





## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

# ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ

## ΕΚΛΥΤΙΚΗ OPMONH ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH)

## ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

# **Σ**THN ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

\*\*\*\*\*

ΟΛΓΑ ΡΑΣΟΥΛΗ

**НРАКЛЕІО 2011** 

## Επταμελής συμβουλευτική επιτροπή

Αχιλλέας Γραβάνης (Καθηγητής-Επιβλέπων) Ανδρέας Μαργιωρής (Καθηγητής -Συνεπιβλέπων) Αικατερίνη Κάραλη (Ερευνήτρια Β-Συνεπιβλέπουσα) Ηλίας Καστανάς (Καθηγητής) Χρήστος Τσατσάνης (Αναπληρωτής Καθηγητής) Γεώργιος Λιαπάκης (Επίκουρος Καθηγητής) Μαρία Βενυχάκη (Επίκουρη Καθηγήτρια)

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν.5343/1932, άρθρο 202)

# Ο χρόνος γιατρεύει τις πληγές

Όχι, όμως πλήρως...

στις ανεπούλωτες πληγές

και σε όσους κατά καιρούς βοήθησαν να απαλύνουν

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Εκφράζω εδώ την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου προς όλους όσοι με βοήθησαν να ολοκληρώσω τούτη τη διατριβή.

Ευχαριστώ τον καθηγητή Αχιλλέα Γραβάνη και επιβλέποντα της διατριβής μου για την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Ανδρέα Μαργιωρή που με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του όπου και εκπονήθηκε η παρούσα διατριβή. Η πατρική του φιγούρα, αυστηρή αλλά και συνάμα υποστηρικτική αποτέλεσε σημαντικό στήριγμα στις δύσκολες στιγμές που υπήρξαν.

Εξίσου θερμά ευχαριστώ την ερευνήτρια Β' βαθμίδας Κάτια Κάραλη από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών που με εμπιστεύτηκε και με ένταξε στο ερευνητικό έργο ΠΕΝΕΔ-2003, που αποτέλεσε την πηγή χρηματοδότησης της παρούσας διατριβής και για την πολύτιμη βοήθειά της στο σχεδιασμό των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής: Τον κ. Ηλία Καστανά, τον κ. Χρήστο Τσατσάνη, τον κ. Γιώργο Λιαπάκη και την κ. Μαρία Βενυχάκη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν, τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές τους κατά την αξιολόγηση της προόδου της παρούσας εργασίας. Οι άνθρωποι αυτοί είναι για μένα ξεχωριστοί, όχι μόνο εξαιτίας του επιστημονικού τους κύρους, αλλά και γιατί κοντά τους μεγάλωσα ηλικιακά και ίσως επιστημονικά.

Θα ήθελα να σταθώ στην κ. Μαρία Βενυχάκη, που αποτέλεσε τον φύλακαάγγελό μου τα τελευταία χρόνια. Εκτός από την καθημερινή παρουσία και συμβολή της στην εργαστηριακή πρακτική, μου προσέφερε απλόχερα ηθική και συναισθηματική στήριξη και αποτέλεσε το «αγχολυτικό μου» σε πολλές στρεσογόνες καταστάσεις.

Ένας μεγάλος αριθμός συνεργατών συνέβαλλε στην ολοκλήρωση τούτης της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας που με τις συζητήσεις τους συνεισέφεραν στην περάτωση του παρόντος έργου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τις Ρένα Δερμιτζάκη και Αριάδνη Ανδρουλιδάκη για την συνεργασία αλλά και την ανεκτίμητη φιλία τους. Επίσης, τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο: την Βασιλική Ζαχαριουδάκη, την Έφη Καραγιάννη, την Alicia Arranz de Miguel, τον Γιάννη Λιάπη, την Κατερίνα Ρωμανού, την Ιωάννα Πλατή και όλα τα παιδιά που πέρασαν κατά καιρούς από το εργαστήριο μας.

Θερμότατο ευχαριστώ στην Μαριλένα Καμπά του εργαστηρίου Εργαστηριακής

III

Ενδοκρινολογίας για τις συμβουλές και την αγάπη της όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους της επιστημονικής οικογένειας που αποτέλεσαν συνοδοιπόροι μου στο δύσκολο αυτό δρόμο: τον κ.Γιάννη Χαραλαμπόπουλο, τον Ιάκωβο Λαζαρίδη, τον Κώστα Γκουντέλια, την Ισμήνη Αλεξάκη, το Βασίλη Μηνά, τη Δέσποινα Βάσσου, τη Βαρβάρα Βέργου, τη Γιασεμή Κουτμάνη, τη Ζωή Χανιώτου, το Γεώργιο Νότα, την Φοίβη Νιφλή, τη Βάσω Πελεκάνου, τη Χριστίνα Κόγια, την Ειρήνη Ταλιούρη, τη Νίκη Μαστροδήμου, την Κάσση Ψηφογεώργου, τη Ναταλία Παπαδοπούλου, τον Γιώργο Κωνσταντινίδη, την Έλσα Παπαδημητρίου, την Ειρήνη Θεοδώρου, τη Μαρία Σαββάκη, τη Μαρίνα Βιδάκη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όσους προσέφεραν την επιστημονική τους γνώση και υλικά για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Ευστάθιο Σταθόπουλο για την παραχώρηση του εργαστηρίου Παθολογοανατομίας όπου πραγματοποιήθηκαν οι ιστολογικές χρώσεις και την παθολογοανατόμο κ. Λίντα Γιαννικάκη για την αξιολόγηση των πλακιδίων. Ευχαριστώ επίσης την παθολογοανατόμο κ. Φραγκιά του νοσοκομείου Σωτηρία για την εκτίμηση των πλακιδίων. Τον αναπληρωτή καθηγητή Γεώργιο Χαλεπάκη του Εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας και ιδιαίτερα τον Βαγγέλη Παυλάκη για τις συμβουλές του σε θέματα τεχνικών ιστολογίας. Τον γιατρό Γεώργιο Σακελλάρη του Τμήματος Παιδοχειρουργικής του ΠαΓΝΗ για την παραχώρηση του ανθρώπινου υλικού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους ανθρώπους που με ανέχτηκαν στη ζωή τους παρά την ελλιπή παρουσία μου. Ευχαριστώ για την ουσιαστική επικοινωνία, τις ώρες διασκέδασης, χαλάρωσης και ψυχανάλυσης τους: Ειρήνη Βλαχάκη, Εμμανουέλλα Μοδάτσου, Χρύσα Καρνομουράκη, Χριστίνα Ξέστερνου, Σήφη Μαυραλεξάκη, Θέμη Δακανάλη και Γεράσιμο Βασσάλο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υπομονή που επέδειξε και την συναισθηματική και οικονομική στήριξη σε αυτήν μου την προσπάθεια: Την μητέρα μου Ζωή, τον πατέρα μου Βαγγέλη, τον αδερφό μου Βασίλη και την αδερφή μου Σοφία. Ξεχωριστά ευχαριστώ στους αδερφούς μου Μανώλη και Γιώργο των οποίων ο άνισος αγώνας με το Θάνατο, αποτέλεσε το βασικό μου κίνητρο για να ακολουθήσω τις επιστήμες της Ζωής.

Ευχαριστώ τον Παρασκευά που υπάρχει..

IV

### ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### <u>Προσωπικά στοιχεία</u>

| Όνομα:                          | Ρασούλη Όλγα του Ευαγγέλου       |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Ημερομηνία γεννήσεως:           | 22 Σεπτεμβρίου 1980              |
| Τόπος γεννήσεως:                | Μαρούσι Αττικής                  |
| Εθνικότητα:                     | Ελληνική                         |
| Διεύθυνση προσωρινής κατοικίας: | Σίσες Μυλοποτάμου Ρέθυμνο Κρήτης |
| Διεύθυνση μόνιμης κατοικίας:    | Σίσες Μυλοποτάμου Ρέθυμνο Κρήτης |
| Τηλέφωνο:                       | 6947109689                       |
| e-mail:                         | orassouli@edu.med.uoc.gr         |

## <u>Εκπαίδευση</u>

| 1998      | Απολυτήριο Πολυκλαδικού Λυκείου<br>Ρεθύμνου  |
|-----------|--|
| 1999-2004 | Προπτυχιακή εκπαίδευση στο Τμήμα<br>Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης   |
| 2001-2002 | Εξάμηνη παρακολούθηση μαθημάτων στο<br>πανεπιστήμιο της Βαρκελώνης<br>(Universidad de Barcelona) στα πλαίσια<br>του προγράμματος ERASMUS.  |
| 2003-2004 | Εκπόνηση πτυχιακής εργασίας στο<br>εργαστήριο Εργαστηριακής<br>Ενδοκρινολογίας του τμήματος Ιατρικής<br>του Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα:<br>«Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση τεχνικών<br>μοριακής ανιχνεύσεως γονιδίων<br>μεταβολισμού φαρμάκων» (υπεύθυνοι |

|                       | καθηγητές: Ηλίας Καστανάς - Αχιλλέας   |
|-----------------------|--|
|                       | Γραβάνης)                              |
| 2004 - 2006           | Φοίτηση στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα     |
|                       | «Εγκέφαλος και Νους» της Ιατρικής      |
|                       | Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης        |
| 2006-2011             | Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο    |
|                       | τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου       |
|                       | Κρήτης με θέμα: «Συμβολή της εκλυτικής |
|                       | ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) και  |
|                       | των γλυκοκορτικοειδών στην δερματική   |
|                       | τραυματική επούλωση» με υπεύθυνο       |
|                       | καθηγητή τον κ. Αχιλλέα Γραβάνη        |
|                       |  |
| <u>Ξένες Γλώσσες:</u> | Αγγλικά (πτυχίο FCE)                   |
|                       | Ισπανικά (παρακολούθηση μαθημάτων      |
|                       | ως φοιτήτρια Erasmus)                  |

### <u>Υποτροφίες:</u>

«Μαρία Μιχαήλ Μανασσάκη» (2009-2010)

### Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

- M. Kampa, O. Rasouli, C. Mitropoulos, E. Tsagaraki, C. Tsatsanis, K. Glinou, V. Tsaousis, A. Margioris, E.Castanas, A. Gravanis. A simple and fast method for genotyping drug metabolizing enzymes CYP2D6 and CYP2C19. 31st FEBS Congress, 24-29 June 2006. Istanbul, Turkey.
- E. Karagianni, A. Androulidaki, E. Dermitzaki, M. Venihaki, O. Rassouli, M. Spiliotaki,
  V. Zacharioudaki, C. Stournaras, A. Gravanis, C. Tsatsanis, A. N. Margioris.
  CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR (CRF) AFFECTS BREAST CANCER CELL
  PROLIFERATION, APOPTOSIS AND INVASIVENESS. 59<sup>th</sup> National Conference of
  Biochemistry and Molecular Biology. December 7-9, 2007. Athens, Hellas.
- 3. C. Tsatsanis, A. Arranz, M. Venihaki, **O. Rassouli**, A. Androulidaki, and A. N. Margioris. THE IMPACT OF STRESS ON TUMOR GROWTH: THE SIGNIFICANCE OF PERIPHERAL

CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR. Era of Hope, Congressionally Directed Medical Research Programs. June 25-28, 2008. Baltimore, USA

- 4. K. Gkountelias, T. Tselios, O. Rassouli, G. Deraos, J. Koltsaki, M. Papadokostaki, G.Liapakis. TWO AROMATIC RESIDUES OF TYPE 1 CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTOR ARE IMPORTANT FOR PEPTIDE BINDING. Greek Clinical Chemistry. 2008. Patra, Hellas
- 5. O. Rassouli, A. Gravanis, A. N. Margioris, K.P. Karalis, M. Venihaki. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE (Crh) DEFICIENCY ACCELERATES DERMAL FIBROBLAST PROLIFERATION; ROLE OF INTERLEUKIN IL-6. Endo 2009. June 10-13, 2009. Washington, USA
- 6. O. Rassouli, J. Lazarides, A. Gravanis, A. N. Margioris, K.P. Karalis, M. Venihaki. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE (Crh) DEFICIENCY ACCELERATES DERMAL FIBROBLAST PROLIFERATION; ROLE OF INTERLEUKIN IL-6. 61<sup>th</sup> National Conference of Biochemistry and Molecular Biology. November 20-22, 2009. Athens, Hellas

#### Προφορικές Ανακοινώσεις:

O. Rassouli, G. Liapakis, J. Lazarides, G. Sakellaris, K. Gkountelias, A. Gravanis, A. N. Margioris, K.P. Karalis, M. Venihaki. A NOVEL ROLE OF ENDOGENOUS CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE (CRH) ON DERMAL FIBROBLAST FUNCTION. 6<sup>th</sup> Panhellenic Congress of Pharmacology. June 4-6, 2010. Crete, Hellas

### Δημοσιεύσεις:

- Gkountelias, K., Tselios, T., Venihaki, M., Deraos, G., Lazaridis, I., Rassouli, O., Gravanis, A., and Liapakis, G. Alanine scanning mutagenesis of the second extracellular loop of type 1 corticotropin-releasing factor receptor revealed residues critical for peptide binding. *Molecular pharmacology*, 2009 75, 793-800
- Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andreakou, E., Stournaras, C., Margioris, A. N., and Tsatsanis, C. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Molecular cancer*, 2009 8, 30
- 3. Mavridou, S., Venihaki, M., **Rassouli, O**., Tsatsanis, C., Kardassis, D. Feedback inhibition of human Scavenger Receptor class B type I gene expression by

glucocorticoid in adrenal and ovarian cells. *Endocrinology*, 2010 **151** (7), 3214-24

- Arranz, A., Venihaki, M., Mol, B., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Rassouli, O., Ripoll, J., Stathopoulos, N., Gomariz, R.P., Margioris, A.N., Tsatsanis, C. The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Molecular Cancer*, 2010, 9, 261
- Rassouli, O., Liapakis, G., Lazaridis, I., Sakellaris, G., Gkountelias, K., Gravanis, A., Margioris, A. N., Karalis, K. P., Venihaki, M. A Novel Role of Peripheral Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) on Dermal Fibroblasts. *PLoS One*, 2011 6 (7), e21654

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| 4 | Ευχαριστίες   | III   |
|---|---|-------|
| 4 | Βιογραφικό σημείωμα   | V     |
| 4 | Περιεχόμενα   | IX    |
| 4 | Συντμήσεις  | XVI   |
| 4 | Περίληψη  | XXIV  |
| 4 | Summary   | XXVII |
| 4 | Εισαγωγή  | 1     |
| 4 | <u>Α. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ, CRH ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ</u>              | 2     |
| 4 | Α.1. Ο Υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός άξονας (ΗΡΑ) | 2     |
| 4 | A.2. CRH  | 3     |
| 4 | Το γονίδιο της CRH  | 4     |
| 4 | Α.3. Συγγενή πεπτίδια προς τη CRH (CRH related peptides)    | 4     |
| 4 | Σωβαζίνη και ουροτενσίνη Ι                                  | 4     |
| 4 | Ουροκορτίνες  | 5     |
| 4 | UCN1  | 5     |
| 4 | UCN2  | 6     |
| 4 | UCN3  | 6     |
| 4 | Α.4. CRF υποδοχείς  | 7     |
| 4 | A.5. <i>Crh-/-</i> μύες                                     | 9     |
| 4 | <u>Β. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ, CRH ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</u>           | 11    |
| 4 | Β.1.Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην ανοσοαπόκριση        | 12    |
| 4 | Β.2. Ο ρόλος της CRH στην ανοσοαπόκριση                     | 13    |
| 4 | Οι <i>Crh-/-</i> μύες                                       | 14    |
| 4 | Φλεγμονή επαγόμενη από καρραγινίνη                          | 14    |
| 4 | Φλεγμονή επαγόμενη από διαλυτικό                            | 15    |
| 4 | Οξεία φλεγμονή επαγόμενη από LPS                            | 15    |
| 4 | Αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα                                 | 16    |
| 4 | B.3. CRΗ και υποδοχείς της και αγγειογένεση                 | 16    |
| 4 | <u>Γ. ΔΕΡΜΑ</u>   | 17    |
| 4 | Γ.1. Ανατομία και φυσιολογία του δέρματος                   | 17    |

| 4 | Γ.2. Επιδερμίδα-Δομή                      | 18 |
|---|---|----|
| 4 | Κερατινοκύτταρα                           | 18 |
| 4 | Γ.3. Δερμίδα- Δομή                        | 18 |
| 4 | Ινοβλάστες                                | 19 |
| 4 | Κολλαγόνο                                 | 19 |
| 4 | Γ.4. Αγγειακό σύστημα δέρματος            | 19 |
| 4 | Γ.5. Νευρικό σύστημα δέρματος             | 20 |
| 4 | Γ.6. Ανοσολογικό σύστημα δέρματος         | 20 |
| 4 | Δ. ΔΕΡΜΑ ΚΑΙ ΑΞΟΝΑΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ             | 21 |
| 4 | Δ.1. Φυσιολογικό δέρμα και CRH/HPA άξονας | 21 |
| 4 | Δ.2. CRΗ και συγγενή πεπτίδια             | 21 |
| 4 | Homo sapiens                              | 21 |
| 4 | Mus musculus                              | 22 |
| 4 | Δ.3. CRΗ υποδοχείς                        | 22 |
| 4 | Homo sapiens                              | 22 |
| 4 | Mus musculus                              | 23 |
| 4 | <u>Ε. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ</u>             | 24 |
| 4 | Ε.1. Φάσεις                               | 25 |
| 4 | Ε.1.1 Φλεγμονώδης φάση                    | 25 |
| 4 | Αιμόσταση                                 | 26 |
| 4 | Φλεγμονή                                  | 26 |
| 4 | Ουδετερόφιλα                              | 26 |
| 4 | Μονοκύτταρα                               | 27 |
| 4 | Ιστιοκύτταρα                              | 27 |
| 4 | Τ-λεμφοκύτταρα                            | 28 |
| 4 | Ε.1.2 Πολλαπλασιασμός                     | 29 |
| 4 | Επαναεπιθηλιοποίηση                       | 29 |
| 4 | Αγγειογένεση                              | 30 |
| 4 | Ουλώδης ιστός                             | 31 |
| 4 | Μυοϊνοβλάστες                             | 32 |

| 4 | E.1.3. Αναδόμηση (tissue remodeling)   | 32         |
|---|--|------------|
| 4 | Ε.2. Παράγοντες που εμπλέκονται στην τραυματική επούλωση   | 33         |
| 4 | E.2.1. TGF-β   | 33         |
| 4 | TGF-β και τραυματική επούλωση  | 34         |
| 4 | E.2.2. IL-6  | 35         |
| 4 | IL-6 και τραυματική επούλωση   | 36         |
| 4 | ΣΤ. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ ΚΑΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ   | 38         |
| 4 | ΣΤ.1. Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση   | 38         |
| 4 | ΣΤ.2. Ρόλος της CRH και των συγγενών πεπτιδίων στο δέρμα   | 40         |
| 4 | Σκοπός της διατριβής   | 41         |
| 4 | Υλικά και μέθοδοι  | 44         |
| 4 | Βιολογικά Υλικά  | 45         |
| 4 | Εργαστηριακά Ζώα   | 45         |
| 4 | Διατήρηση-Φροντίδα   | 45         |
| 4 | <i>Crh-/</i> - μύες  | 46         |
| 4 | <i>ΙΙ6-/-</i> μύες   | 46         |
| 4 | <i>Crh-/-Il-6-/-</i> μύες  | 46         |
| 4 | <u>Ιη νίνο πειράματα τραυματικής επούλωσης</u>   | 47         |
| 4 | Ι. Φαρμακολογικός αποκλεισμός των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών  | 47         |
| 4 | α. Φαρμακολογικός αποκλεισμός του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-<br>Πείραμα με RU486  | 47         |
| 4 | β. Φαρμακολογικός αποκλεισμός της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών απ<br>επινεφρίδια - Πείραμα Φαρμακολογικής επινεφριδεκτομής (PhADx) | ό τα<br>47 |
| 4 | ΙΙ. Αποκατάσταση γλυκοκορτικοειδών   | 48         |
| 4 | Επαγωγή τραύματος  | 48         |
| 4 | <u>Καλλιέργεια Κυττάρων</u>  | 50         |
| 4 | Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων δέρματος  | 52         |
| 4 | Απομόνωση και καλλιέργεια ινοβλαστών   | 53         |
| 4 | Δοκιμές  | 53         |
| 4 | Ιστολογικές μελέτες  | 53         |
| 4 | Ανοσοϊστοχημεία για την ταυτοποίηση των κυττάρων   | 54         |

| 4 | Συλλογή αίματος   | 56 |
|---|---|----|
| 4 | Ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός κορτικοστερόνης   | 57 |
| 4 | Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων  | 58 |
| 4 | Α) Απομόνωση RNA από κύτταρα και ιστούς   | 58 |
| 4 | Β) Απομόνωση DNA από ουρά μυός  | 60 |
| 4 | Μέθοδος σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA) από ολικό RNA   |    |
|   | με χρήση ειδικής πολυμεράσης  | 61 |
| 4 | Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης   | 62 |
| 4 | Ταυτοποίηση γονότυπου μυός με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης<br>πολυμεράσης  | 64 |
| 4 | Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης   | 65 |
| 4 | Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς Φάσεως με Σύνδεση Ενζύμου   | 67 |
| 4 | Χρωματογραφία στήλης/ Μικροκολώνα ανάστροφης φάσης C18  |    |
|   | (sep-pack)  | 71 |
| + | Ενζυμικός ανοσολογικός προσδιορισμός πεπτιδίων (Peptide Enzyme<br>Immunoassay - EIA)- Προσδιορισμός της ανοσοδραστικής εκλυτικής<br>ορμόνης της κορτικοτροπίνης (I-CRH) σε υπερκείμενα καλλιεργειών<br>ινοβλαστών | 72 |
| 4 | Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης<br>(Western blot) -Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης<br>σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης Δοκιμασία Sircol                              | 73 |
| 4 | Ηλεκτροφορητική κινητικότητα συμπλόκου σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης<br>(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)   | 80 |
| 4 | Δοκιμή Sircol   | 83 |
| 4 | Συστολή Πλέγματος Πηκτώματος Κολλαγόνου (Free Floating Gel Matrix -<br>Collagen Gel Lattices Contraction)   | 85 |
| 4 | Υπολογισμός ποσότητας πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford  | 86 |
| 4 | In vitro δοκιμή τραυματικής επούλωσης με δημιουργία εγκάρσιας τομής   | 87 |
| 4 | Προσδιορισμός της αποπτώσεως - Χρώση με Annexin V και ιωδιούχο<br>προπίδιο σε κυτταρικές καλλιέργειες και κυτταρομετρική ανάλυση ροής<br>(FACS)   | 88 |
| 4 | Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού  | 90 |
| 4 | Α) Δοκιμή ενσωμάτωσης θυμιδίνης (thymidine incorporation test)  | 90 |
| 4 | Β) Δοκιμή ΜΤΤ   | 90 |
| 4 | Μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης  | 92 |

| 4 | Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού ΑΜΡ  | 94               |
|---|--|------------------|
| 4 | Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων   | 98               |
| 4 | Αποτελέσματα   | 98               |
| 4 | <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>0</sup>:</u>   |                  |
| 4 | <u>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ CRH ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ</u><br><u>ΕΠΟΥΛΩΣΗ</u>   | 98               |
| 4 | Ανίχνευση των mRNA της CRH και των υποδοχέων της σε φυσιολογικό και<br>σε τραυματισμένο δέρμα μυών αγρίου τύπου  | 98               |
| 4 | Οι Crh-/- μύες παρουσιάζουν επιταχυμένη τραυματική επούλωση  | 100              |
| 4 | Επιταχυμένη επαναεπιθηλιοποίηση του τραύματος στους Crh-/- μύες  | 102              |
| 4 | Η διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης δεν ενεργοποιεί τον<br>HPA άξονα στους Crh-/- μύες   | 109              |
| 4 | Επίδραση της γενετικής ανεπάρκειας σε CRH στην έκφραση και παραγωγή<br>κυτοκινών στην περιοχή του τραύματος κατά τη διάρκεια της δερματικής<br>τραυματικής επούλωσης | 110              |
| 4 | Επίδραση της γενετικής ανεπάρκειας σε CRH στην πρόσδεση του NF-κΒ<br>κατάτη διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης  | 112              |
| 4 | <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2º:</u>  |                  |
| 4 | <u>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΣΕ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ (GC) ΤΩΝ Crh-/- ΜΥΩ</u><br>ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ   | <u>2N</u><br>114 |
| 4 | Αποκατάσταση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών του πλάσματος<br>στους Crh-/- μύες στα αντίστοιχα εκείνων των Crh+/+ μυών  | 115              |
| 4 | Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών επιταχύνει την τραυματική<br>επούλωση στους Crh-/- μύες τις πρώτες ημέρες μετά την επαγωγή του<br>τραύματος                     | 116              |
| 4 | Επιταχυνόμενη επαναεπιθηλιοποίηση στους Crh-/- μύες  | 117              |
| 4 | Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στους Crh-/- μύες οδηγεί σε μείωση της<br>συγκέντρωσης του TGF-β και του TNF-α στην περιοχή του τραύματος                               | 118              |
| 4 | <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>0</sup>:</u>   |                  |
| 4 | <u>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRΗ ΣΤΟΥΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ</u><br><u>IN VITRO</u>   | 120              |
| 4 | Απομόνωση και ταυτοποίηση ινοβλαστών   | 120              |
| 4 | Ταυτοποίηση του συστήματος της CRH στους δερματικούς ινοβλάστες<br>μυών  | 122              |
| 4 | Οι δερματικοί ινοβλάστες νεογνών μυών εκφράζουν και εκκρίνουν CRH  | 122              |

| 4 | Βιβλιογραφία  | 161        |
|---|---|------------|
| 4 | Γενική συζήτηση - Προοπτικές  | 158        |
| 4 | Μελέτη του τρόπου δράσης της CRH στην λειτουργία των δερματικών<br>ινοβλαστών   | 154        |
| 4 | Φαρμακολογικός αποκλεισμός των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών  | 153        |
| 4 | Αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών  | 151        |
| 4 | Μελέτες δράσης ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στην επούλωση δερματικών<br>τραυμάτων  | v<br>149   |
| 4 | Η CRΗ συμμετέχει στην επούλωση του δερματικού τραύματος μυών  | 144        |
| 4 | Συζήτηση  | 142        |
| 4 | Η CRH διαμεσολαβεί παρόμοια ενδογενή μονοπάτια στους ανθρώπινους και<br>στους ινοβλάστες των μυών   | 135        |
| ÷ | Ο TGF-β1 και η Il-6 δεν ευθύνονται για τις αλλαγές που παρατηρούνται στο<br>ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των Crh-/- ινοβλαστών | 135        |
| 4 | Οι Crh-/-ινοβλάστες χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκκριση IL-6 και TGF-β<br>θρεπτικό μέσο  | στο<br>133 |
| 4 | Η γενετική ανεπάρκεια της CRH επηρεάζει την παραγωγή κολλαγόνου αλλά<br>τη συσταλτική ικανότητα των ινοβλαστών                            | όχι<br>131 |
| ÷ | Η γενετική ανεπάρκεια σε CRH οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού της<br>μεταναστευτικής ικανότητας των ινοβλαστών                                 | 129        |
| 4 | Η αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Crh-/- ινοβλαστών δεν<br>οφείλεται σε αλλαγή του ρυθμού απόπτωσή τους                             | 127        |
| 4 | Η γενετική ανεπάρκεια σε CRH οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού<br>πολλαπλασιασμού των δερματικών ινοβλαστών μυών                                | 125        |
| 4 | Μελέτη του ρόλου της CRH σε σημαντικές λειτουργίες των δερματικών<br>ινοβλαστών μυών  | 125        |
| 4 | Οι δερματικοί ινοβλάστες νεογνών μυών εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχε<br>της CRH  | ίς<br>123  |

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACTH (Adenocorticotropin Hormone, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)

**α- MSH** (α- Melanocyte Releasing Hormone, μελανοτροπίνη)

**aFGF** (acidic Fibroblast Growth Factor, όξινος παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών όξινος)

**α- SMA** (a-smooth muscle actin, ακτίνη τύπου α των λείων μυών)

AP-1 (Activator Protein 1, πρωτεΐνη ενεργοποίησης)

APS (Ammonium PeroxodiSulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο)

AVP (Arginin- Vasopressin Peptide, πεπτίδιο αργινίνης- βασοπρεσσίνης)

**β-actin** (εκκινητής για το γονίδιο της β-ακτίνης)

**bFGF** (basal Fibroblast Growth Factor, βασικός παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών)

**bp** (base pairs, ζεύγη βάσεων)

BSA (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός)

Bt (biotin, βιοτυνυλιωμένο μόριο)

**C/EBPβ** (CCAAT-Enhancer Binding Protein β)

cAMP (cyclic Adenosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

cDNA (complementary DNA, συμπληρωματικό DNA)

Cox (Cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση)

cpm (counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό)

**CREB** (cyclic AMP response element binding factor)

CRF (Corticotropin Releasing Factor, εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης)

**CRH** (Corticotropin Releasing Hormone, εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης)

**Crh+/+** (μυς με ανέπαφο το *Crh*)

**Crh+/-** (μυς ετερόζυγος ως προς το *Crh*)

**Crh-/-** (μυς με έλλειψη στο *Crh*)

**Crh+/+IL6+/+**(μυς με ανέπαφα το *Crh* και το *ll6*)

Crh-/-IL6-/- (μυς με έλλειψη ταυτόχρονα στο Crh και το 116)

CRF1 (Corticotropin Releasing Factor Receptor 1, υποδοχέας 1 του CRF)

**CRF**<sub>2</sub> (Corticotropin Releasing Factor Receptor 2, υποδοχέας 2 του CRF)

**CRF**<sub>3</sub> (Corticotropin Releasing Factor Receptor 3, υποδοχέας 3 του CRF)

CRF-BP (CRF Binding Protein, συνδετική πρωτεΐνη του CRF)

DEPC-H20 (Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα)

datp (deoxytriphosphate adenosine, δεοξυ-τριφωσφορική αδενοσίνη)

dCTP (deoxytriphosphate cytosine, δεοξυ-τριφωσφορική κυτοσίνη)

DEX (dexamethazone, δεξαμεθαζόνη)

**dGTP** (guanosine deoxytriphosphate, δεοξυ-guanosine triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, θρεπτικό υλικό)

DMSO (Dimethyl sulfoxide, διμεθυλσουλφοξίδιο)

DNA (Desoribonucleic acid, δεσοξυριβονουκλεικό οξύ)

dNTPs (deoxytriphosphate nucleotides, δεοξυ-τριφωσφορικά νουκλεοτίδια)

DTT (Dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη)

**dTTP**(deoxytriphosphate thymidine, δεοξυ-τριφωσφορική θυμιδίνη)

EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, πειραματική αυτοάνοση εκεφαλομυελίτιδα)

ECL (Enchanced Chemmiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)

EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, αιθυλενο διαμινο τετραοξικό οξύ)

EGF (Epidermal Growth Factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)

**EGTA** (Ethyleneglycol-bis (beta- aminoethyl ether) tetracetic acid, αιθυλενο γλυκολ- δις (β- αμινοαιθυλαιθέρας)- N,N, N', N' τετραοξικό οξύ)

EIA (Enzyme Immunoassay, ενζυμικός ανοσολογικός προσδιορισμός )

ELISA (Enzyme- Linked Immunoabsorbent Assay, ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση)

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay, μέθοδος ηλεκτροφορητικής κινητικότητας)

**ERK** (Extracellular signal Regulated Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάριο σήμα)

FACS (Flow cytometry, κυτταρομετρική ανάλυση ροής)

FBS (Foetal Bovine Serum, ορός εμβρύου βοός)

**FCS** (Foetal Calf Serum, ορός εμβρύου βοός)

FITC (Fluorescein isothyocyanate, ισοθειακυανιούχος φλουοροσκεϊνη)

FGF (Fibroblast Growth Factor, παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών)

GC (Glucocorticoid, γλυκοκορτικοειδή)

**GM-CSF** (Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor, παράγοντας που διεγείρει τις αποικίες κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων)

GPCR (G- protein Coupled Receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G- πρωτεΐνες)

**GR**<sup>dim</sup> (DNA-binding-defective mutant version of the GR, μεταλλαγμένος τύπος του υποδοχέα GR ο οποίος δεν είχε την ικανότητα να συνδέεται στο DNA)

GREs (Glucocorticoid Response Elements-αλληλουχίες απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή

GTP (guanosine triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη)

**HB-EGF** (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας συνδεόμενη σε ηπαρίνη)

**HEPES** ( 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulphonic acid, 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινο-αιθανο-σουλφονικό οξύ)

HRP (Horseradish Peroxidase, υπεροξειδάση του ραπανιού)

H&E (Hematoxylin & Eosin, χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης)

**HPA** (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, Υποθάλαμο- υποφυσιο- επινεφριδιακός άξονας)

HRP (Horseradish Peroxidase, υπεροξειδάση του ραπανιού)

IFN-γ (Interferon- γ, ιντερφερόνη γ)

IGF (Insulin- like Growth Factor)

IgG (Immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη G)

**ΙκΒ-α** (Inhibitor α of nuclear factor *k*B, αναστολέας του NFkB, α)

IKK (Inhibitor of nuclear factor kB kinase, αναστολέας της κινάσης του NFkB)

IL- (Interleukin- , ιντερλευκίνη-)

**IL6+/+** (μυς με ανέπαφο το *ll6*)

IL6-/- (μυς ανεπαρκείς για το Il6)

**IL-6R** (Interleukin-6 Receptor, υποδοχέας της IL-6)

**iNOs** (inducible Nitric Oxide synthase, εκκρινόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου)

IP3 (tri- phosphate inositol, τριφωσφορική ινοσιτόλη)

IR-CRH (immunoreactive CRH, ανοσοδραστική CRH)

KGF (Keratinocyte Growth Factor, αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων)

 $K_D$  (dissociation constant, σταθερά διάστασης)

ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα)

LPS (Lipopolysacharide, λιποπολυσακχαρίτης)

Μ1/Μ2 (προφλεγμονώδη/αντιφλεγμονώδη μακροφάγα)

**MAPK** (Mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο σήμα)

ΜC2 (μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου 2 της μελανοκορτίνης)

MMP -9 (Metalloproteinase -9, μεταλοπρωτεϊνάση-9)

mRNA (messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA)

**MSH** (melanotropins, μελανοτροπίνη)

**MTT** (3- (4,5 dimethylthiazol- 2,5- diphenyl tetrazolium) bromide, βρωμιούχο 3-(4,5 διμεθυλ θιαζολ- 2,5 διφαινυλ τεταζόλιο)

Να<sub>3</sub>Ν (Νατραζίδιο)

NFkB (Nuclear Factor kappa B, πυρηνικός παράγοντας -κB)

NGF (Nerve Growth Factor, Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας)

NK cells (Natural Killer cells, κύτταρα φυσικοί φονιάδες)

NP40 (Nonidet P-40)

NO (Nitric Oxide, ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου)

NPY (Neuropeptide Υ, νευροπεπτίδιο Υ)

**0.D** (Optical Density οπτικής πυκνότητας)

PBS (Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)

PEG-400 (πολυαιθυλενογλυκόλης 400)

**PGE**<sub>2</sub> (Prostaglandin  $E_2$ , προσταγλανδίνη  $E_2$ )

**PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια)

PI3K (Phospho Inositol 3 Kinase, κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης)

PKA (Protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A)

PKB (Protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B)

PKC (Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C)

PMSF (Phenylmethylsulfonyl, φαινυλο μεθυλ σουλφονυλο φθορίδιο)

**PNMT** (Phenyl N methyl transferase)

**POMC** (Proriomelanocortin, προ-οπιομελανοκορτίνη)

**PPARy** (Peroxisome Proliferators Activated Receptor-γ)

PVN (paraventricular nucleus, παρακοιλιακού πυρήνα)

RANTES

RIA (RadioImmunoAssay, Ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός)

**rmIL-6** (recombinant mouse Interleukin-6, ανασυνδυασμένη IL-6 μυός)

RNA (Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ)

rRNA (ριβοσωμικό RNA)

**rpm** (rounds per minute, στροφές ανά λεπτό)

ROS (Reactive Oxygen Species)

**RT-PCR** (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, mέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης)

**RU486** (Roussel-Uclaf 486, μιφεπριστόνη)

Sephadex (Separation Pharmacia dextran, εμπορική ονομασία)

**SA-HRP** (Streptavidin- Horseradish Peroxidase στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού)

**SD** (Standard deviation, τυπική απόκλιση)

SDS (Sodium dodecyl sulfate, μετα νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου)

**TAE** (Tris/Acetic acid/EDTA)

**TBE** (Tris/Borate/EDTA, ρυθμιστικό διάλυμα Tris με βορικό και EDTA)

**TBS-T** (Tris Buffered saline- Tween, ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween)

TCR (T- cell Receptor, υποδοχέας των Τ- κυττάρων)

**TEMED** (N,N,N',N'- Tetyramethyl- ethylenediamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλενο αιθυλοδιαμίνη)

**TGF** (Transforming Growth Factor, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού)

**TGF-βR** (Tumor Growth Factor β Receptor, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα όγκων)

- **Th1 /** (τύπος 1 βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων)
- Th1 / Th2 (τύπος 1 βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων)
- **TNF-α** (Tumor Necrosis Factor –α, ογκονεκρωτικός παράγοντας α)
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane
- **U** (units, μονάδες)
- UCN (Urocortin, ουροκορτίνη)
- UV (ultraviolet, υπεριώδης ακτινοβολία)
- **VEGF** (Vascular Endothelial Growth factor)
- VIP (Vasoactive Intestinal Peptide, αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο)
- VP (Vasopressin, βασοπρεσσίνη)

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δερματική τραυματική επούλωση είναι μία σύνθετη διαδικασία, άρρηκτα συνδεδεμένη με τη φλεγμονή, που απαιτεί τη συνεργασία πολλών διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών και παραγόντων. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του υποθαλαμικού-υποφυσιακού-επινεφριδιακού (HPA) άξονα, ο οποίος μεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες, συμπεριλαμβανομένης και της φλεγμονής. Η διέγερση της CRH από στρεσογόνα ερεθίσματα οδηγεί στην απελευθέρωση των επινεφριδιακών γλυκοκορτικοειδών, ενός ισχυρού ενδογενούς αντιφλεγμονώδους μέσου. Η CRH ασκεί τις δράσεις της μέσω δύο κύριων τύπων υποδοχέων, τον υποδοχέα 1 της CRH (CRF<sub>1</sub>) και τον υποδοχέα 2 της CRH (CRF<sub>2</sub>). Το mRNA της CRH καθώς και το ανοσοδραστικό πεπτίδιο και οι υποδοχείς της έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα περιφερικών ιστών συμπεριλαμβανομένου του δέρματος. Αν και έχει δειχθεί ότι η περιφερική CRH ασκεί άμεση προ-φλεγμονώδη δράση, εντούτοις ο ρόλος της στη διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης παραμένει αδιευκρίνιστος.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της CRH στην επούλωση του δερματικού τραύματος χρησιμοποιήθηκαν μύες στους οποίους είχε γίνει απαλοιφή του γονιδίου της CRH (Crh-/-). Η CRH ανιχνεύθηκε τόσο σε φυσιολογικό όσο και τραυματισμένο δέρμα Crh+/+ μυών. Οι Crh-/- μύες χαρακτηρίζονταν από επιταχυμένη τραυματική επούλωση ταχύτερη εξέλιξη της φλεγμονής η οποία συνοδευόταν από και της επαναεπιθηλιοποίησης από τη δεύτερη έως την πέμπτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος συγκριτικά με τους μύες αγρίου τύπου. Επιπλέον οι Crh-/- μύες είχαν υψηλότερα επίπεδα TGF-β1 την 3<sup>η</sup> ημέρα όταν συγκρίνονταν με τους Crh+/+ μύες. Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους Crh-/- μύες επιτάχυνε την τραυματική επούλωση ακόμα περισσότερο την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος συγκριτικά με τους Crh-/- μύες στους οποίους δε χορηγήθηκε κορτικοστερόνη και ταυτόχρονα επιτάχυνε τη λύση της φλεγμονώδους αντίδρασης και αύξησε τον αριθμό και την ταχύτητα οργάνωσης των ινοβλαστών. Τέλος, η χορήγηση κορτικοστερόνης επανέφερε τα ιστικά επίπεδα του TGF-β1 στους Crh-/- μυς σε αυτά που παρατηρούνταν Crh-/- στους μύες. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η γενετική έλλειψη CRH συνδέεται με επιταχυμένη τραυματική επούλωση που χαρακτηρίζεται από αυξημένη επιθηλιοποίηση και παρουσία ινοβλαστών στην τραυματική περιοχή κατά τρόπο ανεξάρτητο των γλυκοκορτικοειδών.

