreotide in this concentration on inflammation simulation with 3C on the same cell line is minimal as to TGF- $\beta$ 3 and SMAD 3 mRNAs, but noticeable in the case of SMAD 4 mRNA, where dose dependent results are observed. Thus, SMAD 4 seems to be the main link between inflammatory and anti-inflammatory, as well as profibrotic pathways in the CACO-2 cell line.

In contrast, HT-29 cells seem to respond to 3C (induction) and octreotide 10<sup>-6</sup> M (suppression) only as to TGF- $\beta$ 3 mRNA. In contrast SMAD 4, alleged to be a main link between anti-inflammatory and inflammatory pathways, seems to be insensitive to the above stimuli and cell line as to mRNA. The same applies to the other mRNAs of the pathway.

To our surprise, TGF- $\beta$ 1 protein secretion is firmly induced, especially at earlier time points, by octreotide 10<sup>-6</sup> M, while 3C stimulate TGF- $\beta$ 1 protein secretion at later time points. Octreotide seems to have a mild inhibitory effect on 3C induced TGF- $\beta$ 1 at late time points (48 hours).

**Conclusion.** Octreotide almost abolishes mRNA expression of the TGF- $\beta$  pathway in CACO-2, but not in HT-29 cells. The effect of octreotide on inflammatory stimulation produced by 3C is clear in the case of SMAD 4 mRNA. Thus, SMAD 4 might be the main link to inflammatory pathways in colonic epithelium.

## REFERENCES

- Ollas G, Violett C, Kussnerow H et al. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 2004; 89: 1057-1091.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
- Moustakas A, Souchelnyski S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- $\beta$  signal transduction. *J Cell Science* 2001; 114: 4359-4369.
- Planchon S, Flocchi C, Takafuji Y et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  Preserves Epithelial Barrier Function: Identification of Receptors, Biochemical Intermediates, and Cytokine Antagonists. *J Cell Physiology* 1999; 181: 55-66.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect



## Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis<sup>☆</sup>

Ioannis Drygiannakis<sup>a</sup>, Vassilis Valatas<sup>a,\*</sup>, Ourania Sfakianaki<sup>a</sup>,  
Leonidas Bourikas<sup>a</sup>, Pinelopi Manousou<sup>a</sup>, Konstantinos Kambas<sup>b</sup>,  
Konstantinos Ritis<sup>b</sup>, George Kolios<sup>c</sup>, Elias Kouroumalis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gastroenterology Laboratory, Medical Department, University of Crete, Greece

<sup>b</sup> First Department of Internal Medicine, Democritus University of Thrace, Dragana, Alexandroupolis, GR-68100, Greece

<sup>c</sup> Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Dragana, Alexandroupolis, GR-68100, Greece

Received 22 January 2012; received in revised form 10 April 2012; accepted 11 April 2012

### KEYWORDS

Endothelin;  
Matrix metalloproteinases;  
Collagen;  
Transforming growth factor;  
Intestinal fibrosis;  
Myofibroblast migration

### Abstract

**Background and aims:** Colonic epithelial cells and adjacent subepithelial myofibroblasts are important counterparts in the pathogenesis of intestinal inflammation and fibrosis. We investigated the possible crosstalk between them, whilst focusing on the mucosal inflammation pathways that potentially trigger intestinal fibrosis.

**Methods:** We studied the effects of proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) on human colonic epithelial cell lines and the effects of epithelial cell-conditioned media on primary human colonic subepithelial myofibroblasts isolated from normal controls or patients with inflammatory Crohn's disease along with the corresponding 18CO cell line. Readouts included production of TGF- $\beta$  and TIMP-1, total collagen synthesis, matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and myofibroblast migration/mobility.

**Abbreviations**  $\alpha$ -SMA, alpha-smooth muscle actin; CD, Crohn's disease; CTGF, connective tissue growth factor; ECC, epithelial cell-conditioned; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ECM, extracellular matrix; ET, endothelin; ETR, endothelin receptor; HGF, hepatocyte growth factor; IBD, inflammatory bowel disease; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; IL-1 $\alpha$ , interleukin-1alpha; MMP, matrix metalloproteinase; SEMF, subepithelial myofibroblast; TF, tissue factor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor-beta; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha.

<sup>☆</sup> Conference Presentation: Part of this work was presented in the 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden, 2011.

\* Corresponding author at: Department of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, PO Box 1352, Voutes, Heraklion GR-71100, Crete, Greece. Tel.: +30 2810392356; fax: +30 2810542085.

**E-mail addresses:** [idygiannakis@gmail.com](mailto:idygiannakis@gmail.com) (I. Drygiannakis), [valatas@gmail.com](mailto:valatas@gmail.com) (V. Valatas), [rsfaki@yahoo.gr](mailto:rsfaki@yahoo.gr) (O. Sfakianaki), [lbourikas@hotmail.com](mailto:lbourikas@hotmail.com) (L. Bourikas), [manousou@med.uoc.gr](mailto:manousou@med.uoc.gr) (P. Manousou), [kkampas@hotmail.com](mailto:kkampas@hotmail.com) (K. Kambas), [kritis@med.duth.gr](mailto:kritis@med.duth.gr) (K. Ritis), [gkolios@med.duth.gr](mailto:gkolios@med.duth.gr) (G. Kolios), [kouroum@med.uoc.gr](mailto:kouroum@med.uoc.gr) (E. Kouroumalis).

1873-9946/\$ - see front matter © 2012 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008

Please cite this article as: Drygiannakis I, et al, Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis, *Journal of Crohn's and Colitis* (2012), doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008

**Results:** Proinflammatory cytokines upregulated TGF- $\beta$  and TIMP-1 in colonic epithelial cells. Conditioned medium from these epithelial cell cultures induced production of MMP-9 and collagen and inhibited the migration/mobility of subepithelial myofibroblasts. MMP-9 production depended on endothelin receptor A signalling on responding myofibroblasts. Collagen up-regulation was independent of TGF- $\beta$ , CTGF, TF and endothelin. Subepithelial myofibroblasts isolated from Crohn's disease patients had similar responses to those isolated from normal controls, with the exception of higher basal collagen production.

**Conclusions:** Our study indicates that colonic epithelial cells may respond to an inflammatory milieu by inducing myofibroblast functions similar to those observed during intestinal fibrosis.

© 2012 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Intestinal subepithelial myofibroblasts (SEMFs) are  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-positive mesenchymal cells located at the interface between the intestinal epithelium and lamina propria. Connective tissue fibrils form a connective tissue barrier called the basal lamina, through which SEMFs and the epithelium can extend interacting pseudopods.<sup>1,2</sup> The epithelial–mesenchymal cell interaction may play an important role in the process of intestinal extracellular matrix (ECM) remodelling and inflammation associated fibrosis. Mucosa overlying Crohn's disease (CD) strictures overexpress profibrotic transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) transcripts and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1),<sup>3,4</sup> whilst resident mesenchymal cells overproduce collagens I and III.<sup>5–8</sup> Matrix metalloproteinases (MMPs), including the gelatinases MMP-2 and MMP-9, have also been implicated in ECM remodelling and ulceration in inflammatory bowel disease (IBD).<sup>9–12</sup>

Epithelial cells have been proposed to participate in the control of ECM remodelling in the skin and lungs. In the skin, keratinocytes are partially responsible for the induction of  $\alpha$ -SMA in fibroblasts via TGF- $\beta$  and endothelin-1 (ET-1).<sup>13</sup> Interactions between keratinocytes and the underlying fibroblasts also seem to modulate the levels of MMP-2 and MMP-9.<sup>14</sup> In the lungs, mechanically stressed epithelial cells induce the incorporation of proline into matrix proteins (mostly collagen) by unstressed normal human lung fibroblasts via pathways that involve ET and TGF- $\beta$ 2.<sup>15</sup>

Our study explored possible interactions between epithelial cells and adjacent SEMFs in the gut. We studied the effects of proinflammatory cytokines on the production of profibrotic mediators by epithelial cells, and the effects of proinflammatory cytokines and epithelial cell conditioned medium on MMP activity, collagen production and mobility/migration of colonic subepithelial myofibroblasts isolated from normal controls and CD patients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

For cell culture treatments, human interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and active recombinant transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) were purchased from R&D

Systems (Abingdon, UK). Mouse monoclonal anti-human antibody was also purchased from R&D Systems (Abingdon, UK) to neutralise all TGF- $\beta$  isoforms (anti-pan-TGF- $\beta$ ). Neutralising rabbit anti-human connective tissue growth factor (CTGF) polyclonal antibody was purchased from Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen, Germany) and neutralising anti-human monoclonal tissue factor (TF) antibody was purchased from American Diagnostica (Stamford, CT). Human anti-thrombin-III protein (Kyberin® P) was purchased from ZLB Behring (Hattersheim am Main, Germany). We used azepane-1-carbonyl-Leu-D-Trp(For)-D-Trp-OH (BQ-610) and N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl- $\beta$ -tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)-D-Nle-OH (BQ-788) as selective synthetic antagonists for endothelin receptors (ETR) A and B, respectively; these chemicals were purchased from Bachem (Weil am Rhein, Germany).<sup>16</sup> Goat anti-human polyclonal anti-CTGF IgG and goat anti-human monoclonal IgG1 isotype control antibodies used for immunocytochemistry studies were products of Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) and DAKO (Carpinteria, CA), respectively.