Για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της ενδογενούς CRH στη λειτουργία των ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της επούλωσης χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών προερχόμενες από δέρμα νεογνών *Crh+/+* και *Crh-/-* μυών. Οι

XXV

μελέτες μας έδειξαν ότι η *Crh* εκφράζεται στους ινοβλάστες μυών αγρίου τύπου. Επιπλέον, οι ινοβλάστες και των δύο γονοτύπων διαθέτουν λειτουργικούς υποδοχείς, καθώς επάγουν την παραγωγή cAMP. Οι ινοβλάστες με γενετική έλλειψη CRH παρουσίαζαν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης και μειωμένη παραγωγή IL-6, TGF-β1 και κολλαγόνου σε σύγκριση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Ο φαρμακολογικός αποκλεισμός του CRF<sub>1</sub> με τη χρήση ανταλαρμίνης σε καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών επέφερε παρόμοιες αλλαγές αναφορικά με το ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης και την έκκριση IL-6, με αυτές που παρατηρούνταν στους *Crh* -/- ινοβλάστες. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η CRH στη βιολογία των δερματικών ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης του τραύματος.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματά μας, από *in vivo* και *in vitro* πειράματα, καταδεικνύουν για πρώτη φορά το σημαντικό ρόλο της τοπικά παραγόμενης CRH στη δερματική τραυματική επούλωση. Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης της αυτής δεν έχει διασαφηνισθεί. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι οι ινοβλάστες αποτελούν σημαντική συνιστώσα στη διαδικασία αυτή.

# **SUMMARY**

Cutaneous wound healing is a complex process tightly related to inflammation, which requires the cooperation of several different cell populations and factors. Corticotropin releasing hormone (CRH) is the main regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which mediates the body's response to stress, including inflammation. The stimulation of CRH by stressful stimuli leads to the release of adrenal glucocorticoids, a potent endogenous anti-inflammatory agent. CRH exerts its effects through two main types of receptor, receptor 1, (CRF<sub>1</sub>) and receptor 2 (CRF<sub>2</sub>). The mRNA of CRH and the immunoreactive peptide and its receptors have been identified in a plethora of peripheral tissues including the skin. Although it has been shown that peripheral CRH possesses direct pro-inflammatory action, its role in the process of cutaneous wound healing remains unclear.

To study the role of CRH in cutaneous wound healing we used mice with genetic deletion of CRH (*Crh-/-*). CRH mRNA was detected in both normal and wounded skin of *Crh+/+* mice. *Crh-/* - mice characterized by accelerated wound healing which was accompanied by rapid progression of inflammation and re-epithelialization from the second to the fifth day following the induction of wound compared to wild type mice. Moreover, *Crh-/-* mice had higher levels of TGF- $\beta$ 1 on day 3 when compared with *Crh+/+* mice. The replacement of glucocorticoids on *Crh-/-* mice accelerated the wound healing even more during the first day following the induction of wound compared with vehicle alone-treated *Crh-/-* mice and simultaneously accelerated the resolution of the inflammatory response and increased the number and organization speed of fibroblasts. Finally, administration of corticosterone restored the tissue levels of TGF- $\beta$ 1 in *Crh-/-* mice to those observed in *Crh+/+* mice. Our results suggest that genetic deficiency of CRH is associated with accelerated wound healing characterized by increased epithelialization and presence of fibroblasts in the area of the wound in a manner independent of glucocorticoids insufficiency.

To clarify the role of endogenous CRH in the function of fibroblasts during wound healing we used primary cultures of fibroblasts derived from neonatal skin of *Crh* +/+ and *Crh-/-* mice. Our studies showed that *Crh* is expressed in wild type fibroblasts. Moreover, fibroblasts of both genotypes have functional receptors, as they induce the production of cAMP. Fibroblasts with genetic deficiency of CRH have higher proliferation and migration rate and decreased production of IL-6, TGF- $\beta$ 1 and collagen in comparison with the corresponding wild type fibroblasts. The pharmacological blockade of CRF<sub>1</sub> using antalarmin in cultured human fibroblasts led to similar changes on the rate of proliferation and

XXVIII

migration and secretion of IL-6, with those observed in *Crh -/-* fibroblasts. These results reinforce the importance of CRH in the biology of skin fibroblasts during wound healing.

In summary, our findings from *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrate for the first time the important role of locally produced CRH in cutaneous wound healing. The exact mechanism of action has not been clarified. However it appears that fibroblasts are an important component in this process.

### Α. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ, CRH ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

### Α.1. Ο Υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός άξονας (ΗΡΑ)

Ο υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός (HPA) άξονας είναι ο κυριότερος ενδοκρινικός άξονας ο οποίος διαμεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες (εικόνα Ι). Η επίδραση ενός στρεσογόνου παράγοντα ενεργοποιεί νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου που συνθέτουν και εκλύουν την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) η οποία μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας εισέρχεται στα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης όπου διεγείρει την έκφραση του γονιδίου και την παραγωγή της προοπιομελανοκορτίνης (*POMC*) και συνεπώς την απελευθέρωση αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) και άλλων πεπτιδικών προϊόντων προερχόμενων από την POMC όπως η β-ενδορφίνη και η μελανοτροπίνη (*MSH*). Οι δράσεις της CRH στην υπόφυση διαμεσολαβούνται από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς (CRF<sub>1</sub>) ευρισκόμενους στα φλοιοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης {Chen, 1993}.

Μετά την απελευθέρωσή της στη συστηματική κυκλοφορία, η ΑCTΗ ενεργοποιεί τους μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου 2 της μελανοκορτίνης (MC2) στον φλοιό των επινεφριδίων διεγείροντας την παραγωγή και έκκριση γλυκοκορτικοειδών (κορτικοστερόνης στα τρωκτικά και κορτιζόλης στα πρωτεύοντα). Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του HPA άξονα και συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης και στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Επίσης, αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της βασικής λειτουργίας του HPA άξονα και της λήξης της αντίδρασης ασκώντας αρνητική ανάδραση τόσο στο επίπεδο της υπόφυσης όσο και στο επίπεδο του υποθαλάμου {Stratakis, 1995}.



Εικόνα Ι Σχηματική αναπαράσταση του ΗΡΑ άξονα.

### A.2. CRH

Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin-Releasing Hormone -CRH), γνωστή και ως εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (Corticotropin-Releasing Factor - CRF), αποτελεί ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που απομονώθηκε αρχικά το 1981 από εκχυλίσματα υποθαλάμο προβάτου {Vale, 1981}. Η ονομασία της οφείλεται στην ικανότητά της να διεγείρει την απελευθέρωση κορτικοτροπίνης (ACTH), όπως αναφέρθηκε πρωτύτερα, από τα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* {Chen, 1993}. Εκτός από τον υποθάλαμο που αποτελεί την κυριότερη πηγή, το mRNA της CRH καθώς και το ανοσοδραστικό πεπτίδιο έχουν εντοπιστεί σε πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου όπως η αμυγδαλή, ο υπομέλαινας τόπος, ο φλοιός καθώς επίσης και σε πληθώρα περιφερικών συστημάτων (αναπαραγωγικό, πεπτικό, ανοσοποιητικό, δέρμα) και ιστών (επινεφρίδια, σπλήνας, θύμος αδένας){Suda, 1984; Boorse, 2006} όπου φαίνεται να εμπλέκεται στη ρυθμιστική τους λειτουργία και να διαμεσολαβεί διαφορετικές πτυχές της απόκρισης των θηλαστικών στο στρες.

Η δομή της CRH παρουσιάζει μεγάλη διατήρηση μεταξύ των ειδών τόσο όσο αφορά το γονίδιο όσο και το πεπτίδιο. Έτσι έχει βρεθεί ότι η κωδικοποιούσα περιοχή

του γονιδίου της ανθρώπινης CRH εμφανίζει 94% ομοιότητα με την αντίστοιχη των επίμυων. Παρόμοια, η αλληλουχία των αμινοξέων της ανθρώπινης CRH και της CRH των μυών και επίμυων είναι πανομοιότυπες, ενώ διαφέρουν μόνο κατά 2 και 7 αμινοξέα από την CRH του χοίρου και του προβάτου αντίστοιχα {Lovejoy, 1999}. Το γεγονός αυτό πιθανότατα αντανακλά την ανάγκη διατήρησης της λειτουργικότητας της CRH κατά τη μήκος της εξελικτικής γραμμής.

### Το γονίδιο της CRH

Το γονίδιο της CRH αποτελείται από 2 εξώνια που ενώνονται με ένα εσώνιο περίπου 800 ζευγών βάσεων. Το πρώτο εξώνιο κωδικοποιεί την 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA, ενώ το δεύτερο ολόκληρο το πρόδρομο μόριο της CRH (προπεπτίδιο) από το οποίο προέρχεται η ενεργή ορμόνη. Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της CRH περιέχει αρκετές αλληλουχίες ρύθμισης της έκφρασης του {Vamvakopoulos, 1994}, όπως στοιχείο απόκρισης σε cAMP (*CRE*) {Spengler, 1992; Seasholtz, 1988}, αλληλουχίες απόκρισης στην AP-1 καθώς και στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) {Guardiola-Diaz, 1996; Malkoski, 1999}.

### A.3. Συγγενή πεπτίδια προς τη CRH (CRH related peptides)

Αρκετά χρόνια μετά τον χαρακτηρισμό της CRH ένας αριθμός συγγενών προς αυτήν πεπτίδια ανακαλύφθηκαν και εντάχθηκαν στην οικογένεια των CRH συγγενών – παραλόγων πεπτιδίων. Σε αυτήν ανήκουν, εκτός από την CRH, η ουροτενσίνη I (urotensin I), η σωβαζίνη (sauvagine), και οι ουροκορτίνες Ι, ΙΙ και ΙΙΙ. Τα παραπάνω πεπτίδια διαθέτουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τα οποία στηρίζουν την υπόθεση της κοινής καταγωγής τους από ένα πρόδρομο αρχέγονο πεπτίδιο {Lovejoy, 2006; Lovejoy, 1999}. Συγγενή πεπτίδια της CRH εμφανίζονται τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά. Τα ασπόνδυλα εκκρίνουν δύο παράλογα της CRH που ονομάζονται διουρητικές ορμόνες {Lovejoy, 2006}.

### Σωβαζίνη και ουροτενσίνη Ι

Αμφίβια και ψάρια παράγουν CRH και ένα δεύτερο παράλογο μόριο, την σωβαζίνη και την ουροτενσίνη Ι αντίστοιχα {Lovejoy, 1999}. Η σωβαζίνη είναι ένα πεπτίδιο 40 αμινοξέων που απομονώθηκε από το δέρμα του *Phyllomedusa sauvagei*, ενός είδους βατράχου, από τον οποίο πήρε και το όνομά της {Pallai, 1983; Montecucchi, 1980; Montecucchi, 1981}. Εκτός από την υψηλή ομολογία που μοιράζεται με τη CRH (τα μισά αμινοξέα της σωβαζίνης βρίσκονται σε ανάλογες θέσης στη CRH), διαθέτει και

παρόμοιες δράσεις με τη CRH, όπως την ικανότητα απελευθέρωσης ACTH και βενδορφίνης *in vivo*. Η ουροτενσίνη Ι, ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που απομονώθηκε από την ουροϋπόφυση του τελεόστεου ιχθύ *Catostomus commersoni* {Lederis, 1982}, είναι δομικά συγγενές με την σωβαζίνη και επομένως με την CRH με τις οποίες μοιράζεται κοινές βιολογικές δράσεις. Οι ομοιότητες στα δομικά χαρακτηριστικά των τριών πεπτιδίων αποτελούν τη βάση στις παρατηρούμενες ομοιότητες στη βιολογική τους δραστικότητα {Pallai, 1983}.



#### Εικόνα ΙΙ

### Ουροκορτίνες

Στα θηλαστικά, η οικογένεια της CRH αποτελείται από τέσσερα παράλογα πεπτίδια, την CRH και τις ουροκορτίνες Ι, ΙΙ και ΙΙΙ (UCN1, 2 και 3).

#### UCN1

Η ουροκορτίνη ή ουροκορτίνη Ι (urocortin-UCN1){Vaughan, 1995}, που αποτελείται από 40 αμινοξέα, έλαβε το όνομά της λόγω της ομολογίας που παρουσιάζει τόσο με την ουροτενσίνη όσο και με την CRH (εικόνα II). Το γονίδιο της UCN1 εμφανίζει πολλές δομικές ομοιότητες με το γονίδιο της CRH. Επιπλέον, τα γονίδια της CRH και της UCN1 περιέχουν παρόμοιες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές τους {Zhao, 1998}.

Η κύρια θέση έκφρασης της UCN1 αποτελεί ο πυρήνας Edinger-Westphal {Weninger, 1999; Pan, 2008}. Το mRNA της UCN1 έχει εντοπιστεί επίσης και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως τον ιππόκαμπο, τον έξω πυρήνα της άνω ελαίας (lateral superior olive) και σε νευρώνες του μετωπιαίου φλοιού {Pan, 2008}. Η UCN1

Σύγκριση αμινοξικής αλληλουχίας των μελών της οικογένειας των CRH συγγενών πεπτιδίων {Breault, 2003}

εντοπίζεται σε πολύ συγκεκριμένες θέσεις στον εγκέφαλο, και μάλιστα σε περιοχές που δεν εκφράζουν CRH, γεγονός που προτείνει ότι η UCN1 διαμεσολαβεί διαφορετικές λειτουργίες από εκείνες της CRH. Αντίθετα με το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου η UCN1 παρουσιάζει περιορισμένη εντόπιση, στην περιφέρεια η έκφραση του μορίου αυτού είναι πιο ευρεία. Πράγματι, το πεπτίδιο της UCN1 έχει ανιχνευτεί στην υπόφυση {Pan, 2008}, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στις αμυγδαλές, στα μυοκύτταρα της καρδιάς {Okosi, 1998; Nishikimi, 2000}, στο θύμο αδένα, στα επινεφρίδια {Fukuda, 2005}, στο σπλήνα, στους πνεύμονες, στον πλακούντα, στα νεφρά {Kageyama, 1999}, στο λιπώδη ιστό {Seres, 2004} και στο δέρμα {Slominski, 2001}.

Η UCN1 λειτουργεί ως ισχυρός επαγωγέας της έκκρισης της ACTH *in vitro*, αν και εξαιτίας της ανατομικής της κατανομής είναι απίθανο να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της απελευθέρωσης της *in vivo* {Asaba, 1998}. Παρόλα αυτά φαίνεται να διαμεσολαβεί συμπεριφορές που επάγονται από το στρες συμπεριλαμβανομένων του άγχους και πιθανόν της ανορεξίας, ενώ ενδέχεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση της ισορροπίας του ύδατος και του νατρίου {Skelton, 2000; Koob, 1999}.

### UCN2

Η δεύτερη ουροκορτίνη που, χρονικά, ανακαλύφθηκε, η ουροκορτίνη ΙΙ (urocortin II, UCN2) {Reyes, 2001}, είναι ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων, που εκφράζεται σε πολύ συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως τους παρακοιλιακούς, υπεροπτικούς και τοξοειδείς πυρήνες του υποθαλάμου και τον υπομέλανα τόπο {Skorzewska, 2011}. Στην περιφέρεια, το mRNA της UCN2 έχει ανιχνευτεί στην καρδιά {Takahashi, 2004}, στα επινεφρίδια {Kageyama, 2010}, σε ανθρώπινα κύτταρα ενδομήτριου {Novembri, 2011}, στους σκελετικούς μύες {Chen, 2004} και στο δέρμα {Slominski, 2004}.

Η UCN2 εμπλέκεται στην καταστολή της όρεξης, στην καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης, ενώ μειώνει το οίδημα που επάγεται από θερμότητα. Όσον αφορά το κυκλοφορικό σύστημα, παρουσιάζει αγγειοδιασταλτική δράση {Kageyama, 2003}, αυξάνει το υποξικό στρες και προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση {Chanalaris, 2003}.

### UCN3

Το τρίτο και τελευταίο μέλος των ουροκορτινών, η ουροκορτίνη ΙΙΙ (urocortin III, UCN3) ή *stresscopin* {Lewis, 2001; Venihaki, 2004}, αποτελείται από 38 αμινοξέα. Εκφράζεται σε περιοχές του ΚΝΣ όπως ο υποθάλαμος, ο μέσος πυρήνας της αμυγδαλής

6
και το στέλεχος {Venihaki, 2004; Li, 2002}. Στην περιφέρεια το mRNA της UCN3 ανιχνεύεται στο γαστρεντερικό σωλήνα {Saruta, 2005}, στην καρδιά {Takahashi, 2004}, στα β- κύτταρα του παγκρέατος {Li, 2003}, στον λιπώδη ιστό {Seres, 2004}, στους μύες, στα επινεφρίδια {Fukuda, 2005} και στο δέρμα {Hsu, 2001}. Συμπεριφορικές μελέτες σε μύες έδειξαν ότι η UCN3, όπως και η UCN2, καταστέλλει την όρεξη, ενώ μειώνει την γαστρική κένωση και το οίδημα που επάγεται από θερμότητα (heat-induced edema).

#### A.4. CRF υποδοχείς

Η CRH και τα συγγενή της πεπτίδια ασκούν τη βιολογική δράση τους συνδεόμενα σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς που ανήκουν στην τάξη ΙΙ της υπερ-οικογένειας των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCR), τον υποδοχέα 1 της CRH (CRF<sub>1</sub>) και τον υποδοχέα 2 της CRH (CRF<sub>2</sub>) οι οποίοι διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Επιπλέον, όπως και τα υπόλοιπα γνωστά μέλη αυτής της υπεροικογένειας διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση μετά από ενεργοποίηση τους από τον αντίστοιχο αγωνιστή. Εκτός όμως από αυτό το μονοπάτι, είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς της CRH μπορούν να ενεργοποιήσουν μια πληθώρα άλλων διαφορετικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών (π.χ. της ινοσιτόλης, της PKC, της PKB/Akt, της ERK, και της p38 MAPK) ή άλλα σηματοδοτικά μόρια (Ca<sup>2-</sup>, η συνθάση του NO (NOS), όπως την κυκλάση της γουανυλίνης (guanylyl cyclase), προσταγλανδίνες, RhoA/ Rho kinase, Fas και Fas προσδέτες) τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* {Arzt, 2006}.

Οι δύο οικογένειες υποδοχέων της CRH μοιράζονται 70% ομολογία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι υποδοχείς CRF<sub>1</sub> και CRF<sub>2</sub> μοιράζονται περιοχές με ταυτόσημα αμινοξέα, κυρίως στις θέσεις που φαίνεται να είναι σημαντικές για τη σύζευξη με τις G-πρωτείνες και τη μεταγωγή του σήματος, γεγονός που ενισχύει την άποψη των διατηρημένων βιοχημικών λειτουργιών των υποδοχέων. Παρόλα αυτά, οι δύο υποδοχείς διαφέρουν σημαντικά στη δομή, στο φαρμακολογικό προφίλ και στον ανατομικό εντοπισμό {Grigoriadis, 1996}.

Ο CRF<sub>1</sub> υποδοχέας είναι μία πρωτεΐνη 415 αμινοξέων που κατανέμεται ευρέως τόσο στο KNΣ όσο και στην περιφέρεια {Grammatopoulos, 2002}. Το γονίδιο του CRF<sub>1</sub> χαρακτηρίζεται από 98% ομολογία μεταξύ του ανθρώπου, του μυός και του επιμύος {Grigoriadis, 1996}. Έχουν χαρακτηριστεί πολλές παραλλαγές (R1a-h) του υποδοχέα στον άνθρωπο που οφείλονται σε διαφορετικό μάτισμα του mRNA (splice variants) οι οποίες πιθανόν κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές. Η λειτουργία αυτών των διαφορετικών ισομορφών δεν είναι ακόμα γνωστή. Ο CRF<sub>1</sub> συνδέεται με την CRH, την

ουροκορτίνη, την ουροτενσίνη Ι και την σωβαζίνη με σχεδόν ίδια συγγένεια (Kd~1-2nM) {Todorovic, 2009} αλλά έχει μικρή ή καθόλου συγγένεια προς τις ουροκορτίνες ΙΙ και ΙΙΙ {Hsu, 2001}(εικόνα ΙΙΙ, A). Ο CRF<sub>1</sub> εκφράζεται σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (κυρίως φλοιό, στέλεχος, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, υπόφυση). Η έκφρασή του στον υποθάλαμο επάγεται από το στρες {Sanchez, 1999}. Στην περιφέρεια, αν και τα επίπεδα έκφρασης είναι χαμηλότερα, εντοπίζεται στην υπόφυση, στις αμυγδαλές, στην ωοθήκη, στον σπλήνα, στα επινεφρίδια, στο δέρμα {Slominski, 2004}, στο γαστρεντερικό σύστημα {Chatzaki, 2004}και στο λιπώδη ιστό {Seres, 2004}.

Ένα εντελώς διαφορετικό γονίδιο κωδικοποιεί τον  $CRF_2$  στον άνθρωπο. Αυτό το γονίδιο έχει τρεις παραλλαγές λόγω διαφορετικού ματίσματος του mRNA που κωδικοποιούν τους υπότυπους R2a, R2b, R2c οι οποίοι διαθέτουν μοναδική κατανομή στους ιστούς {Grammatopoulos, 2002}. Ο CRF2a, εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο (υποθάλαμος, πλάγιο διάφραγμα, ραφιοειδής πυρήνας στον μεσεγκέφαλο, οσφρητικός βολβός) και στην υπόφυση {Lovenberg, 1995}. Ο CRF<sub>2b</sub> ανιχνεύεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες), αλλά κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας){Perrin, 1999}. Το mRNA του CRF2 βρέθηκε επίσης στους πνεύμονες, στον σπλήνα, στο θύμο αδένα, στο δέρμα και στο λιπώδη ιστό. Ο  $CRF_{2c}$  έχει ανιχνευθεί μόνο στην μεταιχμιακή περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου {Kostich, 1998}. Αντίθετα με τον CRF1, ο  $CRF_2$  δεσμεύει όλες τις ουροκορτίνες, την σωβαζίνη και την ουροτενσίνη Ι με σημαντικά υψηλότερη συγγένεια από εκείνη προς τη CRH γεγονός που προτείνει ότι αυτά τα πεπτίδια μπορεί να είναι οι ενδογενείς του προσδέτες {Lewis, 2001; Hsu, 2001; Todorovic, 2009} (εικόνα ΙΙΙ, Β). Οι υποδοχείς CRF εκφράζονται επίσης σε υψηλό ποσοστό σε διάφορα καρκινώματα στον άνθρωπο {Reubi, 2003; Suda, 1993}.

Το 2001 χαρακτηρίστηκε ένας τρίτος υποδοχέας για την CRH (*CRF*<sub>3</sub>) στην υπόφυση και τον εγκέφαλο του γατόψαρου (είδος *Ameiurus nebulosus*) ο οποίος εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τον CRF<sub>1</sub> του συγκεκριμένου είδους. Ο υποδοχέας αυτός δεν έχει βρεθεί ακόμα σε άλλα είδη. Ο CRF<sub>3</sub> δεσμεύει την CRH με υψηλότερη συγγένεια απ' ότι τα άλλα συγγενή πεπτίδια {Arai, 2001}.



#### Εικόνα ΙΙΙ

Σχηματική αναπαράσταση του φαρμακολογικού προφίλ των υποδοχέων CRF1 (A) και CRF2 (B) {Grammatopoulos, 2002}

## A.5. Crh-/- μύες

Η δημιουργία και χρήση μυών που φέρουν γενετικές μεταλλάξεις ή στους οποίους απουσιάζουν ειδικά γονίδια αποτελεί σπουδαίο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου και της λειτουργικότητας πολλών γονιδίων *in vivo* και τη σύνδεσή τους με διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Οι μύες με ανεπάρκεια στη CRH (*Crh-/-*) δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο του Dr Joseph A. Majzoub. Η δημιουργία τους βασίστηκε στη στοχευμένη διαταραχή των εμβρυικών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού {Muglia, 1995}.

Ενώ οι Crh-/- μύες που προέρχονται από ετερόζυγη διασταύρωση επιβιώνουν φυσιολογικά, για την επιβίωση των απογόνων Crh-/- που προέρχονται από Crh-/μητέρες απαιτείται η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (κορτικοστερόνης) (μέσω του πόσιμου νερού στις μητέρες) κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ζωής και μέχρι τον πλήρη απογαλακτισμό {Venihaki, 2000}. Ανεπαρκής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στο θάνατο των απογόνων τις πρώτες ώρες της ζωής τους που οφείλεται στη μη φυσιολογική ανάπτυξη των πνευμόνων τους.

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

στην υπόφυση και φυσιολογική συγκέντρωση ACTH στο πλάσμα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ζώα. Όσο αφορά τον κιρκάδιο ρυθμό παραγωγής της κορτικοστερόνης είναι απών στους αρσενικούς και ελαττωμένος στους θηλυκούς *Crh-/-*μύες {Muglia, 2001}.

Καθώς η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής του HPA άξονα, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (π.χ. απομόνωση, νηστεία, αιμορραγία, υπογλυκαιμία) όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα {Jacobson, 2000}. Η μικρή ενεργοποίηση του άξονα στα *Crh-/-* θηλυκά ποντίκια σε αντίθεση με την απουσία ενεργοποίησης στα αρσενικά μετά από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα υποδηλώνει την παρουσία άλλων παραγόντων που καθορίζουν τη διαφορετική απόκριση μεταξύ των φύλων. Παρά την υπολειπόμενη ενεργοποίηση του HPA, τα *Crh-/-* παρουσιάζουν φυσιολογική συμπεριφορά απόκρισης στο ψυχολογικό στρες {Weninger, 2000}. Φαίνεται ότι άλλα πεπτίδια, όπως η UCN1 υποκαθιστούν τη CRH στις περιπτώσεις που εκείνη απουσιάζει {Gysling, 2004}.

## **Β. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ, CRH ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Ο έλεγχος της ανοσολογικής/φλεγμονώδης αντίδρασης απαιτεί την επικοινωνία μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος {Bateman, 1989} και επιτυγχάνεται μέσω κοινών διαμεσολαβητών, όπως νευροπεπτίδια και κυτοκίνες και τους υποδοχείς τους. Επιπλέον, πολλές από τις δράσεις αυτών των νευροπεπτιδίων και κυτοκινών διαμεσολαβούνται από τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια {Blalock, 1994}. Ο HPA αποτελεί το σημαντικότερο ενδοκρινικό άξονα που μεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες, συμπεριλαμβανομένης και της φλεγμονώδης διαδικασίας (εικόνα IV). Η ενεργοποίηση της υποθαλαμικής CRH από στρεσογόνα ερεθίσματα επάγει την έκφραση του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής της κορτικοτροπίνης (ACTH). Η έκλυση της ACTH στη συστηματική κυκλοφορία ενεργοποιεί τη σύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια, έναν ισχυρό ενδογενή αντιφλεγμονώδη παράγοντα. Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν αρνητικά έναν μεγάλο αριθμό προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως το μεταγραφικο παράγοντα NF-κB, κυτοκίνες και μόρια πρόσφυσης, ενώ έχει δειχθεί ότι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες 1 (IL-1) και 6 (IL-6) ενεργοποιούν απευθείας τον ΗΡΑ προκαλώντας αύξηση της έκκρισης της CRH, της ΑСΤΗ και των γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα IV

Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του ΗΡΑ άξονα και του ανοσοποιητικού συστήματος *{Sternberg, 2006}* 

## Β.1. Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην ανοσοαπόκριση

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ευρέως γνωστά για την επίδραση που έχουν στα κύτταρα τόσο του εγγενούς όσο και του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος. Η πιο γνωστή δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι η ανοσοκαταστολή και έχει παρατηρηθεί κυρίως μετά από εξωγενή χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών σε φαρμακολογικές δόσεις. Όταν το ανοσολογικό σύστημα ενεργοποιηθεί, τα γλυκοκορτικοειδή ελευθερώνονται γρήγορα στην κυκλοφορία, συνήθως ενεργοποιούμενα από κυτοκίνες όπως ΙL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ και IL-2. Τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τη φλεγμονώδη αντίδραση καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως των μακροφάγων, των Τ-λεμφοκυττάρων και των ιστιοκυττάρων (mast cells) ενώ αντίθετα φαίνεται να αυξάνουν την επιβίωση των

ουδετερόφιλων. Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να ελέγχουν τη φλεγμονή είτε επάγοντας την έκφραση αντιφλεγμονωδών παραγόντων είτε καταστέλλοντας την έκφραση προφλεγμονωδών. Τα γλυκοκορτικοειδή εμποδίζουν έμμεσα την σύνθεση παραγόντων επάγοντας πολλών φλεγμονωδών τη μεταγραφή ειδικών ριβονουκλεασών που κάνουν λιγότερο σταθερό το mRNA τους. Επίσης μπορούν να καταστέλλουν τα ένζυμα που συμμετέχουν στον έλεγχο της σύνθεσης ή της ενεργοποίησης των παραγόντων αυτών. Η καταστολή της φλεγμονώδους δράσης μέσω γλυκοκορτικοειδών ευοδώνεται και με την μείωση της μεταγραφής γονιδίων υποδοχέων των φλεγμονωδών παραγόντων. Επειδή τα περισσότερα από τα παραπάνω γονίδια στα οποία ασκούν αρνητική ρύθμιση τα γλυκοκορτικοειδή δεν διαθέτουν γνωστές θέσεις GRE, έχουν προταθεί έμμεσοι μηχανισμοί ρύθμισης.

Πράγματι, το μεγαλύτερο μέρος της αντιφλεγμονώδους δράσης των γλυκοκορτικοειδών ευοδώνεται μέσα από την αλληλεπίδραση του ενεργοποιημένου υποδοχέα με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο πυρηνικός παράγοντας κΒ (NF-κB) και η πρωτεΐνη ενεργοποίησης (AP-1) που αποτελούν τους κυριότερους διαμεσολαβητές της έκφρασης των φλεγμονωδών γονιδίων. Ο NF-κΒ διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών φλεγμονωδών και ανοσολογικών γονιδίων και η αλληλεπίδραση του με τα γλυκοκορτικοειδή πιθανό να καταστέλλει την έκφραση αυτών των γονιδίων. Επιπλέον έχει δειχτεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ελέγχουν την ενεργοποίηση του NF-κB επάγοντας την έκφραση του ΙκB-α, του κυριότερου κυτταροπλασματικού καταστολέα του NF-κB στα μονοπύρηνα κύτταρα {Barnes, 1998}.

#### B.2. Ο ρόλος της CRH στην ανοσοαπόκριση

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η CRH και οι υποδοχείς της εκφράζονται σε πληθώρα περιφερικών ιστών συμπεριλαμβανομένων και του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα σε περιφερικά κύτταρα αίματος, το θύμο αδένα και τη σπλήνα και σε φλεγμαίνοντες ιστούς {Aird, 1993; Karalis, 1997}. Πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί με επαγωγή φλεγμονής σε αρουραίους στις αρχές της δεκαετίας του 1990 έδειξαν για πρώτη φορά την παρουσία ανοσοδραστικής CRH σε φλεγμονώδες έκκριμα {Karalis, 1991}. Κατόπιν αυτού, η CRH ανιχνεύθηκε σε ποικίλες τοπικές φλεγμονές, όπως στον αρθρικό θύλακα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα {Crofford, 1993}, στον σπλήνα και τις αρθρώσεις αρουραίων Lewis με φλεγμονώδη αρθρίτιδα {Crofford, 1992}, σε φλεγμονώδεις θυροειδίτιδες {Scopa, 1994} και στο στομάχι ασθενών με εντεροκολίτιδα {van Tol, 1996}. Ανοσοδραστική CRH εντοπίστηκε, επίσης,

στους οφθαλμούς τρωκτικών που είχαν αναπτύξει πειραματικά επαγόμενη αυτοάνοση κερατίτιδα {Mastorakos, 1995} και σε πειραματικά επαγόμενη αρθρίτιδα {Webster, 2002}. Η τοπική χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων CRH και στις δύο περιπτώσεις μείωσε τη φλεγμονή.

Πολυάριθμες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν προτείνει ότι η εκφραζόμενη σε φλεγμαίνοντες ιστούς CRH, γνωστή και ως "ανοσοδραστική CRH" έχει άμεσο αυτοκρινικό/παρακρινικό προφλεγμονώδη ρόλο {Karalis, 1991}. Πράγματι, σε πειράματα επαγόμενης από καρραγίνινη, φλεγμονής σε αρουραίους από τους Karalis et al. έδειξαν ότι αν, πριν από την υποδόρια ένεση καρραγινίνης, χορηγηθεί περιφερικά ο ανταγωνιστής της CRH ανταλαρμίνη ή ειδικό αντίσωμα κατά του CRF, παρατηρείται σημαντική καταστολή της κυτταρικής διήθησης και μείωση του φλεγμονώδους εκκρίματος υπογραμμίζοντας το προφλεγμονώδη ρόλο της τελευταίας στην περιφέρεια {Bamberger, 2000; Karalis, 1991}. Έκτοτε, πολλές εργασίες έχουν ενισχύσει την υπόθεση αυτή. In vitro πειράματα έχουν δείξει τη διεγερτική δράση της CRH στην παραγωγή της IL-1, IL-2, and IL-6, την έκφραση του υποδοχέα της IL-2 και στον πολλαπλασιασμό των T- και Β-λεμφοκυττάρων {Angioni, 1993; McGillis, 1989; Jessop, 1997}. Επιπλέον, η CRH επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών της οξείας φάσης στο ήπαρ.

## Οι Crh-/- μύες

Παρόλο που, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα οι *Crh-/-* μύες έχουν χαμηλότερα επίπεδα βασικής και επαγόμενης από στρες έκκρισης γλυκοκορτικοειδών δείχνουν ελαττωμένη απόκριση κατά τη διάρκεια δύο διαφορετικών πειραματικών μοντέλων φλεγμονής, αυτό της άσηπτης φλεγμονής επαγόμενης από καρραγινίνη και αυτό της τοπικής φλεγμονής επαγόμενης από διαλυτικό (τερεβινθέλαιο) {Karalis, 1999; Venihaki, 2001}. Αυτά τα δεδομένα επιπλέον υποστηρίζουν τη θεωρία του προφλεγμονώδη ρόλου της περιφερικά εκφραζόμενης CRH.

#### Φλεγμονή επαγόμενη από καρραγινίνη

Η επαγόμενη από καρραγινίνη φλεγμονή είναι μια οξεία άσηπτη φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από έντονη συλλογή πολυμορφοπύρηνων και μακροφάγων. Η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων μετά από υποδόρια χορήγηση καρραγινίνη σε ανεπαρκείς σε CRH μύες χαρακτηρίζεται σημαντικά αυξημένη. Παρόλο που, μετά από επινεφριδιεκτομή και αποκατάσταση των επιπέδων της κορτικοστερόνης με εξωγενή χορήγηση, και οι δύο γονότυποι παρουσιάζουν παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της

κορτικοστερόνης μετά από καρραγινίνη, οι *Crh-/-* μύες εμφανίζουν μειωμένα συμπτώματα φλεγμονής. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε η ερευνητική ομάδα ήταν ότι η επινεφρίνη είναι ο προφλεγμονώδης επινεφριδιακός παράγοντας που αποκαλύπτεται από την απουσία CRH στους *Crh-/-* μύες {Karalis, 1999}.

#### Φλεγμονή επαγόμενη από διαλυτικό

Η επαγόμενη από διαλυτικό φλεγμονή αποτελεί ένα μοντέλο υποξίας φλεγμονής στα τρωκτικά κατά την οποία προκαλείται διέγερση του HPA άξονα και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα IL-6 στο πλάσμα, ανορεξία και ελάττωση βάρους. Μετά από χορήγηση διαλυτικού στους *Crh-/-* μύες βρέθηκαν λιγότερα λευκοκύτταρα στο σημείο της φλεγμονής και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 στο πλάσμα σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου. Η συγκέντρωση της κορτικοστερόνης στο πλάσμα και των δύο γονοτύπων μετά την επαγωγή της φλεγμονής δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η CRH είναι απαραίτητη για την έκκριση ACTH αλλά όχι και για την παραγωγή κορτικοστερόνης στη φλεγμονώδη ανοσοαπάντηση. Η έλλειψη CRH συσχετίζεται με τα μη αναμενόμενα αυξημένα επίπεδα IL-6 η οποία φαίνεται να μπορεί να δρα ρυθμίζοντας την έκκριση της ACTH. Επιπρόσθετα, η CRH πιθανών να ρυθμίζει την παραγωγή IL-6 από τα επινεφρίδια, συμβάλλοντας έτσι στην παθοφυσιολογία ανοσολογικών καταστάσεων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα {Venihaki, 2001}.

#### Οξεία φλεγμονή επαγόμενη από LPS

Η επαγωγή σηπτικού σοκ με την χορήγηση LPS σε μύες ανεπαρκείς για την CRH οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης της κορτικοστερόνης στο πλάσμα στο 60% των αντίστοιχων επιπέδων των μυών αγρίου τύπου (wild type). Παρά τα μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης και τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών (TNF-α) στο πλάσμα, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε θυμοκύτταρα προερχόμενα από *Crh-/*- μύες που τους είχε δοθεί LPS βρέθηκε μειωμένη. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τα *in vitro* δεδομένα συνηγορεί στον χαρακτηρισμό της δράσης της CRH ως προφλεγμονώδης που εμπλέκει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB {Zhao, 2002}.

## Αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα

Η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΕΑΕ) είναι μια Th1 τύπου άσηπτη φλεγμονή του ΚΝΣ κατά την οποία παρατηρείται διήθηση μακροφάγων και Τ-κυττάρων στο παρέγχυμα. Επαγωγή ΕΑΕ στους *Crh-/*- μύες οδήγησε σε ήπια συμπτώματα {Benou, 2005}. Τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στον ορό παραπάνω μυών δεν παρουσίασαν αύξηση. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδεικνύουν ένα προφλεγμονώδη ρόλο της CRH ανεξάρτητο από τα γλυκοκορτικοειδή που φαίνεται να αφορά τη λειτουργία των Τ-λεμφοκύτταρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών.

## B.3. CRH και υποδοχείς της και αγγειογένεση

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ανοσοδραστική CRH ανιχνεύεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα φλεγμαίνοντων ιστών και αποτελεί έναν ισχυρό διεγέρτη της χημειοταξίας τους *in vitro* ενώ ασκεί αγγειογενετικές δράσεις *in vivo*, παρόμοια με ότι έχει δειχθεί για άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένου και του TNF-α {Chen, 2004}. Είναι πιθανό ότι η δράση του πεπτιδίου στην περίπτωση αυτή μεσολαβείται από τον CRF<sub>1</sub>, αφού, ειδικοί ανταγωνιστές αυτού του υποδοχέα αναστέλλουν το φαινόμενο. Επιπλέον, πρόσφατες *in vivo* μελέτες χρησιμοποιώντας μύες ανεπαρκείς για τον CRF<sub>2</sub> έχουν δείξει ότι ο CRF<sub>2</sub> είναι ισχυρός αναστολέας του φαινόμενου της αγγειογένεσης {Kageyama, 2003}.

## Γ. ΔΕΡΜΑ

## Γ.1. Ανατομία και φυσιολογία του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο των θηλαστικών, καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια του σώματός τους και έρχεται άμεσα σε επαφή με το περιβάλλον. Αν και εμφανίζονται δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των θηλαστικών, το δέρμα ενός ενήλικου θηλαστικού συνίσταται, γενικά, από δύο κύρια διαμερίσματα, την επιδερμίδα και τη δερμίδα. Η επιδερμίδα αποτελεί την εξωτερική στιβάδα και απαρτίζεται από στρώματα κερατινοκυττάρων που οργανώνονται σε επιμέρους υποστιβάδες. Στην επιδερμίδα περιλαμβάνονται και τα διάφορα εξαρτήματα του δέρματος. Η δερμίδα ή χόριο απαντάται εσωτερικά και είναι ένα παχύ στρώμα συνδετικού ιστού πλούσιο σε ίνες κολλαγόνου. Η ζώνη της βασικής μεμβράνης διαχωρίζει την επιδερμίδα και τα επιδερμικά εξαρτήματα από τη δερμίδα. Το πάχος της επιδερμίδας και της δερμίδας εξαρτάται από την ανατομική θέση. Η υποδερμίδα ή υποχόριο που κείτεται εσωτερικά και αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό, αν και δεν αποτελεί τμήμα του δέρματος, έχει στενή ανατομική και λειτουργική σχέση μαζί του {Slominski, 2000}(*εικόνα V*). Το δέρμα, εμφανίζει μεγάλη δομική και λειτουργική ετερογένεια ανάλογα με την ανατομική του θέση εξαιτίας της διαφορετικής επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων.



Εικόνα V

Δομή φυσιολογικού δέρματος μυός. Ιστολογική τομή μετά από χρώση με Η&Ε.

## Γ.2. Επιδερμίδα - Δομή

Η επιδερμίδα αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα και τρεις ακόμη τύπους κυττάρων σε μικρότερη αναλογία: μελανοκύτταρα, κύτταρα Merkel και κύτταρα Langerhans. Τα κερατινοκύτταρα σχηματίζουν ένα πλακώδες επιθήλιο, αποτελούμενο από πολλές στοιβάδες, που ανανεώνεται συνεχώς σύμφωνα με ένα ειδικό πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Στην επιδερμίδα περιλαμβάνονται επίσης, τα διάφορα εξαρτήματα του δέρματος όπως το τριχοθυλάκιο, οι σμηγματογόνοι, οι απεκκριτικοί και οι εκκριτικοί αδένες. Τα εξαρτήματα προέρχονται από το επιθήλιο αλλά εισδύουν στη δερμίδα και στην υποδερμίδα. Η επιδερμίδα δεν διαθέτει αγγεία, αλλά τρέφεται μέσω διάχυσης από τη δερμίδα (Kanitakis, 2002).

Η ανθρώπινη επιδερμίδα χωρίζεται σε 4 ή 5 στιβάδες, ανάλογα με την ανατομική θέση του δέρματος {Kanitakis, 2002}. Σε αντίθεση με την ανθρώπινη επιδερμίδα, η επιδερμίδα ενός ενήλικου μυός περιλαμβάνει μόνο δύο στιβάδες {Ikuta, 2006; Hedrich, 2004}.

## Κερατινοκύτταρα

Τα κερατινοκύτταρα προέρχονται από το εμβρυικό εξώδερμα. Κατά την ενήλικη ζωή παράγονται από τα βλαστικά κύτταρα της βασικής στιβάδας που μεταναστεύουν προς την επιφάνεια του δέρματος, υφιστάμενα μορφολογική και βιοχημική διαφοροποίηση με μια διαδικασία (κερατινοποίηση) κατά την οποία μετατρέπονται σε κερατοκύτταρα (corneocytes) για να απορριφθούν {Kanitakis, 2002}. Εξαιτίας της διαφοροποίησης που υφίστανται, τα κερατινοκύτταρα δεν συνιστούν έναν δομικά και λειτουργικά ομοιόμορφο πληθυσμό.

## Γ.3. Δερμίδα- Δομή

Η δερμίδα ή χόριο σχηματίζεται από υποστηρικτικό, συμπιεστό και ελαστικό συνεκτικό ιστό που προστατεύει την επιδερμίδα και τα εξαρτήματα της καθώς και τα νευρικά και αγγειακά πλέγματα που την διαπερνούν. Η δερμίδα αποτελείται από κύτταρα, ινώδη μόρια και θεμέλια ουσία που σχηματίζουν δύο διακριτές δομές, τη θηλώδη και τη δικτυωτή δερμίδα (εικόνα V). Στον άνθρωπο, η θηλώδης δερμίδα σχηματίζει ανερχόμενες κωνικές προεκβολές (dermal papillae) που εναλλάσσονται με τις επιδερμικές σπειραματικές ακρολοφίες (epidermal rete ridges). Αντίθετα, η φυσιολογική δερμίδα ενός ενήλικου μυός δεν παρουσιάζει ακρολοφίες, οι οποίες σχηματίζονται μόνο μετά την φάση της εξέλκωσης (ulceration) κατά τη διάρκεια της επούλωσης του δέρματος του μυός {Hedrich, 2004}. Η δικτυωτή δερμίδα περιέχει το

βαθύτερο μέρος των εξαρτημάτων και των αγγειακών και νευρικών πλεγμάτων {Kanitakis, 2002}. Η δερμίδα υφίσταται συνεχιζόμενη ανακύκλωση που ρυθμίζεται από μηχανισμούς που ελέγχουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών της συστατικών.

#### Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες διαθέτουν μεσεγχυματική προέλευση και αποτελούν τα βασικά κύτταρα της δερμίδας αλλά και όλων των συνδετικών ιστών καθώς συνθέτουν όλους τους τύπους των ινών και τη θεμέλια ουσία. Γενικά, οι ινοβλάστες χαρακτηρίζονται από ατρακτοειδές ή αστεροειδές σχήμα ενώ διαθέτουν πλούσιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο {Kanitakis, 2002}. Στη δερμίδα, οι ινοβλάστες απαρτίζουν έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που προσδιορίζεται από τη θέση που κατέχουν σε αυτήν. Ως ακολούθως, έχουν χαρακτηριστεί δύο διαφορετικοί πληθυσμοί που κείτονται στα δύο στρώματα της δερμίδας ενώ ένας τρίτος πληθυσμός σχετίζεται με το τριχοθυλάκιο (hair follicle) {Sorrell, 2004}. Η ταυτοποίηση τους μπορεί να γίνει με αντισώματα που αναγνωρίζουν μοριακούς δείκτες μεσεγχυματικής προέλευσης (π.χ. βιμεντίνη) ή ένζυμα που εμπλέκονται στην σύνθεση κολλαγόνου {Kanitakis, 2002}.

#### Κολλαγόνο

Η πλειοψηφία των ινών της δερμίδας (έως και το 90%) απαρτίζεται από κολλαγόνο, κυρίως τύπου Ι και ΙΙΙ, που είναι υπεύθυνο για την μηχανική αντίσταση του δέρματος. Οι ίνες κολλαγόνου οργανώνονται σε δεμάτια που είναι χαλαρά στη θηλώδη και παχύτερα στη δικτυωτή δερμίδα. Άλλοι τύποι κολλαγόνου που συναντιούνται στη δερμίδα περιλαμβάνουν το κολλαγόνο τύπου ΙV (παρουσιάζεται στη δερμιδοεπιδερμική σύνδεση- DEJ και στις βασικές μεμβράνες εξαρτημάτων, αγγείων, μυών και νεύρων) και το κολλαγόνο τύπου VII (παρουσιάζεται στις ίνες πρόσφυσης της δερμιδοεπιδερμικής σύνδεσης) {Kanitakis, 2002}.

#### Γ.4. Αγγειακό σύστημα δέρματος

Η αγγείωση του δέρματος χωρίζεται στο επιπολής (υποθηλώδες) πλέγμα που βρίσκεται στην πάνω δικτυωτή δερμίδα και στο εν τω βάθη πλέγμα που συναντιέται στην κάτω δικτυωτή δερμίδα. Τα δύο πλέγματα συνδέονται με επικοινωνούντα αγγεία που είναι περισσότερα στην άνω δερμίδα και γύρω από τις θυλακο-ιδρωτοποιές και εξωκρινείς μονάδες. Ένα λεμφικό δίκτυο συνυπάρχει με το αγγειακό στρώμα αν και αποτελεί ξεχωριστή μονάδα (Slominski, 2000).

## Γ.5. Νευρικό σύστημα δέρματος

Το ΚΝΣ συνδέεται είτε άμεσα (δια μέσου απαγωγών νεύρων ή διαμεσολαβητών προερχόμενων από το ΚΝΣ) είτε έμμεσα (δια μέσου των επινεφριδίων ή των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος) με το δέρμα. Τα νεύρα που βρίσκονται στο δέρμα ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα προερχόμενα από την κυκλοφορία του αίματος και σε συναισθηματικά ερεθίσματα. Τόσο τα αισθητικά όσο και τα αυτόνομα νεύρα επηρεάζουν πληθώρα φυσιολογικών (εμβρυογένεση, μια αγγειοσυστολή, θερμοκρασία του σώματος, λειτουργία φραγμού, έκκριση, αγγειοδιαστολή, διαφοροποίηση, ανάπτυξη, θρέψη κυττάρων, ανάπτυξη νεύρων) και παθολογικών (φλεγμονή, ανοσολογική άμυνα, απόπτωση, πολλαπλασιασμός και τραυματική επούλωση) καταστάσεων {Roosterman, 2006}.

## Γ.6. Ανοσολογικό σύστημα δέρματος

Το ανοσολογικό σύστημα του δέρματος αποτελείται από αυτόχθονους, «στρατευμένους» και ανα-κυκλοφορούντες κυτταρικούς πληθυσμούς. Αυτόχθονοι χαρακτηρίζονται όσοι κυτταρικοί τύποι παράγονται σταθερά στο δέρμα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην ανοσολογική απόκριση. Οι πληθυσμοί αυτοί αντιπροσωπεύονται από κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, αγγειακά και λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα, ιστιοκύτταρα (mast cells), ιστιακά μακροφάγα (tissue macrophages-histiocytes), Τ- λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα.

Οι δύο άλλοι τύποι πληθυσμών προέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου. Οι «στρατευμένοι» πληθυσμοί αποτελούνται από μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, μαστοκύτταρα, Τ και Β λεμφοκύτταρα. Τέλος, οι ανα-κυκλοφορούμενοι πληθυσμοί αντιπροσωπεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα-εκτελεστές (NK cells) και τα Τ λεμφοκύτταρα {Slominski, 2000; Bos, 1997).

Τα επιδερμικά και δερμικά ανοσολογικά στοιχεία προσφέρουν προστασία ενάντια σε βιολογικές προσβολές και επίσης εμπλέκονται στην ενοποίηση της αντίδρασης σε ξένα ή αυτο-αντιγόνα μέσω αλληλεπιδράσεων με το κεντρικό ανοσολογικό σύστημα {Slominski, 2000}.

## 

## Φυσιολογικό δέρμα και CRH/ HPA άξονας

Η ανατομική θέση του δέρματος το εκθέτει καθημερινά σε ένα μεγάλο φάσμα στρεσογόνων ερεθισμάτων, για την διαχείριση των οποίων απαιτούνται ειδικοί τοπικοί μηχανισμοί αναγνώρισης και αντιμετώπισης. Έχει προταθεί ότι το δέρμα αποτελεί σημαντικό στόχο και δυνητική πηγή παραγόντων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του HPA άξονα {Ito, 2005}. Πράγματι, βιοχημικές και μοριακές μελέτες έχουν δείξει ότι όλοι οι παράγοντες που εμπλέκονται στον HPA άξονα (CRH, ουροκορτίνες και οι υποδοχείς τους, POMC πεπτίδια, γλυκοκορτικοειδή) εμφανίζονται τόσο στο ανθρώπινο όσο και στο δέρμα μυός {Slominski, 2004}.

## CRH και συγγενή πεπτίδια

## Homo sapiens

Το ανθρώπινο δέρμα εκφράζει το γονίδιο της CRH και της UCNI και παράγει τα αντίστοιχα πεπτίδια όπως έχει τεκμηριωθεί από μελέτες υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (reversed phase-high performance liquid chromatographic) και υγρής χρωματογραφία/φασματοφωτομετρία μάζας (liquid chromatography/mass spectrometry analyses) {Slominski, 2000; Slominski, 1999; Roloff, 1998; Slominski, 1998; Slominski, 1996; Slominski, 2000; Slominski, 2000}. Παράλληλα, έχει αναφερθεί η έκφραση των παραπάνω πεπτιδίων σε διάφορες φυσιολογικές, καρκινικές ή αθανατοποιημένες καλλιέργειες κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινο δέρμα (φυσιολογικά, αθανατοποιημένα και κακοήθη κερατινοκύτταρα και μελανοκύτταρα {Slominski, 1998; Slominski, 1996}, ινοβλάστες {Kauser, 2006}, σμηγματοκύτταρα {Zouboulis, 2002} και ιστιοκύτταρα {Cao, 2005} ). Τέλος, έχει βρεθεί έκφραση της UCN2 στο ανθρώπινο δέρμα και σε καλλιέργειες φυσιολογικών και κακοηθών μελανοκυττάρων και κερατινοκυττάρων, φυσιολογικών δερματικών ινοβλαστών και στον υποδόριο λιπώδη ιστό {Slominski, 2006}.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες κατέδειξαν την παρουσία των παραπάνω πεπτιδίων στην επιδερμίδα, στη δερμίδα και σε επιδερμικά εξαρτήματα κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις {Slominski, 2000; Slominski, 2004; Ito, 2005; Slominski, 2000; Kono, 2001; Ito, 2004; Quevedo, 2001}. Συγκεκριμένα, η ανοσολογικά δραστική CRH έχει εντοπιστεί *in situ* στην επιδερμίδα, στο τριχοθηλάκιο, στα νευρικά δεμάτια και στα αγγεία της δερμίδας {Slominski, 2000}, ενώ το πεπτίδιο της UCN1 στην επιδερμίδα,

στο τριχοθηλάκιο, στους ιδρωτοποιούς αδένες, στους μελανοκυτταρικούς σπίλους (melanocytic nevi), στους λείους μύες και το τοίχωμα των αγγείων.

Η παραγωγή της CRH στο ανθρώπινο δέρμα επηρεάζεται από κοινούς στρεσογόνους παράγοντες όπως η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία {Slominski, 1996} και οι κυτοκίνες του ανοσοβιολογικού συστήματος {Coste, 2001}. Πράγματι, η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει την παραγωγή CRH, ενώ αντίθετα η δεξαμεθαζόνη (συνθετικό ανάλογο των γλυκοκορτικοειδών) την καταστέλλει [{Slominski, 2000; Slominski, 1998; Slominski, 1996}], χωρίς, όμως να επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, καταδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο επίδραση στο μηχανισμό των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων {Slominski, 1998}. Επιπλέον, η UVB διεγείρει την παραγωγή της CRH στα επιδερμικά μελανοκύτταρα και στους καλλιεργούμενους δερματικούς ινοβλάστες, ενώ αυξάνει την έκφραση του POMC στους τελευταίους {Slominski, 2006}. Συμπερασματικά, το ανθρώπινο δέρμα έχει την ικανότητα να παράγει CRH και τα συγγενικά της πεπτίδια, UCNI και UCNII κάτω από την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων.

#### Mus musculus

Αντίθετα με το δέρμα του ανθρώπου, το δέρμα του ενήλικου μυός δεν εκφράζει το mRNA της CRH όπως υποδεικνύουν δεδομένα από RT-PCR και *in situ* υβριδοποίηση {Slominski, 1999; Slominski, 2001; Slominski, 2006] παρόλο που το ώριμο πεπτίδιο είναι παρόν στο δέρμα. Μάλιστα, ανοσοδραστική CRH έχει ανιχνευτεί σε επιδερμικά και θυλακοειδή κερατινοκύτταρα και νευρικά δεμάτια. Εξαιτίας της ανατομικής θέσης που εντοπίζεται το πεπτίδιο της CRH στην περίπτωση του μυός, έχει υποτεθεί ότι απελευθερώνεται από τις τοπικές νευρικές απολήξεις { Slominski, 1996; Slominski, 2001}. Μία δεύτερη ερμηνεία υποστηρίζει ότι το δέρμα του μυός μπορεί να εκφράζει πεπτίδιο με μεγάλη συγγένεια με τη CRH {Slominski, 1996; Slominski, 2000}.

Εντούτοις, το δέρμα του μυός εκφράζει το *ucn1* και παράγει το αντίστοιχο πεπτίδιο {Slominski, 2000}. Η έκφραση της CRH και της UCN1 στα λεμφοκύτταρα υπονοεί ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του δέρματος μπορούν επίσης να συμβάλλουν στη δεξαμενή αυτών των πεπτιδίων {Slominski, 2000}. Τέλος, τόσο το mRNA όσο και το ανοσοδραστικό πεπτίδιο της UCNII έχουν εντοπιστεί σε επιδερμικά, δερμιδικά και εξαρτηματικά διαμερίσματα, όπως και στους σκελετικούς μύες {Chen, 2004}.

**CRH υποδοχείς** Homo sapiens

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το ανθρώπινο δέρμα εκφράζει υψηλά επίπεδα υποδοχέων CRH {Slominski, 2004}. Ο CRF<sub>1</sub> είναι ο κυριότερος υποδοχέας, που εκφράζεται τόσο στα επιδερμικά όσο και στα δερμιδικά και υποδόρια διαμερίσματα. Πιο συγκεκριμένα ο υποδοχέας CRF<sub>1a</sub> αποτελεί την κυριότερη ισομορφή και εκφράζεται σε όλους τους βασικούς κυτταρικούς πληθυσμούς της επιδερμίδας, δερμίδας και υποδερμίδας. Ειδικές θέσεις δέσμευσης για την CRH έχουν βρεθεί και στους δερματικούς ινοβλάστες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους λείους μύες {Slominski, 2000}. Τέλος, καλλιεργούμενα ανθρώπινα μελανοκύτταρα παράγουν CRF<sub>1</sub> κάτω από την επίδραση UV ακτινοβολίας {Slominski, 1996}.

Ο υπότυπος CRF<sub>2</sub> συναντιέται κυρίως σε δερμιδικούς-χοριακούς πληθυσμούς (Slominski, 2006). Το mRNA του υποδοχέα εντοπίζεται στα κερατινοκύτταρα του τριχοθυλακίου και στους θυλώδεις ινοβλάστες ενώ η πρωτεΐνη, κυρίως στο τριχοθυλάκιο στους σμηγματογόνους και στους εκκρινείς αδένες, τους μύες και τα αιμοφόρα αγγεία (Slominski, 2004). Η έκφραση του CRF<sub>2</sub> εντοπίζεται αποκλειστικά σε εξαρτηματικές δομές, λείους μύες, αγγεία και σε συγκεκριμένα κύτταρα που προέρχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα.

#### Mus musculus

Σε αντίθεση με το ανθρώπινο δέρμα, κυρίαρχος υποδοχέας στο δέρμα του μυός είναι ο CRF<sub>2</sub>. Το μετάγραφο του υποδοχέα έχει ανιχνευτεί με PCR. Ανοσοιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει επίσης την παρουσία του CRF<sub>2</sub> σε όλα τα δερματικά διαμερίσματα και συγκεκριμένα στα επιδερμικά και θυλακοειδή συστατικά, στους θυλακοειδείς ινοβλαστες, τα αιμοφόρα αγγεία και τους σμηγματογόνους και εκκρινείς αδένες. Ο ίδιος υποδοχέας ανιχνεύτηκε στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας και σε υποπληθυσμούς χοριακών κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης {Slominski, 2004}.

Η έκφραση του Crf1 ακολουθεί τις φάσεις της τρίχας (πολύ χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της τελογένεσης και υψηλά στην αναγένεση VI) {Slominski, 1999; Slominski, 1996} παρόλο που ανοσοϊστοχημικές μελέτες καταδεικνύουν περιορισμένο εντοπισμό της πρωτεΐνης στα θυλακοειδή κερατινοκύτταρα και στους θυλακοειδείς ινοβλάστες του τριχοθυλακίου και απουσία από την επιδερμίδα {Roloff, 1998}.

Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η έκφραση των υποδοχέων CRF<sub>1</sub> και CRF<sub>2</sub> παρουσιάζει αντίθετο εντοπισμό στο ανθρώπινο και στο δέρμα μυός. Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, ο Slominski και οι συνεργάτες του κατέληξαν στην υπόθεση ότι οι ίδιοι υπότυποι των υποδοχέων της CRH κατέχουν διαφορετικές λειτουργίες στο ανθρώπινο και στο δέρμα μυός {Slominski, 2004}.

## Ε. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

Η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του δέρματος είναι πολύ σημαντική και επιτυγχάνεται με ένα γρήγορο και καλά συντονισμένο μηχανισμό. Η λύση της συνέχειας του δέρματος ακολουθείται από μια σειρά γεγονότων που έχουν ως σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας του φραγμού. Η τραυματική επούλωση θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια πολύπλοκη σειρά αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και εκκρινόμενων παραγόντων που αποσκοπεί στην αποκατάσταση της χαμένης ομοιόστασης.

Άμεσα μετά τον τραυματισμό, το τραύμα αποκαθίσταται προσωρινά με το σχηματισμό θρόμβου αίματος που κλείνει την προσβεβλημένη περιοχή. Τις επόμενες ημέρες ενεργοποιούνται διαδικασίες για την αποκατάσταση του ιστού που έχει υποστεί βλάβη. Φλεγμονώδη κύτταρα και στη συνέχεια ινοβλάστες και τριχοειδή αγγεία εισέρχονται στο τραύμα για να σχηματίσουν τον κοκκιώδη φλεγμονώδη ιστό. Στο μεταξύ, τα επιδερμικά κύτταρα, που βρίσκονται στα άκρα του τραύματος, μεταναστεύουν για να καλύψουν την απογυμνωμένη επιφάνεια του {Martin, 1997}. Τις επόμενες εβδομάδες ο νεοσχηματισμένος ιστός υφίσταται αναδόμηση, για να αποκαταστήσει μια βέλτιστη ισορροπία μεταξύ των κυτταρικών και ακυτταρικών συστατικών που παράχθηκαν μετά τον τραυματισμό {Coulombe, 2003}. Ανεξάρτητα από την αιτία που την προκάλεσε, η τραυματική επούλωση διακρίνεται παραδοσιακά σε τρεις διαδοχικές και αλληλεπικαλυπτόμενες φάσεις: τη φάση της φλεγμονής, τη φάση του πολλαπλασιασμού και τη φάση της αναδόμησης.

## Ε.1. Φάσεις

## Ε.1.1. Φλεγμονώδης φάση

Κατά τη φλεγμονώδη φάση λαμβάνουν χώρα διαδικασίες αποκατάστασης της ομοιόστασης και απελευθέρωσης διαφόρων παραγόντων (εικόνα VI). Οι παράγοντες αυτοί έχουν σκοπό, από τη μία να προσελκύσουν κύτταρα που θα φαγοκυτταρώσουν τους κατεστραμμένους ιστούς, τα υπολείμματα του τραύματος και τα βακτήρια που έχουν εισβάλει και, από την άλλη, να οδηγήσουν στην επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού.





## Εικόνα VI

Σχηματική αναπάρασταση άμεσης απόκρισης (1) και φλεγμονώδους φάσης (2) της δερματικής τραυματικής επούλωσης. {Shaw, 2009 }

## Αιμόσταση

Τα περισσότερα τραύματα στο δέρμα προκαλούν απώλεια αίματος από τα κατεστραμμένα αγγεία {Martin, 1997}. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, οι κυτταρικές μεμβράνες των κατεστραμμένων κυττάρων απελευθερώνουν ουσίες, όπως την θρομβοξάνη Α2 και προσταγλανδίνες 2-α, δυο ισχυρές αγγειοσυσταλτικές ουσίες, προκειμένου να αποφευχθεί η περαιτέρω απώλεια αίματος {Broughton, 2006}. Το κολλαγόνο, που εκτίθεται κατά τον τραυματισμό, ενεργοποιεί τόσο το εγγενές όσο το εξωγενές μονοπάτι θρόμβωσης ενώ ωθεί τα αιμοπετάλια να παράγουν φλεγμονώδεις παράγοντες όπως σεροτονίνη, βραδυκινίνη, προστακυκλίνες, θρομβοξάνη, ισταμίνη και PDGF, CXCL4, bFGF, TGF-β, VEGF, RANTES {Bahou, 2004}. Ο σχηματισμός του θρόμβου αμέσως μετά τον τραυματισμό α. αποσκοπεί στο προσωρινό κλείσιμο της πληγής, β. χρησιμεύει ως προσωρινή ασπίδα γ. αποτελεί το κυριότερο δομικό στήριγμα της πληγής μέχρι την αντικατάστασή του από το κολλαγόνο σε επόμενες φάσεις, και δ. δρα ως μια κυτταροκινών αυξητικών δεξαμενή συγκέντρωσης και παραγόντων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποκοκκιοποίησης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρέχοντας χημειοτακτικά σήματα για την στρατολόγηση κυκλοφορόντων φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή της πληγής {Martin, 1997}.

#### Φλεγμονή

Η φλεγμονώδης αντίδραση αρχίζει αμέσως μετά τον τραυματισμό με την παθητική διαρροή κυκλοφορούντων λευκών αιμοσφαιρίων (κυρίως ουδετερόφιλων) από τα τραυματισμένα αγγεία (εικόνα VI,2). Ταυτόχρονα, παρατηρείται ενεργοποίηση των αυτόχθονων ανοσολογικών κυττάρων του δέρματος όπως τα ιστιοκύτταρα {Noli, 2001}, τα γδ Τ κύτταρα {Jameson, 2004} και τα κύτταρα Langerhans {Cumberbatch, 2000} τα οποία απελευθερώνουν πολύ γρήγορα χημειοκίνες και κυτταροκίνες. Η φλεγμονώδης αντίδραση συνεχίζεται με την ενεργή στρατολόγηση ουδετερόφιλων και μακροφάγων από τα γειτονικά υγιή αγγεία.

#### Ουδετερόφιλα

Τα πρώτα φλεγμονώδη κύτταρα που επιστρατεύονται είναι τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα) {Kim, 2008}. Τα ουδετερόφιλα προσελκύονται από ουσίες που παράγονται στο σημείο της πληγής όπως χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους. Ο βασικός ρόλος των πολυμορφοπύρηνων είναι να καθαρίσουν τον τραυματισμένο ιστό από κυτταρικά υπολείμματα και μικροοργανισμούς που έχουν

εισβάλλει είτε με την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων ή με την παραγωγή κατιονικών πεπτιδίων, εικοσανοειδών {Weiss, 1989} και δραστικών μορίων οξυγόνου (ρίζες οξυγόνου) {Dovi, 2004}. Επιπλέον, συμμετέχουν στην λύση του ινώδους και της προσωρινής μήτρας, στην επαγωγή της αγγειογένεσης και στην επαναεπιθηλιοποίηση {Theilgaard-Monch, 2004}.

#### Μονοκύτταρα

Με την πάροδο του χρόνου τα ουδετερόφιλα αντικαθίστανται σταδιακά από μονοκύτταρα τα οποία προσελκύονται στην πληγή από χημειοτακτικές ουσίες και παράγοντες (π.χ προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες) που απελευθερώνουν τα αιμοπετάλια, τα πολλαπλασιαζόμενα κερατινοκύτταρα στα όρια του τραύματος, οι ινοβλάστες, τα ίδια τα λευκά αιμοσφαίρια {Eming, 2007}, όπως επίσης και από θραύσματα κολλαγόνου, φιμπρονεκτίνης και ελαστίνης της εξωκυττάριας ουσίας που προέρχονται από την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων {Tonnesen, 2000}. Τα μονοκύτταρα στο σημείο του τραύματος μετασχηματίζονται σε μακροφάγα. Έχει βρεθεί με ανάλυση γονιδιακής έκφρασης ότι τόσο τα προφλεγμονώδη M1 όσο και τα αντι-φλεγμονώδη ενεργοποιημένα M2 μακροφάγα είναι παρόντα στο τραύμα από νωρίς με τα M2 να κυριαρχούν αργότερα, κατά τη φάση της ανάπλασης {Deonarine, 2007}.