### 2.2. Patients

Colonic tissue was obtained by endoscopic biopsy from patients with CD and normal controls undergoing colonoscopy at the Gastroenterology Department, University Hospital of Heraklion, Greece. Colonic biopsies were obtained from 10 control patients, who underwent diagnostic colonoscopy for reasons other than IBD, (e.g. abdominal pain, screening colonoscopy) and where the examination and histology were found to be normal. Biopsies of inflamed colonic mucosa were obtained from three patients with CD ileocolitis. All patients were first diagnosed, with CD proven by colonoscopy and histological examination, they had a Crohn's disease Activity Index >150 and they did not receive any treatment prior to examination. The local Research Ethics Committee has granted approval for this study, and patients gave their informed written consent prior to participation in the study.

### 2.3. Colonic subepithelial myofibroblast isolation and culture

Studies were performed on subepithelial myofibroblasts (SEMFs; passages 3–8) isolated from colonic tissue. Tissue was obtained by endoscopic biopsy of apparently normal mucosa from patients undergoing screening colonoscopy or inflamed colonic mucosa from the three patients with CD

ileocolitis in compliance with the Helsinki declaration and according to regulations set by our Institutional Review Board. Colonic SEMFs were isolated as previously described.<sup>17</sup> Mucosal specimens were collected in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) with  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  plus penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), amphotericin B (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), gentamicin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), vancomycin (32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Gibco, Paisley, UK) and were de-epithelialised with three individual 10-min treatments with 1 mM dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) along with three separate 30-min incubations in 3 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37 °C. HBSS without  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  plus the same antibiotics was used for wash and DTT- or EDTA-containing media. Colonic tissue, denuded from epithelium, was ultimately incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose; GIBCO, Paisley, UK) plus 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK) and penicillin/streptomycin/amphotericin B (P/S/A) in 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C. During culturing, numerous non-adherent and adherent cells appeared in the culture flasks. The cells in suspension were removed every 72 h, and the denuded mucosal tissue was maintained in culture for up to 4 weeks, until numerous foci of myofibroblasts appeared, which were attached to the bottom of the culture flask. Tissue specimens were then removed, and intestinal myofibroblasts were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and P/S/A. The myofibroblast phenotype was verified using immunofluorescence microscopy by confirming the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin and vimentin and the absence of desmin expression.<sup>17</sup>

#### 2.4. Cell culture treatments

Two human colon cancer epithelial cell lines (HT-29 and CaCO-2) and the human embryonic colonic subepithelial myofibroblast cell line 18CO were purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Porton Down, UK). HT-29, CaCO-2 and 18CO cell lines were cultured in 75  $\text{cm}^2$  flasks (NUNC, Roskilde, Denmark) with McCoy's, Modified Eagle Medium (MEM), and MEM-Alpha media (Gibco, Paisley, UK), respectively. Media were enriched with 10% FBS and P/S/A. Colonic epithelial cell lines were chosen after preliminary experiments showed low yields and decreased viability in primary human intestinal cells. The 18CO cell line is derived from human neonatal colonic mucosa and exhibits many of the properties of intestinal SEMFs, such as reversible stellate morphology,  $\alpha$ -SMA expression, intracellular organelles characteristic of fibroblasts and smooth muscle cells, membrane receptors for natriuretic peptides and endothelins.<sup>38</sup> SEMFs and 18CO cells were passaged at a ratio of 1:2, whilst HT-29 and CaCO-2 at a ratio of 1:3. All experiments were performed with FBS-free media at 95% culture confluence with a stable ratio of supernatant:cell surface (1.5 ml:9.6  $\text{cm}^2$ ). Cultured cells were treated with the following proinflammatory cytokines: IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), and IFN- $\gamma$  (300 U/ml) used alone or in combination. To prepare epithelial cell-conditioned (ECC) media, confluent epithelial cells (HT-29 and CaCO-2) were treated in 6-well plates in the absence or presence of IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  or combinations of two or three of the cytokines (3C) for 6 h. The cells were then

washed, and the supernatant was replaced with cytokine-free media for another 18 h. The resulting ECC media were placed over confluent cultures of SEMFs or 18CO cells in 12-well plates for 24 h. The effects of neutralising antibodies (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-pan-TGF- $\beta$ , 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CTGF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-TF) or organic blocking substances (3 IU/ml anti-thrombin-III, 1  $\mu\text{M}$  BQ-610, 1  $\mu\text{M}$  BQ-788) were studied in ECC media. Supernatant from SEMF and 18CO cultures was collected, and cells were lysed with a commercially available lysis buffer (Promega, San Luis Obispo, CA). Supernatants and cell lysates were kept frozen at -80 °C until assayed.

#### 2.5. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Human DuoSet® ELISAs (R&D Systems, Abingdon, UK) were used to estimate the concentrations of the three TGF- $\beta$  isoforms and TIMP-1 in supernatants. Flat 96-well plates were coated overnight with the primary antibody. The plates were then blocked with the recommended reagent for 1 h. Latent TGF- $\beta$  in samples was activated with acidification (1 N HCl for 10 min). Samples were neutralised with 2.7 N NaOH/1 M HEPES for TGF- $\beta$ 1 or 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES for TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3. Duplicates of each sample were added in wells for 2 h, which was followed by incubation with the secondary antibody for another 2 h. Conjugation with horseradish peroxidase for 20 min and addition of tetramethylbenzidine with  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced differing optical densities (OD) of colour at 450 nm, which were measured after an additional 10–20 min. The results were corrected by subtraction of the OD at 540 nm. ODs of provided TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TIMP-1 standards were used to plot standard curves for the calculation of sample concentrations.

#### 2.6. Gelatin zymography

The enzymatic activities of MMP-2 and MMP-9 were assessed by gelatin zymography.<sup>18</sup> Sodium dodecyl sulphate (10%; Merck, Darmstadt, Germany) gels with 0.25% bovine gelatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were prepared. Supernatants were added to 5 $\times$  sample buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and incubated at room temperature for 10 min. Samples were loaded onto gels and run at 20 mA with a maximum voltage of 140 V for 6 h. Afterwards, gels were washed four times (15 min each) in renaturing buffer (2.5% Triton X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to restore enzyme three-dimensional structure and functionality; this was followed by a 30-min incubation in development buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.02% Brij-35; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Finally, gels were incubated in new development buffer at 37 °C for 60–80 h.

After that incubation period, gels were incubated for 3 h in staining solution (0.5% Coomassie blue R-250, 30% methanol, 10% acetic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and were then incubated with destaining solution (50% methanol, 10% acetic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 30–60 min to achieve maximum contrast between the pale areas of enzymatic activity and the blue stained areas of no enzymatic activity. MMP-9 was identified by an area of

gelatinolytic activity with an approximate molecular weight of 100 kDa, whilst pro- and active MMP-2 activity was viewed at approximately 70 kDa. Band size was indicated by the appropriate MW marker (Invitrogen, Paisley, UK or Takara, Otsu, Japan). Gelatinolytic band densities were quantified with ImageJ version 1.41 software (US National Institute of Health, Bethesda, MD).

## 2.7. Total intracellular collagen measurement

Collagen was measured by the Sircol assay.<sup>19</sup> Specifically, cell lysates were added to Sirius Red dye (Sircol; Biocolor, Carrickfergus, UK), which bound to the side chain groups of the basic amino acids that were present in collagen. After a 30-min incubation, the mixtures were centrifuged at 10,000 *g* for 10 min. The supernatant was discarded, and the collagen pellet was dissolved in 0.5 M NaOH alkali reagent for 10 min. Next, the ODs of the samples and controls of known concentration were measured at 540 nm, and the collagen concentration was calculated using a linear standard curve according to the manufacturer's instructions.

## 2.8. Wound healing scratch assay

Myofibroblast migration was assessed in vitro with the wound-healing scratch assay, as previously described.<sup>20</sup> A narrow gap devoid of cells was created on the SEMF cultures. Next, we measured the rate of gap closure. This process resembles wound healing and is dependent on myofibroblast migration.<sup>20</sup> The FBS concentration in the media was gradually reduced from 10% to 5% to minimise the contribution of proliferation. Subsequently, monolayers of confluent SEMF cultures in 6-well plates were given one mechanical wound per well by scoring with a 200  $\mu$ l pipette tip. Wound was vertical to pre-drawn lines on the bottom of the well so that we could define more than 12 stable points per well at the junctions of those lines with the wound. Images were recorded at those fixed wound points with an inverted DMIRE2 Leica microscope equipped with a DFC300 FX Leica camera (Wetzlar, Germany). SEMFs were treated with proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), TGF- $\beta$ 1 or ECC media from epithelial cells that were pretreated in the absence or presence of proinflammatory cytokines. Wells were reassessed at 48 h. The average percentage of gap closure after 48 h in treated wells was divided by the average percentage of gap closure in untreated wells to assess the treatment effect.