Ο ρόλος των μακροφάγων το σημείο του τραύματος δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος. Έχει προταθεί ότι κύτταρα αυτά αποτελούν τα κυριότερα φαγοκύτταρα του τραύματος και επιπλέον μέσω της απελευθέρωσης μιας πληθώρας ένζυμων και κυτταροκινών, συμμετέχουν στην επαγωγή των επόμενων φάσεων της τραυματικής επούλωσης. Πράγματι έχει δειχθεί ότι διάφορες κυτοκίνες όπως ο TNF-α ενεργοποιούν τους ινοβλάστες για την παραγωγή κολλαγόνου και επάγουν την αγγειογένεση {Schafer, 2008}, ενώ ο TGF-β, ο bFGF, ο PDGF και ο VEGF επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση μορίων εξωκυττάριας ουσίας από τα αυτόχθονα κύτταρα του δέρματος {Eming, 2007}.

## Ιστιοκύτταρα

Η τρίτη κατηγορία λευκών αιμοσφαιρίων που συμμετέχει στην τραυματική επούλωση είναι τα ιστιοκύτταρα. Μέσα σε λίγες ώρες από τον τραυματισμό, τα αυτόχθονα ιστιοκύτταρα αποκοκκιοποιούνται αποτελώντας έτσι σημαντική πηγή προφλεγμονωδών παραγόντων και κυτταροκινών ικανών να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση και αλλαγές στα αγγεία. Τα επίπεδα των ιστιοκυττάρων

επιστρέφουν στα φυσιολογικά περίπου 48 ώρες μετά τον τραυματισμό ενώ αυξάνουν ξανά σε αριθμό όσο η τραυματική επούλωση προχωρά {Eming, 2007}.

Τα ιστιοκύτταρα εμπλέκονται σε όλες τις φάσης της τραυματικής επούλωσης. Στην διάρκεια της πρώιμης φάσης, η ισταμίνη, η σεροτονίνη και ο TNF-α που απελευθερώνονται από αυτά συμμετέχουν στην επαγωγή της τοπικής θρόμβωσης, της εξαγγείωσης (*extravasation*) και της στρατολόγησης λευκών αιμοσφαιρίων, διαδικασίες απαραίτητες για την εκκίνηση της φλεγμονής {Weller, 2006}. Κατά τη διάρκεια της φάσης του πολλαπλασιασμού τα ιστιοκύτταρα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κερατινοκυττάρων {Ng, 2010}. Διάφοροι προφλεγμονώδεις και αυξητικοί παράγοντες όπως VEGF, FGF-2, PDGF, TGF-b, NGF, IL-4 και IL-8 {Artuc, 1999} που απελευθερώνονται από τα ιστιοκύτταρα εμπλέκονται στην νεοαγγειογένεση, στην ινογένεση και στην επανεπιθηλιοποίηση κατά τη διάρκεια της επούλωσης, ενώ, η εκκρινόμενη τρυπτάση φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη σύνθεση και εναπόθεση κολλαγόνου. Τέλος τα ιστιοκύτταρα εμπλέκονται στην αναδόμηση του ιστού απελευθερώνοντας πρωτεολυτικά ένζυμα όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP, *π.χ.* MMP9){Weller, 2006}.

## Τ-λεμφοκύτταρα

Τα Τ-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στην φάση της αναδόμησης, όταν το τραύμα έχει πλέον επουλωθεί και η μόλυνση έχει υπερκεραστεί. Η συσσώρευση τους παρατηρείται τέσσερις μέρες μετά την επαγωγή του τραύματος και οφείλεται στην παρουσία διαφόρων χημειοκινών που παράγονται από τα μακροφάγα όπως η επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ πρωτεΐνη 10 (IFN-γ inducible protein-10) και η μονοκίνη που επάγονται από την IFN-γ.

Στη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης συμμετέχουν και οι δύο κατηγορίες Τ-λεμφοκυττάρων, Th1 και Th2 που εκκρίνουν διαφορετικό συνδυασμό κυτταροκινών: τα Th1 απελευθερώνουν IFN-γ, IL2, TNF-α, ενώ τα Th2 ιντερλευκίνες 4, 5 και 10 (IL-4, 5, 10). Η διαφορετική έκφραση κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα έχει συσχετιστεί με διαφορετικές διαδικασίες της φάσης της αναδόμησης. Τα T λεμφοκύτταρα επηρεάζουν την τραυματική επούλωση αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτόχθονα ή μη κύτταρα του τραύματος {Eming, 2007}.

## Ε.1.2. Πολλαπλασιασμός

Η φάση του πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διαδικασίες αντικατάστασης του χαμένου ιστού (εικόνα VII). Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, τα κύτταρα που συμμετέχουν (κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα) υφίστανται διαίρεση. Η φάση ξεκινά λίγες ώρες μετά τον τραυματισμό και ο χρόνος που απαιτείται για την επούλωση ποικίλει και εξαρτάται από το μέγεθος, την τοποθεσία του τραύματος, την ηλικία και την υγεία του ιστού. Ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που συμμετέχουν, η φάση του πολλαπλασιασμού χωρίζεται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες: την επαναεπιθηλιοποιηση, την αγγειογένεση και την δημιουργία ουλώδους ιστού.



Εικόνα VII

**Σχηματική αναπάρασταση της φάσης πολλαπλασιασμού της τραυματικής επούλωσης.** *{Shaw, 2009 }* 

## Επαναεπιθηλιοποίηση

Η αποκατάσταση του κατεστραμμένου επιθηλίου ξεκινά μέσα σε 1-2 μέρες μετά τον τραυματισμό και ο χρόνος που απαιτείται για να επουλωθεί πλήρως ποικίλει ανάλογα με την έκταση του τραύματος. Στην περίπτωση που τα προγονικά κύτταρα της βασικής μεμβράνης παραμείνουν άθικτα κάτω από το τραύμα, οι φυσιολογικές στιβάδες της επιδερμίδας αποκαθίστανται σε 2-3 μέρες με τα επιθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύουν προς την κεράτινη στιβάδα με φυσιολογικό τρόπο. Αν η βασική μεμβράνη καταστραφεί, η διαδικασία επαναεπιθηλιοποίησης που ακολουθείται είναι πιο πολύπλοκη και μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες. Σε αυτήν την περίπτωση, τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στα όρια του τραύματος πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν προεκβολές για να επανιδρύσουν ένα προστατευτικό φραγμό ενάντια

στην απώλεια υγρών και στην περαιτέρω είσοδο μικροβίων (Broughton, 2006). Το εναρκτήριο σήμα της μετανάστευσης αποτελεί η απουσία γειτονικών κυττάρων, το επονομαζόμενο «φαινόμενο επίδρασης ελεύθερων άκρων (free edge effect){Clark, 1985}. Λίγες ώρες μετά την έναρξη της μετανάστευσης, τα κερατινοκύτταρα πίσω από τα όρια του τραύματος πολλαπλασιάζονται δεχόμενα ερεθίσματα από μέλη της οικογένειας του EGF, όπως ο EGF, ο TGF-α και ο HB-EGF. Επιπλέον παράγοντες που σχετίζονται με την επαναεπιθηλιοποίηση είναι οι TGF-β1 και TGF-β2 που απελευθερώνονται από αιμοπετάλια και μακροφάγα και σχετίζονται με την κινητικότητα των κερατινοκυττάρων, ο IGF-1 που απελευθερώνεται από ινοβλάστες και επιδερμικά κύτταρα {Coulombe, 2003; Grinnell, 1992; Singer, 1999} και διάφοροι φλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-1 και ο TNF-α που επιδρούν στους ινοβλάστες που διεγείρουν την μετανάστευση τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των γειτονικών κερατινοκυττάρων.

## Αγγειογένεση

Προκειμένου να καλυφθούν οι υψηλές μεταβολικές ανάγκες κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης του κατεστραμμένου ιστού, απαιτείται η παροχή μεγάλης ποσότητας αίματος από το κυκλοφορικό σύστημα. Πράγματι, λίγες μέρες μετά τον τραυματισμό, ένα μικροαγγειακό δίκτυο είναι εμφανές στη θέση του τραύματος, το οποίο παρέχει στον αναπτυσσόμενο ιστό θρεπτικά υλικά και οξυγόνο. Παράλληλα με τον σχηματισμό των νέων αγγείων, θα ξεκινήσει και η αντικατάσταση του ινώδους από τον κοκκιώδη ιστό που αποτελείται από ινοβλάστες, μακροφάγα και τα νεοσχηματισμένα αγγεία εμβαπτισμένα σε μια χαλαρή μήτρα κολλαγόνου, φιμβρονεκτίνης και υαλουρονικού οξέος.

Σύντομα η μήτρα αυτή αντικαθίσταται με ώριμη βασική μεμβράνη. Τελικά τριχοειδή αγγεία που έχουν δημιουργηθεί διακλαδίζονται και ενώνονται για να σχηματίσουν τριχοειδή τόξα (capillary arcades) και στη συνέχεια τα τριχοειδή δίκτυα. Καθώς ο κοκκιώδης ιστός ωριμάζει κατά τη διάρκεια της 2<sup>ης</sup> εβδομάδας μετά την επαγωγή του τραύματος και ο νέος συνδετικός ιστός (neostroma) ή ουλώδης ιστός (scar tissue) εμπλουτίζεται με κολλαγόνο τύπου Ι και ΙΙΙ, τα περισσότερα νέα αιμοφόρα αγγεία αποδομούνται μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης.

Οι κυριότεροι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, είναι μέλη της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF), ο παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών 1 (FGF-1) ή βασικός (bFGF) και 2 (FGF-2) ή όξινος (aFGF), το νιτρικό οξείδιο (NO), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-b), και η τρυπτάση. Σημαντική πηγή VEGF κατά τη φάση της αγγειογένεσης της τραυματικής επούλωσης αποτελούν τα κερατινοκύτταρα στα όρια του τραύματος){Clark, 1985}.

#### Ουλώδης ιστός

Οι ινοβλάστες αποτελούν τα πιο σημαντικά μεσεγχυματικά κύτταρα που εμπλέκονται στην τραυματική επούλωση. Ο ρόλος τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της επούλωσης είναι να παράγουν εξωκυττάρια ουσία, κυρίως κολλαγόνο, που θα αντικαταστήσει το προσωρινό ινώδες, ενώ είναι επίσης υπεύθυνοι για την επαναπροσέγγιση των άκρων του τραύματος λόγω της συσταλτικής τους ικανότητας κατά τη διάρκεια της αναδόμησης. Επειδή το ινώδες είναι αρχικά απαλλαγμένο από ινοβλάστες, γίνεται εμφανές ότι οι διαδικασίες πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας είναι σημαντικές για την αναγέννηση μιας λειτουργικής δερμίδας {Baum, 2005}.

Τις τρεις πρώτες ημέρες μετά τον τραυματισμό ινοβλάστες στα όρια του τραύματος υφίστανται διαδοχικές διαιρέσεις ενώ από την 4η ημέρα ξεκινούν τη μεταναστευτική τους πορεία μέσα στο τραύμα. Από τη στιγμή που θα μεταναστεύουν στο τραύμα παράγουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου τύπου Ι και φιμπρονεκτίνης, ικανότητα η οποία χάνεται μετά την 9<sup>η</sup> ημέρα {Clark, 1993}.

Τα μοριακά σήματα που οδηγούν στο σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού είναι πολλαπλά και περιλαμβάνουν χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, δομικά μόρια και ένζυμα που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία. Σημαντικό ρόλο επίσης, διαδραματίζει το φαινόμενο της επίδρασης των ελεύθερων άκρων (free edges effect) {Broughton, 2006}. Ο PDGF και ο EGF που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα αποτελούν τους κυριότερους διεγέρτες της μετανάστευσης των ινοβλαστών στο τραύμα από τους γύρω ιστούς. Τα μακροφάγα απελευθερώνουν επίσης TGF-β1 που επάγει την σύνθεση κολλαγόνου από τους τραυματικούς ινοβλάστες.

## <u>Μυοϊνοβλάστες</u>

Η συστολή του τραύματος θα πραγματοποιηθεί 7-14 ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος {Clark, 1993}. Αρχικά, οι τραυματικοί ινοβλάστες στα όρια του τραύματος αντιδρούν σχηματίζοντας συσταλτικές δεσμίδες κολλαγόνου επιτρέποντας συστολή μικρού βαθμού του συνδετικού ιστού. Η συστολή αυξάνεται με την διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυο-ινοβλάστες που εκφράζουν ακτίνη τύπου α των λείων μυών (a-smooth muscle actin) υπό τη επίδραση αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β1, της εξωκυττάριας ύλης και/ ή του μηχανικού στρες. Τόσο οι ινοβλάστες όσο και οι μυο-ινοβλάστες συμμετέχουν στην έλξη των άκρων του τραύματος και εμπλέκονται στη σύνθεση, το πακετάρισμα και την ευθυγράμμιση των ινών κολλαγόνου, την πρωταρχική συνιστώσα του ουλώδους ιστού {Hinz, 2007; Shaw, 2009}. Οι μυοϊνοβλάστες θα παράγουν προσωρινή θεμέλια ουσία πλούσια σε φιμπρονεκτίνη και υαλουρονικό οξύ η οποία θα στηρίξει την αποκατάσταση των αγγείων και την συσταλμένη πληγή {Sorrell, 2009}.

## E.1.3. Αναδόμηση (tissue remodeling)

Η τρίτη και τελική φάση της τραυματικής επούλωσης χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο διαδικασιών που σκοπό έχουν την αποκατάσταση της πλήρους λειτουργικότητας και της φυσιολογικής εμφάνισης του τραυματισμένου ιστού {Shaw, 2009} με βασικό στοιχείο την αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας {Clark, 1985}. Η φάση της αναδόμησης αλληλεπικαλύπτεται με τις προηγούμενες φάσεις, ενώ η διάρκεια τη εξαρτάται από την έκταση του αρχικού τραύματος. Από κλινική σκοπιά, αποτελεί, ίσως, την πιο σημαντική φάση {Broughton, 2006}.



## Εικόνα VIII

Σχηματική αναπάρασταση της φάσης αναδόμησης. {Shaw, 2009 }

Η φάση της αναδόμησης ξεκινά, σε μερικές περιπτώσεις, αμέσως μετά την δημιουργία της ασυνέχειας αλλά παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την επιφανειακή επούλωση {Beanes, 2003}.

Η κυριότερη διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την αναδόμηση είναι η εναπόθεση κολλαγόνου σε έναν οργανωμένο δίκτυο {Broughton, 2006}. Το πρωτογενές κολλαγόνο που είναι λεπτότερο και προσανατολισμένο παράλληλα στο δέρμα απορροφάται με την πάροδο του χρόνου και στη θέση του εναποτίθεται πιο παχύ κολλαγόνο που προσανατολίζεται κατά μήκος των γραμμών τάσης. Το πυκνό εξωκυττάριο υλικό που τυχαία είχε εναποτεθεί στις προηγούμενες φάσεις αναδομείται σε μια εκλεπτυσμένη ισορροπία σύνθεσης και αποικοδόμησης του κολλαγόνου {Shaw, 2009}. Σε αυτή την φάση, οι ινοβλάστες, που αποτελούν τα κύτταρα παραγωγής κολλαγόνου δεν αυξάνονται μόνο σε αριθμό, αλλά αυξάνουν και την παραγωγή

Οι περισσότερες λύσεις στο δέρμα επουλώνονται πολύ γρήγορα και αποτελεσματικά μέσα σε μία με δύο εβδομάδες. Το τελικό προϊόν, όμως, δεν είναι ούτε αισθητικά ούτε λειτουργικά τέλειο. Για παράδειγμα, τα επιδερμικά εξαρτήματα που καταστράφηκαν κατά τη δημιουργία του τραύματος δεν αναγεννιώνται. Επιπλέον, μετά το πέρας της διαδικασίας επούλωσης, στο σημείο του τραύματος παραμένει ένας ουλώδης συνδετικός ιστός που αποτελείται από πυκνά παράλληλα δεμάτια κολλαγόνου. Η διάταξη αυτή καθιστά το κολλαγόνο μηχανικά λιγότερο αποτελεσματικό σε σύγκριση με το κολλαγόνου που συναντάται στη μη τραυματισμένη δερμίδα {Martin, 1997}.

#### Ε.2. Παράγοντες που εμπλέκονται στην τραυματική επούλωση

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων έχουν εμπλακεί στη διαδικασία της τραυματικής επούλωσης οι οποίοι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο τόσο κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης, όσο και της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού. Οι πιο μελετημένοι από αυτούς παρόλα αυτά είναι η IL-6 και ο TGF-β εξαιτίας της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν την έκφραση άλλων παραγόντων και έτσι να επεκτείνουν περαιτέρω τη δική τους δράση {Beanes, 2003; Lin, 2003}.

## E.2.1. TGF-β

Παρά το όνομά του, ο TGF-β χαρακτηρίζεται περισσότερο ως κυτοκίνη παρά ως αυξητικός παράγοντας λόγω του μικρού μοριακού του βάρους και της δράσης του σε πολλές φλεγμονώδεις διαδικασίες. Πέντε διαφορετικές ώριμες μορφές του TGF-β,

αριθμούμενες από το 1-5, έχουν απομονωθεί. Όλες οι μορφές αν και διαφοροποιούνται ανάλογα με τα κύτταρα στόχους, χαρακτηρίζονται από παρόμοιες τελικές λειτουργίες. Ο TGF-β δρα με αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο μέσω της σύνδεσης του με τον υποδοχέα του που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και αποτελείται από δύο ξεχωριστές διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, τις TGF-βRI και TGF-βRII. Ο TGF-β συνδέεται με τον TGF-βRII ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τον TGF-βRI και οι οποίοι δημιουργούν έναν σύμπλοκο ετεροδιμερή υποδοχέα. Το ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται μετά τη σύνδεση του TGF-β, με το υποδοχέα του, περιλαμβάνει την ομάδα των πρωτεϊνών οι οποίες ονομάζονται SMADs {Faler, 2006}.

## TGF-β και τραυματική επούλωση

Οι δράσεις του TGF-β είναι πολυδύναμες σε κάθε μία από τις τρεις φάσεις της επούλωσης, ρυθμίζοντας τους κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται σε αυτές, δηλαδή τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα. Αν και όλοι σχεδόν οι κυτταρικοί τύποι παράγουν TGF-β, είναι κυρίως τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και οι ινοβλάστες που αποτελούν τις κυριότερες πηγές παραγωγής του στη διάρκεια της επούλωσης.

Κατά την έναρξη της τραυματικής επούλωσης, ο τοπικά παραγόμενος TGF-β προέρχεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Από τη στιγμή που θα απελευθερωθεί, ο αρχικός του ρόλος είναι να προσελκύσει φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Μέσα από έναν μηχανισμό θετικής ανάδρασης, τα κύτταρα αυτά διεγείρονται και παράγουν περισσότερο TGF-β, προκειμένου να διατηρήσουν την ενεργότητά τους. Από την άλλη, αποτελώντας καταστολέα της παραγωγής των πρωτεασών, ο TGF-β καταστέλλει το πρωτεολυτικό περιβάλλον που δημιουργούν τα φλεγμονώδη κύτταρα και διευκολύνει τη διέλευση στη φάση του πολλαπλασιασμού {Faler, 2006}.

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης της τραυματικής επούλωσης (πολλαπλασιασμός), ο TGF-β, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μπορεί είτε να διεγείρει είτε να καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και αυτό πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία άλλων παραγόντων {Broughton, 2006}. Έτσι, φαίνεται ότι ο TGF-β επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων {Faler, 2006}, ενώ καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό τον ενδοθηλιακών κυττάρων {Broughton, 2006}.

Ο TGF-β επάγει επίσης την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, κυρίως κολλαγόνου (από ινοβλάστες) και φιμπρονεκτίνης (από κερατινοκύτταρα) που θα

αποτελέσει τη βάση, πάνω στην οποία θα σχηματιστεί ο κοκκιώδης ιστός και θα ευοδωθεί η μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και η συστολή του τραύματος. Ο ρόλος του TGF-β στη φάση της αναδόμησης σχετίζεται με τη δράση του ως ισχυρού επαγωγέα της σύνθεσης του κολλαγόνου {Broughton, 2006}. Ταυτόχρονα, ο TGF-β εμποδίζει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου επάγοντας την έκκριση του TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) και άλλων καταστολέων των μεταλλοπρωτεϊνασών των οποίων η παραγωγή από τους ινοβλάστες επάγεται από τον TGF-β και την IL-6. Μάλιστα, ο TNF-α επάγει την απελευθέρωση της IL-6 από τους ινοβλάστες ενισχύοντας την συστολή του τραύματος {Montesano, 1988} μέσω απευθείας επαγωγής της έκφρασης της α-SMA από τους ινοβλάστες {Desmouliere, 1993}.

## E.2.2 IL-6

Η ιντερλευκίνη 6 (ΙL-6) αποτελεί μια πλειοτροπική κυτοκίνη γνωστή για το ρόλο της στην έναρξη των αποκρίσεων οξείας φάσης και στη φλεγμονή {McFarland-Mancini, 2010}. Πιο συγκεκριμένα, η IL-6 επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών του πλάσματος που ανήκουν στις πρωτεΐνες οξείας φάσης από το ήπαρ, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση Β και Τ λεμφοκυττάρων και ενεργοποιεί τα μακροφάγα {Sehgal, 1990}. Οι δράσεις της IL-6 διαμεσολαβούνται κυρίως από το μεμβρανικό υποδοχέα της, IL-6Rα {McFarland-Mancini, 2010} αλλά και από μια διαλυτή μορφή του {Taga, 1989}.

Πολυάριθμοι κυτταρικοί τύποι παράγουν IL-6 και ειδικά σε φλεγμαίνουσες περιοχές υπό την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων (πχ. IL-1, TNF, PDGF) {Kupper, 1989; Fong, 1989; Helfgott, 1989}. Τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας είναι οι κυριότερες πηγές της IL-6 στο δέρμα {Sehgal, 1990}, ενώ τα μακροφάγα, τα Langerhans και οι ινοβλάστες της δερμίδας αντιπροσωπεύουν άλλες πηγές της κυτταροκίνης αυτής {Paquet, 1996}.

Η IL-6 εμπλέκεται στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση αρκετών κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του δέρματος {Gallucci, 2006}. Η IL-6 είναι μιτογόνος για τα κερατινοκύτταρα {Sato, 1999; Grossman, 1989; Grossman, 1989} όπως φαίνεται σε πειράματα υπερέκφρασης της στο δέρμα φυσιολογικών επίμυων. Επιπρόσθετα, διαγονιδιακοί μύες που υπερεκφράζουν την IL-6 εμφανίζουν παχύτερη κεράτινη στιβάδα {Gallucci, 2006; Turksen, 1992}. Τέλος, αυξημένα επίπεδα της έχουν συσχετιστεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων του δέρματος, όπως η ψωρίαση {Grossman, 1989} το σκληρόδερμα {Koch, 1993} και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος {Fugger, 1989}.

Η δημιουργία των μυών με ανεπάρκεια σε IL-6 (*Il6-/-*) {Kopf, 1994} έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της κυτταροκίνης σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις διαφόρων ιστών και οργάνων, μεταξύ αυτών και του δέρματος.

## IL-6 και τραυματική επούλωση

Η IL-6 είναι εύκολα ανιχνεύσιμη στα δερματικά τραύματα {Hubner, 1996; Kondo, 1996} όπου παράγεται από επιδερμικά κύτταρα, ινοβλάστες της δερμίδας και μακροφάγα {Mateo, 1994} και επιδρά σε διάφορες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την επούλωση. Έτσι η IL-6 δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας αυξάνοντας την σύνδεση των ουδετερόφιλων στους δερματικούς ινοβλάστες {Giuliani, 1993}. Κατέχει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην επαναεπιθηλιοποίηση εφόσον αποτελεί μιτογόνο παράγοντα για τα κερατινοκύτταρα. Επιπροσθέτως, μπορεί να δρα και έμμεσα ρυθμίζοντας αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους {Chedid, 1994}, {Brauchle, 1994}.

Η συγκέντρωση της IL-6 εμφανίζει δύο μέγιστα κατά τη διάρκεια της επούλωσης. Το πρώτο μέγιστο της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης παρατηρείται 16 ώρες περίπου μετά την επαγωγή του τραύματος για να μειωθεί κοντά στα βασικά επίπεδα μέσα στις πρώτες 24 ώρες {Mateo, 1994}. Το δεύτερο μέγιστο στη συγκέντρωση ξεκινά μετά από 48 ώρες και στη συνέχεια τα επίπεδα της κυτταροκίνης σταδιακά σταθεροποιούνται από την 3 έως την 7 ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος {Mateo, 1994; Kondo, 1996}.

Οι *Il6-/-* μύες εμφανίζουν σημαντικά καθυστερημένη τραυματική επούλωση έως και 15 ημέρες συγκρινόμενοι με τα ζώα αγρίου τύπου {Lin, 2003; Gallucci, 2001}. Τραύματα στους μύες παρουσιάζουν πολλαπλές ατέλειες συμπεριλαμβανομένων της καθυστερημένης επαναεπιθηλιοποίησης, της μείωσης του κοκκιώδους ιστού, της καταστολής της αγγειογένεσης και της σημαντικής τελικά καθυστέρησης στην επούλωση {Gallucci, 2006}. Η εξέλιξη της επούλωσης μπορεί να αναστραφεί με την τοπική χορήγηση rmIL-6 (recombinant mouse IL-6) ή πλασμίδιου που εκφράζει IL-6 στους IL-6-/- μύες {Gallucci, 2000}.

Οι *Il6-/-* μύες εμφανίζουν μικρότερο αριθμό ουδετερόφιλων και μακροφάγων στο τραύμα σε σχέση με τα ζώα αγρίου τύπου {Lin, 2003; Lin, 2003; Hartner, 1997; Fenton, 2002; Smith, 1998; Cole, 2001; Lemay, 2000}. Επιπρόσθετα, οι ανεπαρκείς για την IL-6 μύες παρουσιάζουν μικρότερη εναπόθεση κολλαγόνου στις θέσεις του τραύματος συγκριτικά με τους αγρίου τύπου {Lin, 2003; Lin, 2003}. Τέλος, η έλλειψη της IL-6 φαίνεται να επηρεάζει το μετασχηματισμό των ινοβλαστών σε μυοινοβλάστες {Gallucci, 2006}.

## **Σ**Τ. ΗΡΑ ΑΞΟΝΑΣ ΚΑΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

#### ΣΤ.1. Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση

Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση έχει μελετηθεί εκτενώς. Από έναν μεγάλο αριθμό κλινικών και πειραματικών μελετών έχει προταθεί ότι η εξωγενής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών είναι επιζήμια για την τραυματική επούλωση {Grose, 2002}, γεγονός που αποτελεί μία από τις σοβαρότερες παρενέργειες της χρήσης τους. Επιπροσθέτως, η αύξηση των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα μετά από ενεργοποίηση του άξονα του στρες έχει την ίδια κατασταλτική επίδραση {Padgett, 1998}. Αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών παρατηρούνται σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις που συχνά σχετίζονται με προβλήματα στην τραυματική επούλωση, όπως το σύνδρομο Cushing, η παχυσαρκία, και ο διαβήτης {Bitar, 1998 }.

Η κατασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται κυρίως με την αντιφλεγμονώδη δράση τους {Grose, 2002}. Τα γλυκοκορτικοειδή, σε φαρμακολογικές δόσεις, επηρεάζουν τη φλεγμονώδη φάση της τραυματικής επούλωσης ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών πρωτεϊνών-κλειδιών της φάσης αυτής, όπως προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Στην ίδια συγκέντρωση μειώνουν την διαπερατότητα των αγγείων και επομένως ελαττώνουν τη διαθεσιμότητα χημεοτακτικών ουσιών όπως των λευκοτριενίων Β4 και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 των μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein 1) με επακόλουθο την καταστολή της προσέλκυση ουδετερόφιλων και μακροφάγων στο σημείο του τραύματος. Σε δόσεις που χαρακτηρίζονται ανοσοκατασταλτικές τροποποιούν την ενεργότητα και ταυτόχρονα μειώνουν την παραγωγή ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών από τα μονοκύτταρα όπως προσταγλαδινών, λευκοτριενίων, κολλαγενασών, ελαστασών, τον ενεργοποιητή του πλασμιδογόνου και την ΙL-1. Τέλος μειώνουν την ικανότητα φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα {Beer, 2000}.

Ο Padgett και η ομάδα του έδειξαν ότι η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών στον ορό του αίματος μυών μετά από επαγωγή στρες περιορισμού (restrain stress) καθυστερεί την τραυματική επούλωση κατά 3,1 ημέρες. Η μεγαλύτερη διαφορά στο μέγεθος του τραύματος μεταξύ φυσιολογικών και υπό στρες μυών παρατηρείται νωρίς (1-3 ημέρες) κατά τη διάρκεια της επούλωσης. Η χορήγηση του ανταγωνιστή του υποδοχέα GR, RU486, μία μέρα πριν την εκτέλεση της δοκιμασίας απομόνωσης επαναφέρει τη διαδικασία της επούλωσης στα φυσιολογικά χρονικά πλαίσια {Padgett, 1998}. Επιπρόσθετα πειράματα της συγκεκριμένης ομάδας έδειξαν ότι το στρες προκαλεί αλλαγές στην κινητική της έκφρασης των γονιδίων των IL-1a, IL-1b και KGF κατά τη

διάρκεια των πρώτων 5 ημερών μετά την επαγωγή του τραύματος {Mercado, 2002}. Ένας επιπλέον λόγος που καθυστερεί η επούλωση του τραύματος σε μύες που έχουν υποβληθεί σε στρες κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της επούλωσης είναι ότι η ανοσοκατασταλτική δράση των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την ευπάθεια σε μόλυνση από βακτήρια σε αντίθεση με τις περιπτώσεις που το ανοσολογικό σύστημα είναι ανέπαφο όπου η βακτηριακή πρόκληση αυξάνει τον ρυθμό της τραυματικής επούλωσης {Rojas, 2002}. Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν την κατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στα πρώτα στάδια της τραυματικής επούλωσης που ανήκουν χρονικά στη φάση της φλεγμονής. Ένας πιθανός στόχος των γλυκοκορτικοειδών είναι τα μακροφάγα του ιστού, η δράση των οποίων έχει δειχτεί ότι επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή {De Bosscher, 2009}.

Τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν επίσης αλλαγές στις φάσεις του πολλαπλασιασμού και αναδόμησης μέσω της επίδρασής τους σε παράγοντες που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα στα πρώτα στάδια της επούλωσης καταστέλλονται από τα γλυκοκορτικοειδή και ευθύνονται για τη μετάβαση στις φάσεις αυτές. Πειράματα με υδροκορτικοστερόνη έδειξαν ότι η χρήση της σε υψηλές δόσεις καταστέλλει την αγγειογένεση και την ίνωση (fibroplasia) in vivo και μειώνει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κολλαγόνου από τους ινοβλάστες. Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν την αντοχή εφελκυσμού του τραύματος (wound tensile strength) {Beer, 2000} και καταστέλλουν τη συσταλτική ικανότητα και τη διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών in vivo σε μύες που έχουν υποστεί στρες περιορισμού {Horan, 2005}.

Ο Grose και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση φυσιολογικών συγκεντρώσεων των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση χρησιμοποιώντας μύες οι οποίοι εξέφραζαν έναν μεταλλαγμένο τύπο του υποδοχέα GR ο οποίος δεν είχε την ικανότητα να συνδέεται στο DNA (DNA-binding-defective mutant version of the GR (GR<sup>dim</sup> mice). Οι συγκεκριμένοι μύες παρουσιάζουν ανεπάρκεια στο σηματοδοτικό μονοπάτι των γλυκοκορτικοειδών που ευοδώνεται μέσω των υποδοχέων τους, αλλά διατηρούν την ρυθμιστική ικανότητα των γλυκοκορτικοειδών που δεν προϋποθέτει άμεση σύνδεση στο DNA {Reichardt, 1998}. Η μελέτη αυτών των μυών έδειξε ότι, αντίθετα με τη δραματική επίδραση των εξωγενών γλυκοκορτικοειδών, τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή, όταν βρίσκονται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις φαίνεται να ασκούν κατασταλτική δράση στα αρχικά στάδια της τραυματικής επούλωσης. Μια τέτοια δράση μπορεί να είναι σημαντική σε περιπτώσεις που η φλεγμονώδης αντίδραση είναι ισχυρή, για παράδειγμα σε περίπτωση μολυσμένης τραύματος {Grose, 2002}.

## ΣΤ.2. Ρόλος της CRH και των συγγενών πεπτιδίων στο δέρμα

Τόσο η CRH όσο και η UCN1 έχουν ένα αναγνωρισμένο ρόλο στην παθοφυσιολογία του δέρματος μέσω της δράσης τους στο ανοσολογικό σύστημα του τελευταίου {Slominski, 2000}. Η CRH φαίνεται ότι μπορεί να δράσει είτε ως αντιφλεγμονώδης, είτε ως προφλεγμονώδης παράγοντας στο δέρμα. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, αντιφλεγμονώδεις δράσεις έχουν καταγραφεί σε μοντέλα τραύματος ιστού όπως το τραύμα μετά από χρήση θέρμανσης όπου οι τοπικές ενέσεις CRH έχουν αντιοιδηματική δράση. Ένα άλλο μοντέλο αφορά την φλεγμονή του βλεφάρου από χρήση δοξορουβικίνης (*doxorubicin-induced eye lid inflammation*) που περιορίζεται όταν CRH χορηγηθεί στο βλέφαρο πριν την εφαρμογή του φαρμάκου {Slominski, 2000; Wei, 1993; Wei, 1993; Schafer, 1997}.

Εντούτοις, πλήθος εργασιών καταδεικνύει τον προφλεγμονώδη ρόλο της CRH στην περιφέρεια. Έτσι, μαζί με την UCN1 επάγουν την αποκοκκιοποίηση των ιστιοκυττάρων και επομένως αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων {Zbytek, 2004}. Επιπρόσθετα, ο CRH διαθέτει αντιαναλγητική ικανότητα {Slominski, 2000}.

Πέρα από τον σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη λειτουργία του δέρματος οι CRH και UCN1 φαίνεται να επηρεάζουν και την λειτουργία των κυττάρων του δέρματος. Τα παραπάνω πεπτίδια καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και επάγουν τη διαφοροποίηση τους {Zbytek, 2005}. Επίσης μπορούν είτε να διεγείρουν είτε να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελανώματος ανάλογα τις συνθήκες καλλιέργειας τους {Slominski, 2005}. Ανθρώπινα επιδερμικά μελανοκύτταρα διεγερόμενα από CRH και ACTH εκκρίνουν κορτοζόλη *in vitro* μέσω επαγόμενης από CRH υπερρύθμισης (up-regulation) της μεταγραφής του *POMC* και της επακολουθούμενης παραγωγής ACTH {Slominski, 2005}.

Περισσότερες μελέτες στο δέρμα αφορούν τον κύκλο ανάπτυξης της τρίχας. Τα τριχοθυλάκια του ανθρώπινου δέρματος ανταποκρίνονται σε διέγερση από CRH με λειτουργικές αλλαγές σε σημαντικές παραμέτρους της ανάπτυξης και της χρώσης της τρίχας με εντυπωσιακά παρόμοιο τρόπο με τον HPA άξονα {Ito, 2005}.

# **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ

Η επούλωση τραυμάτων είναι μία σύνθετη διαδικασία η οποία απαιτεί τη συλλογική συνεργασία πολλών διαφορετικών ιστών και κυττάρων. Η συμπεριφορά καθενός από τους επιμέρους τύπους κυττάρων οι οποίοι παίρνουν μέρος στις διάφορες φάσεις της διαδικασίας της επούλωσης τραυμάτων καθώς επίσης και η συνεισφορά των παραγόντων που εκφράζονται στην περιοχή του τραύματος δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Μεταξύ των μορίων που έχει προταθεί ότι παίρνουν μέρος στη διαδικασία αυτή προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και αγγειογενετικοί παράγοντες έχει δειχτεί ότι είναι κύριοι ρυθμιστές της.

Πληθώρα μελετών προτείνουν ότι το δέρμα εκφράζει και παράγει σημαντικό αριθμό νευροπεπτιδίων τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Τα νευροπεπτίδια μπορεί να απελευθερώνονται από νευρικές απολήξεις του ιστού αυτού ή να παράγονται από τα αυτόχθονα κύτταρα. Μεταξύ των νευροπεπτιδίων αυτών συμπεριλαμβάνονται και εκείνα που εμπλέκονται στη λειτουργία του άξονα HPA, τον κυριότερο ενδοκρινικό άξονα που διαμεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες όπως η CRH, και οι υποδοχείς της και η προοπιομελανοκορτίνη. Εντούτοις, η έκφραση των πεπτίδίων αυτών σε τραυματισμένο ιστό κατά τη διάρκεια της επούλωσης και η συμμετοχή τους στη διαδικασία αυτή δεν έχει μελετηθεί ακόμα.

Το μοντέλο μυών στους οποίους έχει αφαιρεθεί γενετικά η CRH (*Crh-/-*) μύες έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της CRH στο στρες συμπεριλαμβανομένων και της φλεγμονώδους αντίδρασης η οποία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την τραυματική επούλωση. Οι *Crh-/-* μύες έχουν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης του mRNA της POMC στην υπόφυση και μολονότι έχουν χαμηλότερα επίπεδα βασικής και επαγόμενης από στρες έκκρισης γλυκοκορτικοειδών δείχνουν ελαττωμένη απόκριση κατά τη διάρκεια δύο διαφορετικών πειραματικών μοντέλων φλεγμονής, αυτό της άσηπτης φλεγμονής επαγόμενης από καραγίνη και αυτό της τοπικής φλεγμονής της επαγόμενης από διαλυτικό. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι *Crh-/*μύες έχουν 2-3 φορές υψηλότερα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών στο πλάσμα μετά από σήψη επαγόμενη από LPS καθώς επίσης και επίπεδα IL-6 μετά από τοπική

Παρά τα καλώς μελετημένα ευεργετικά αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών (του ισχυρότερου ενδογενούς αντιφλεγμονώδους μέσου) κατά τη διάρκεια φλεγμονής, πολλές in vivo και in vitro μελέτες προτείνουν ότι οι ίδιες αυτές ορμόνες όταν χορηγούνται σε φαρμακολογικά επίπεδα, αναστέλλουν την επούλωση τραυμάτων σε ανθρώπους και πειραματικά μοντέλα Πράγματι, μια σειρά πειραματικών και κλινικών μελετών προτείνει ότι παρατεταμένη χορήγηση αντιφλεγμονωδών στεροειδών οδηγεί
# ΣΚΟΠΟΣ

σε καθυστερημένη επούλωση τραυμάτων και πολλαπλές επιπλοκές στη διαδικασία αυτή. Οι δράσεις αυτές πιστεύεται ότι οφείλονται σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναστολή της σύνθεσης κολλαγόνου στους ινοβλάστες και μη επιτυχημένη μετανάστευση των μακροφάγων στην περιοχή του τραύματος. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν μόρια κλειδιά στη διαδικασία της τραυματικής επούλωσης.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω **ο στόχος** της παρούσας διατριβής ήταν η διαλέυκανση του ρόλου της CRH και των γλυκοκορτικοειδών στη διαδικασία της επούλωσης δερματικών τραυμάτων και στην έκφραση των παραγόντων που παίρνουν μέρος σ' αυτήν.

# Βιολογικά Υλικά

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν α) μύες με ανεπάρκεια στην CRH και/ή την IL-6 β) πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών προερχόμενες από δέρμα μυός και ανθρώπου.

#### Εργαστηριακά Ζώα

#### Διατήρηση-Φροντίδα

Οι μύες στεγάζονταν σε κλωβούς πολυπροπυλενίου σε κατάλληλα διαμορφωμένους χώρους στους οποίους επικρατούσαν ελεγχόμενες συνθήκες φωτός (κύκλος φωτός/σκότους 12:12ώρες, με έναρξη των φώτων στις 7:30 π.μ.) και θερμοκρασίας (22±2°C) και διαθεσιμότητα φαγητού και νερού κατά βούληση (*ad libitum*). Οι απόγονοι των διασταυρώσεων απογαλακτίζονταν μετά την 21<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους. Κατά τον απογαλακτισμό γινόταν διαχωρισμός των αρσενικών από τους θηλυκούς μύες και λήψη μικρού τμήματος της ουράς τους για τον έλεγχο του γονότυπου.

Στα πειραματικά πρωτόκολλα τραυματικής επούλωσης που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί μύες ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 9-11 π.μ. και είχαν εγκριθεί από την Επιτροπή Ζωικών Πειραματικών Πρωτοκόλλων του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς επίσης και από το Αρμόδιο τμήμα της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Κρήτης. Κάθε μυς που συμμετείχε στα πειράματα απομονώνονταν σε ξεχωριστό κλωβό τουλάχιστον 24 ώρες πριν την πραγματοποίηση του πειράματος. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας διότι με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο εγκλιματισμός του ζώου και η αποφυγή αύξησης των επιπέδων κορτικοστερόνης στο αίμα προερχόμενης από το στρες εξαιτίας της έκθεσης σε νέο περιβάλλον.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιηθήκαν μύες τεσσάρων διαφορετικών γονοτύπων: αγρίου τύπου (wild type, Wt ή *Crh+/+1L6+/+*), ανεπαρκείς για την CRH (*Crh-/-*), ανεπαρκείς για την IL-6 (*II-6-/-*) και ανεπαρκείς ταυτόχρονα για τις CRH και IL-6 (*Crh-/-II-6-/*). Το γενετικό υπόβαθρο τόσο των ανεπαρκών όσο και των αγρίου τύπου μυών ήταν C57BL6x1291SvJ. Η ταυτοποίηση του γονότυπου των ζώων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR analysis) του γενομικού DNA που απομονώθηκε από την ουρά των ζώων.

#### Crh-/- μύες

Η δημιουργία των *Crh-/-* μυών βασίστηκε στη στοχευμένη διαταραχή των εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού η οποία πραγματοποιήθηκε από τους {Muglia, 1995}. Το στέλεχος διατηρήθηκε με διασταυρώσεις ομόζυγων αδερφών (διασταυρώσεις *Crh-/-* γονέων). Στις έγκυες μητέρες χορηγούνταν 10 μg/ml κορτικοστερόνης (διαλυμένης σε 100% αιθανόλη) μέσω του πόσιμου νερού {Venihaki, 2000} από τη 12<sup>η</sup> ημέρα εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των μικρών. Η φροντίδα των ζώων ακολούθησε τις κλασικές επιταγές ενός τυπικού εργαστηριακού χώρου. Οι μύες με ανεπάρκεια στη CRH ήταν μια ευγενική δωρεά του καθηγητή Joseph A. Majzoub του τμήματος Ενδοκρινολογίας (Division of Endocrinology) του Παιδιατρικού Νοσοκομείου της Βοστόνης (Children's Hospital, Boston, MA, 02115, USA).

#### Il6-/- μύες

Μύες ομόζυγοι για ανεπάρκεια στην ιντερλευκίνη 6 (IL-6) (επίσημο όνομα: B6.129S6-*ll6tm1Kopf*) αποκτηθήκαν από την εταιρεία The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, HΠΑ). Η μετάλλαξη στο γονίδιο της IL-6 δημιουργήθηκε από τους Manfred Kopf και Georges Kohler στο Ινστιτούτου Max Planck της Γερμανίας και βασίστηκε στην στοχευμένη διαταραχή των εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού. Το στέλεχος διατηρήθηκε με διασταυρώσεις ομόζυγων αδερφών. Η φροντίδα των ζώων ακολούθησε τις κλασικές επιταγές ενός τυπικού εργαστηριακού χώρου.

#### Crh-/-Il-6-/- μύες

Μύες ομόζυγοι με ανεπάρκεια στην CRH (*Crh-/-*) διασταυρώθηκαν με ομόζυγους μύες με ανεπάρκεια στην IL-6 (*II-6-/-*). Στη συνέχεια, οι ετερόζυγοι απόγονοι ως προς και τα δύο γονίδια (*Crh+/-II6+/-*) που προέκυψαν διασταυρώθηκαν μεταξύ τους για να δώσουν ομόζυγους μύες με ταυτόχρονη ανεπάρκεια ως προς και τα δύο γονίδια (*Crh-/-II6-/-*) σύμφωνα με τις προβλεπόμενες μεντελικές αναλογίες. Όπως και στην περίπτωση των *Crh-/- μυών*, για την επιβίωση των *Crh-/-II6-/-* νεογέννητων μυών που προέρχονταν από *Crh-/-II6-/-* θηλυκά απαιτήθηκε η χορήγηση κοστικοστερόνης (10µg/ml) στο νερό των εγκύων μητέρων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από τη 12<sup>η</sup> ημέρα εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των μικρών.

### <u>Ιη νίνο πειράματα τραυματικής επούλωσης</u>

Ι. Φαρμακολογικός αποκλεισμός των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών

α. Φαρμακολογικός αποκλεισμός του υποδοχέα των
 γλυκοκορτικοειδών- Πείραμα με RU486

#### Διαλύματα

#### 100mg/ml μιφεπριστόνη (RU486)

Η μιφεπριστόνη διαλύθηκε αρχικά σε 100% αιθανόλη και χρησιμοποιήθηκε, αφού αραιώθηκε σε στείρο PEG-400.

#### Μέθοδος

Αρσενικοί μύες με πλήρη έκφραση της CRH ενέθηκαν ενδοδερμικά με διάλυμα μιφεπριστόνης, ενός μη ειδικού ανταγωνιστή των υποδοχέων τύπου ΙΙ των γλυκοκορτικοειδών, σε αναλογία 25 mg/Kg μία μέρα πριν την επαγωγή του τραύματος. Η δόση επαναλαμβάνονταν καθημερινά μέχρι το τέλος του πειράματος. Ταυτόχρονα, μύες ενέθηκαν με ίσο όγκο πολυαιθυλενογλυκόλης 400 (PEG-400) /αιθανόλης (έκδοχα) και οι ιστοί που παραλήφθηκαν από αυτά τα ζώα, αποτέλεσαν τα δείγματα ελέγχου.

# β. Φαρμακολογικός αποκλεισμός της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια - Πείραμα Φαρμακολογικής επινεφριδεκτομής (PhADx)

#### Διαλύματα

4mg/100μl μετυραπόνης

Η μετυραπόνη ζυγίζονταν την ημέρα πραγματοποίησης των ενέσεων και διαλύονταν σε 10% DMSO σε αναλογία 4mg/100μl/δόση/ζώο.

2mg/100μl αμινογλουτεθυμίνη

Η αμινογλουτεθυμίνη ζυγίζονταν την ημέρα πραγματοποίησης των ενέσεων και διαλύονταν σε 10% DMSO σε αναλογία 2mg/100μl/δόση/ζώο.

#### Μέθοδος

Αρσενικοί μύες με πλήρη έκφραση της CRH ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, δύο φορές την ημέρα, με διάλυμα μετυραπόνης, ενός καταστολέα της 11-β υδροξυλάσης, σε αναλογία 200mg/Kg βάρους σώματος/δόση. Η χορήγηση ξεκίνησε πέντε μέρες πριν την επαγωγή του τραύματος και διήρκησε μέχρι το τέλος του πειράματος. Μία μέρα πριν

την επαγωγή του τραύματος στα ζώα χορηγήθηκαν δύο δόσεις διαλύματος αμινογλουτεθυμίνης, ενός καταστολέα της διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης (cholesterol side-chain cleavage), σε αναλογία 100mg/Kg βάρους σώματος/δόση. Ταυτόχρονα, μύες ενέθηκαν με ίσο όγκο 10% (v/v) DMSO (έκδοχο) και οι ιστοί και αίμα που ελήφθησαν από αυτά τα ζώα, αποτέλεσαν τα δείγματα ελέγχου. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, στα ζώα επιτρέπονταν να πιούν νερό που περιείχε 5% (w/v) δεξτρόζη σε 0,9% (w/v) φυσιολογικό ορό μαζί με το κανονικό πόσιμο νερό και φαγητό.

#### *ΙΙ.* Αποκατάσταση γλυκοκορτικοειδών

#### Διαλύματα

🗥 Διάλυμα 10 mg/ml κορτικοστερόνης

Διαλυμένη σε 100% αιθανόλη. Φυλάσσεται σε σκοτεινό μπουκάλι και σε θερμοκρασία δωματίου

#### Μέθοδος

*Crh-/-* αρσενικοί μύες καθώς και οι αντίστοιχοι συγγενείς τους αγρίου τύπου δέχτηκαν μέσω του πόσιμου νερού τους κορτικοστερόνη σε συγκέντρωση 10 μg/ml. Η χορήγηση ξεκίνησε τέσσερις ημέρες πριν την επαγωγή του τραύματος και συνεχίστηκε μέχρι τη λήξη του πειράματος.

#### Επαγωγή τραύματος

#### Υλικά και συσκευές

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

#### Μέθοδος

Ενήλικες αρσενικοί *Crh-/-*, *Il6-/-*, *Crh-/-Il6-/-* μύες καθώς και οι αντίστοιχοι συγγενείς τους αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία τραύματος εκτομής. Την ημέρα του πειράματος (ημέρα 0), οι μύες αναισθητοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μείγμα αναισθητικών κεταμίνης-ξυλαζίνης στο οποίο είχε προστεθεί το αναλγητικό φεντανίλη. Η δόση του μείγματος καθορίστηκε στα 120 mg/Kg βάρους σώματος μυός κεταμίνη, 8mg/Kg βάρους σώματος ξυλαζίνη και 1μg/Kg βάρους σώματος φεντανίλης. Σε αυτή τη δοσολογία τα ζώα παρέμεναν σε αναισθησία για περίπου μισή ώρα. Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας, δύο διαμπερείς εκτομές τριών χιλιοστών (mm) επάχθηκαν στην πλάτη κάθε ζώου αφού πρώτα είχαν αποτριχωθεί και απολυμανθεί με 70% διαλύματος αιθανόλης. Τα ζώα τοποθετήθηκαν ξανά στα κλουβιά τους και η κατάστασή τους παρακολουθήθηκε μέχρι την πλήρη αφύπνισή τους. Σε κάθε πείραμα βιαφορετικό πειραματισμό και χρονική στιγμή, ενώ το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 2 φορές.

Ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα έγινε λήψη αίματος από τα ζώα μέσω της οπισθοοφθαλμικής φλέβας για τον προσδιορισμό των επιπέδων πλάσματος ορμονών, κυτταροκινών και άλλων παραγόντων. Για τη μέτρηση της περιοχής του τραύματος, οι μύες αναισθητοποιήθηκαν με μείγμα ξυλαζίνης/κεταμίνης και τα τραύματα καλύφθηκαν με ένα διαφανές πλαστικό στο οποίο σημειώθηκε η επιφάνεια του τραύματος. Η μέτρηση της επιφάνειας του τραύματος έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα NIH Image analysis (<u>http://rsb.info.nih.gov/nih-image/</u>). Επιπροσθέτως, τα τραύματα φωτογραφήθηκαν και αναλύθηκε η περιοχή της τραυματισμένης περιοχής χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε καθορισμένα χρονικά σημεία όπως αυτά αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Οι μύες θανατώθηκαν σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (1-8 ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος) με αποκεφαλισμό και ο τραυματισμένος ιστός αφαιρέθηκε μαζί με 1-2 mm περιβάλλοντος ιστού. Ταυτόχρονα, γινόταν λήψη μη τραυματισμένου δέρματος που προερχόταν είτε από ζώα ελέγχου είτε από τα ζώα στα οποία είχαμε επάγει τραύμα. Ο ιστός ψύχονταν ταχύτατα σε ξηρό πάγο ή μονιμοποιούνταν στο κατάλληλο μονιμοποιητικό μέσο ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

#### <u>Καλλιέργεια Κυττάρων</u>

#### Υλικά και συσκευές

- Διάλυμα 10% ιωδιούχου ποβιδόνης: polyvinylpyrrolidone povidone-iodine, εμπορική ονομασία Betadine (Lavipharm, Ελλάδα)
- එ Δισπάση: dispase II (Sigma, ΗΠΑ)
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος ελεύθερο μαγνησίου και ασβεστίου: Dulbecco PBS, D-PBS (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- Διάλυμα 0,25% και 2,5% θρυψίνης/αιθυλενοδιαμινο τετραοξικού οξέος: Trypsin/EDTA (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- Ο Θρεπτικό μέσο για κερατινοκύτταρα τύπου KGM-2 ελεύθερο ασβεστίου (Clonetics BioWhittaker Inc., ΗΠΑ)
- <sup>C</sup> Κιτ παραγόντων απαραίτητων για επιβίωση και ανάπτυξη των κερατινοκυττάρων: bulletkit (Clonetics BioWhittaker Inc., ΗΠΑ)
- 🕆 Κολλαγόνο ουράς επίμυος: rat tail collagen (Roche, Γερμανία)
- <sup>•</sup> Θρεπτικό μέσο τύπου Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- 🗘 Ορός εμβρύου βοός: FBS (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- Διάλυμα αντιβιοτικών: πενικιλίνη (5.000 μονάδων/ml) και στρεπτομυκίνη (5.000µg/ml) (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- 🕑 r/hCRF (Tocris, НПА)
- 🖑 rUCN1 (Sigma-Aldrich, НПА)
- 🖑 mUCN2 (Sigma-Aldrich, НПА)
- 🕆 anti- sauvagine- 30 (ευγενική δωρεά του Dr J.Spiess)
- 🕆 a-helical CRF (Sigma-Aldrich)
- 🕆 antalarmin (ευγενική δωρεά από τον Dr. Chrousos)
- 🖑 Mouse IL-6 antibody, polyclonal goat IgG (R&D Systems, НПА)
- 🕆 Human IL-6 antibody, polyclonal goat IgG (R&D Systems, НПА)
- <sup>4</sup> TGFβ1, 2, 3 antibody, monoclonal mouse IgG<sub>1</sub> (R&D Systems, HΠA)
- <sup>1</sup> Στείρα εργαλεία (ψαλίδια, λαβίδες, βελόνες) διαφόρων μεγεθών (Fisher Scientific, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Φίλτρα κυττάρων μεγέθους οπών 70 μm: Falcon Cell Strainers (BD Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο)
- 🕆 Φίλτρα μεγέθους οπών 0,45μm (Pall Corporation, ΗΠΑ)
- 🕆 Χρωστική Trypan Blue (Seromed Biochrom, Γερμανία)

- 🕆 Διμέθυλο σουλφοξίδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma, ΗΠΑ)
- 🕆 Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Γερμανία)
- 🕆 Πλάκα κυτταρομετρητή (Hausser Scientific, ΗΠΑ)
- 🕆 Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Ιαπωνία)
- 🕆 Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Nikon TMS, Ιαπωνία)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής Aura Verical S.D.4 Series, Down-Flow Cabinet (Bioair-waEuroClone, Ιταλία)
- 🕆 Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., ΗΠΑ).

#### Διαλύματα

#### 🗥 <u>Διάλυμα 1% (v/v) αντιβιοτικών /PBS</u>

Φωσφορικό διάλυμα αλάτων που περιέχει 500 μονάδες πενικιλίνη και 500μg στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα που χρησιμοποιείται.

#### 👚 <u>Διάλυμα 10 μg/ml Δισπάση (dispase II)</u>

Σκόνη δισπάσης που αραιώνεται σε D-PBS. Το διάλυμα παρασκευάζεται την μέρα που χρησιμοποιείται.

#### 👚 Πλήρες θρεπτικό υλικό τύπου DMEM για καλλιέργεια ινοβλαστών

Σε 445ml θρεπτικού μέσου τύπου DMEM προστίθενται 50ml ορού εμβρύου βοός και 5ml διάλυμα αντιβιοτικών. Το υλικό διατηρείται στους 4°C για περίπου ένα μήνα.

#### 👚 <u>Πλήρες θρεπτικό υλικό τύπου KGM-2 για καλλιέργεια κερατινοκυττάρων</u>

Σε 500ml θρεπτικού μέσου τύπου KGM-2 χωρίς ασβέστιο προστίθενται ξεχωριστά οι αυξητικοί παράγοντες του κιτ: επινεφρίνη, τρανσφερίνη, υδροκορτιζόνη, ινσουλίνη, γενταμυκίνη/αμφοτερικίνη, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και εκχύλισμα υπόφυσης βοός. Τέλος, προστίθενται 500μl 0,7M CaCl<sub>2</sub>. Το υλικό διατηρείται στους 4°C για περίπου ένα μήνα.

# Διάλυμα 2 mg/ml κολλαγόνου ουράς επίμυος για επίστρωση πλακών καλλιέργειας κερατινοκυττάρων

Σε 10 mg λυοφιλοποιημένου κολλαγόνου προστίθενται 5 ml 0,2% οξικού οξέος (διαλυμένο σε απιονισμένο νερό). Αφού μείνει μια μέρα στους 4°C για να διαλυθεί πλήρως, το κολλαγόνο είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί. Διατηρείται στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο.

#### 🗥 <u>Διάλυμα 0,5% FBS</u>

Σε 49,75ml D-PBS προστίθενται 250μl ορού εμβρύου βοός (FBS). Το διάλυμα διατηρείται για λίγες μέρες στους 4°C.

- 🖆 Διάλυμα 0,07Μ χλωριούχου ασβέστιου
- 🗥 Διάλυμα 70% (ν/ν) αιθανόλης

#### Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων δέρματος

#### Αποστείρωση δέρματος

#### Μυός

Νεογέννητοι Crh+/+/Il6+/+, Crh-/- και Il-6-/- μύες (μέχρι 3 μερών) θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Στη συνέχεια τα σώματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως και ακολούθησε η αποστείρωση τους με διαδοχικές πλύσεις με 1) διάλυμα 10% ιωδιούχου ποβιδόνης, 2) διάλυμα 1% αντιβιοτικών/PBS 3) 70% αιθανόλης, για 10 min έκαστο. Τελικά, τα σώματα τοποθετήθηκαν σε PBS/1% αντιβιοτικά και διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη στιγμή της τελικής επεξεργασίας τους.

#### Ανθρώπινο

Δείγματα ανθρώπινης ακροποσθίας προερχόμενης από επεμβάσεις περιτομής ή άλλες παρεμφερείς σε υγιή κατά τα άλλα παιδιά τοποθετήθηκαν σε στείρα ποτήρια ζέσεως και ακολούθησε η διαδικασία αποστείρωσης όπως περιγράφηκε για το δέρμα μυός.

#### Διαχωρισμός στιβάδων δέρματος

#### Μυός

Το σώμα κάθε νεογέννητου μυός τοποθετήθηκε σε βακτηριολογικό τρυβλίο προκειμένου να αφαιρεθούν τα άκρα και η ουρά του, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του γονότυπου του ζώου. Το δέρμα απομακρύνθηκε με τη βοήθεια στείρων ψαλιδιών και λαβίδων αποφεύγοντας τον τραυματισμό εσωτερικών οργάνων (π.χ. εντέρου) για την αποφυγή μόλυνσης του δείγματος. Κάθε δέρμα τοποθετήθηκε στον πυθμένα ενός καινούργιου στείρου τρυβλίου και αφέθηκε να στεγνώσει για 10min στον πάγο. Στη συνέχεια, το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε καινούργιο τρυβλίο όπου είχε προστεθεί στείρο διάλυμα 10 mg/ml δισπάσης ΙΙ και επωάστηκε για 15-24 ώρες στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε καινούργιο, στείρο βακτηριολογικό τρυβλίο στο οποίο είχε προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κερατινοκυττάρων (KGM-2) για να απομακρυνθεί η δισπάση ΙΙ. Σε αυτήν την φάση η δερμίδα έχει αποκτήσει ζελατινώδη μορφή, ενώ η επιδερμίδα μοιάζει με ένα λεπτό λευκό ημιδιαφανές φύλλο και ο διαχωρισμός τους είναι πολύ εύκολος. Μετά τον αποχωρισμό των δύο στιβάδων με τη βοήθεια λαβίδων, καθεμιά υπέστη διαφορετική επεξεργασία για την απομόνωση των επιθυμητών κυτταρικών πληθυσμών της.

#### Ανθρώπινο

Ο ιστός τοποθετήθηκε στον πυθμένα ενός στείρου τρυβλίου και με τη βοήθεια ψαλιδιού και λαβίδας αφαιρέθηκε το λίπος. Αφού κόπηκε σε λωρίδες των 0,5cm x 1,5 cm περίπου, τοποθετήθηκε στον πυθμένα ενός καινούργιου στείρου βακτηριολογικού τρυβλίου και αφέθηκε να στεγνώσει για 10min στον πάγο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια είναι η ίδια που αναφέρεται για το δέρμα μυός.

#### Απομόνωση και καλλιέργεια ινοβλαστών

Για την απομόνωση ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο επέκτασης (expansion protocol). Τα τεμάχια της δερμίδας, που προήλθαν από τον ενζυμικό διαχωρισμό ανθρώπινου ή δέρματος μυός, τοποθετήθηκαν σε στείρο βακτηριολογικό πιάτο των 100 mm<sup>2</sup> στο οποίο είχε προστεθεί διάλυμα 2,5% θρυψίνης/EDTA και επωάστηκαν στους 37°C για 20min. Μετά την απενεργοποίηση της θρυψίνης από διάλυμα 0,5% FBS/D-PBS, κάθε τμήμα τοποθετήθηκε στον πυθμένα τρυβλίου ιστοκαλλιέργειας έως ότου προσκολληθεί σε αυτόν. Στη συνέχεια, στο τρυβλίο προστέθηκε πλήρες μέσο καλλιέργειας τύπου DMEM και τα τεμάχια επωάστηκαν για περίπου 5 μέρες. Στο διάστημα αυτό, ινοβλάστες μετανάστευαν από τα τεμάχια στο πιάτο (expansion).

Όταν η καλλιέργεια έφτανε σε επίπεδα πληρότητας 80% ακολουθούσε η διαδικασία μεταφοράς τους σε νέα τρυβλία ιστοκαλλιέργειας (passing). Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, τα κύτταρα στα αρχικά τρυβλία υφίσταντο επώαση με 0,05% θρυψίνης/EDTA για 5 λεπτά στους 37°C. Μετά την απενεργοποίηση της θρυψίνης με πλήρες DMEM, το υλικό μεταφέρονταν σε σωλήνα των 50ml και φυγοκεντρούνταν στις 200xg για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύονταν σε πλήρες DMEM και τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε τρυβλία καλλιέργειας των 100mm<sup>2</sup> σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/cm<sup>2</sup>. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε κάθε φορά που γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων.

# Δοκιμές

#### Ιστολογικές μελέτες

#### Μέθοδος

Το δέρμα με το τραύμα που ελήφθη τεμαχίζονταν μεσο-εγκάρσια σε δύο τμήματα, τοποθετούνταν σε ουδέτερη φορμόλης για 16-24 ώρες για να μονιμοποιηθεί (Rømer *et al.*, 1991) και στη συνέχεια εγκλείονταν σε παραφίνη. Τομές 5μm κόβονταν

κάθετα, διαμήκως του τραύματος με τη βοήθεια μικροτόμου και στη συνέχεια βάφονταν με αιματοξυλίνη/εωσίνη, τριχρωμική Masson, Sirius red ή Giemsa ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιεί το Παθολογοανατομικό Τμήμα του πανεπιστημίου μας.

Η χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη αποτελεί το πιο συχνό πρωτόκολλο ελέγχου ιστολογικών τομών και χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστούν τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του δέρματος. Η αιματοξυλίνη βάφει μπλε τους πυρήνες, ενώ η εωσίνη ροζ ή κόκκινο το κυτταρόπλασμα και τον συνδετικό ιστό {Wu, 1940}. Η δημιουργία ουλώδους ιστού ελέγχθηκε με δύο διαφορετικές ιστολογικές χρώσεις, τη Sirius red και τη τριχρωμική Masson. Στο οπτικό μικροσκόπιο και μετά από χρώση Sirius red οι ίνες κολλαγόνου φαίνονται κόκκινες και τα υπόλοιπα στοιχεία του ιστού ανοικτό κίτρινο {Junqueira, 1979}, ενώ μετά από χρώση Masson, οι ίνες κολλαγόνου και τα οστά βάφονται μπλε ή πράσινα, τα κερατινοκύτταρα και οι μυϊκές ίνες κόκκινες, το κυτταρόπλασμα ροζ και τέλος ο πυρήνας μαύρος. Τέλος, η χρώση Giemsa χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των ιστιοκυττάρων {Toren, 1963}. Κατά τη χρώση Giemsa, τα κύτταρα βάφονται ως ακολούθως: τα κοκκία των ιστιοκυττάρων και τα βασεόφιλα μοβ, τα ηωσινόφιλα ανοικτό ροζ και τα λεμφοκύτταρα μπλε.

#### Ανοσοϊστοχημεία για την ταυτοποίηση των κυττάρων

#### Υλικά-Συσκευές

- Aντίσωμα ενάντια στη βιμεντίνη μυός [Ευγενική προσφορά από τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Στουρνάρα στον οποίο είχε δοθεί από τον Dr. G. Giese (MPI, Ladenburg){Papakonstanti, 1998}
- 🕆 Μονοκλωνικό αντισώμα ενάντια στις κερατίνες (Sigma/Aldrich,ΗΠΑ)
- <sup>•</sup> Πλακίδια με 8 θαλάμους: Lab-Tek<sup>™</sup> Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific, HΠΑ)
- 🕆 Ξυλένιο (Sigma, ΗΠΑ)
- 🕆 Ακετόνη (Sigma, ΗΠΑ)
- 🗘 Ορός αλόγου: Horse serum (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- <sup>•</sup> Μέσο προστασίας του φθορισμού: DABCO, Antifading (Fluka,Sigma/Aldrich,ΗΠΑ)
- 🕆 Hoechst 33258 (Molecular Probes,НПА)

#### Διαλύματα

\land Διάλυμα 0,1% TBS-T

#### Μέθοδος

Για την ταυτοποίηση των κυττάρων που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού που βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές. Συνήθως χρησιμοποιείται 1 ζευγάρι αντισωμάτων: το πρώτο αντίσωμα, που συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο που επιθυμείται να ανιχνευτεί και το δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα και φέρει την χρωστική. Για την ταυτοποίηση των ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα εναντίον της βιμεντίνης, μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων. Αυτή η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για κύτταρα με μεσοδερμική προέλευση, όπως οι ινοβλάστες. Για την ταυτοποίηση των κερατινοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα εναντίον των κερατινών (anti-Pankeratin), δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό ενδιάμεσων ινιδίων στα κερατινοκύτταρα.

Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλακίδια 8 θαλάμων σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/θάλαμο. Αφού καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού για 12-24 ώρες, το θρεπτικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα. Ακετόνη προστέθηκε σε κάθε θάλαμο προκειμένου τα κύτταρα να μονιμοποιηθούν στα πλακίδια τα οποία επωάστηκαν για 15min στους 4°C. Η ακετόνη αφαιρέθηκε προσεκτικά και τα πλακίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα για 5-10min. Ακολούθησαν 2 πλύσεις, μία με διάλυμα PBS και μία με TBS και στη συνέχεια τα πλακίδια επωάστηκαν με 15-20% ορό αλόγου αραιωμένου σε 0,1% (v/v) TBS-T για 20min. Η διαδικασία αυτή σκοπεύει στον αποκλεισμό της σύνδεσης των αντισωμάτων με μη ειδικές θέσεις των πλακιδίων.

Μετά το πέρας της επώασης, τα πλακίδια εκπλύθηκαν με 0,01% (v/v) TBS-T για 1min για να ακολουθήσει επώαση με 1 μl αντισώματος εναντίον της βιμεντίνης {Papakonstanti, 1998} ή της πανκερατίνης αραιωμένο σε 0,01% TBS-T για μία ώρα στους 37°C, ή για 2ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα αραιώθηκε σε 0,1% (v/v) TBS-T και προστέθηκε στους θαλάμους, αφού πρώτα είχαν εκπλυθεί μία φορά με 0,01% (v/v) TBS-T. Ακολούθησε επώαση για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου μετά το πέρας της οποίας τα πλακίδια εκπλύθηκαν με 0,01% (v/v) TBS-T και υπέστησαν χρώση αντίθεσης των πυρήνων (counterstain) με Hoechst 33258 με επώαση για 5min. Τελικά, οι θάλαμοι αφαιρέθηκαν από τα πλακίδια στα οποία προστέθηκε μονιμοποιητικό υλικό (Mounting), τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες και στη συνέχεια εξετάστηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού. Ως δείγμα ελέγχου αποτέλεσαν τομές στις οποίες δεν προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα.

#### Συλλογή αίματος

#### Υλικά και συσκευές

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

#### Μέθοδος

Υπάρχουν διάφορες οδοί για τη συλλογή αίματος από μύες. Ενδεικτικά αναφέρονται η ουραία, η πρόσθια ποδική, η σαφηνής, η σφαγίτιδα και η οπισθιοοφθαλμική φλέβα. Η συλλογή αίματος μπορεί να προκαλέσει μεγάλο στρες στα πειραματόζωα. Η επιλογή λήψης μέσω της οπισθιο-οφθαλμικής φλέβας έγινε γιατί ικανοποιούσε τρεις σημαντικές παραμέτρους:

- Γρήγορη συλλογή αίματος (μέσα σε 20 δευτερόλεπτα από την ακινητοποίηση του ζώου). Αυτό εξυπηρετεί στην όσο το δυνατόν μειωμένη ενεργοποίηση του άξονα του στρες. Για τον ίδιο λόγο επιλέχτηκε να μην γίνει αναισθητοποίηση των ζώων πριν τη λήψη αίματος.
- 2. Συλλογή σχετικά μεγάλης ποσότητας αίματος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους
- 3. Άσηπτες συνθήκες

Η συλλογή του αίματος τις προγραμματισμένες μέρες έγινε κατά κανόνα 1-2 ώρες μετά την έναρξη των φώτων στο δωμάτιο των ζώων για να αποφευχθούν οι διακυμάνσεις στις μετρήσεις των επιπέδων της κορτικοστερόνης εξαιτίας του κιρκάδιου ρυθμού. Κατά τη λήψη του αίματος, ακολουθήθηκε η διαδικασία που φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν. Το αίμα φυγοκεντρούνταν στις 750xg για 10min και σε θερμοκρασία 4°C και το υπερκείμενο (πλάσμα) χωρίζονταν σε σωλήνες και φυλάσσονταν στους -80°C.



(http://www.theodora.com/rodent\_laboratory/blood\_collection.html)

# Ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός (RadioImmunoAssay, RIA) κορτικοστερόνης.

#### Υλικά και συσκευές

<sup>A</sup> Immuchem<sup>Tm</sup> Corticosterone<sup>-125</sup>I RIA kit, (MP Biomedicals, ΗΠΑ) το οποίο περιέχει:

- Διαλύτη στεροϊδών: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος ζελατίνης
  που περιέχει γ-σφαιρίνες κουνελιού (Steroid diluent)
- Αντιορό κορτικοστερόνης που έχει παραχθεί σε κουνέλι (Anticorticosterone)
- Έξι διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων κορτικοστερόνης (25, 50, 100, 250, 500 και 1000ng/ml) (Corticosterone calibrators)
- Διάλυμα κατακρήμνισης: Μείγμα πολυαιθυλενογλυκόλης και αντισώματος έναντι των γ-σφαιρίνών που έχουν παραχθεί σε κατσίκα. (Precipitant solution)
- Παράγωγο κορτικοστερόνης σημασμένο με ραδιενεργό ιώδιο (<sup>125</sup>I)
  (Corticosterone -<sup>125</sup>I derivative)
- Δύο δείγματα ελέγχου, ένα υψηλής και ένα χαμηλής συγκέντρωσης κορτικοστερόνης (Corticosterone controls)

🕆 Μετρητής γ-ακτινοβολίας: 1275 Minigamma (LKB Wallac, Inc., Turku, Φιλανδία)

#### Μέθοδος

Η τεχνική του ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού ανήκει στις τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών όπου μια περιορισμένη ποσότητα ειδικού αντισώματος αντιδρά με την κορτικοστερόνη που είναι συνδεδεμένη με το ραδιοϊσότοπο. Με την προσθήκη μιας μεγαλύτερης ποσότητας μη σημασμένης κορτικοστερόνης ένα αντίστοιχα μειούμενο κλάσμα ραδιοσημασμένης ορμόνης συνδέεται στο αντίσωμα. Μετά από διαχωρισμό της δεσμευμένης από την ελεύθερη ραδιοσημασμένη ορμόνη, η ποσότητα της ραδιενέργειας στο ένα ή και στα δύο κλάσματα υπολογίζεται και χρησιμοποιείται για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης σύμφωνα με την οποία τα άγνωστα δείγματα υπολογίζονται.

Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: 5μl ορού αραιώνονταν σε 1ml διαλύτη στεροειδών. Στη συνέχεια αραιώνονταν τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (25, 50, 100, 250, 500 και 1000ng/ml) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας που παράγει το κιτ.

Στη συνέχεια, σε όλα τα δείγματα προστίθεντο ποσότητα σημασμένου παράγωγου κορτικοστερόνης, ενώ ποσότητα αντι-ορού κορτικοστερόνης προστίθεντο σε όλα τα δείγματα πλην των τυφλών. Τα δείγματα αναδεύονταν και επωάζονταν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθετο διάλυμα

κατακρήμνισης σε όλα τα δείγματα. Μετά από ανάδευση του υλικού, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στις 1000xg για 15 min στους 4°C. Αφού απομακρύνονταν το υπερκείμενο, το ραδιενεργό ίζημα μετρούνταν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η συγκέντρωση της κορτικοστερόνης κάθε δείγματος υπολογίζονταν με βάση τη καμπύλη βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg/dl. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση με τη μέθοδο αυτή είναι 7,7 ng/ml.

#### Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

#### Α) Απομόνωση RNA από κύτταρα και ιστούς

#### Υλικά και συσκευές

- 🕆 Διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης: TRIzol Reagent (Invitrogen, ΗΠΑ)
- 🕆 Ομογενοποιητής: Turrax 25 T-25 (ΙΚΑ® Werke GmbH & Co. ΚG,Γερμανία)
- 🕆 «Ξέστρο» κυττάρων (Cell scraper, Corning & Costar, ΗΠΑ)

#### Μέθοδος

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων κάνει χρήση ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το θειοκυανικό άλας της γουανιδίνης μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και των ριβονουκλεοπρωτεασών (RNases) και απομακρύνει το ριβοσωμικό RNA (rRNA) από τα ριβοσώματα.

### Συλλογή δειγμάτων Ομογενοποίηση ιστών

Ιστοί που είχαν φυλαχθεί στους -80°C μετά το τέλος του πειράματος, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου eppendorf στους οποίους είχε τοποθετηθεί 1ml παγωμένου TRIZOL ανά 50-100 mg ιστού και ομογενοποιήθηκαν.

#### Συλλογή κυτταρικού εκχυλίσματος

Τα κύτταρα προστέθηκαν σε τρυβλία κυτταρικής καλλιέργειας 24 οπών σε συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/cm<sup>2</sup>. Την επόμενη μέρα, το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με καινούργιο που περιείχε τους υπό μελέτη παράγοντες παρουσία ή απουσία ορού και τα κύτταρα επωάστηκαν για καθορισμένα χρονικά διαστήματα που αναφέρονται στα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Μετά το πέρας του πειράματος, το θρεπτικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με παγωμένο PBS. Εν συνεχεία, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε πάγο όπου προστέθηκαν 200μl Trizol ανά οπή και τα δείγματα συλλέχθηκαν και φυλάχτηκαν στους -80°C εφόσον δε συνεχίστηκε η απομόνωση του RNA την ίδια ημέρα.

#### Απομόνωση RNA

Τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 15 λεπτά για να επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Μετά την προσθήκη 200μl χλωροφορμίου ανά 1ml Trizol, το μείγμα αναδεύτηκε έντονα για 15sec και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 20min στα 12.000 x g. Μετά τη φυγοκέντρηση, η υδατική φάση, που περιέχει το RNA, μεταφέρθηκε προσεκτικά σε καινούργιο σωλήνα όπου είχε προηγούμενα προστεθεί 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης ανά 1ml Trizol. Μετά από ανακίνηση, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στους -80°C για 30 λεπτά και μετέπειτα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C στα 12.000 x g για 15 min. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε από τον σωλήνα, και το ίζημα ξεπλύθηκε με την προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης ανά 1ml Trizol και φυγοκεντρήθηκε στους 4°C στις 7.500 x g για 5min. Το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά διαλυτοποιήθηκε σε νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα μετά από θέρμανση στους 65°C για 3min. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για την εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA λαμβάνονται υπόψη οι απορροφήσεις στα 260 nm και στα 280 nm, όπου απορροφούν το RNA και το DNA αντίστοιχα. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων δίνει την καθαρότητα του RNA και πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,5 με 2, ενώ η ποσότητα υπολογίζεται βάση της απορρόφησης στα 260nm (τιμή απορρόφησης 1nm αντιστοιχεί σε 40 μg/ml RNA). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε το Nanodrop (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies, HΠA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για να μετρηθεί η απορρόφηση του διαλύματος.

#### B) Απομόνωση DNA από ουρά μυός

#### Υλικά και συσκευές

- <sup>A</sup> Διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών: Protein Precipitation Solution (Qiagen, ΗΠΑ)
- 🕆 Πρωτεϊνάση Κ: Proteinase K Fungal (Invitrogen, ΗΠΑ)

#### Διαλύματα

👚 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ουράς (tail lysis buffer)</u>

| Υλικά | Τελική Συγκέντρωση |
|-------|--------------------|
| Tris  | 50mM, pH8          |
| EDTA  | 100mM              |
| NaCl  | 100mM              |
| 1%    | SDS                |

Τα παραπάνω συστατικά αναμειγνύονται και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση προστίθενται 10mg/ml πρωτεϊνάσης Κ με τελική συγκέντρωση 5μl/ml διαλύματος λύσης

#### 🗥 Διάλυμα πρωτεϊνάσης K 10mg/ml:

Tris και χλωριούχο κάλιο διαλύονται σε dH20 σε τελική συγκέντρωση 10mM και 20mM αντίστοιχα και το pH ρυθμίζεται στο 8. Αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης (τελικό ποσοστό στο διάλυμα 50% w/w), 10mg πρωτεϊνασης K διαλύονται σε 1ml του διαλύματος αυτού και το υλικό χωρίζεται σε σωληνάρια και αποθηκεύεται στους -20°C.

#### Μέθοδος

Η απομόνωση του DNA από ουρά μυός χρησιμοποιεί τη μέθοδο διάρρηξης (disruption method) που βασίζεται στη χρήση διαλύματος λύσεως που περιέχει SDS και πρωτεϊνάση Κ.

#### Λύση Ουράς

Τμήμα της ουράς μυός μήκους περίπου 5mm τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου eppedorf με 400μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης στο οποίο είχαν προστεθεί 50μl/ml Πρωτεϊνάσης Κ. Στη συνέχεια, το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 55°C και αφέθηκε 12-16 ώρες μέχρι την πλήρη λύση του ιστού. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής το υλικό μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C μέχρι και 1 εβδομάδα.

#### Απομόνωση DNA

Μετά τη λύση του ιστού και την επαναφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, στα διαλύματα προστέθηκε διάλυμα RNάσης I σε τελική συγκέντρωση 50μl/ml και επωάστηκε για μία ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια τα δείγματα ψύχθηκαν και σε καθένα από αυτά προστέθηκαν 200μl διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Μετά από έντονη ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο κάθε δείγματος, που περιείχε και το DNA, μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάριο όπου είχαν προστεθεί 600μl ισοπροπυλικής αλκοόλης. Τα μείγματα αναδεύτηκαν απαλά και το DNA κατακρημνίστηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000 x g για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα εκπλύθηκε με 600μl διαλύματος αιθανόλης 70% v/v, και ακολουθησε φυγοκέντρηση στις 12.000 x g για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε ενέσιμο νερό μετά από θέρμανση στους 55°C για 10 min και φυλάχτηκε στους -20°C μέχρι την ημέρα της πραγματοποίησης PCR.

# Μέθοδος σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA) από ολικό RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription)

#### Υλικά και συσκευές

- 🕆 Ολικό ώριμο mRNA
- 🕆 Thermoscript RT kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:
  - Τυχαία εξαμερή: random hexamers
  - Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H<sub>2</sub>0)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer
  - Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM
  - Διθειοθρειτόλη: DTT, 0.1 M
  - Διάλυμα αναστολέων RΝασών: RNaseOUT, 40 U/μL
  - Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT
- ား ကို θερμοκυκλωτής: Thermal cycler, DNA engine (MJ Research, ΗΠΑ)
- 🕆 Θερμοάντοχα σωληνάρια των 200μl (Corning Inc, ΗΠΑ)

#### Μέθοδος

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

Η αρχική αντίδραση εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA περιελάμβανε την ανάμειξη 1 μg ολικού RNA, 1μl τυχαία εξαμερή και DEPC-H<sub>2</sub>O σε ποσότητα τέτοια ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 10 μl. Το μείγμα επωάστηκε για 5 λεπτά στους 65°C προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή και στη συνέχεια ψύχθηκε στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονταν τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Κατόπιν προετοιμάζονταν το κύριο μείγμα της αντίδρασης το οποίο προστίθεντο στο αρχικό. Για κάθε δείγμα απαιτούνταν 4 μl cDNA buffer (5x), 1 μl DTT, 1 μl RNAse OUT, 1 μl DEPC-H2O, 2μl dNTPs και 1μl ενζύμου Thermoscript. Ακολουθούσε επώαση του δείγματος για 60 min στους 50°C, οπότε υβριδοποιούνταν με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C όποτε και αποδιατάσσονταν τα υβρίδια και απενεργοποιούνταν η αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA είτε χρησιμοποιούνταν αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσονταν στους 20°C.

# Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

#### Υλικά και συσκευές

Συμπληρωματικό DNA (cDNA)

🕆 Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:

- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού: 10X PCR buffer
- Χλωριούχο μαγνήσιο: 50mM MgCl<sub>2</sub>
- Ένζυμο πολυμεράσης: Platinum Taq DNA polymerase, 5 u/μl

🕆 Εκκινητές (primers): παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (1):

| Γονίδιο  | Αλληλουχία εκκινητή<br>νοηματικού κλώνου<br>(Forward) (5'-3') | Αλληλουχίαεκκινητή μη<br>νοηματικού κλώνου<br>(Reverse) (5'-3') | Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού | Μήκος<br>Προϊόντος<br>(ζεύγη<br>βάσεων) | Κύκλοι |
|----------|---|---|---------------------------|---|--------|
| hCRH     | caccctcagcccttggatttc   | gccctggccatttccaagac  | 60                        |   | 35     |
| hCRHR 1a | ggcagctagtggttcggcc   | tcgcaggcaccggatgctc   | 59                        | 272                                     | 40     |
| hCRHR 1b | ggccaggctgcacccattg   | tcgcaggcaccggatgctc   | 59                        | 107                                     | 40     |
| hCRHR 2a | atggacgcggcactgctcca  | cacggcctctccacgaggg   | 57                        | 191                                     | 40     |
| hCRHR 2b | ggggctggccagggtgtga   | cacggcctctccacgaggg   | 59                        | 342                                     | 40     |
| hCRHR 2c | ctgtgctcaagcaatctgcc  | cacggcctctccacgaggg   | 59                        | 300                                     | 40     |
| hbActin  | ccggccagccaggtccaga   | caaggccaaccgcgagaagatg  | 60                        | 214                                     | 25     |
| hColI    | aggacaagaggcatgtctggtt  | ttgcagtggtaggtgatgttctg   |                           |   |        |
| mCRH     | agcccttgaatttcttgca   | aacacgcggaaaaagtta  | 62                        | 201                                     | 40     |
| mCRHR1   | cggagtttggtcatgaggat  | gccgcctacaattacttcca  | 60                        | 310                                     | 40     |
| mCRHR2   | ctggtggctgctttcctgcttttc                                      | atggggccctggtagatgtagtcc  | 60                        |   | 40     |
| mTgfb    | aagtggatccacgagcccaa  | ctgcacttgcaggagcgcac  | 64                        | 245                                     | 35     |
| mCol1    | ctgctgctttctccctcaac  | gactggcgagccttagtttg  | 60                        | 399                                     | 30     |
| mVEGF    | gtacctccaccatgccaagt  | actccagggcttcatcgtta  | 55                        | 229                                     | 35     |
| mIl6     | ccagaacagatttgagag  | ctacatttgccgaagagc  | 60                        | 252                                     | 35     |
| mbActin  | tctctttgatgtcacgcacg  | tcagaaggactcctatgtgg  | 55                        | 500                                     | 25     |

#### Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Kary Banks Mullis το 1984 και αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA in vitro. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αλυσίδων δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων να αποδιατάσσονται και να υβριδίζονται όταν επωάζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Το προϊόν διαχωρίζεται και ταυτοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης.

Πιο συγκεκριμένα, το cDNA που προέκυψε από την αντίδραση RT επωάστηκε παρουσία εκκινητών για το επιθυμητό γονίδιο, μίγματος dNTPs, διαλύματος MgCl<sub>2</sub>, διαλύματος PCR και πολυμεράσης σε τελική συγκέντρωση για κάθε δείγμα:

1Χ ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού 1,5mM MgCl<sub>2</sub> 200μΜ από κάθε dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 200nM νοηματικός εκκινητής 200nM αντι-νοηματικός εκκινητής 1Unit Platinum Taq πολυμεράση

| 1 | μg | cD | NA |
|---|----|----|----|
|---|----|----|----|

Ενέσιμο νερό μέχρι ο τελικός όγκος του μείγματος να γίνει 20μl

Η αντίδραση της PCR περιλάμβανε τις παρακάτω διαδοχικές επωάσεις του μείγματος με τη χρήση θερμοκυκλωτή: **α.** Αποδιάταξη του cDNA στους 95°C, **β.** Υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του cDNA με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-68°C και **γ.** Πολυμερισμός και σύνθεση της αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από τα εκκινητές παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs) και της πολυμεράσης στους 72°C. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές ούτως ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του γονιδίου.

# Ταυτοποίηση γονότυπου μυός με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

#### Υλικά και συσκευές

🕆 Ολικό γενωμικό DNA

🕆 Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) το οποίο περικλείει:

- 2 X Taq PCR master Mix: Μείγμα που περιέχει Taq DNA Polymerase, 2X ρυθμιστικό διάλυμα (2x QIAGEN PCR Buffer), 3 mM MgCl<sub>2</sub> και 400 μM από κάθε dNTP.
- H2O- RNase free: Νερό ελεύθερο από RΝάσες

🕆 Εκκινητές (primers): παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

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

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

Για το γονίδιο της Crh

| 1x Taq PCR master mix   |
|---|
| 600 nM νοηματικού εκκινητή (LM-6)                               |
| 300 nM αντί-νοηματικού εκκινητή αγρίου τύπου (MS-1)             |
| 300 nM αντί-νοηματικού εκκινητή μεταλλαγμένου τύπου (LM-3)      |
| 1 μg DNA  |
| Νερό χωρίς RΝάσες μέχρι το μείγμα να αποκτήσει τελικό όγκο 20μl |

#### Για το γονίδιο της Il-6

1x Taq PCR master mix

200nM νοηματικός εκκινητής

200nM αντί-νοηματικός εκκινητής

1 µg cDNA

Νερό χωρίς RΝάσες μέχρι το μείγμα να αποκτήσει τελικό όγκο 20μl

#### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

#### Υλικά και συσκευές

- 🕆 Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (Life Technologies, ΗΠΑ)
- 🕆 Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης : E431 (Consort, Βέλγιο)
- 🕆 Αγαρόζη (Sigma, USA)
- 🕆 Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma, ΗΠΑ)
- 🕆 Συσκευή UV /Κάμερα: Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- 🕆 Λογισμικό: Molecular Analyst, version 1.4.1 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- 🕆 Λογισμικό: Tina scan, version 2.07d (Raytest, isotopenmessgeräte, Γερμανία)

#### Διαλύματα

#### Διάλυμα ΤΑΕ 50x

| Υλικά          | Τελική Συγκέντρωση |
|----------------|--------------------|
| Tris (pH 8)    | 10nM               |
| EDTA           | 10mM               |
| Οξικό Ασβέστιο | 5nM                |
| NaCl           | 10nM               |

Τα παραπάνω υλικά αναμειγνύονται και το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου.

🗥 Διάλυμα φόρτωσης

| Υλικά                   | Τελική Συγκέντρωση |
|-------------------------|--------------------|
| Tris (pH 7,5)           | 10mM               |
| EDTA                    | 60mM               |
| Γλυκερόλη               | 60% (v/v)          |
| πορτοκαλί της ακριδίνης | 0.15% (w/v)        |
| (Orange G)              | 0,13 /0 (₩/ ٧)     |

Τα παραπάνω υλικά αναμειγνύονται και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί πλήρως η χρωστική. Στη συνέχεια, διηθείται και φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 10mg/ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται με τη διάλυση δισκίου βάρους 10mg σε 1 ml απιονισμένο H<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο.

#### <u>1,5% (w/v) Πήκτωμα αγαρόζης</u>

Μετά την προσθήκη 1,5g αγαρόζης σε 100ml 1x TAE το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται έως ότου μετατραπεί σε διαυγή διάλυμα. Αφού παγώσει στους ~50°C, στο διάλυμα προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 500ng/ml. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε κατάλληλο εκμαγείο (gel tray) στο οποίο ενσωματώνονται χτένια και αφήνεται έως ότου στερεοποιηθεί. Όταν έρθει η στιγμή της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε δεξαμενή ηλεκτροφόρησης (tank) και τα χτένια, που χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργήσουν οπές-πηγάδια στο πήκτωμα, αφαιρούνται.

#### Μέθοδος

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, 12 μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης ή δείκτη γνωστού μοριακού βάρους αναμειγνύονταν με διάλυμα φόρτωσης

και τοποθετούνταν στις οπές του πηκτώματος αγαρόζης. Η συσκευή συνδέονταν με τροφοδοτικό και αφού εφαρμόζονταν σταθερή τάση αφήνονταν ώστε να διαχωριστεί το DNA. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεντο κάτω από λάμπα UV (το DNA είναι ορατό σε αυτήν την περίπτωση με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου), φωτογραφιζόταν με το πρόγραμμα Molecular Analyst και αναλύονταν με το πρόγραμμα Tina scan. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA ήταν εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που ηλεκτροφορούνταν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

# Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς Φάσεως με Σύνδεση Ενζύμου (Enzyme -Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

#### Ομογενοποίηση δέρματος

#### Διαλύματα

🗥 Διάλυμα λύσης:

Tris και χλωριούχο νάτριο διαλύονται σε απιονισμένο νερό με τελική συγκέντρωση 50mM και 150mM αντίστοιχα και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8. Στη συνέχεια προστίθενται:

| Υλικά             | Τελική Συγκέντρωση |
|-------------------|--------------------|
| SDS               | 0,1 % (w/v)        |
| DCA               | 0,5 % (w/v)        |
| NP40              | 1 % (v/v)          |
| Na <sub>3</sub> N | 0,02 % w/v         |

Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση προστίθεται μείγμα αναστολέων πρωτεϊνασών (*Complete, Mini, EDTAfree*, Roche, Ελβετία).

#### Μέθοδος

Ιστοί που είχαν φυλαχθεί στους -80°C μετά το τέλος του πειράματος, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου eppedorf στους οποίους είχε τοποθετηθεί 0,5ml παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και ομογενοποιούνταν. Κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, οι ιστοί βρίσκονταν συνεχώς σε πάγο για να επιβραδυνθεί η δράση των πρωτεϊνασών. Μετά την ομογενοποίηση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 x g για 15min. Τα υπερκείμενα (που περιείχαν τις προς μελέτη πρωτεΐνες) συλλέχθηκαν και φυλάχτηκαν στους -80 °C. Η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford.

#### Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς Φάσεως με Σύνδεση Ενζύμου

#### Υλικά και συσκευές

- <sup>A</sup> Mouse TNF-α/ TNFSF1A DuoSet ELISA Development kit (Quantikine, R&D Systems) το οποίο περιέχει:
  - Αντίσωμα εναντίον του TNF-α μυός ανεπτυγμένο σε κατσίκα (Capture antibody)
  - Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα εναντίον του TNF-α μυός ανεπτυγμένο σε κατσίκα (Detection antibody)
  - Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TNF-α μυός (Standard)
  - Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση χραίνας (Streptanidin-HRP)
- To mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit (Quantikine, R&D Systems) το οποίο περιέχει:
  - Αντίσωμα εναντίον της IL-6 μυός ανεπτυγμένο σε επίμυ (Capture antibody)
  - Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα εναντίον της ΙL-6 μυός ανεπτυγμένο σε κατσίκα (Detection antibody)
  - Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη IL-6 μυός (Standard)
  - Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση χραίνας (Streptanidin-HRP)
- To mouse TGF-β1 DuoSet ELISA Development kit (Quantikine, R&D Systems) το οποίο περιέχει:
  - Αντίσωμα εναντίον του TGF-β1 μυός (Capture antibody)
  - Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα εναντίον του TGF-β1 μυός ανεπτυγμένο σε κοτόπουλο (Detection antibody)
  - Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TGF-β1 μυός (Standard)
  - Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση χραίνας (Streptanidin-HRP)
- To mouse IL-1β DuoSet ELISA Development kit (Quantikine, R&D Systems) το οποίο περιέχει:
  - Αντίσωμα εναντίον του ΙL-1β μυός ανεπτυγμένο σε επίμυ (Capture antibody)
  - Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα εναντίον του ΙL-1β μυός ανεπτυγμένο σε κατσίκα (Detection antibody)
  - Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη IL-1β μυός (Standard)
  - Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση χραίνας (Streptanidin-HRP)

Aπολιπιδιωμένος ορός βοός (Reagent Diluent Concentrate 1, Quantikine, R&D Systems)

🕆 Υπόστρωμα υπεροξειδάσης (Substrate Reagent Pack, Quantikine, R&D Systems)

🕆 Μικροπλάκες για ELISA (Quantikine, R&D Systems )

#### Διαλύματα

👚 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων (Wash Buffer)</u>

0,05% (v/v) διαλύματος του μη ιοντικού απορρυπαντικού Tween-20 σε PBS Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C

**Ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (Blocking Buffer)** Για τον TGF-β

Διάλυμα 5% (v/v) διαλύματος Tween-20 σε PBS με 0,05% (w/v)  $Na_3N$ 

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C

Για την ΙL-1β

Διάλυμα 1% (w/v) διαλύματος BSA σε PBS

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C

🗥 Διαλύτης αντιδραστηρίων (Reagent Diluent)

Για τους ΤΝΓ-α και ΙL-6

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

#### Για τον TGF-β

Διάλυμα 1,4% (v/v) απολιπιδιωμένου ορού βοός σε 0,05% (v/v) διαλύματος Tween-20 σε PBS. Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,2 μm και χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του.

#### Για την ΙL-1β

Διάλυμα 0,1% (w/v) BSA σε 0,05% (v/v) διαλύματος Tween-20 σε ρυθμιστικό διάλυμα άλατος Tris. Το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρου διαμέτρου πόρων 0,2 μm και χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του.

🗥 Διάλυμα υποστρώματος (Substrate Solution)

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

🗥 <u>Διάλυμα παύσης αντίδρασης (Stop Solution)</u>

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

🗥 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα άλατος Tris (Tris-buffered saline)</u>

 Διάλυμα ενεργοποίησης TGF-β Για κυτταρικά υπερκείμενα
 1N HCl αραιωμένο σε απιονισμένο νερό. Για ορό ή πλάσμα αίματος
 Σε 10Μ διαλύματος ουρίας προστίθεται οξικό οξύ τελικής κανονικότητας 2,5Ν.
 Τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου
 Διάλυμα εξουδετέρωσης TGF-β Για κυτταρικά υπερκείμενα
 1,2N NaOH σε 0,5M ρυθμιστικού διαλύματος HEPES Για ορό ή πλάσμα αίματος
 2,7 N NaOH σε 1M ρυθμιστικού διαλύματος HEPES.
 Τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου

#### Μέθοδος

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των ιντερλευκινών TNF-α, IL-6, IL-1β και TGF-β βασίζεται στον ποσοτικό ανοσοενζυματικό προσδιορισμό τύπου «σάντουιτς». Στις τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών χρησιμοποιούνται σημασμένα αντισώματα για την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων. Στην ELISA γίνεται χημική σύνδεση ενός ένζυμου με το αντίσωμα ή το αντιγόνο.

Πιο συγκεκριμένα, πλάκες ELISA 96 οπών επικαλύπτονταν με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του εξεταζόμενου παράγοντα. Την επόμενη μέρα κάθε οπή επωάζονταν για 1 ώρα με διάλυμα που περιείχε περίσσεια μη ειδικής πρωτεΐνης (π.χ. ωολευκωματίνη) για να παρεμποδισθεί οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση πρωτεϊνών με το πλαστικό των οπών. Η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ της υπό μελέτη ουσίας και του ακινητοποιημένου αντισώματος ακολούθησε την προσθήκη δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων καθώς και των άγνωστων δειγμάτων. Η επώαση των δειγμάτων διήρκησε 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή μια νύχτα στους 4°C. Στην περίπτωση του TGF-β, έπρεπε να προηγηθεί μετατροπή της κυτοκίνης σε ανοσοενεργή μορφή πριν προστεθεί στις οπές. Για αυτό το λόγο, τα δείγματα ενεργοποιούνταν παρουσία οξέος που στη συνέχεια εξουδετερώνονταν με προσθήκη βασικού διαλύματος.

Μετά την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου κλάσματος με εκπλύσεις, κάθε οπή επωάστηκε για 2 ώρες με πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τις μετρούμενους παράγοντες το οποίο είναι σημασμένο με βιοτίνη που μπορεί να συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντιγόνο σχηματίζοντας σύμπλοκο μορφής «σάντουιτς». Οι μη προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν με έκπλυση και στις οπές προστέθηκε στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με φυτική υπεροξειδάση που μπορεί να συνδεθεί στο

βιοτυνιλιωμένο δεύτερο αντίσωμα. Το σύμπλοκο που σχηματίστηκε καθίστατο ορατό με την προσθήκη χρωμογόνου, το οποίο είναι ένα άχρωμο υπόστρωμα (τετραμεθυλβενζιδινη) επάνω στο οποίο δρα το ενζυμικό τμήμα της στρεπταβιδίνης για να παραχθεί ένα έγχρωμο (μπλε) προϊόν. Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη θειικού οξέος και την παραγωγή ενός τελικού κίτρινου προϊόντος η ένταση του οποίου μετρήθηκε σε φωτόμετρο ELISA. Η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος μετρήθηκε εκτιμώντας την ποσότητα του εγχρώμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου στα 450nm.

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

# Χρωματογραφία στήλης/ Μικροκολώνα ανάστροφης φάσης C18 (sep-pack) Υλικά

- 🕆 Ακετονιτρίλιο (Merck, Γερμανία)
- 🕆 HCL (Merck, Γερμανία)
- 🖑 Μικροκολώνα SEP-pack C18 (Water associated, MA, ΗΠΑ)
- 🕆 Συσκευή συγκέντρωσης υπό κενό Speed-Vac model SVC-100H (Savant, N.Y.)

#### Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις συχνότερες χρησιμοποιούμενες μεθόδους για απομόνωση πεπτιδίων και άλλων ουσιών ανάλογα με την πολικότητα τους. Για την πραγματοποίηση της τεχνικής ακολουθούνται τα επόμενα βήματα: Αρχικά η κολώνα εκπλύθηκε με 10ml ακετονιτρίλιου και 20ml HCl 0,1N. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνονταν η ενεργοποίηση της και η δημιουργία τέτοιων συνθηκών ώστε η CRH να παρέμενε στη μικροκολώνα. Στη συνέχεια τοποθετούνταν το δείγμα στην κολώνα και στο στάδιο αυτό γίνονταν η κατακράτηση των υδρόφοβων πεπτιδίων. Ακολουθούσε έκπλυση της κολώνας με άλλα 20 ml HCl 0,1N οπότε αποβάλλονταν οι υψηλής πολικότητας, χημικές ενώσεις. Η CRH εκλούονταν με 3ml διαλύματος ακετονιτρίλιου/HCl 0,01N (4:1). Τα δείγματα στη συνέχεια συγκεντρώνονταν σε συσκευή συγκέντρωσης υπό κενό και διατηρούνταν στους -20°C μέχρι της τελικής τους ανάλυσης.

Ενζυμικός ανοσολογικός προσδιορισμός πεπτιδίων (Peptide Enzyme Immunoassay - EIA)

Προσδιορισμός της ανοσοδραστικής εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (I-CRH) σε υπερκείμενα καλλιεργειών ινοβλαστών

#### Υλικά και συσκευές

- Peptide Enzyme Immunoassay (EIA) kit (high sensitivity absorbance) (Peninsula laboratories, Bachem, ΗΠΑ) το οποίο περιέχει:
  - ο Πλάκα 96 οπών επιστρωμένη με αντισώματα
  - Συγκεντρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ενζυμικού ανοσολογικού προσδιορισμού πεπτιδίου (EIA buffer)
  - Λειοφιλοποιημένο αντιορό CRH που έχει παραχθεί σε κουνέλι (Antiserum)
  - ο Λειοφιλοποιημένο δείγμα CRH συγκέντρωσης 1μg/ml (Standard)
  - ο Λειοφιλοποιημένο βιοτυνυλιωμένο ιχνηθέτη (Bt-tracer)
  - Συγκεντρωμένο διάλυμα στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση ραπανιού
  - ο Διάλυμα τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB substrate solution)
  - ο Διάλυμα παύσης αντίδρασης (Stop Solution)

#### Μέθοδος

Η μέθοδος αποτελεί μια ανοσοδοκιμή ανταγωνισμού. Ο αντι-ορός προσδένεται σε αντισώματα που καλύπτουν την πλάκα 96 οπών. Στη συνέχεια, σταθερή ποσότητα βιοτυνυλιωμένου ιχνηθέτη (Bt-tracer) και διαφορετικές συγκεντρώσεις μη σημασμένου πεπτιδίου γνωστής συγκέντρωσης ή δείγματος ανταγωνίζονται για την ειδική σύνδεση στον αντι-ορό. Τέλος, προστίθεται στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση ραπανιού (SA-HRP) η οποία προσδένεται στο συνδεδεμένο βιοτυνυλιωμένο ιχνηθέτη και παράγει ένα διαλυτό χρωματιστό προϊόν μετά από την προσθήκη υποστρώματος. Τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων υπολογίζεται συγκρίνοντας την απορρόφηση που εμφανίζουν με την πρότυπη καμπύλη.



Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: Σε κάθε οπή πλάκας 96 οπών που ήταν καλυμμένη με αντισώματα προστέθηκαν 50μl δείγματος CRH γνωστής ή άγνωστης συγκέντρωσης (που προήλθε από εκχύλιση της CRH από δείγμα καλλιέργειας αφού επαναδιαλύθηκε σε 70μl διαλύματος EIA) και 25μl αντι-ορός. Στις οπές που αποτέλεσαν τα τυφλά δείγματα προστέθηκαν 50μl διαλύτης και 25μl διάλυμα ΕΙΑ. Η πλάκα επωάστηκε στους 4°C για 12-16 ώρες και στη συνέχεια 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε οπή προστέθηκαν 25μl βιοτυνυλιωμένου ιχνηθέτη και η πλάκα επωάστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης και την έκπλυση των οπών πέντε φορές με 300μl διαλύματος ΕΙΑ, σε κάθε οπή προστέθηκαν 100μl στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με HRP και η πλάκα επωάστηκε για άλλη μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ένα δεύτερο βήμα πέντε εκπλύσεων με 300μl διαλύματος ΕΙΑ ακολούθησε και στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl υποστρώματος TMB. Η παρουσία της HRP μετέτρεπε το διαφανές υπόστρωμα σε μπλε. Η διαδικασία αυτή διαρκούσε από 30-60 λεπτά. Η αντίδραση σταματούσε με 100μl 2N HCl ανά οπή και το χρώμα του διαλύματος μετατρέπονταν σε κίτρινο του οποίου η απορρόφηση μετρούνταν σε φωτόμετρο ELISA στα 450nm. Οι απορροφήσεις που πάρθηκαν από τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τη χρήση λογισμικού προσαρμογής καμπύλης (curve fitting software) βάση της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση της CRH στα άγνωστα δείγματα.

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης (Western blot) -Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης

#### Υλικά και συσκευές

- 🕆 Ακρυλαμίδιο (Scharlau, Ισπανία)
- 🕆 Bis-ακρυλαμίδιο: N,N'-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο (Euroclone, Ιταλία)
- TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (SERVA Electrophoresis, Γερμανία)
- 🕆 Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma Chemical Co, ΗΠΑ)
- 🕆 Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Biorad, ΗΠΑ)
- <sup>A</sup> Σύστημα ανάπτυξης χημειοφωταύγειας για ανοσοαποτύπωση: ECL (Amersham ΗΠΑ)
- 🐣 Χαρτί Whatman 3MM (Whatman International Ltd., Αγγλία)
- 🗇 Ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά (Regilait, Γαλλία)

- <sup>A</sup> Νιτροκυτταρίνη: Porablot NCP, Nitrocellulose membrane (Macherey-Nagel, Γερμανία)
- <sup>A</sup> Φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας: Super RX, medical X-ray film (FUJIFILM Corporation, Ιαπωνία)
- ී Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)
- 🕆 Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)
- ឹ Συσκευή εμφάνισης film: X-OMAT 1000 Film Processor (Kodak, ΗΠΑ)

#### Διαλύματα

孢 <u>Διάλυμα λύσης</u>

| Υλικά             | Τελική Συγκέντρωση |
|-------------------|--------------------|
| Tris base         | 50 mM              |
| NaCl              | 150 mM             |
| SDS               | 0.1 % (w/v)        |
| NP40              | 1 % (v/v)          |
| Na <sub>3</sub> N | 0.02 % (w/v)       |

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8 μόνο με Tris και NaCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση προστίθεται μείγμα ειδικών αναστολέων πρωτεασών (*Complete, Mini, EDTAfree* -Κωδικός 04 693 159 001- Roche, Ελβετία).

<u> Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x)</u>

| Υλικά              | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------|--------------------|
| Tris base          | 0,125M             |
| SDS                | 4 % (w/v)          |
| β-μερκαπτοαιθανόλη | 4% (w/v)           |
| γλυκερόλη          | 10% (w/v)          |
| κυανούν της        | 0.0204 (m/m)       |
| βρωμοφαινόλης      | 0,02% (W/V)        |

Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 μόνο με το Tris και στη συνέχεια προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 $^{\circ}$ C.

👚 Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%

| Υλικά           | Τελική Συγκέντρωση |
|-----------------|--------------------|
| Ακρυλαμίδιο     | 29,2% (w/v)        |
| Bis-ακρυλαμίδιο | 0,8% (w/v)         |

Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45μm και φυλάσσεται στους 4 $^{\circ}$ C.

🗥 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Separating gel buffer)</u>

Υδατικό διάλυμα 1.5M Tris.HCl. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

# 🗥 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης (Stacking gel buffer)</u>

Υδατικό διάλυμα 1M Tris.HCl. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) (NH<sub>4</sub>)S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10%

10mg APS διαλύονται σε 1ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα της παρασκευής του πηκτώματος.