## 2.9. Immunocytochemistry

Immunocytochemical staining was performed according to the manufacturer's instructions with the LSAB+ System-AP kit (DAKO, Carpinteria, CA). Confluent SEMF cultures on 2-well chamber slides (NUNC, Roskilde, Denmark) were treated with or without ECC media from epithelial cells pretreated in the absence or presence of proinflammatory cytokines. After 24 h of treatment, cells were washed and fixed with ice-cold ethanol for 20 min. After rehydration, non-specific staining was blocked with a 30-min incubation in 3.3% NGS, and slides were subsequently incubated with goat anti-human CTGF antibody (1:100 dilution) at room

temperature for 4 h. Next, slides were incubated in buffer that contained biotinylated anti-goat immunoglobulin. Staining was performed with streptavidin-alkaline phosphatase and the appropriate chromogens. Haematoxylin was used to counterstain nuclei.

## 2.10. Statistics

Data were presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of at least 3 independent experiments. Comparisons between groups were performed using Student's *t* test for independent samples. Statistical significance was established at  $p=0.05$ .

## 3. Results

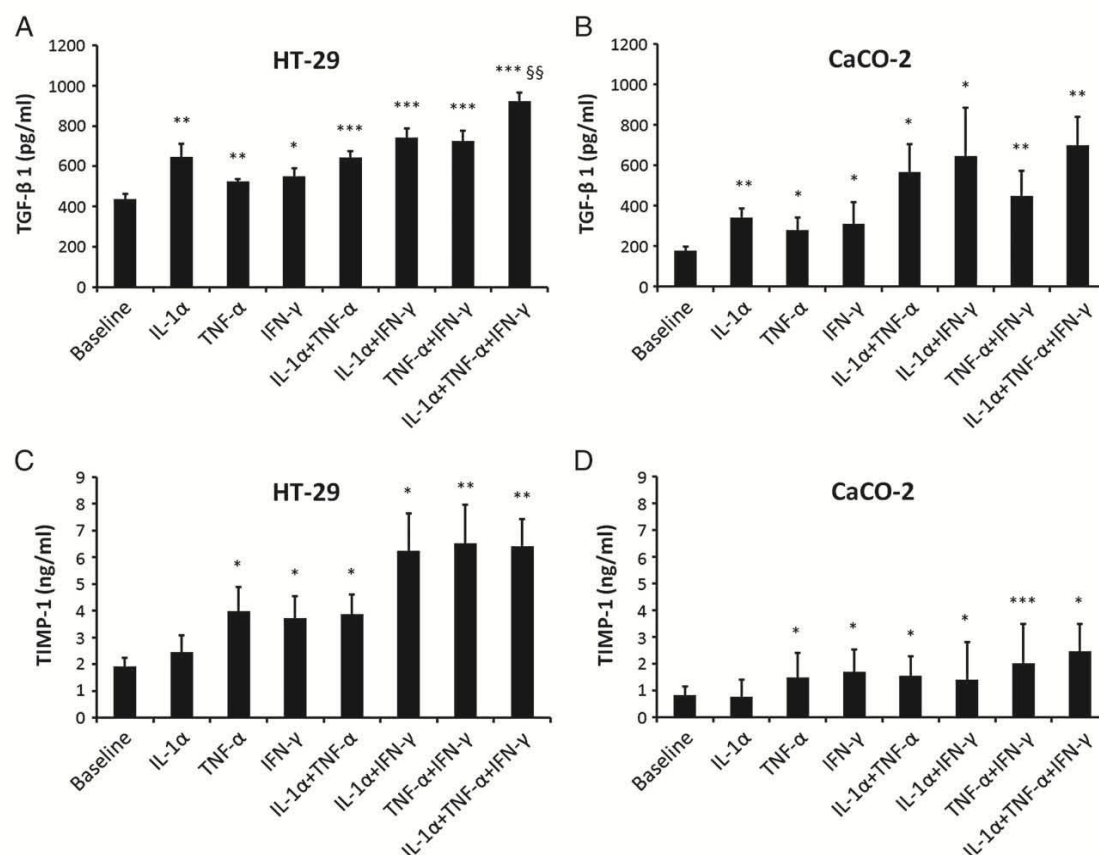
### 3.1. Colonic epithelial cells produce profibrotic mediators

We studied TGF- $\beta$ 1 production in colonic epithelial cell lines (HT-29 and CaCO-2). Both cell lines secreted substantial amounts of TGF- $\beta$ 1 into their supernatants without any stimuli with CaCO-2 having a lower steady state production (Fig. 1A and B). The addition of the proinflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  into the cell culture media significantly increased the production of TGF- $\beta$ 1. IL-1 $\alpha$  was the most potent single stimulator of TGF- $\beta$ 1 production in both cell lines ( $p<0.01$ ), whilst TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  had less pronounced effects (Fig. 1A and B).

When combinations of two cytokines were used as stimuli, we observed a significant additive increase of TGF- $\beta$  production with some combinations. However, the highest increase in TGF- $\beta$  production was observed when colonic epithelial cells were treated with a cocktail of all three cytokines ( $p<10^{-11}$  for HT-29,  $p<0.01$  for CaCO-2) (Fig. 1A and B). The other two TGF- $\beta$  isoforms (TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3) were also secreted by untreated colonic epithelial cells in considerable amounts. Their production was increased following treatment with proinflammatory cytokines in a manner similar to TGF- $\beta$ 1 (data not shown).

We also examined secretion of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in cultured colonic subepithelial myofibroblasts. Primary SEMFs and the 18CO cell line secreted very small quantities of TGF- $\beta$ 1 after 24 h in culture. Moreover, SEMF and 18CO cultures were not responsive to IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , added in isolation or in every possible combination. TGF- $\beta$ 3 was also secreted at low concentrations and was not upregulated by those cytokines. We were unable to detect any TGF- $\beta$ 2 production in primary SEMF or 18CO cultures, even after stimulation with a cocktail of all three proinflammatory cytokines (data not shown).

Furthermore, colonic epithelial cell lines secreted substantial amounts of TIMP-1 into the cell culture supernatant. Treatment with TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , but not IL-1 $\alpha$ , significantly increased TIMP-1 secretion above baseline in HT-29 ( $p<0.05$ ) and CaCO-2 cells (TNF- $\alpha$ :  $p<0.05$ ; IFN- $\gamma$ :  $p<0.05$ ) (Fig. 1C and D). Treating with two or all three cytokines together also resulted in a further increase in TIMP-1 production for HT-29 ( $p<0.01$ ) and CaCO-2 cells ( $p<0.05$ ) (Fig. 1C and D). Primary SEMFs and 18CO cells also exhibited substantial TIMP-1 secretion without any stimulation. However, TIMP-1



**Figure 1** Proinflammatory cytokines increase TGF-β 1 and TIMP-1 production by colonic epithelial cells. TGF-β1 (A, B) and TIMP-1 (C, D) production in HT-29 (A, C) and CaCO-2 (B, D) cell lines were measured in cell culture supernatants by ELISA. The effects of stimulation with IL-1α, TNF-α and IFN-γ for 24 h on colonic epithelial cells are demonstrated. The results from =3 experiments are shown. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 relative to baseline production. §§ p<0.01 relative to the production induced by combinations of two cytokines.

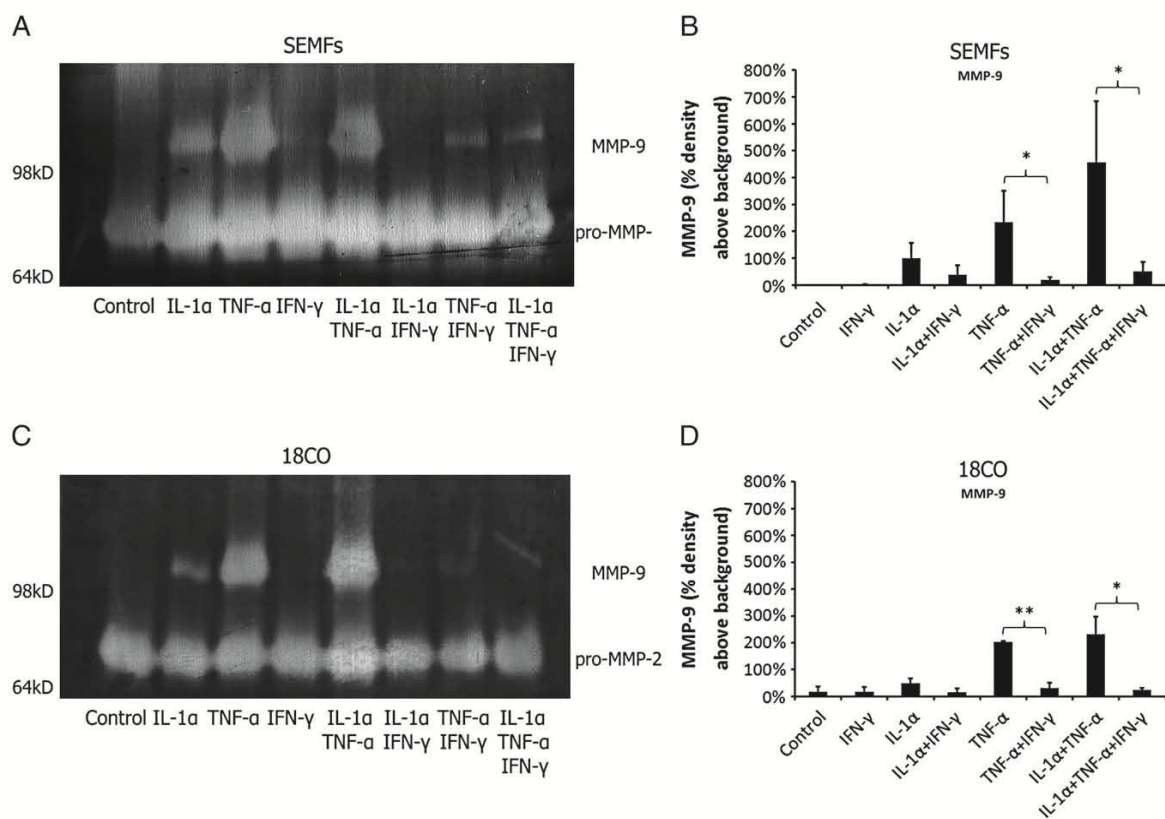
production in SEMFs and 18CO cells was unresponsive to stimulation with IL-1α, TNF-α and IFN-γ, in isolation or in combination.