### 👚 <u>Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (30ml)</u>

Για την παρασκευή 15 ml πηκτώματος 12% ακρυλαμίδης αναμειγνύονται, με τη σειρά που καταγράφονται, τα παρακάτω υλικά:

| Υλικά                 | Αρχική Συγκέντρωση | Όγκος   |
|-----------------------|--------------------|---------|
| Συγκεντρωμένο διάλυμα | 30%                | 12 ml   |
| ακρυλαμίδης           |                    | 12 111  |
| Ρυθμιστικό διάλυμα    | 1 5 M Tris         | 7 5 ml  |
| διαχωρισμού           | 1,5 10 1115        | 7.5 111 |
| Απιονισμένο νερό      | -                  | 9.9 ml  |
| SDS                   | 10%                | 300µl   |
| APS                   | 10%                | 300µl   |
| TEMED                 | -                  | 12µl    |

Τα υλικά μεταφέρονται γρήγορα στο εκμαγείο για την κατασκευή του πηκτώματος

### <u>Πήκτωμα επιστοίβαξης 5,1% (10ml)</u>

Για την παρασκευή 5 ml πηκτώματος 5,1% ακρυλαμίδης αναμειγνύονται, με τη σειρά που καταγράφονται, τα παρακάτω υλικά:

| Υλικά                 | Αρχική Συγκέντρωση | Όγκος  |
|-----------------------|--------------------|--------|
| Συγκεντρωμένο διάλυμα | 30%                | 850ul  |
| ακρυλαμίδης           |                    | υσυμι  |
| Ρυθμιστικό διάλυμα    | 1M Tris            | 625ul  |
| επιστοίβαξης          | 114 1115           | 025μι  |
| Απεσταγμένο νερό      | -                  | 3,4 ml |

| SDS   | 10% | 50µl |
|-------|-----|------|
| APS   | 10% | 50µl |
| TEMED | -   | 5µl  |

Τα υλικά μεταφέρονται γρήγορα στο εκμαγείο για την κατασκευή του πηκτώματος

🗥 Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10χ

| Υλικά     | Τελική Συγκέντρωση |  |
|-----------|--------------------|--|
| Tris base | 250 mM             |  |
| Γλυκίνη   | 1,96 M             |  |
| SDS       | 1% (w/v)           |  |

Το pH ρυθμίζεται στα 8.3 μόνο με το Tris και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

🗥 Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών:

Για την παρασκευή του διαλύματος, 0,5lt διάλυμα ηλεκτροφόρησης αναμιγνύεται με 1lt μεθανόλη. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται στα 5lt και φυλάσσεται στους 4°C.

▲ <u>TBS-T (10x):</u>

| Υλικά     | Τελική Συγκέντρωση |  |
|-----------|--------------------|--|
| NaCl      | 1,37               |  |
| Tris base | 200µM              |  |
| Tween-20  | 1% (v/v)           |  |

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,6 μόνο με το Tris και το NaCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

🗥 Διάλυμα γάλακτος:

1 g γάλακτος χωρίς λιπαρά διαλύεται σε 20 ml TBS-T (1x). Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

🗥 Διάλυμα χημειοφωταύγειας:

Το διάλυμα περιέχει λουμινόλη και  $H_2O_2$  σε νερό και χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις αραιώσεις που προτείνει ο κατασκευαστής.

#### 🗥 Διάλυμα αφαίρεσης πρωτεϊνών (Stripping buffer)

| Υλικά              | Τελική Συγκέντρωση |  |
|--------------------|--------------------|--|
| Tris base          | 62.5mM             |  |
| β-μερκαπτοαιθανόλη | 100mM              |  |
| SDS                | 2%                 |  |

Το pH ρυθμίζεται στο 6,7 μόνο με το Tris. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.

#### 🗥 Διαλύματα 1<sup>ων</sup> και 2<sup>ων</sup> αντισωμάτων:</sup>

Τα αντισώματα αραιώνονται σε TBS-T (1x) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

| Αντίσωμα           | Εναντίον      | Αναπτύχθηκε σε | Συγκέντρωση που<br>χρησιμοποιήθηκε | Εταιρία                          |
|--------------------|---------------|----------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Μονοκλωνικό        | Ακτίνης μυός  | μυ             | 1:10000                            | Chemicon, НПА                    |
| Πολυκλωνικό        | ΙκΒ-α μυός    | κουνέλι        | 1:100                              | (sc-371),<br>Santa Cruz, НПА     |
| Συνδεδεμένο με HRP | IgG μυός      | αίγα           | 1:10000                            | (IM0817)<br>(Immunotech, Γαλλία) |
| Συνδεδεμένο με HRP | IgG κουνελιού | αίγα           | 1:5000                             | (IM0831)<br>(Immunotech, Γαλλία) |

#### Μέθοδος

Η δοκιμή ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιείται για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών με τη χρήση ενός μη-ραδιενεργού συστήματος εκπομπής φωτός, που μπορεί να ανιχνεύσει πρωτεΐνες που προηγούμενα έχουν ακινητοποιηθεί σε μεμβράνες. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες αποδιάταξης με χρήση SDS, τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, την υβριδοποίησή της με αντίσωμα ειδικό για τον εξεταζόμενο παράγοντα και ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης με σύστημα χημειοφωταύγειας ECL. Το SDS χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικός παράγοντας και επιπλέον προσδίδει στην πρωτεΐνη αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο σχηματίζοντας σύμπλοκα μαζί της σε καθορισμένη κατά βάρος αναλογία 14g SDS/g πρωτεΐνης. Η μέθοδος έχει ευαισθησία 1-10 pg πρωτεΐνης.

# Συλλογή δειγμάτων Ιστός

Ιστοί που είχαν φυλαχθεί στους -80°C μετά το τέλος του πειράματος, τοποθετήθηκαν σε 400μl διαλύματος λύσεως (lysis buffer) και ομογενοποιήθηκαν. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά από τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 12000 × g για 20 λεπτά, φυλάχτηκε στους -80°C. Η ποσότητα της πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τη δοκιμασία Bradford.

#### Κύτταρα

Μετά το πέρας των επιλεγμένων χρονικών περιόδων, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν με τη βοήθεια διαλύματος (lysis buffer) αφού παρέμειναν στον πάγο για 30min. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 × g για 15min, το υπερκείμενο συλλέχτηκε, το οποίο περιέχει τις κυτταρικές πρωτεΐνες και καταψύχτηκε στους -80 °C. Η ποσότητα της πρωτεΐνης καθορίστηκει με τη δοκιμασία Bradford.

#### Προετοιμασία των δειγμάτων

Τριάντα (30) μg ολικής πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος μετουσίωσης (2x sample loading buffer). Για την αποδιάταξη της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης, τα δείγματα βράστηκαν για 5min στους 100°C. Αφού παρέμειναν στον πάγο για 3min, φυγοκεντρήθηκαν για 1min και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών.

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης

Αρχικά, παρασκευάστηκε το πήκτωμα για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών: Μετά την ανάμειξη των υλικών παρασκευής του διαλύματος διαχωρισμού το τελευταίο αφήνονταν να πολυμεριστεί στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, προστίθεντο, στην συνέχεια, το διάλυμα επιστοίβαξης και τοποθετούνταν 'χτένι' για τον σχηματισμό οπών. Όταν ολοκληρώνονταν ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου, τα δείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνταν στις οπές καθώς και ένας δείκτης, ο οποίος αποτελεί δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker). Κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (αρχικά 70V και μετά τη διέλευση των δειγμάτων από το διάλυμα επιστοίβαξης στα 100V), τα δείγματα κινούνταν με βάση το μοριακό τους βάρος μέσα στο πήκτωμα διότι το φορτίο/μονάδα μάζας είναι σταθερό.

#### Μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Όταν ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφορητική διαδικασία, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου απομακρύνθηκε από τη συσκευή και απορρίφθηκε το τμήμα του πηκτώματος επιστοίβαξης. Το πήκτωμα διαχωρισμού, που εμπεριείχε τις πρωτεΐνες, τοποθετούνταν ανάμεσα σε δύο χαρτιά Whatmann, με τρόπο που να εφάπτεται στη νιτροκυτταρίνη. Το «σάντουιτς» που δημιουργήθηκε τοποθετήθηκε σε διχτυωτό πλέγμα το οποίο μεταφέρθηκε στη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στο θετικό πόλο. Κάτω από την επίδραση
# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 0,8 Α για 1 ώρα οι πρωτεΐνες, που φέρουν αρνητικό φορτίο, μεταφέρονταν από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Όταν τελείωνε η διαδικασία της μεταφοράς η μεμβράνη μπορούσε να φυλαχτεί στους 4° C ή να επωαστεί με το κατάλληλο αντίσωμα για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης.

#### Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη

Η μεμβράνη επωάζονταν για 1 ώρα σε 5% διάλυμα ξηρού γάλακτος / TBS-T υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισωμάτων πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Μετά από έκπλυση με TBS-T, η μεμβράνη επωάζονταν με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την υπό εξέταση πρωτεΐνη. Οι συνθήκες επώασης διαφοροποιούνταν ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιούνταν, με συνήθη διάρκεια 12-16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, οι μεμβράνες ξεπλένονταν 3 φορές με TBS-T (1x) για 10min και επωάζονταν με το 2° αντίσωμα. Η επώαση πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα κάτω από συνεχή ανάδευση. Στο τέλος της επώασης, η μεμβράνη ξεπλένονταν 3 φορές με TBS-T (1x) για 15 λεπτά. Για την τελική αντίδραση, η μεμβράνη επωάζονταν με το διάλυμα της χημειοφωταύγειας για 1 λεπτό. Ακολουθούσε έκθεση στο φιλμ και εμφάνιση σε εμφανιστικό μηχάνημα. Η ένταση της κάθε ζώνης ήταν ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και εκτιμούνταν με την χρήση του λογισμικού Tina Scan.

Στις περιπτώσεις που θεωρούνταν αναγκαίο να γίνει ανίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η μεμβράνη επωάζονταν για 30min στους 50°C με το διάλυμα αφαίρεσης των συνδεδεμένων αντισωμάτων (stripping). Ακολουθούσε έκπλυση με TBS-T και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προέκυπταν μετά την ηλεκτροφόρηση της κάθε πρωτεΐνης, οι μεμβράνες επωάζονταν με αντίσωμα ειδικό για μια δομική πρωτεΐνη η οποία δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις στην συγκέντρωση μεταξύ των δειγμάτων (πχ. ακτίνη). Τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως ο λόγος της έντασης της ζώνης της προς μελέτη πρωτεΐνης προς την ένταση της ζώνης της σταθερά παραγόμενης πρωτεΐνης.

# Ηλεκτροφορητική κινητικότητα συμπλόκου σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

# Υλικά και συσκευές

- 🕆 Sephadex G\*2 50 ή 60: Separation Pharmacia dextran (Pharmacia, Σουηδία)
- 🕆 Διηθητικό χαρτί πόρων 3mm (Whatman International Ltd, Αγγλία)
- 🕆 Large Fragment of DNA Polymerase I (Klenow Fragment) (Invitrogen, НПА)

# Διαλύματα

孢 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα Α (διάλυμα λύσης)</u>

| Υλικά | Τελική Συγκέντρωση |
|-------|--------------------|
| Hepes | 10 mM (pH 7.9)     |
| KCl   | 10 mM              |
| EDTA  | 0,1 mM             |
| EGTA  | 0,1 mM             |
| DTT   | 1 mM               |

Το μείγμα φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση προστίθεται μίγμα αναστολέων πρωτεϊνασών (*Complete, Mini, EDTAfree*, Roche).

| Υλικά    | Τελική Συγκέντρωση |
|----------|--------------------|
| Hepes    | 20mM (pH 7.9)      |
| NaCl     | 400mM              |
| Glycerol | 25% (w/v)          |
| EDTA     | 1mM                |
| EGTA     | 1mM                |
| DTT      | 0.5mM              |

👚 <u>Ρυθμιστικό διάλυμα C (διάλυμα απομόνωσης νουκλεοπρωτεΐνων)</u>

Το μείγμα φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση προστίθεται μίγμα αναστολέων πρωτεϊνασών (*Complete, Mini, EDTAfree*, Roche).

🗥 Διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) 1x

| Υλικά             | Τελική Συγκέντρωση |
|-------------------|--------------------|
| HEPES             | 20mM (pH 7.5)      |
| EDTA              | 0.5 mM             |
| MgCl <sub>2</sub> | 5mM                |
| KCl               | 60mM               |
| NP40              | 0.005% (v/v)       |
| glycerol          | 10% (v/v)          |

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| DTT          | 10mM   |
|--------------|--------|
| poly (dI/dC) | 1.5 μg |

▲ <u>10x TBE</u>

| Υλικά      | Τελική Συγκέντρωση |
|------------|--------------------|
| Tris base  | 890mM              |
| Βορικό οξύ | 890mM              |
| EDTA       | 2mM                |

#### <u>6% (w/v) Πήκτωμα ακρυλαμίδης</u>

Τα παρακάτω υλικά αναμείχτηκαν (στον πάγο) με τη σειρά που αναγράφονται:

32ml H<sub>2</sub>O 10ml of 30% Acrylamide 2.5 mM 5x TBE 5ml 50% glycerol 375μl 10% APS 17,5 μl TEMED

Μετά την ανάμειξη των υλικών, το μείγμα μεταφέρεται πολύ γρήγορα στο κατάλληλο εκμαγείο (gel tray) στο οποίο ενσωματώνονται χτένια και αφήνεται έως ότου στερεοποιηθεί. Όταν έρθει η στιγμή της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε δεξαμενή ηλεκτροφόρησης (tank) και τα χτένια, που χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργήσουν οπές-πηγάδια στο πήκτωμα, αφαιρούνται.

#### Απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων

Μετά το τέλος του πειράματος οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε 400μl από το ρυθμιστικό διάλυμα Α. Το ομογενοποίημα έμεινε στον πάγο για 15min και στη συνέχεια προστέθηκαν 25μl 10% (v/v) NP40 κι ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8386 x g για 10min στους 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο που περιέχει το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα καταψύχθηκε στους -80 °C. Στο ίζημα –πυρήνες κυττάρων- προστέθηκαν 50μl από το ρυθμιστικό διάλυμα C και αφέθηκαν για μία ώρα στους 4°C υπό ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000xg για 15 min στους 4°C. Το υπερκείμενο, που περιείχε πλέον τις πυρηνικές πρωτεΐνες, μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο. Μέρος του υλικού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχει με τη δοκιμασία της Bradford ενώ το υπόλοιπο φυλάσσονταν στους -80° C μέχρι την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

#### Σήμανση των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών

Για την παρασκευή του ειδικού για τον NF-κB σημασμένου ανιχνευτή ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Ειδικοί ανιχνευτές για τη θέση πρόσδεσης του NF-κB (5'-ACAAGGGACTTTCCGCTG**GGGACTTTCC**AGGG-3') αναμείχθηκαν σε ίση αναλογία με τελική συγκέντρωση 100 pg/ml και θερμάνθηκαν στους 100°C για δέκα λεπτά και στη συνέχεια το μείγμα αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ολιγονουκλεοτίδια διπλής έλικας που παράχθηκαν με την παραπάνω διαδικασία σημάνθηκαν με [γ-<sup>32</sup>P] CTP. Η σήμανση πραγματοποιήθηκε με επώαση των ολιγονουκλεοτίδιων με το ένζυμο Klenow και την προσθήκη των υπόλοιπων τριών μη σημασμένων δεοξυνουκλεοτιδίων για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ποσότητες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

10ng ολιγονουκλεοτιδίων 5μl από 10x Klenow Dilution Buffer 1μl από 10mM dATP 1μl από 10mM dGTP 1μl από 10mM dTTP 5μl dCT<sup>39</sup>P 1μl από 0,5 U/μl Klenow Fragment Νερό μέχρι τελικό όγκο 50μl

Ο διαχωρισμός του σημασμένου ανιχνευτή από τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια έγινε με φυγοκέντρηση του μείγματος μέσα από κολώνα Sephadex G-50. Οι αναμενόμενες κρούσεις ήταν 20000-30000 cpm/μL

# Προετοιμασία δειγμάτων

Πυρηνικό εκχύλισμα, συγκέντρωσης 40μg πρωτεΐνης επωάστηκε μέσα σε διάλυμα σύνδεσης τελικού όγκου 35μl, στο οποίο προστέθηκαν 4μl 10<sup>5</sup>cpm σημασμένου ανιχνευτή, σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Για τον ανταγωνισμό της σήμανσης χρησιμοποιήθηκε επίσης 100 φορές μεγαλύτερη ποσότητα μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου 10 min πριν την προσθήκη του αντίστοιχου σημασμένου.

# Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν (3-4 ώρες στα 150V) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% (σε διάλυμα ηλεκτοφόρησης TBE 0.25x), όπου διαχωρίστηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια στα οποία είχε προσδεθεί ο μεταγραφικός παράγοντας (σύμπλεγμα DNA-πρωτεΐνης) από το ολιγονουκλεοτίδια που παρέμειναν ελεύθερα. Αφού τοποθετήθηκε σε χαρτί whatman, το πήκτωμα αφυδατώθηκε υπό κενό και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ μέχρι την επομένη στους -80° C, οπότε και πραγματοποιήθηκε η εμφανίστηκε του.

# Δοκιμασία Sircol

# Υλικά και συσκευές

🕆 Sircol Soluble Collagen Assay kit (Biocolor life science assays):

- Χρωστική που περιέχει Sirius Red σε πικρικό οξύ (Sircol Dye)
- Αλκαλικό διάλυμα 0,5Μ καυστικού νατρίου (NαOH)(Alkali Reagent )
- Αλατοδιαλυτός παράγοντας κατακρήμνισης κολλαγόνου (Precipitation Reagent)
- 🕆 Φωτόμετρο για μέτρηση πλακών με φίλτρο στα 540nm

# Διαλύματα

<u>Διάλυμα 0,5Μ οξικού οξέος (CH₃COOH)</u>

#### Μέθοδος

Η δοκιμή Sircol αποτελεί ποσοτική μέθοδο μέτρησης κολλαγόνου μέσω της δέσμευσης του σε χρωστική. Είναι κατάλληλη για την ανάλυση κολλαγόνων διαλυτών σε οξέα που απομονώνονται από ιστούς θηλαστικών και κολλαγόνων ή απελευθερώνονται στο μέσο καλλιέργειας από κύτταρα θηλαστικών σε *in vitro* καλλιέργειες. Ο παράγοντας Sircol περιέχει τη χρωστική Sirius Red ή αλλιώς Direct Red 80. Αποτελεί μία ανιονική χρωστική με πλευρικές ομάδες σουλφονικού οξέος (*sulphonic acid side chain groups*). Αυτές οι ομάδες αντιδρούν με τις ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των βασικών αμινοξέων που είναι παρόντα στο μόριο του κολλαγόνου. Η ειδική συγγένεια της χρωστικής με το κολλαγόνο κάτω από τις πειραματικές συνθήκες βασίζεται στο γεγονός ότι τα επιμηκυμένα μόρια της χρωστικής ευθυγραμμίζονται παράλληλα με τη μακριά, άκαμπτη δομή των φυσικών κολλαγόνων που διαθέτουν άθικτη οργάνωση τριπλής έλικας. Η χρωστική δεσμεύεται ειδικά στην ελικοειδή δομή [Gly-X-Y]n που συναντάται σε όλους τους τύπους κολλαγόνων. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση κολλαγόνων θηλαστικών τύπου Ι και V.

# Συλλογή δειγμάτων Ιστός

Το δέρμα ομογενοποιήθηκε σε 1 ml 0,5M οξικού οξέος παρουσία αναστολέων πρωτεινασών (*Complete, Mini, EDTAfree,* Roche). Το ομογενοποίημα επωάστηκε για 12-16 ώρες υπό ανάδευση στους 4°C. Την επόμενη μέρα το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 x g και στους 4°C για 10min και το υπερκείμενο φυλάχτηκε στους -80°C μέχρι την ημέρα της εκτέλεσης της δοκιμής κολλαγόνου. Η ποσότητα της πρωτεΐνης καθορίστηκε με τη δοκιμασία Bradford.

# Κυτταρικό εκχύλισμα

Ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 οπών σε συγκέντρωση 400.000/οπή για 12-18 ώρες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν οι επιθυμητές επιδράσεις υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού (3-5%FBS) και τα κυτταρικά υπερκείμενα συλλέχθηκαν σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000xg για 5min, μεταφέρθηκαν σε καινούργια σωληνάρια και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της δοκιμής. Ταυτόχρονα συλλέχθηκαν και τα κύτταρα προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης με την δοκιμασία Bradford για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

#### Δοκιμασία Sircol

Για τη μέτρηση κολλαγόνου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, 100μl δείγματος προστέθηκαν σε 1000μl χημικής χρωστικής Sircol και επωάστηκαν για 30-35min στους 25°C υπό συνεχόμενη ανάδευση. Ταυτόχρονα δείγματα ελέγχου γνωστής συγκέντρωσης κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Μετά την φυγοκέντρηση, στις 10.000xg για 10min, τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1ml 0,5M NaOH μετά από έντονη ανάδευση. Τελικά, 200 μl αλκαλικού διαλύματος χρωστικής μεταφέρθηκαν σε πλάκα 96 οπών και φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 540nm με φωτόμετρο μέτρησης ELISA.

# Συστολή Πλέγματος Πηκτώματος Κολλαγόνου (Free Floating Gel Matrix -Collagen Gel Lattices Contraction)

#### Υλικά και συσκευές

- 🕆 Κολλαγόνο ουράς επιμύος: rat tail collagen (Roche, Γερμανία)
- 🕆 Πλάκες καλλιέργειας 24 οπών (Corning & Costar, ΗΠΑ)
- 🕆 Κάμερα: Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- 🕆 Λογισμικό: Molecular Analyst, version 1.4.1 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό ImageJ Software v. 1.32 που προέρχεται από το Εθνικό Ίδρυμα Υγείας (National Institutes of Health, Bethesda, MD) και διατίθεται δωρεάν στον ιστότοπο http://rsb.info.nih.gov/ij/.
- ◆ Portable Lightbox (Apollo, Court, NY).

#### Διαλύματα

🕭 <u>1M NaOH</u>

#### Μέθοδος

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος μέτρησης κυτταρικής συσταλτικότητας είναι αυτή της επιπλέουσας μήτρας που βασίζεται στο γεγονός ότι τα πλέγματα κολλαγόνου συρρικνώνονται με το χρόνο. Η μέτρηση της μείωσης του γεωμετρικού σχήματος του κολλαγόνου παρέχει μια έμμεση ποσοτικοποίηση της συσταλτικότητας αυτών των κυττάρων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα της συστολής είναι ο κυτταρικός τύπος, η κυτταρική πυκνότητα, η θερμοκρασία της καλλιέργειας, η συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, η συγκέντρωση του κολλαγόνου και η παρουσία παραγόντων.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, κυτταρικό αιώρημα όγκου 458 μl που περιέχει 300.000 κύτταρα αναμείχτηκε ταχύτατα με 140μl κολλαγόνου ουράς επίμυος (αρχικής συγκέντρωσης 5μg/ml) και 2μl 1Μ NaOH και ακολούθησε προσεκτική ανάμειξη του υλικού για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Από το παραπάνω μείγμα 500μl μεταφέρθηκαν πολύ γρήγορα σε πλάκα 24 οπών. Αφού επιτράπηκε στη μήτρα να πήξει (η διαδικασία αυτή απαιτεί επώαση για περίπου 60min στους 37°C μέσα στον επωαστικό κλίβανο), προστέθηκαν στην οπή 500μl θρεπτικού και οι μήτρες αποσπάστηκαν από τα τοιχώματα της οπής. Αφού κατέστη σίγουρο ότι η μήτρα είχε αποκολληθεί από την οπή, η πλάκα καλλιεργειών επιστρέφονταν στον επωαστικό κλίβανο. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα η πλάκα απομακρυνόταν από τον επωαστήρα και τοποθετούνταν πάνω σε φωτεινό κουτί (light box). Με τη χρήση κάμερας που βρισκόταν σε σταθερή απόσταση από την πλάκα λαμβάνονταν

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

φωτογραφίες. Ο βαθμός και ο ρυθμός της συστολής των πηκτωμάτων στα διάφορα χρονικά διαστήματα αξιολογούνταν με τον υπολογισμό της επιφάνειας του πηκτώματος μέσω των φωτογραφιών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονταν ως % της αρχικής περιφέρειας του πηκτώματος.

#### Υπολογισμός ποσότητας πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford

#### Υλικά και συσκευές

- <sup>4</sup> Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 : Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies)
- 🕆 Μικροπλάκες 96 οπών με επίπεδο πυθμένα (Costal, ΗΠΑ)
- 🕆 Φωτόμετρο για μέτρηση πλακών (Microplate Reader, Model 550, Biorad)

#### Διαλύματα

#### 1mg/ml ορολευκωματίνης βόος

Σε 10ml απιονισμένου νερού προστίθενται 10mg BSA. Το μείγμα αναδεύεται καλά, φιλτράρεται μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45μm, χωρίζεται σε σωλήνες του 1,5ml και φυλάσσεται στους -20°C.

#### Μέθοδος

Η δοκιμασία Bradford {Bradford, 1976} αποτελεί μια φασματοσκοπική αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού κυτταρικών πρωτεϊνών (ολικών, μεμβρανικών, κυτταροπλασματικών ή πυρηνικών). Βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant blue G-250 υπάρχει σε δύο διαφορετικές μορφές που μπορούν να διακριθούν εξαιτίας του διαφορετικού χρώματος που εμφανίζουν, κόκκινο και μπλε. Η σύνδεση της χρωστικής στις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας προκαλεί μετατροπή του κόκκινου χρώματος σε μπλε και μετατόπιση του μέγιστου απορροφήσεως της χρωστικής από τα 365nm σε υψηλότερο μήκος κύματος, 595nm, που μπορεί να προσδιορισθεί με φωτομετρία. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm είναι ανάλογη της ποσότητας της δεσμευμένης χρωστικής και επομένως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που είναι παρούσα στο δείγμα. Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεΐνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ορολευκωματίνης βόος.

Σε μικροπλάκα 96 οπών με επίπεδο πυθμένα τοποθετήθηκαν 160μl ανά οπή από κάθε γνωστό και άγνωστο δείγμα εις τριπλούν και προστεθήκαν 40μl ανά οπή του διαλύματος χρωστικής. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.) σε μήκος κύματος 595nm σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης και εκφράστηκε σε μονάδες mg/ml.

# In vitro δοκιμή τραυματικής επούλωσης με δημιουργία εγκάρσιας τομής Υλικά και συσκευές

Mικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Leica DM IRBE, Visitron Systems, GMBH, SPOT)

#### Διαλύματα

#### 👚 <u>0.5 mg/ml μιτομυκίνη C</u>

Η μιτομυκίνη διαλύεται σε απιονισμένο νερό και φυλάσσεται στους 4°C για λίγες ημέρες.

#### Μέθοδος

Η *in vitro* δοκιμή τραυματικής επούλωσης με δημιουργία εγκάρσιας τομής αποτελεί μια καλά αναπτυγμένη μέθοδο χαμηλού κόστους για τη μέτρηση της μεταναστευτικής ικανότητας κυτταρικών πληθυσμών *in vitro*. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι μετά τη δημιουργία μίας εγκάρσιας τομής (scratch), σε μία καλλιέργεια που αναπτύσσεται σε μονό επίπεδο και είναι πλήρης, τα κύτταρα από τα όρια του νεοσχηματισμένου ανοίγματος κινούνται προς το κενό χώρο για να κλείσουν την τομή μέχρι να δημιουργηθούν ξανά νέες συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Τα βασικά βήματα της μεθόδου είναι η δημιουργία τομής σε μια μονοστίβαδη καλλιέργεια, η λήψη φωτογραφιών στην αρχή και σε τακτικά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης και τέλος η σύγκριση των φωτογραφιών για τον υπολογισμό του μεταναστευτικού ρυθμού των κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών μέχρι να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια. Την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα αποξέστηκαν σε ευθεία γραμμή με ρύγχος των 200μl δημιουργώντας 3 εγκάρσιες τομές ανά οπή. Στη συνέχεια, οι οπές ξεπλένονταν δύο φορές με στείρο διάλυμα φωσφορικών αλάτων για να απομακρυνθούν τα κύτταρα που είχαν αποκολληθεί και τελικά προστίθεντο θρεπτικό υλικό χωρίς ορό με τον υπό εξέταση παράγοντα {Liang, 2007}. Σε ένα δεύτερο σετ πειραμάτων τα κύτταρα προ-επωάζονταν για δύο ώρες με 5μg/ml μιτομυκίνης, ένα

αντιβιοτικό που καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πριν την επαγωγή της τομής. Οι φωτογραφίες (8 ανά οπή, 2 οπές ανά συνθήκη) λαμβάνονταν στις 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά την δημιουργία της τομής και επεξεργάζονταν με τη βοήθεια του λογισμικού Image J. Κατά την ανάλυση, μετρούνταν η συνολική περιοχή που δεν είχε καλυφθεί από κύτταρα, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα και ο μεταναστευτικός ρυθμός υπολογίζονταν από τον τύπο:

# $(A_{t0}-A_t)*100/A_{t0}$

 $(A_{t0}=\pi\epsilon\rho_{t0})$  τη στιγμή της δημιουργίας της τομής,  $A_t=\pi\epsilon\rho_{t0}$  μετά από χρόνο t)



Προσδιορισμός της αποπτώσεως - Χρώση με Annexin V και ιωδιούχο προπίδιο σε κυτταρικές καλλιέργειες και κυτταρομετρική ανάλυση ροής (FACS)

# Υλικά- Συσκευές

- To κιτ της δοκιμής με Ανεξίνη (BD Biosciences Pharmingen, San Diego,ΗΠΑ) που περιέχει:
  - ο Ανεξίνη 5 σημασμένη με φλουορεσκεΐνη fluorescein: FITC Annexin V
  - ο Διάλυμα ιωδιούχου προπίδιου: Propidium Iodide (PI) Staining Solution,
  - 10x διάλυμα πρόσδεσης ανεξίνης (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl2, 2,5 mM CaCl2, pH 7,4) : 10x Annexin V Binding Buffer
- 🕆 Κυτταρομετρητής Beckton-Dickinson FACSArray (Beckton-Dickinson, Franklin
- 🕑 Lakes, NJ)
- Software προγράμματα CELLQuest (Beckton-Dickinson) και ModFit LT (Verify Software, Topsham, MN)

#### Διαλύματα

🗥 <u>Διάλυμα 0,5% FBS</u>

#### Μέθοδος

Μια από τις μεθόδους μέτρησης της απόπτωσης και της νέκρωσης των κυττάρων πραγματοποιείται με χρώση των κυττάρων με Annexin V και ιωδιούχο προπιδίο και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της Annexin V να δεσμεύεται στα φωσφολιπίδια φωσφατιδυλοσερίνης, τα οποία κατά την κυτταρική απόπτωση μεταφέρονται από το εσωτερικό στρώμα λιπιδίων της μεμβράνης στο εξωτερικό. Η έκθεση των μορίων φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της απόπτωσης, επομένως η Annexin V-FITC σημαίνει τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τελικά στάδια της απόπτωσης ή τα νεκρά, είναι θετικά σε ιωδιούχο προπίδιο, επειδή, όντας διαπερατή η μεμβράνη τους, επιτρέπει στο ιωδιούχο προπίδιο να εισέρχεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται και χρωματίζει το γενετικό υλικό.

Η μέθοδος της κυτταρομετρικής ανάλυσης ροής χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό κυττάρων σε ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά. Ο κυτταρομετρητής ροής λειτουργεί ως εξής: Τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα μπροστά από μια δέσμη φωτός, συνήθως από ένα laser, και κατατάσσονται ανάλογα με δύο παραμέτρους: α. Τα μορφολογικά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που προκαλούν σκέδαση της δέσμης φωτός, και, β. Την εκπομπή φθορισμού από χημικές ενώσεις που υπάρχουν μέσα στα κύτταρα.

Για την εκτέλεση της μεθόδου συγκεκριμένα, τα κύτταρα στρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 12 οπών σε συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/οπή. Την επόμενη ημέρα το θρεπτικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε καινούργιο με ή χωρίς ορό παρουσία ή απουσία των προς μελέτη ουσιών. Μετά από 24, 48 και 72 ώρες, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με χρήση αραιού διαλύματος θρυψίνης (0,05% θρυψίνης/EDTA) που απενεργοποιήθηκε με 0,5%FBS/PBS. Σε σύντομο διάστημα, έγινε έκπλυση δύο φορές με PBS συνοδευμένη από φυγοκέντρηση σε 200-400 x g για 2min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διάλυμα πρόσδεσης όπου προστέθηκαν 400 μl του διαλύματος πρόσδεσης και τα δείγματα εξετάστηκαν εντός μίας ώρας με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSArray και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα CELLQuest και ModFit LT.

#### Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

# Α) Δοκιμή ενσωμάτωσης θυμιδίνης (thymidine incorporation test)

# Υλικά και συσκευές

- Τριτιωμένη θυμιδίνη: Methyl-[3H]-Thymidine- Specific Activity 1mMCi (Amersham-Pharmacia, Buckinghabshire, Αγγλία)
- 🕆 Υγρό σπινθηρισμού: Scintillation fluid (Sigma Fluor, Sigma)
- 🕆 Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (Sarstedt, Γερμανία)
- Φίλτρα ινών υάλου 1822849, grand GF/C, 102x254mm, (Whatman International Ltd., Αγγλία))
- 🕆 Μηχανή «θερισμού» : Skatron Harvester (Molecular Devises, ΗΠΑ)
- Mετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer, Foster City, CA) με απόδοση 60% στο <sup>3</sup>H.

# Μέθοδος

Ο ρυθμός σύνθεσης DNA σε ένα κύτταρο αντανακλά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του. Η μέθοδος ενσωμάτωσης θυμιδίνης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων και πραγματοποιείται με τη χρήση ραδιενεργού θυμιδίνης της οποίας μετράμε το ρυθμό ενσωμάτωσής της στο νεοσυντιθέμενο DNA διαιρούμενων κυττάρων. Αφού τα κύτταρα λυθούν και περάσουν από φίλτρο για να απομακρυνθεί η μη δεσμευμένη ραδιενέργεια, η ενσωματωμένη θυμιδίνη μετράται με τη χρήση μετρητή β-ακτινοβολίας.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 οπών επίπεδου πυθμένα, σε συγκέντρωση 8.000 κύτταρα/οπή για 24 ώρες κι έπειτα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού με νέο, παρουσία ή απουσία ορού, το οποίο περιείχε τους υπό εξέταση παράγοντες. Την τελευταία μέρα του πειράματος, στο θρεπτικό προστέθηκε 1μCi [<sup>3</sup>H]thymidine/οπή και τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub> για τις επόμενες 16 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, οι πλάκες καταψύχτηκαν στους -80°C μέχρι τη μέρα συλλογής του DNA.

Το DNA συλλέχτηκε με τη βοήθεια φίλτρων τύπου glass-fiber μέσω «θεριστή» πλακών 96 οπών ( 96-well plate cell harvester ). Τα φίλτρα, που αντιπροσώπευαν κάθε οπή, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια υγρού σπινθηρισμού των 6ml και σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 3ml υγρό σπινθηρισμού. Η ποσότητα ραδιενέργειας που είχε ενσωματωθεί στο DNA μετρήθηκε με τη χρήση μετρητή β-ακτινοβολίας.

# B) Δοκιμή ΜΤΤ

#### Διαλύματα

# 🕭 Διάλυμα ΜΤΤ:

Το MTT διαλύεται σε PBS σε συγκέντρωση 5 mg/ml και στη συνέχεια διηθείται πριν τη χρήση, για να αποστειρωθεί και να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα σωματίδια. Επειδή είναι φωτοευαίσθητο, φυλάσσεται σε σκοτεινή φιάλη στους 4 °C.