### 3.2. Epithelial cell-conditioned medium regulates gelatinolytic activity of colonic subepithelial myofibroblasts via the endothelin receptor A

We examined the presence of two gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the cell culture supernatant of colonic subepithelial myofibroblasts. Gelatinases were detected with gelatin zymography as gelatinolytic bands and discriminated by their molecular weights. MMP-2 activity was detected as one or two gelatinolytic bands (the second corresponding to active MMP-2) at approximately 70 kDa. Primary SEMFs from normal controls (Fig. 2A), CD patients (Fig. 3D) and 18CO cells (Fig. 2C) secreted MMP-2 into the cell culture supernatant without any additional stimulus after 24 h in culture. No MMP-9 activity was observed in untreated SEMFs from normal controls (Fig. 2A), CD patients (Fig. 3D) and 18CO cells (Fig. 2C), as shown by the lack of a gelatinolytic band at approximately 100 kDa.

Stimulation of primary control SEMFs and 18CO cells with TNF-α or IL-1α for 24 h induced MMP-9 activity in their supernatants (Fig. 2). Combination of both TNF-α and IL-1α had an additive effect (p<0.05) (Fig. 2A, B). IFN-γ had no effect if added alone, but suppressed MMP-9 activity when added to TNF-α (p<0.05), IL-1α or both (p<0.05) (Fig. 2). Those cytokines in isolation or in every possible combination had no effect on MMP-2 activity (Fig. 2A, C). Colonic epithelial cell lines were also tested but showed no gelatinolytic activity despite stimulation with IL-1α, TNF-α, IFN-γ, in isolation or in combination (data not shown).

We subsequently explored the effect of epithelial cell-conditioned media (ECC) on SEMF cultures. ECC media from CaCO-2 cultures pretreated for 6 h with IL-1α, TNF-α, IFN-γ, alone or in combination, induced substantial amounts of MMP-9 activity in SEMFs from normal controls (Fig. 3A), CD patients (Fig. 3D) and 18CO cells (data not shown). Similar results were obtained when we used the HT-29 cell line as a source of ECC for both SEMFs from normal controls (Fig. 3C, E and F) and CD patients (Fig. 3C and F). Since the cytokines used for epithelial cell stimulation were washed out of the cultures and fresh medium was used to produce the ECC, we hypothesized that MMP-9 production by myofibroblasts was



**Figure 2** IFN- $\gamma$  inhibits MMP-9 induction by TNF- $\alpha$  or IL-1 $\alpha$  in SEMFs. Cultures of SEMFs isolated from normal controls or 18CO cells were treated with proinflammatory cytokines for 24 h. Gelatin zymography gels are representative of 3 experiments and show pro-MMP-2 ( $\approx$ 70 kDa) and MMP-9 ( $\approx$ 100 kDa) activity in SEMF (A) and 18CO (C) supernatants. MMP-9 was quantified by densitometry analysis and values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments on SEMFs (B) and 18CO cultures (D). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

triggered by a soluble mediator derived from the cytokine-treated epithelial cells.

We next examined if TGF- $\beta$  was responsible for the induction of MMP-9 activity in SEMFs treated with ECC medium. This hypothesis was based on the observation that exogenous TGF- $\beta$ 1 can induce MMP-9 activity in primary control SEMF cultures in a dose dependent manner (Fig. 3B). However, neutralisation of all TGF- $\beta$  isoforms did not significantly affect MMP-9 production by control or CD SEMF cultures treated with ECC media (Fig. 3C). Results were similar with ECC from CaCO-2 cells or if 18CO cells were used as the responding myofibroblasts (data not shown). Similarly, neutralisation of CTGF, which is a well-known growth factor affecting extracellular matrix turnover, did not have any effect on MMP-9 production by control (data not shown) or CD (Fig. 3D) SEMFs.<sup>21,22</sup>

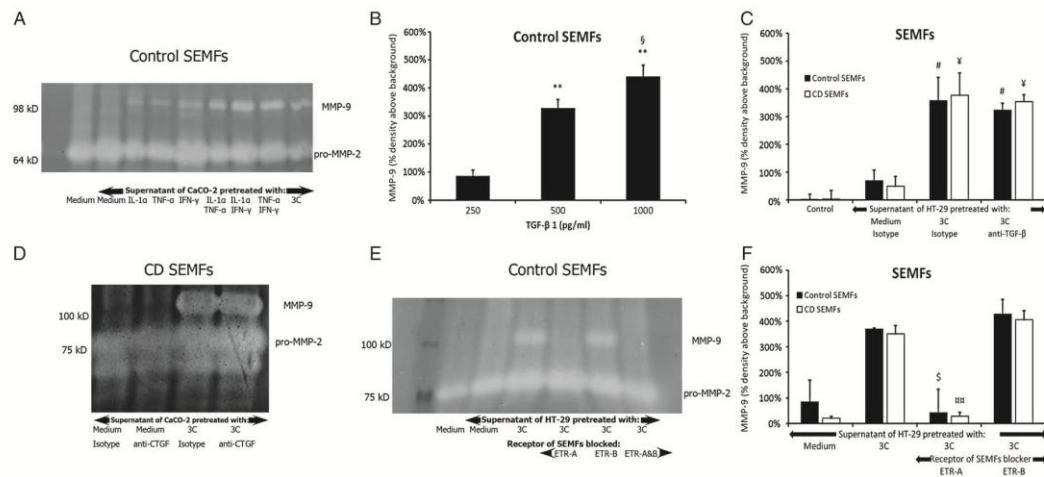
Next, we assayed whether MMP-9 upregulation was dependent on endothelin. Inhibition of endothelin receptor A (ETR-A) signalling in SEMFs isolated from control or CD patients blocked the induction of MMP-9 by ECC media (Fig. 3E and F). In contrast, specific inhibition of endothelin receptor B (ETR-B) had no effect on MMP-9 production (Fig. 3E and F). Furthermore, there was no additional effect

on MMP-9 inhibition when both ETR-A and ETR-B were blocked (Fig. 3E and data not shown).

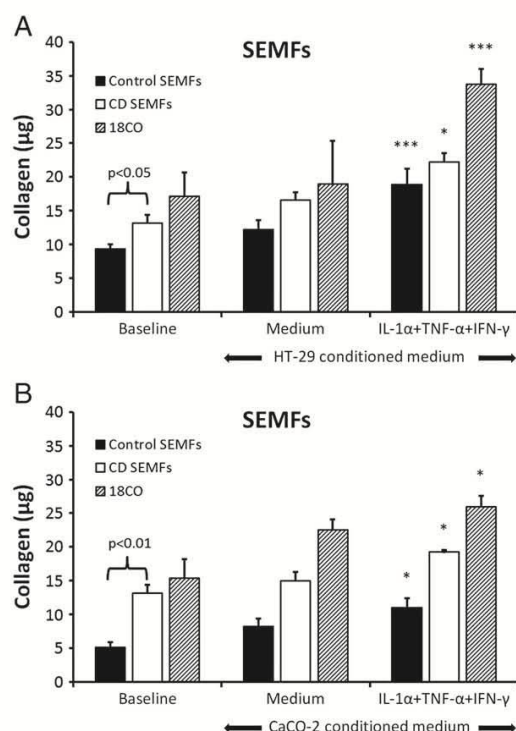
### 3.3. Epithelial cell derived soluble factors increase collagen production by SEMFs

We further explored collagen production by myofibroblasts. The Sircol assay was used to measure the majority of collagen types cumulatively. SEMFs from normal controls and 18CO cells secreted minimal amounts of total collagen in cell culture supernatants in preliminary experiments, so we studied total collagen production by measuring total intracellular collagen. SEMFs derived from patients with CD produced more collagen compared to SEMFs from normal controls ( $p < 0.05$ , Fig. 4A and B). IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  treatment alone, in pairs or all three together (3C) did not have a significant effect on collagen synthesis (Fig. 5A and B, respectively). Stimulation with TGF- $\beta$ 1 produced a minimal non-significant increase in collagen production at 24 h (Fig. 5C and D, respectively). We next studied the effect of ECC media on collagen production in SEMFs. ECC media equally increased collagen production in SEMFs derived from

Please cite this article as: Durgamkale I, et al. Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis. *Journal of Crohn's and Colitis* (2017), doi:10.1093/crocol/jcx008



**Figure 3** Conditioned medium from epithelial cells pretreated with proinflammatory cytokines induce MMP-9 in control or CD SEMFs via an endothelin receptor A dependent pathway. SEMFs isolated from normal controls or CD patients were treated for 24 h with ECC from HT-29 or CaCO-2 cultures. ECC medium was prepared by setting fresh medium devoid of cytokines over HT-29 or CaCO-2 for 18 h, after pretreating them with or not with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in various combinations or all together (3C) for 6 h, as described in the Materials and methods section. (A, D, E) Representative gelatin zymograms showing MMP-2 and MMP-9 activity in SEMF culture supernatants. (B, C, F) Quantification of MMP-9 by densitometry analysis of gelatin zymograms. Values are mean $\pm$ SEM of three independent experiments. (A) Effects of proinflammatory cytokines on MMP production; \*\*  $p < 0.01$  relative to baseline values, §  $p < 0.05$  from 500 pg/ml TGF- $\beta$ 1 (C) Effects of ECC medium and TGF- $\beta$  blockage on MMP-9 production; # and ¥  $p < 0.05$  from ECC of untreated HT-29. (D) Effects of ECC medium and CTGF blockage on MMP production. (E) Effects of ECC medium and ETR blockage on MMP-9 production; §  $p < 0.05$  or ¶  $p < 0.01$  relative to values of ECC media pretreated with 3 C.



**Figure 4** Baseline collagen production is higher in SEMFs isolated from CD patients compared to normal controls and is upregulated by conditioned medium from colonic epithelial cells exposed to proinflammatory cytokines. Total intracellular collagen content in primary control (black bars) or CD (white bars) SEMFs and the 18CO cell line (bars with diagonal pattern) that were untreated or treated for 24 h with ECC media. ECC media were prepared as described in the [Materials and methods](#) section. Results are the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  relative to baseline values of the same cells.

either normal controls or CD patients. The observed effect was moderate with ECC medium from untreated HT-29 or CaCO-2 ([Fig. 4A](#) and [B](#)). In contrast, ECC media from epithelial cells pretreated with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , induced a pronounced increase of collagen production by the SEMF cultures from normal controls, CD patients and the 18CO cell line ([Fig. 4A](#) and [B](#)).

We attempted to identify the epithelial cell-derived factors responsible for the increase in collagen synthesis by SEMFs and epithelial cell-derived TGF- $\beta$ 1 was a probable candidate. However, neutralisation of all three forms of TGF- $\beta$  in the ECC media did not affect the induction of collagen production in control or CD SEMFs ([Fig. 6A](#)). Previous studies have shown that SEMFs can upregulate collagen production via pathways that involve ET-1, thrombin and autocrine production of CTGF and TF.<sup>23,24</sup> ECC medium induced CTGF production by primary SEMF isolated from normal controls, especially if colonic epithelial cells were treated with proinflammatory cytokines ([Fig. 7](#)). However, neutralisation of CTGF ([Fig. 6B](#)), anti-thrombin-III-mediated inhibition of thrombin ([Fig. 6D](#)) or neutralisation of TF ([Fig. 6E](#)) did not

block collagen induction by ECC medium. Endothelin receptor antagonism had also no effect on the upregulation of collagen production in control or CD SEMFs ([Fig. 6F](#) and [G](#)).

### 3.4. Epithelial cell-conditioned medium inhibits SEMF's mobility/migration

SEMF mobility/migration was assessed in vitro with the wound-healing scratch assay and quantified as the percentage of wound repair. Addition of exogenous TGF- $\beta$ 1 in primary SEMF cultures was found to promote SEMF mobility/migration in a dose-dependent manner ([Fig. 8A](#) and [B](#)). In contrast, TNF- $\alpha$  ( $p < 10^{-7}$ ) and IFN- $\gamma$  ( $p < 10^{-6}$ ) inhibited SEMF mobility/migration ([Fig. 8C](#) and [D](#)). In combination, these cytokines exerted an additive inhibitory effect ( $p < 10^{-15}$ ). IL-1 $\alpha$  did not alter mobility/migration either when added alone ([Fig. 8C](#) and [D](#)) or when used in combination with TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  (data not shown).

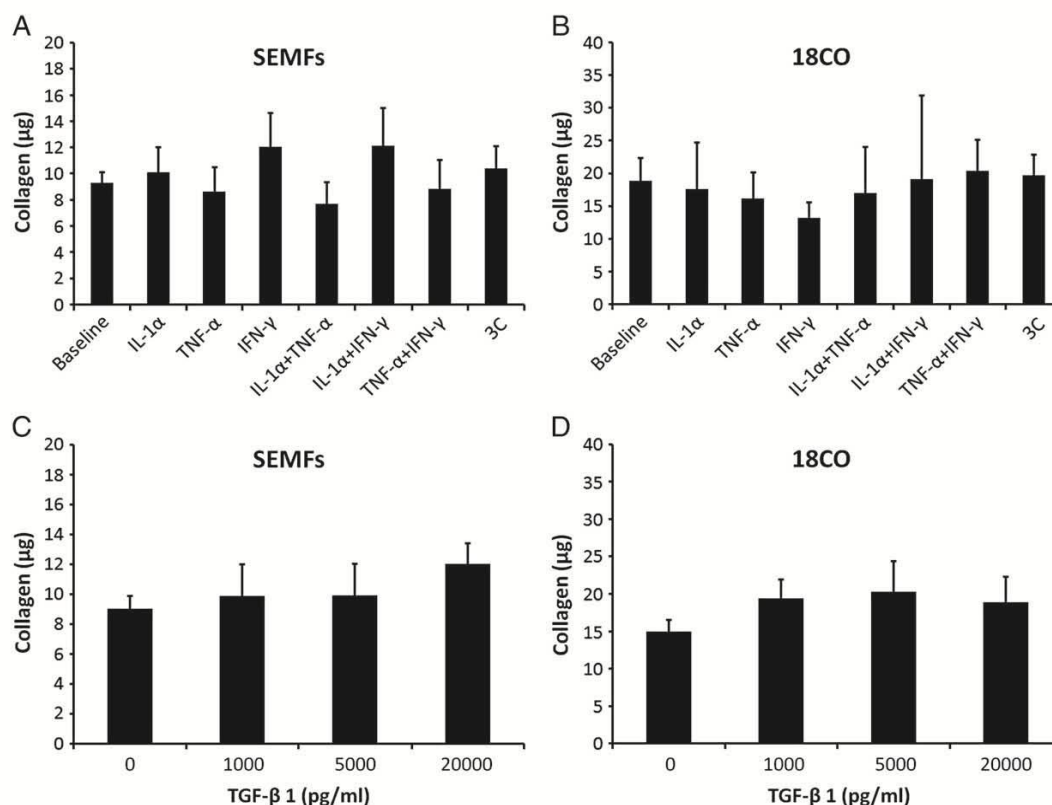
To study the potential impact of epithelial cells on this process, we used ECC media to treat primary SEMFs. ECC medium from untreated CaCO-2 cells had no effect on wound closure ([Fig. 9](#)). Subsequently, we treated epithelial cell cultures with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  for 6 h and then changed to fresh medium for 18 h. This ECC medium devoid of the initial inflammatory stimuli significantly inhibited wound closure ([Fig. 9](#)). Stimulating the epithelial cell cultures with all three cytokines (3C) resulted in stronger inhibition of wound closure ( $p < 10^{-5}$ ) ([Fig. 9](#)). Similar results were obtained with HT-29 ECC medium ([Fig. 10](#)). Taken together these results indicate that proinflammatory stimuli inhibit the migratory potential of SEMFs both directly and indirectly through epithelial cell-derived soluble factors.

## 4. Discussion

Intestinal fibrosis has been associated with local increase in TGF- $\beta$ 1 and TIMP-1.<sup>4,25</sup> TGF $\beta$ 1 has been suggested to originate from inflammatory cells infiltrating the lamina propria, although previous immunohistochemical studies have detected additional TGF- $\beta$  immunoreactivity at the inflamed intestinal epithelium.<sup>3</sup> TIMP-1 production has been attributed mostly to cells of mesenchymal origin, which is in accordance to our findings of a moderate constitutive TIMP-1 production by isolated SEMFs.<sup>26</sup> However, we detected substantial production of TGF- $\beta$ 1-3 and TIMP-1 from the two colonic epithelial cell lines. Furthermore, treatment with INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  had no effect on TIMP-1 production by SEMFs but significantly increased production of both TGF- $\beta$  and TIMP-1 by the epithelial cells. Our findings suggest that colonic epithelial cells might be an important additional source of TGF- $\beta$  and TIMP-1 during chronic intestinal inflammation. Although we haven't confirmed a major role for epithelial cell derived TGF- $\beta$  in the regulation of collagen and MMP-9 production by the SEMF cultures our results might have been affected by the limited treatment times used and the lack of direct cell to cell contact.<sup>27</sup>

Increased MMP-9 production has been detected in the intestinal mucosa of IBD patients and has been found responsible for the bulk of the gelatinolytic activity observed in IBD tissue samples.<sup>10</sup> Consistently with previous





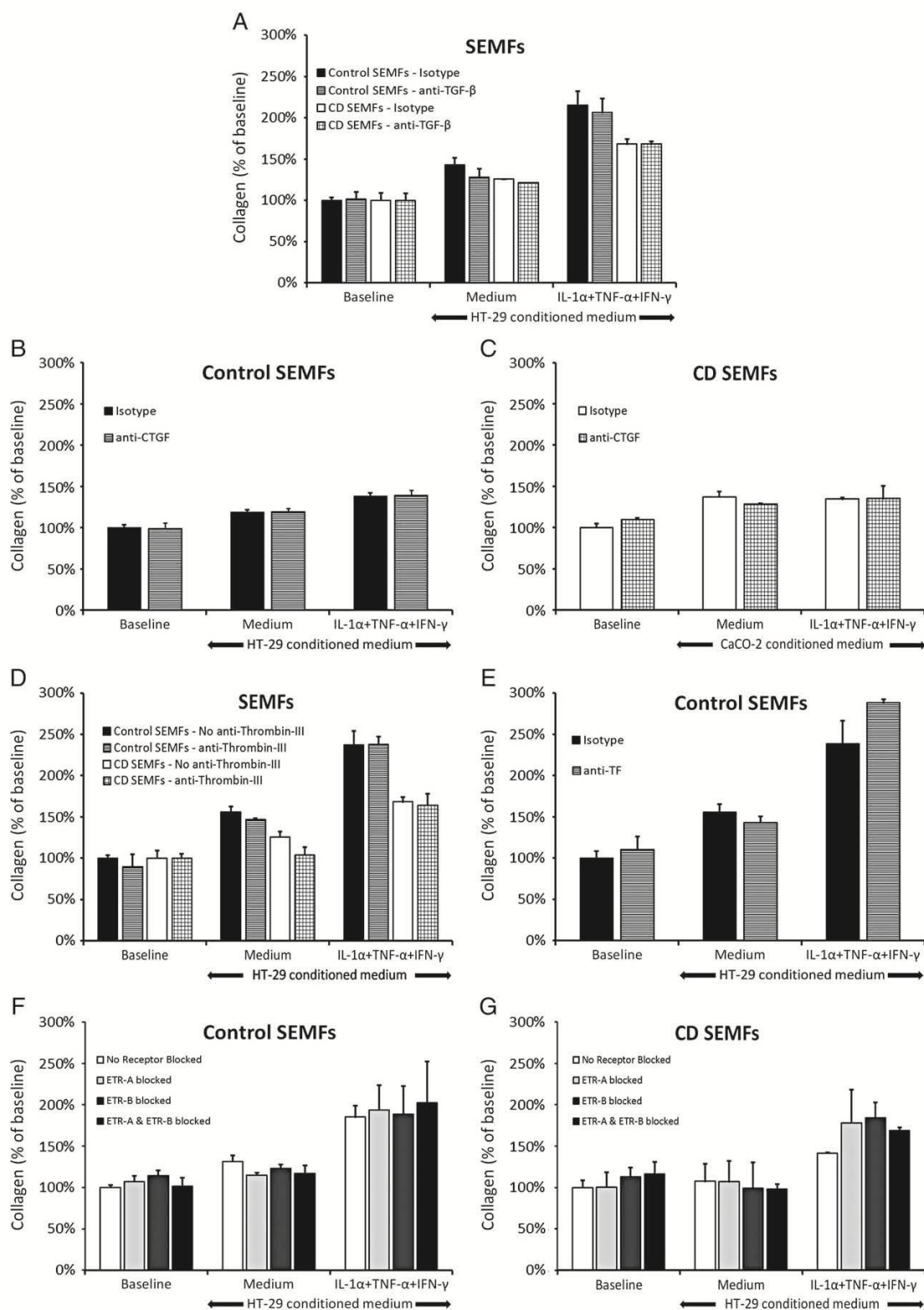
**Figure 5** Collagen production by colonic subepithelial myofibroblasts (SEMFs) is not directly affected by proinflammatory cytokines or TGF- $\beta$ 1. Total intracellular collagen content from primary SEMFs (A) and the 18CO cell line (B) in cultures that were untreated or treated for 24 h with IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  in various combinations or all three (3C). Total intracellular collagen content from primary SEMFs (C) and the 18CO cell line (D) following stimulation with TGF- $\beta$ 1. Values are the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

studies, we found that SEMFs from either normal controls or CD patients, as well as the 18CO myofibroblasts constitutively produced MMP-2 but not MMP-9.<sup>26,28</sup> However, treatment with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 induced MMP-9 production, which was inhibited by IFN- $\gamma$ . This effect could potentially drive the balance between pro-fibrotic and ECM catabolic factors towards collagen deposition and might represent a link between Th1 inflammation, such as CD, and intestinal fibrosis. With the exception of a single study with a small number of patients, showing relatively less MMP-9 levels in CD compared to UC tissue samples but still higher than controls, there is no published data suggesting that less MMP-9 contributes to the pathogenesis of CD-associated fibrosis.<sup>10</sup> The possible operation and in vivo relevance of this pathway needs to be addressed by further studies.

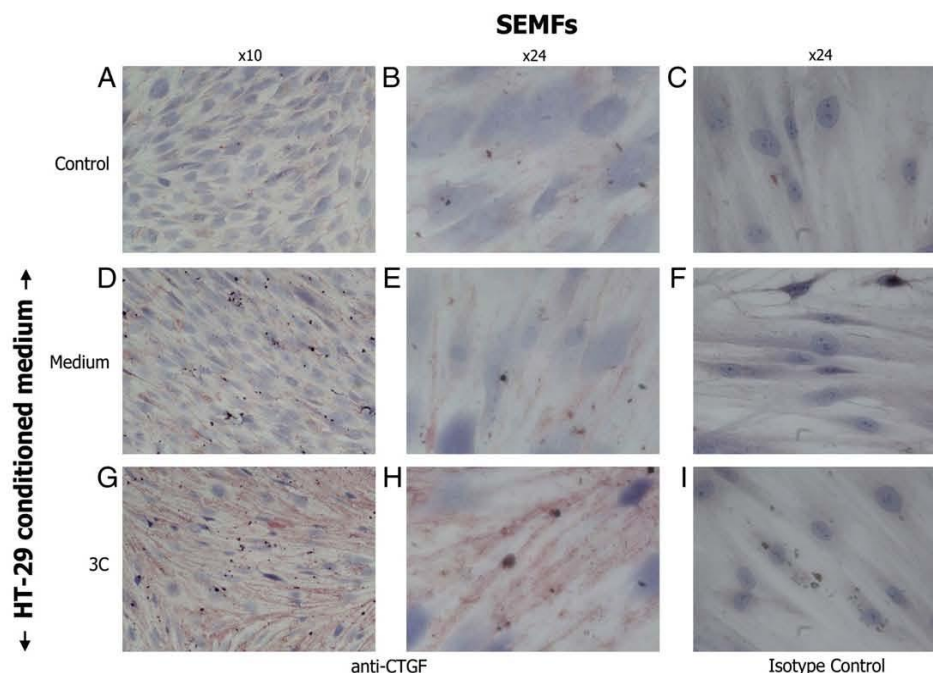
On the other hand, MMP-9 overproduction has been clearly associated with epithelial injury and mucosal ulceration.<sup>12</sup> In our study, ECC media from colonic epithelial cells conditioned with proinflammatory cytokines induced production of MMP-9 by SEMFs from normal controls, CD patients and the 18CO myofibroblasts. This effect was independent of TGF- $\beta$  and CTGF and was mediated through endothelin receptor A signalling in SEMFs. ETR-A is selective for ET-1, which has been previously shown to regulate production of matrix degrading enzymes from colonic

fibroblasts.<sup>29,30</sup> Endothelins are potentially upregulated in either epithelial cells or myofibroblast cells and therefore can exert paracrine or autocrine effects, respectively, on myofibroblasts.<sup>16,31</sup> Irrespective of the cellular source of endothelin-1 the existence of such a circuit operating in the gut, could represent a mechanism whereby epithelial cells facilitate the access of inflammatory cells to the intestinal epithelium via myofibroblast-mediated proteolysis of the subepithelial reticular sheet resulting in disruption of normal mucosal architecture.

The critical event that causes intestinal fibrosis is collagen accumulation. Increased collagen production has been previously reported for fibroblasts isolated from intestinal strictures of CD patients.<sup>4,5,32</sup> Similarly, we report significantly higher collagen production from SEMFs isolated from inflamed areas of the colon of CD patients compared to SEMFs from normal controls. This implies that subepithelial myofibroblasts may contribute to collagen accumulation during CD-associated inflammation. In contrast to studies on intestinal fibroblasts, we found that collagen production by SEMFs and 18CO myofibroblasts was not increased by exogenous TGF- $\beta$ .<sup>4,5,32</sup> Previous studies on SEMFs have produced conflicting results concerning the regulation of collagen production by TGF- $\beta$ .<sup>33-35</sup> This indicates that additional stimuli may be needed to induce a substantial



Please cite this article as: Drygiannakis I, et al, Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis, *Journal of Crohn's and Colitis* (2012), doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008



**Fig. 7** The effect of colonic epithelial cell conditioned media on CTGF production by primary SEMF cultures. Immunocytochemistry with goat anti-human polyclonal anti-CTGF IgG (A, B, D, E, G, and H) on confluent primary SEMF cultures. Goat IgG1 isotype control antibody is used as a control (C, F, I). SEMF cultures were treated for 24 h with ECC media obtained from HT-29 cells and prepared as described in the Materials and methods section. Left column with 10 $\times$  magnification (A, D, G); middle and right columns with 24 $\times$  magnification (B–C, H–I). Representative results from 3 independent experiments are shown.

increase of collagen production by SEMFs. Medium obtained from ECC cultures was able to increase collagen production by SEMFs from CD patients or normal controls and the  $^{18}\text{C}$ O myofibroblasts. Collagen production was further upregulated when the epithelial cells were exposed to proinflammatory cytokines. This finding was in accordance with results from previous experiments on the skin, where coculturing keratinocytes with fibroblasts induced  $\alpha$ -SMA expression and collagen production in fibroblasts. However, cell-to-cell contact and TGF- $\beta$ 1 signalling were required, whereas IL-1 $\alpha$  blocked the interaction.<sup>27</sup>

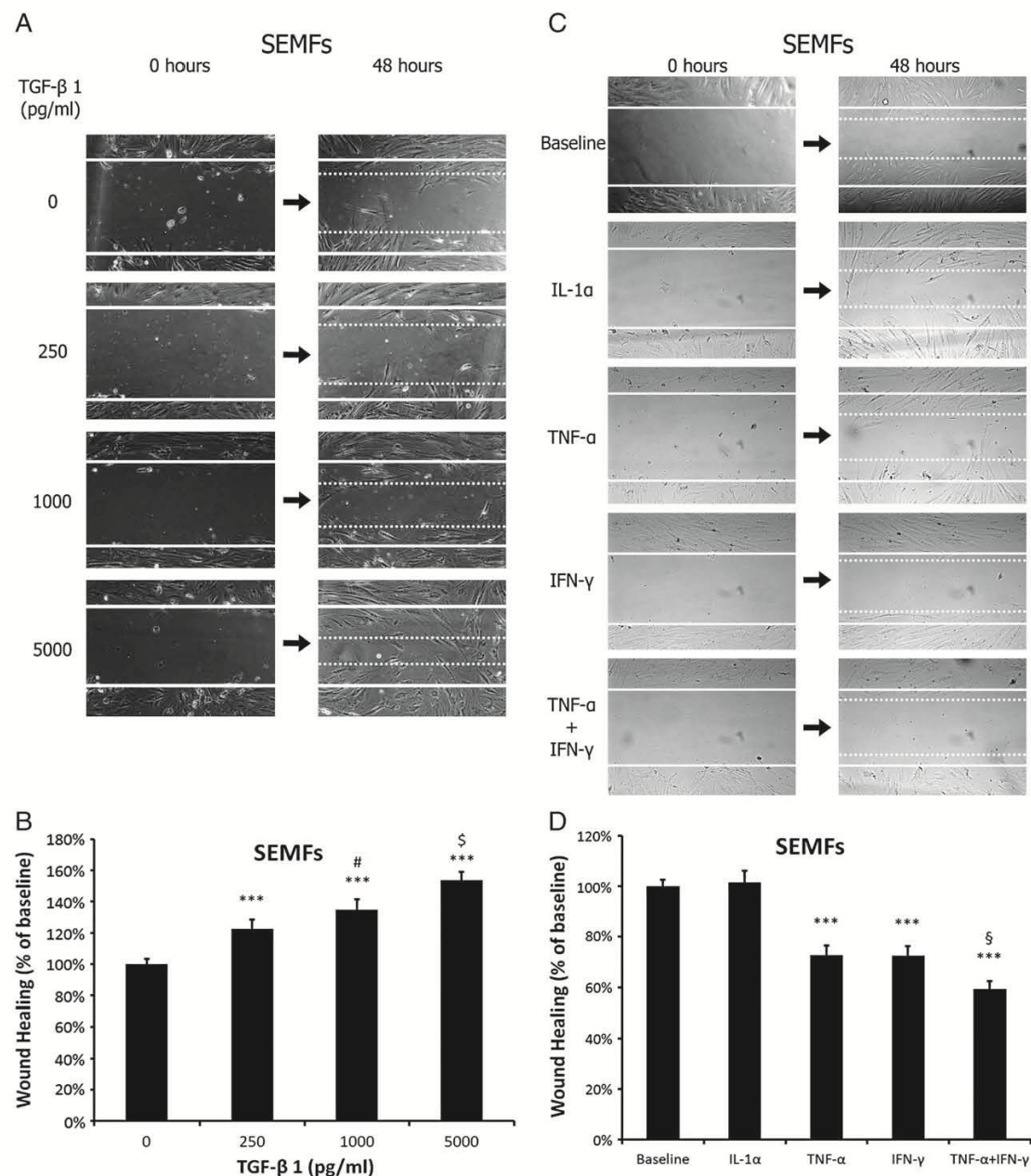
We report that, collagen up-regulation by ECC medium was independent of TGF- $\beta$  and endothelin. Despite upregulation of CTGF in cultured SEMFs by ECC-media, no effects on collagen production were observed with CTGF neutralisation. Neutralisation of TF and thrombin, recently shown to be involved in pulmonary fibrosis via up-regulation of collagen production by SEMFs, failed to inhibit ECC-induced collagen production.<sup>23,24</sup> This indicates that different pathways might be involved in the crosstalk between

intestinal epithelial cells and SEMFs that could be unique to the intestinal microenvironment.

Finally, we studied the effects of various mediators on SEMF migration. Exogenous TGF- $\beta$ 1 promoted SEMF migration and enhanced wound healing, whereas TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  had the opposite effect. These findings are in accordance with previous publications that demonstrated a migratory defect in inflammation-exposed SEMFs isolated from Crohn's disease tissue and an inhibitory effect of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on SEMF migration.<sup>4,36,37</sup> Conditioned medium from epithelial cells exposed to proinflammatory cytokines inhibited SEMF migration, despite the fact that elevated TGF- $\beta$ 1 in ECC media should increase SEMF migration rate. Therefore, we propose that additional soluble factors may be responsible for the observed outcome. We agree with the suggestion by Di Sabatino et al. that the inhibition of migration potentially contributes to the retention of myofibroblasts at inflammatory foci in vivo. This reduced dispersing potential accompanied by increased collagen production, might provide a pathophysiological mechanism for enhanced intestinal fibrosis.

**Figure 6** SEMF collagen production is upregulated by unknown soluble factors derived from epithelial cells. Total intracellular collagen content from primary control (A, B, D–F) or CD (A, C, D, G) SEMF cultures that were untreated or treated for 24 h with ECC media. ECC media were prepared as described in the Materials and methods section. Effects of blocking antibodies for all TGF- $\beta$  isoforms (A), CTGF (B, C) thrombin-III (D) TF (E) and chemical inhibition of endothelin receptor (ETR-) A/B with BQ-610/BQ-788 (F, G) are shown. Results are the mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments.

Please cite this article as: Drygiannakis I, et al, Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis, *Journal of Crohn's and Colitis* (2012), doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008



**Figure 8** Wound healing by colonic subepithelial myofibroblasts (SEMFs): the effect of TGF-β1 and proinflammatory cytokines. (A, C) Representative figures of confluent primary SEMF cultures at 0 h (left column) and 48 h (left column) following a scratch with a 200-μl pipette tip. Stimuli applied are shown on the left. Front of cells at 0 h (white lines) was compared to front at 48 h (dotted lines) to determine percentage of closure. (B) The mean±SEM of values from three independent experiments shown in (A); \*\*\* p<0.001 relative to baseline values. # p<0.05 relative to values obtained by stimulation with 250 pg/ml TGF-β 1. \$ p<0.05 relative to values obtained by stimulation with 500 pg/ml TGF-β 1. (D) The mean±SEM of values from 3 independent experiments shown in (C) \*\*\* p<0.001 relative to baseline values. \$ p<0.05 relative to values obtained by stimulation with individual cytokines.

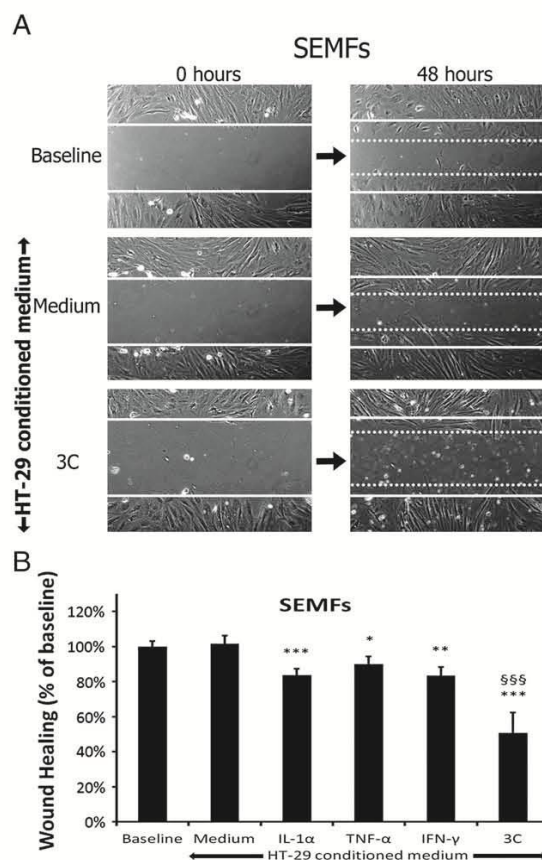
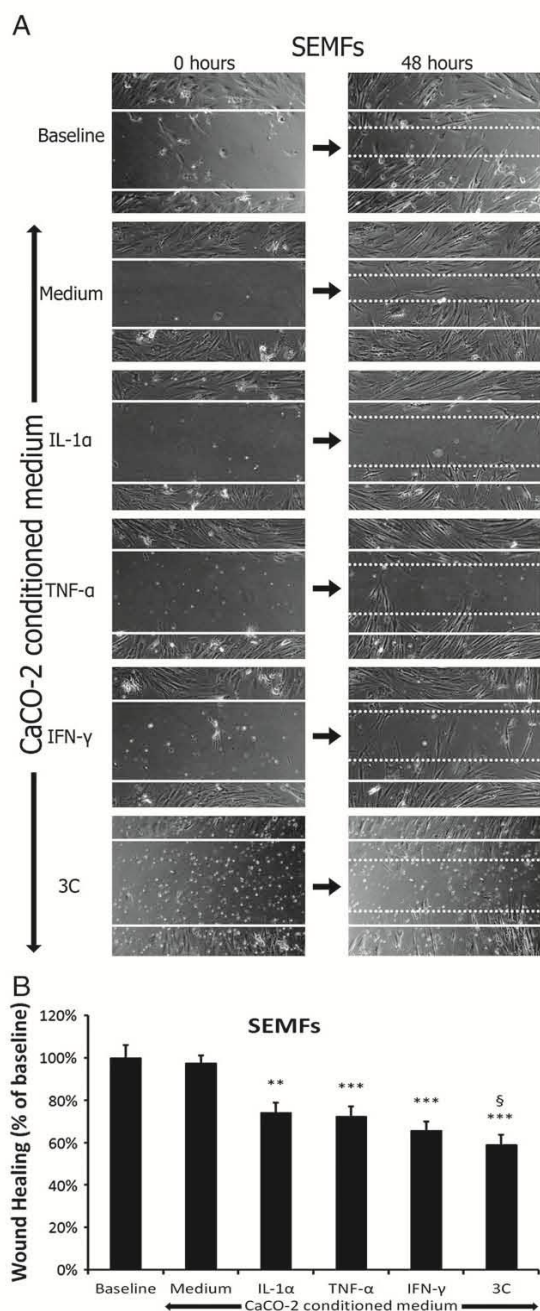
In conclusion, this study provides evidence of a potential crosstalk between intestinal epithelial cells and SEMFs. In vitro stimulation of epithelial cells with proinflammatory cytokines, which partially mimics epithelial cell injury during

intestinal inflammation, provoked changes in SEMFs from CD patients and normal controls similar to those observed during intestinal fibrosis. Our results support the necessity for further investigation and in vivo validation of the possible

cooperation between epithelial cells and adjacent myofibroblasts in the regulation of extracellular matrix remodeling and inflammation-induced intestinal fibrosis.

### Authors contributions

GK, ID, VV, EK, and LB conceived of and designed the study. ID, OS, KK, and PM performed the experiments. VV, ID, and GK with help from OS, KK, PM, analysed and interpreted



**Figure 10** The effect of HT-29 epithelial cell conditioned media on SEMF wound-healing assay. (A) Representative photographs of confluent primary SEMF cultures at 0 h (left column) and 48 h (right column) following a scratch with a 200- $\mu$ l pipette tip. ECC obtained from HT-29 cultures was used as a stimulus. ECC media were prepared as described in the [Materials and methods](#) section. Front of cells at 0 h (white lines) was compared to front at 48 h (dotted lines) to determine percentage of wound closure. (B) The mean  $\pm$  SEM values from three independent experiments shown in (A); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  relative to baseline values. \$\$\$  $p < 0.001$  relative to values obtained by pretreatment of HT-29 cells with individual cytokines.

**Figure 9** The effect of colonic epithelial cell conditioned media on SEMF wound-healing. (A) Representative photographs of confluent primary SEMF cultures at 0 h (left column) and 48 h (right column) following a scratch with a 200- $\mu$ l pipette tip. ECC obtained from CaCO-2 cultures was used as a stimulus. ECC media were prepared as described in the [Materials and methods](#) section. Front of cells at 0 h (white lines) was compared to front at 48 h (dotted lines) to determine percentage of closure. (B) The mean  $\pm$  SEM values from three independent experiments shown in (A); \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  relative to baseline values. \$  $p < 0.05$  relative to values obtained by pretreatment of CaCO-2 with individual cytokines.

Please cite this article as: Drygiannakis I, et al, Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis, *Journal of Crohn's and Colitis* (2012), doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008

data, wrote and revised the paper. EK supervised and coordinated research. KR contributed important reagents and provided important feedback on results. All authors read and approved the final manuscript.

### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

We acknowledge Prof. I. Mouzas, Prof. K. A. Papadakis and Dr G. Notas for their intellectual contributions.

### References

- Komuro T, Hashimoto Y. Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch Histol Cytol* 1990;**53**:1–21.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999;**277**:C183–201.
- di Mola FF, Friess H, Scheuren A, Di Sebastiano P, Graber H, Egger B, et al. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease. *Ann Surg* 1999;**229**:67–75.
- Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, et al. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut* 2009;**58**:777–89.
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;**102**:1920–9.
- Lang M, Schlechtweg M, Kellermeier S, Brenmoehl J, Falk W, Scholmerich J, et al. Gene expression profiles of mucosal fibroblasts from strictured and nonstrictured areas of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:212–23.
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001;**7**:16–26.
- Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, et al. IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;**279**:G1307–22.
- Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994;**47**:113–6.
- Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;**117**:814–22.
- Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, et al. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. *Gut* 2002;**51**:540–7.
- Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Diaz-Gonzalez F, Farre E, Salas A, et al. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol* 2006;**12**:6464–72.
- Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost* 2004;**92**:262–74.
- Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2005;**269**:209–16.
- Tschumperlin DJ, Shively JD, Kikuchi T, Drazen JM. Mechanical stress triggers selective release of fibrotic mediators from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;**28**:142–9.
- Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 2000;**47**:685–8.
- Kouroumalis A, Nibbs RJ, Aptel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG. The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. *J Immunol* 2005;**175**:5403–11.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;**218**:325–9.
- Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTieman CF, Draviam R, Watkins SC, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;**97**:12746–51.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;**2**:329–33.
- Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H. Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem* 2000;**275**:6580–5.
- Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 2000;**275**:14632–41.
- Kambas K, Chrysanthopoulou A, Kourtzelis I, Skordala M, Mitroulis I, Rafail S, et al. Endothelin-1 signaling promotes fibrosis in vitro in a bronchopulmonary dysplasia model by activating the extrinsic coagulation cascade. *J Immunol* 2011;**186**:6568–75.
- Mitroulis I, Kambas K, Anyfanti P, Doumas M, Ritis K. The multivalent activity of the tissue factor-thrombin pathway in thrombotic and non-thrombotic disorders as a target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets* 2011;**15**:75–89.
- Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, et al. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;**289**:G116–28.
- McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003;**162**:1355–60.
- Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol* 2004;**164**:2055–66.
- Baugh MD, Hollander AP, Evans GS. The regulation of matrix metalloproteinase production in human colonic fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1998;**859**:175–9.
- Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002;**54**:219–26.
- Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, Bhalla A, Dashwood MR, Yang S, et al. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts. *Int J Cancer* 2012;**130**:1264–72.

Please cite this article as: Drygiannakis I, et al, Proinflammatory cytokines induce crosstalk between colonic epithelial cells and subepithelial myofibroblasts: Implication in intestinal fibrosis, *Journal of Crohn's and Colitis* (2012), doi:10.1016/j.crohns.2012.04.008

31. Ignatenko NA, Zhang H, Watts GS, Skovan BA, Stringer DE, Gerner EW. The chemopreventive agent alpha-difluoromethylornithine blocks Ki-ras-dependent tumor formation and specific gene expression in CaCO-2 cells. *Mol Carcinog* 2004;**39**:221–33.
32. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;**7**:226–36.
33. Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**283**:G809–18.
34. Koon HW, Shih D, Karagiannides I, Zhao D, Fazelbhoj Z, Hing T, et al. Substance P modulates colitis-associated fibrosis. *Am J Pathol* 2010;**177**:2300–9.
35. Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol* 2002;**37**:317–24.
36. Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 2002;**20**:81–91.
37. Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, et al. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 2003;**125**:1341–54.
38. Valentich JD, Popov V, Saada JI, Powell DW. Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 1997;**272**:C1513–24.