#### Μέθοδος

Η δοκιμή με MTT {Denizot, 1986} αποτελεί εναλλακτική μέθοδο προσδιορισμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς χρησιμοποιείται ευρέος για τον έλεγχο της τοξικότητας ενός χημικού/φαρμακολογικού παράγοντα. Είναι μια ποσοτική χρωματομετρική μέθοδος που στηρίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου (MTT) σε κρυσταλλική ένωση. Ο μεταβολισμός γίνεται στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων με χρήση του ενζύμου ηλεκτρική δεϋδρογενάση (succinate-dehydrogenase). Η συγκέντρωση των κρυστάλλων που παράγονται είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Οι παραγόμενοι από την αντίδραση μπλε κρύσταλλοι είναι υδροφοβικής φύσεως και διαλύονται σε οργανικό διαλύτη (DMSO, διάλυμα όξινης αιθανόλης, διαλύματος SDS/υδροχλωρικού οξέος) δίνοντας διάλυμα κόκκινου χρώματος, η ένταση του οποίου μετράται με φωτόμετρο ELISA σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η μέγιστη απορρόφηση εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και με καλή επαναληψιμότητα, δεδομένου ότι η τυπική απόκλιση (SD) της απορρόφησης κυμαίνεται στο ±5%.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα προστέθηκαν σε πλάκες 96 οπών επίπεδου πυθμένα, σε συγκέντρωση 8.000 κύτταρα/οπή. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις πλάκες για 24 ώρες κι έπειτα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού με νέο, παρουσία ή απουσία ορού, το οποίο περιείχε τους υπό εξέταση παράγοντες. Στο τέλος των επιλεγμένων χρόνων επώασης των παραγόντων, που εξαρτώνται από τον κυτταρικό κύκλο και την επίδραση των παραγόντων, το υλικό καλλιέργειας απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 100μl διαλύματος θρεπτικού/MTT τελικής συγκέντρωσης 0,5 mg/ml. Τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37 °C και 5% CO2 για τις επόμενες 4 ώρες, διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονταν μπλε κρύσταλλοι εντός των ζωντανών κυττάρων, των οποίων τα μιτοχόνδρια είναι ενεργά. Μετά το πέρας των 4 ωρών, το MTT αφαιρέθηκε και σε κάθε οπή προστέθηκαν 100μl DMSO. Το υλικό αναδεύτηκε έντονα, για να διαλυθούν οι κρύσταλλοι, και η ένταση του χρώματος μετρήθηκε σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 595 nm. Τα δείγματα σε κάθε πείραμα εξετάζονταν εις τετραπλού.

# Μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης

# Υλικά - Συσκευές

- <sup>4</sup> [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>0</sup>-σωβαζίνη 2200 Ci (81.4 TBq)/mmol (NEN Life Science Products, ΗΠΑ).
- 🕆 Απροτινίνη, Aprotinin (Sigma, ΗΠΑ).
- 🕆 Βακιτρακίνη, Bacitracin (Sigma, ΗΠΑ).
- 🗘 Πολυαιθυλενιμίνη, PEI (Merck, USA).
- <sup>1</sup> Σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
- 🕆 Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Γερμανία).
- 🕆 Φίλτρα ινών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., Αγγλία).
- 🕆 Συσκευή διήθησης: Cell Harvester (Brandel, ΗΠΑ).
- 🕆 Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Germany).
- Μετρητής γ ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland), απόδοσης 80%

# Διαλύματα

🕭 <u>Διάλυμα Α:</u>

| Υλικά   | Τελική Συγκέντρωση |
|---|--------------------|
| NaCl  | 137 mM             |
| KCl   | 2,7 mM             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 4,3 mM             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1,47 mM            |
| EDTA  | 2 mM               |

Το pH ρυθμίζεται στο 7,3 στους 37°C

# 🕭 Διάλυμα Β:

| Υλικά                                | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------------|--------------------|
| HEPES                                | 20 mM              |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> 0 | 10 mM              |
| EGTA                                 | 2 mM               |
| απροτινίνη                           | 0,93 μg/ml         |
| βακιτρακίνη                          | 0,2 mg/ml          |

Το pH ρυθμίζεται στο 7,1 στους 4°C

# 🕭 Διάλυμα Γ:

| Υλικά                                | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------------|--------------------|
| HEPES                                | 20 mM              |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> 0 | 10 mM              |
| EGTA                                 | 2 mM               |
| BSA                                  | 0,1%               |
| απροτινίνη                           | 0,93 μg/ml         |
| βακιτρακίνη                          | 0,2 mg/ml          |

To pH rubmizetai sto 7,1 stous 20°C

# 🕭 Διάλυμα Δ:

| Υλικά   | Τελική Συγκέντρωση |
|---|--------------------|
| NaCl  | 137 mM             |
| KCl   | 2,7 mM             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 4,3 mM             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1,4 mM             |
| Triton X-100  | 0,01%              |

Το pH ρυθμίζεται στο 7,1 στους 4°C

# Μέθοδος

Ινοβλάστες προερχόμενοι από δερμίδα μυών καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 οπών μέχρι η πυκνότητα τους να φτάσει 100% περίπου. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού τα κύτταρα πλύθηκαν πολύ γρήγορα με ρυθμιστικό διάλυμα Α, αποκολλήθηκαν με τη χρήση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15 ml και τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 x g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα του ιζήματος επαναιωρήθηκαν σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Β και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή Polytron για 10-15 δευτερόλεπτα, στις 20000 στροφές/λεπτό στους 4°C. Τα μεμβρανικά ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 16000 x g για 10 λεπτά στους 4°C και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Γ, ομογενοποιήθηκαν όπως παραπάνω και χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλες αραιώσεις για τα πειράματα Όγκος 50 μl από τα μεμβρανικά ομογενοποιήματα επωάστηκε σε δέσμευσης. σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention), με 350-400 pM <sup>[125</sup>]]-Τγr<sup>0</sup>-σωβαζίνης, απουσία (ολική δέσμευση) ή παρουσία αυξανομένων συγκεντρώσεων ραδιοσημασμένης Tyr<sup>0</sup>-σωβαζίνης ή παρουσία μη 500nM Αστρεσσίνης-2B (ευγενική δωρεά από τον Dr. Spiess), ή 1000nM ανταλαρμίνης

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

(ευγενική δωρεά από τον Dr. Chrousos) σε τελικό όγκο 100μL. Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 20 - 22°C για 2 ώρες με ήπια ανάδευση (30 αναδεύσεις/λεπτό). Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα από την ελεύθερη [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>0</sup>-σωβαζίνη, έγινε με διήθηση μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934, σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα είχαν προηγουμένως επωαστεί για μια ώρα σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης 0,3% στους 4°C. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα πλύθηκαν τρεις φορές με 0.5 ml (τη φορά) διαλύματος Δ και μετρήθηκαν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια ώστε η ειδική δέσμευση να ήταν ίση ή μικρότερη του 10% της ολικής δέσμευσης. Η ειδική

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δέσμευσης αναλύθηκαν με μη γραμμική ανάλυση (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 και οι τιμές IC<sub>50</sub> υπολογίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο ύπαρξης ενός πληθυσμού θέσεων δέσμευσης (one-site competition model).

#### Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού ΑΜΡ

#### Υλικά-Συσκευές

- 🕆 Πολυ-L-λυσίνη, Poly-L-lysine (Fluka, Switzerland).
- \*H-cAMP [2,8-3H] Adenosine-3'-5'-cyclic phosphate ammonium salt (43,0 Ci/mmol Amersham, UK).
- 🕆 Εκχυλίσμα ΡΚΑ
- 🕆 Υγρό σπινθηρισμού
- 🕆 Φίλτρα ινών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., Αγγλία).
- 🕆 Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (SARSTEDT, Γερμανία).
- 🕆 Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
- <sup>4</sup> Μετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer LS1801, Foster City,CA, USA) με απόδοση 60% στο <sup>3</sup>H.

#### Μέθοδος

Ινοβλάστες επιστρώθηκαν σε πλάκες 6 οπών και καλλιεργήθηκαν ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90%. Μετά από 16-24 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στις πλάκες το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 500 μl διαλύματος choline/sucrose και τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα σε κλίβανο επώασης, θερμοκρασίας 37°C. Στο τέλος της επώασης προστέθηκαν στα κύτταρα άλλα 250 μl διαλύματος choline/sucrose χωρίς (βασικά επίπεδα) ή με

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

250nM CRH, 1000nM ανταλαρμίνης ή 1000nM αστρεσίνης-2B και η επώαση συνεχίστηκε για ακόμα 30 λεπτά στους 37°C. Στο τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και μετά τη πρόσθεση κρύου διαλύματος TCA 3% τα κύτταρα έμειναν σε πάγο για 30 λεπτά, ομογενοποιήθηκαν για 4 sec και στη συνέχεια τα ομογενοποιήματα των κυττάρων καταψύχθηκαν σε - 80°C. Μετά από 1-3 ημέρες πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα στάδια του πειράματος, ξεκινώντας με απόψυξη των ομογενοποιημάτων και φυγοκέντρηση τους για 10 λεπτά στα 1700g στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης 100 μl από τα υπερκείμενα διαλύματα αναμίχθηκαν (σε νέα πλάκα 96 οπών ) με διάλυμα 6 μl 2N NαOH και μέρος (20 μl) των μιγμάτων αυτών επωάστηκε για 2,30-3,30 ώρες στους 4°C και σε τελικό όγκο 500 μl μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα CAQ, <sup>3</sup>H-cAMP και PKA. Παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες και γνωστές συγκεντρώσεις κυκλικού AMP (100 pmole, 30 pmole, 10 pmole, 3 pmole και 1 pmole) με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης που χρησίμευσε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κυκλικού AMP στα άγνωστα δείγματα.

Στο τέλος της επώασης τα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων ινών υάλου (Glass Microfibre Filters AH934, Whatman International Ltd., England) σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα που προηγουμένως είχαν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό, μετά τη διήθηση εκπλύθηκαν τρεις φορές με συνολικά 3 ml διαλύματος B (10 mM Tris - HCl, 120 mM NaCl, pH 7,4 στους 4°C) και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 3 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid), έγινε ανακίνηση των δειγμάτων και μετά από 3-24 ώρες μετρήθηκαν σε μετρητή β ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 50%.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του κυκλικού AMP για τα άγνωστα δείγματα έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων κυκλικού AMP γνωστής συγκέντρωσης. Οι τιμές  $EC_{50}$  υπολογίστηκαν με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism v.4.0, GraphPad Software Inc., USA).

#### Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία απλής ανάλυσης της μεταβλητότητας (one-way ANOVA). Κάθε πείραμα επαναλαμβανόταν τουλάχιστο τρεις φορές με σκοπό τον περιορισμό του τυπικού σφάλματος. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Excel και SPSS. Τα error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν το (±) SEM.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ CRH ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

# <u>Ανίχνευση των mRNA της CRH και των υποδοχέων της σε φυσιολογικό και σε</u> τραυματισμένο δέρμα μυών αγρίου τύπου

Πληθώρα δεδομένων, κυρίως από μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα προτείνουν ότι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί του δέρματος εκφράζουν το γονίδιο της CRH και των συγγενών προς αυτήν πεπτιδίων καθώς και των υποδοχέων τους {Slominski, 2001}. Παρόλα αυτά η συμμετοχή των παραπάνω παραγόντων στη διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης δεν έχει εκτιμηθεί μέχρι σήμερα. Προκειμένου, λοιπόν, να μελετήσουμε το ρόλο της CRH στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήσαμε τους Crh-/- μύες και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με εκείνα που ελήφθησαν από τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ή αγρίου τύπου (Crh+/+). Πρωταρχικό και απαραίτητο βήμα στις μελέτες μας ήταν να διαπιστωθεί αν η CRH και οι υποδοχείς της εκφράζονται σε δέρμα φυσιολογικών μυών κατά τις διάφορες φάσεις της τραυματικής επούλωσης. Για τον σκοπό αυτό ελήφθησαν βιοψίες φυσιολογικού δέρματος καθώς επίσης και βιοψίες τραυμάτων μυών αγρίου τύπου από τις οποίες απομονώθηκε RNA το οποίο υποβλήθηκε σε αντίδραση RT-PCR. Το cDNA που σχηματίστηκε από την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της CRH με τη χρήση ειδικών εκκινητών όπως αναφέρεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Ως θετικό δείγμα ελέγχου για το mRNA της CRH χρησιμοποιήθηκε RNA που απομονώθηκε από εγκέφαλο μυός, ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε RNA που απομονώθηκε από δέρμα Crh-/- μυός. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 το mRNA της CRH ανιχνεύεται τόσο σε φυσιολογικό δέρμα όσο και σε βιοψίες δέρματος που ελήφθησαν την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος φυσιολογικών μυών (στήλες 1 και 3 αντίστοιχα) ενώ όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρήθηκε έκφραση της CRH σε δέρμα που ελήφθη από Crh-/- μύες (στήλη 2).



#### Εικόνα 1

Έκφραση της CRH σε φυσιολογικό και τραυματισμένο δέρμα ενήλικου μυός. Η μελέτη της έκφρασης του mRNA της *Crh* σε φυσιολογικό και σε τραυματισμένο δέρμα την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR. **1**: Φυσιολογικό δέρμα *Crh+/+* μυός, **2**: Φυσιολογικό δέρμα *Crh-/-* μυός, **3**: Βιοψία από τραυματισμένο δέρμα *Crh+/+* μυός, **4**. Βιοψία από τραυματισμένο δέρμα *Crh-/-* μυός, **5**: Θετικό δείγμα ελέγχου (RNA προερχόμενο από εγκέφαλο *Crh+/+* μυός), **6**: Αρνητικό δείγμα ελέγχου RT-PCR (χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση-no RT), **7**: Αρνητικό δείγμα ελέγχου PCR (χωρίς cDNA)

Παράλληλα ελέγχθηκε η έκφραση του mRNA των υποδοχέων της CRH σε φυσιολογικό και τραυματισμένο δέρμα μυός. Ως θετικό δείγμα ελέγχου για το mRNA του CRF1 χρησιμοποιήθηκε RNA που απομονώθηκε από εγκέφαλο μυός ενώ για τον CRF2, RNA που απομονώθηκε από καρδιά μυός. Είναι γνωστό από παλαιότερες εργασίες, ότι το δέρμα του μυός εκφράζει το mRNA και των δύο υποδοχέων της CRH (CRF<sub>1</sub> και CRF<sub>2</sub>) {Slominski, 2004}. Τα αποτελέσματά μας πράγματι επιβεβαίωσαν την έκφραση των Crf1 και Crf2 στο φυσιολογικό δέρμα των μυών αγρίου τύπου (εικόνα 2, στήλη 1). Παράλληλα, για πρώτη φορά, δείχθηκε η έκφραση των ίδιων υποδοχέων και στο φυσιολογικό δέρμα των Crh-/- μυών (εικόνα 2, στήλη 2). Στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση των υποδοχέων σε βιοψίες τραυματισμένου δέρματος μυός που ελήφθησαν την πρώτη και τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, η έκφραση του Crf1 καταστέλλεται την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος στους Crh+/+ μύες και επανέρχεται την τρίτη ημέρα (στήλες 3 και 5 αντίστοιχα) φαινόμενο που παρατηρείται και στις βιοψίες τραυματισμένου δέρματος που ελήφθησαν από τους Crh-/- μύες, αλλά σε μικρότερο βαθμό(στήλες 4 και 6 αντίστοιχα). Σε αντίθεση με τον  $Crf_1$ , η έκφραση του  $Crf_2$  ήταν σταθερή και τις δύο ημέρες που εξετάστηκαν και στους δύο γονοτύπους (στήλες 3-5).



#### Εικόνα 2

Έκφραση των υποδοχέων της CRH σε φυσιολογικό και τραυματισμένο δέρμα ενήλικου μυός. Η μελέτη της έκφρασης των mRNA των υποδοχέων της CRH σε φυσιολογικό και τραυματισμένο δέρμα (πρώτη και τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος) *Crh+/+* και *Crh-/-* μυών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR. **1**: Φυσιολογικό δέρμα *Crh+/+* μυός, **2**: Φυσιολογικό δέρμα *Crh-/-* μυός, **3**,**5**: Βιοψίες από τραυματισμένο δέρμα *Crh+/+* μυός την πρώτη και τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος, αντίστοιχα, **4**,**6**: Βιοψίες από τραυματισμένο δέρμα *Crh-/-* μυός την πρώτη και τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος, αντίστοιχα, **7**: Θετικό δείγμα ελέγχου (RNA προερχόμενο από εγκέφαλο μυός για τον *Crf*<sub>1</sub>, RNA προερχόμενο από καρδιά μυός για τον *Crf*<sub>2</sub>) **8**: Αρνητικό δείγμα ελέγχου RT- PCR (χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση-no RT), **9**: Αρνητικό δείγμα ελέγχου PCR (χωρίς cDNA)

#### <u>Οι Crh-/- μύες παρουσιάζουν επιταχυμένη τραυματική επούλωση</u>

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης CRH στην τραυματική επούλωση, δύο κυκλικές τομές διαμέτρου 3mm πλήρους πάχυνσης πραγματοποιήθηκαν στην πλάτη αναισθητοποιημένων μυών με ή χωρίς ανεπάρκεια στη CRH. Για να υπολογιστεί ο ρυθμός επούλωσης του τραύματος ελήφθησαν φωτογραφίες των τραυμάτων για χρονικό διάστημα 8 ημερών από την επαγωγή τους, στις οποίες μετρήθηκε η περίμετρος και η επιφάνεια του τραύματος με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης εικόνας NIH Image analysis Software.



#### Εικόνα 3

**Ρυθμός τραυματικής επούλωσης των** *Crh-/-* μυών συγκριτικά με τους *Crh+/+* μύες. Η συνολική επιφάνεια κάθε τραύματος **(A)** υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού NIH Image analysis Software όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. **(B)** Οι *Crh-/-* μύες παρουσίασαν σημαντική (P<0,05) επιτάχυνση της τραυματικής επούλωσης από τη δεύτερη έως και την πέμπτη ημέρα συγκρτικά με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου μύες. Οι μετρήσεις της επιφάνειας του τραύματος κάθε μυ ανά ημέρα έχουν εκφραστεί ως % της αρχικής επιφάνειας του τραύματος. Το διάγραμμα απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα [n=πέντε ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων (P<0,05)].

Ως θετικό δείγμα ελέγχου του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν μύες ανεπαρκείς για την ΙL-6 για τους οποίους είναι γνωστό ότι η τραυματική επούλωση καθυστερεί σημαντικά μέχρι και 8 ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος {Gallucci, 2000}. Όπως φαίνεται από τις εικόνες 3 και 4 οι ανεπαρκείς για την CRH μύες παρουσίασαν σημαντικά επιταχυνόμενη μείωση της επιφάνειας του τραύματος έως την πέμπτη ημέρα μετά την επαγωγή του σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς μύες.

Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων δεν παρατηρήθηκε μετά την πέμπτη ημέρα. Όπως ήταν αναμενόμενο οι ανεπαρκείς για την IL-6 μύες παρουσίασαν επιβραδυνόμενη τραυματική επούλωση συγκρινόμενη με αυτή των μυών αγρίου τύπου (εικόνα 4).



Ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος

Εικόνα 4

**Ρυθμός τραυματικής επούλωσης των Crh-/- μυών συγκριτικά με τους Crh+/+ και IL-6-/μύες.** Η συνολική επιφάνεια κάθε τραύματος μετρήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού NIH Image analysis Software όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι Crh-/- μύες (•) παρουσίασαν σημαντική (P<0,05) επιτάχυνση της τραυματικής επούλωσης την τρίτη ημέρα σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου (Crh+/+II6+/+). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι IL-6-/-(•) μύες παρουσίασαν σημαντική (P<0,05) επιβράδυνση της τραυματικής επούλωσης κατά τις πρώτες ημέρες σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου. Το διάγραμμα απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα [n=τέσσερα ζώα ανά ομάδα.\*, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0,05) μεταξύ Crh+/+/II6+/+ και Crh-/- ή IL-6-/- αντίστοιχα].

#### Επιταχυμένη επαναεπιθηλιοποίηση του τραύματος στους Crh-/- μύες

Η τραυματική επούλωση χαρακτηρίζεται ως ένα πολύπλοκο φαινόμενο το οποίο περιλαμβάνει διακριτές αλλά ταυτόχρονα άρρηκτα συνδεδεμένες διαδικασίες. Η επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας που παρατηρήθηκε στους *Crh-/-* μύες μπορεί να είναι αποτέλεσμα επαγωγής ή/και καταστολής ορισμένων από αυτές τις διαδικασίες. Προκειμένου να διερευνήσουμε τα αίτια της ταχύτερης επούλωσης του τραύματος στους *Crh-/-* μύες, πραγματοποιήσαμε ιστολογικές χρώσεις σε τομές προερχόμενες από φυσιολογικό και τραυματισμένο δέρμα που ελήφθησαν την 1<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα από ζώα και των δύο γονοτύπων. Η εκτίμηση των τομών πραγματοποιήθηκε από παθολογοανατόμο ο οποίος αγνοούσε την ταυτότητα των τομών.

Για να εξεταστούν τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του δέρματος χρησιμοποιήθηκε η χρώση αιματοξυλίνη/εωσίνη η οποία αποτελεί την πιο συχνή χρώση για τη μελέτη ιστολογικών τομών. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το φυσιολογικό δέρμα των *Crh-/-* μυών δεν διέφερε από αυτό των *Crh+/+*, όσον αφορά το πάχος της επιδερμίδας, τον αριθμό των στοιβάδων των κερατινοκυττάρων, τον αριθμό των τριχών και τη συχνότητα εμφάνισης των εξαρτημάτων (*εικόνα 5Α.1*).



104



B. Ημέρα 1



40X



|                | Crh <sup>+/+</sup> | Crh∕- | Crh <sup>-/-</sup> (+Cort) |
|----------------|--------------------|-------|----------------------------|
| Φλεγμονή       | +                  | ++    | +                          |
| Ινοβλάστες     | +                  | +     | + +                        |
| Κολλαγόνο      | +                  | ++    | ++                         |
| Επιθηλιοποίηση | +                  | +++   | +                          |

Γ. Ημέρα 3



Δ. Ημέρα 5

#### Εικόνα 5

Ιστολογική εκτίμηση φυσιολογικού και τραυματισμένου δέρματος. Τομές από φυσιολογικό (A.1) και το μέσο δερματικών τραυμάτων εκτομής σε Crh+/+, Crh-/- με ή χωρίς χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (B.1,2) 1<sup>η</sup>ς (Γ.1,2) 3<sup>η</sup>ς και (Δ1,2) 5<sup>η</sup>ς ημέρας τομές μετά την επαγωγή του τραύματος βάφτηκαν με H&E. Επιπρόσθετα, τομές φυσιολογικού (A.2) και τραυματισμένου δέρματος 5<sup>η</sup>ς ημέρας (Δ.3) βάφτηκαν με τριχρωμική Masson. Οι πίνακες παρουσιάζουν την ιστολογική εκτίμηση παθολογοανατόμου που αγνοούσε την ταυτότητα των τομών. Ε: Επιδερμίδα, Εφ: εφελκίδα Δ: Δερμίδα, Κ: κοκκιώδης ιστός, Μ: μυώδες πλάτυσμα, Υ υποδερμίδα, Φ: Φλεγμονώδης ιστός. Τα βέλη στα Γ και Δ απεικονίζουν τα όρια του νεοσχηματισμενου επιθηλίου. Χρησιμοποιήθηκαν φακοί 10x και 40x.

Εντούτοις, το φυσιολογικό δέρμα των *Crh-/-* μυών περιείχε μεγαλύτερη πυκνότητα ινών κολλαγόνου σε σχέση με εκείνο των *Crh+/+ (εικόνα 5A.2)*. Παρόλα αυτά, ομογενοποίηματα φυσιολογικού δέρματος δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του κολλαγόνου μεταξύ των δύο γονοτύπων όπως εκείνη υπολογίστηκε με τη δοκιμή SIRCOL (*εικόνα* 6).



**Περιεχόμενο κολλαγόνου σε ομογενοποιήματα φυσιολογικού και τραυματισμένου** δέρματος. Επίπεδα κολλαγόνου, όπως αυτά μετρήθηκαν με τη δοκιμή SIRCOL σε ομογενοποιήματα **A**) φυσιολογικού και **B**) τραυματισμένου δέρματος, το οποίο ελήφθη πέντε ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος και από τους δύο γονότυπους. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι τα συνολικά τριών πειραμάτων, οι τιμές είναι κανονικοποιημένες προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης των ομογενοποιημάτων και έχουν εκφραστεί ως προς το μέσο όρο των μετρήσεων που ελήφθησαν από τους *Crh+/+* μύες ανά πείραμα [n=επτά ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων (P<0,05)].

Επιπρόσθετα, η παθολογοανατομική εκτίμηση των τομών έδειξε ότι οι *Crh-/*μύες εμφανίζουν στοιχεία προχωρημένης φλεγμονής την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς μύες (*εικόνα 5Γ.1*). Οι *Crh-/-* μύες εμφανίζουν επίσης ταχύτερη επαναεπιθηλιοποίηση από την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος (*εικόνα 5Γ.1*), η οποία ολοκληρώνεται την πέμπτη ημέρα, με τη συνένωση των χειλών του επιθηλίου (*εικόνα 5Δ.1*). Αντίθετα, στους *Crh+/+* μύες, η επαναεπιθηλιοποίηση δεν είχε ολοκληρωθεί ακόμα την πέμπτη ημέρα (*εικόνα 5Δ.1*).

Η δημιουργία ουλώδους ιστού ελέγχθηκε με τις χρώσεις Sirius red και Masson τριχρωμική. Η παρατήρηση των τομών που είχαν βαφτεί με οποιαδήποτε από τις δύο χρωστικές (στην εικόνα 5Δ.3 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές τομές βαμμένες με τριχρωμική Masson) δεν έδειξε διαφορές στην πυκνότητα των ινών κολλαγόνου την πέμπτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος μεταξύ των δύο γονοτύπων, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και από τη μέτρηση κολλαγόνου με τη χρήση της μεθόδου SIRCOL όπως αναφέρθηκε πρωτύτερα (εικόνα 6).

Έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η CRH ασκεί σημαντική δράση στα ιστιοκύτταρα {Cao, 2005}. Για το λόγο αυτό εκτιμήθηκε ο αριθμός των τελευταίων σε τομές από τραυματισμένο ιστό και των δύο γονοτύπων με τη χρώση Giemsa. Αν και ο αριθμός των ιστιοκυττάρων ήταν περιορισμένος στις τομές που μελετηθήκαν, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων την πρώτη και την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος.

# Η διαδικασία της δερματικής τραυματικής επούλωσης δεν ενεργοποιεί τον ΗΡΑ άξονα στους Crh-/- μύες

Καθώς η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής του HPA άξονα, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα. Προκειμένου να αξιολογηθεί η απόκριση του HPA άξονα κατά τη διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης, μετρήσαμε τη συγκέντρωση της κορτικοστερόνης στο πλάσμα 24 και 48 ώρες μετά της επαγωγή του τραύματος. Όπως απεικονίζεται στην εικόνα (εικόνα 7), οι *Crh+/+* μύες εμφάνισαν σημαντική αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος (12.2µg/dl), ενώ την επόμενη ημέρα,

τα επίπεδα επέστρεψαν στα βασικά (2µg/dl). Αντίθετα, η συγκέντρωση της κορτικοστερόνης δεν μεταβλήθηκε στους *Crh-/-* μύες στις αντίστοιχες ημέρες.



Ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος

#### Εικόνα 7

**Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα.** Τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στο πλάσμα μετρήθηκαν την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος σε αρσενικούς *Crh+/+* και *Crh-/-* μύες. Το διάγραμμα απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα [n=4 ζώα/γονότυπο \*, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων και # στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικές ημέρες (P < 0.05)]

# <u>Επίδραση της γενετικής ανεπάρκειας σε CRH στην έκφραση και παραγωγή κυτοκινών</u> στην περιοχή του τραύματος κατά τη διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης

Πληθώρα εργασιών έχουν δείξει ότι η περιφερικά παραγόμενη CRH εμπλέκεται σε διάφορες φλεγμονώδεις διεργασίες, ασκώντας ισχυρό προφλεγμονώδη ρόλο {Karalis, 1997; Venihaki, 2001}. Προκειμένου να μελετήσουμε λοιπόν αν η γενετική ανεπάρκεια σε CRH οδηγεί σε αλλαγή της φλεγμονώδους απόκρισης κατά τα διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης εξετάσαμε την έκφραση και παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών στην περιοχή του τραύματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση του mRNA του *Tnf-α* και της *ll-1* την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος μεταξύ των δύο γονοτύπων, όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR. Αναφορικά με την IL-6, παρόλο που οι *Crh-*/- μύες εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA της σε σχέση με τα

αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρήθηκαν στους μύες αγρίου τύπου (εικόνα 8Α), δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ποσότητα της ενεργούς πρωτεΐνης στα ομογενοποίηματα των βιοψιών μεταξύ των δύο γονοτύπων (εικόνα 8Β).



Επίπεδα έκφρασης και παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών σε εκχύλισμα δέρματος κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Α) Ολικό RNA απομονώθηκε από βιοψία δέρματος την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και από τους δύο γονότυπους μυών και καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της IL-6 και του TNF-α με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). **B**) Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από βιοψίες δέρματος την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και από τους δύο γονότυπους και μετρήθηκαν τα επίπεδα της ενεργής πρωτεΐνης με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι τα συνολικά τριών πειραμάτων, οι τιμές είναι κανονικοποιημένες προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης των ομογενοποιημάτων και έχουν εκφραστεί ως προς το μέσο όρο των μετρήσεων που ελήφθησαν από τους *Crh+/+* μύες [n=πέντε ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων (P<0,05)].

Η μέτρηση της ενεργής μορφής του TGF-β1 σε ομογενοποίηματα βιοψιών δέρματος έδειξε ότι οι *Crh-/*- μύες παράγουν υψηλότερα επίπεδα της κυτοκίνης την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος (*εικόνα* 9).



Ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος

#### Εικόνα 9

Επίπεδα παραγωγής TGF-β σε εκχύλισμα δέρματος κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από βιοψίες δέρματος την 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκαν τα επίπεδα του ενεργού TGF-β στο εκχύλισμα με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα τριών πειραμάτων που παρουσιάζονται είναι κανονικοποιημένα προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης και έχουν εκφραστεί ως προς το μέσο όρο των μετρήσεων της πρώτης ημέρας των *Crh+/+* μυών [n=έξι ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων (P<0,05)].

# <u>Επίδραση της γενετικής ανεπάρκειας σε CRH στην πρόσδεση του NF-κB κατά τη</u> διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης

Για να διερευνήσουμε τυχόν επίδραση της έλλειψης CRH σε μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής και κατά συνέπεια στη διαδικασία της τραυματικής επούλωσης, μελετήσαμε την ικανότητα δέσμευσης του NFκB, πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα που ενεργοποιείται μετά από διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκου σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ομογενοποιημάτων βιοψιών δέρματος που είχαν ληφθεί την πρώτη και τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος παρουσιάζονται στην εικόνα (εικόνα 10, A). Όπως φαίνεται, ο NF-κB παρουσιάζεται ενεργοποιημένος την πρώτη ημέρα της επούλωσης στους *Crh-/-* μύες και τα επίπεδα του αυξήθηκαν επιπλέον την τρίτη ημέρα στα ζώα αγρίου τύπου, ενώ την τρίτη μέρα σημειώνεται αύξηση, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με αυτήν που παρατηρήθηκε στους *Crh-/-* μύες την αντίστοιχη ημέρα. Πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για τη μέτρηση των επιπέδων του ΙκΒ-α δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ των δύο γονοτύπων σε καμία από τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν (εικόνα 10,B).



Εικόνα 10

**Ενεργοποίηση του NF-κB και του ΙκB-α κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Α**) Πυρηνική πρωτεΐνη απομονώθηκε από ομογενοποιήματα δέρματος *Crh+/+* και *Crh-/-* μύων την 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκε το επίπεδο πρόσδεσης

του NF-κB στο εκχύλισμα με την τεχνική της EMSA. **B**) Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από ομογενοποιήματα δέρματος *Crh+/+* και *Crh-/-* μυών την 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκαν τα επίπεδα του ΙκB-α στα εκχυλίσματα με την τεχνική του Western. Οι εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικά πειράματα.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΣΕ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ (GC) ΤΩΝ *Crh-/-* ΜΥΩΝ ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

Μεγάλος αριθμός εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων προσφέρει ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση του άξονα του στρες και η επακόλουθη αύξηση των γλυκοκορτικοειδή στο πλάσμα καταστέλλει τη δερματική τραυματική επούλωση, γεγονός που έχει συνδεθεί με τη αντιφλεγμονώδη δράση των τελευταίων {Padgett, 1998; Grose, 2002; Bitar, 1998; Beer, 2000). Σε αντιπαραβολή με τα δεδομένα αυτά, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν προτείνει ότι η τοπικά εκφραζόμενη σε φλεγμαίνοντες ιστούς CRH έχει άμεσο προφλεγμονώδη ρόλο {Karalis, 1997}. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας αναφορικά με το ρόλο της έλλειψης της CRH στην τραυματική επούλωση, σε

- Η επιταχυμένη τραυματική επούλωση στους Crh-/- μύες οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα των γλυκοκορτικοειδή που παρουσιάζουν στο πλάσμα τους
- Η έλλειψη της CRH επηρεάζει θετικά την πορεία της τραυματικής επούλωσης στους Crh-/- μύες.

Βασιζόμενοι στις παραπάνω υποθέσεις σχεδιάσαμε τα εξής πειράματα:

- Αποκατάσταση των επιπέδων γλυκοκορτικοειδών του πλάσματος στους Crh-/μύες
- Φαρμακολογικός αποκλεισμός των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών σε Crh+/+ μύες

α. Φαρμακολογικός αποκλεισμός του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών -Πειράματα με RU486

β. Φαρμακολογικός αποκλεισμός της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών
από τα επινεφρίδια - Πειράματα φαρμακολογικής επινεφριδιεκτομής
(PhADx)
## Αποκατάσταση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών του πλάσματος στους Crh-/- μύες στα αντίστοιχα εκείνων των Crh+/+ μυών

Προκειμένου να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι τα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο αίμα των Crh-/- μυών αποτελούν την αιτία για την παρατηρούμενη επιταχυνόμενη τραυματική επούλωση των τελευταίων, πραγματοποιήσαμε πειράματα αποκατάστασης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών στα αντίστοιχα που παράγονται στους Crh+/+ μύες. Τα γλυκοκορτικοειδή (κορτικοστερόνη) χορηγήθηκαν μέσω του πόσιμου νερού των μυών σε τελική συγκέντρωση 10µg/ml, συγκέντρωση η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες προκειμένου να επιτευχθούν επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα των Crh-/- μυών παρόμοια με εκείνα των αντιστοίχων αγρίου τύπου {Venihaki, 2000}. Ταυτόχρονα συμπεριλάβαμε στα πειράματα, Crh+/+ και Crh-/- μύες στους οποίους χορηγήσαμε μόνο το μέσο διάλυσης της κορτικοστερόνης και στη συνέχεια μετρήσαμε τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα την ημέρα πειραματισμού (ημέρα 0), λίγο πριν την επαγωγή του τραύματος. Καμία σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύτηκε στα επίπεδα της κορτικοστερόνης του πλάσματος μεταξύ των δύο γονοτύπων μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (εικόνα 11).



#### Εικόνα 11

**Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα.** Μέτρηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης στο πλάσμα μετά από χορήγηση κορτικοστερόνης στο πόσιμο νερό. Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε το πρωί, λίγο πριν την επαγωγή του τραύματος μύες [n=τέσσερα ζώα ανά ομάδα, \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά επιδράσεων μεταξύ ζώων του ίδιου γονοτύπου (*P* < 0.05)].

<u>Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών επιταχύνει την τραυματική επούλωση</u> στους Crh-/- μύες τις πρώτες ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος

Για να ελέγξουμε την πορεία της τραυματικής επούλωσης μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στα *Crh-/-* ζώα ακολουθήσαμε την ίδια μεθοδολογία που περιγράφτηκε στην αρχή του κεφαλαίου. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους *Crh-/-* μύες στα επίπεδα που μετρούνται στους φυσιολογικούς μύες επαυξάνει την ταχύτητα επούλωσης των τραυμάτων των πρώτων, συγκριτικά με τους *Crh-/-* μύες στους οποίους δε χορηγήθηκε κορτικοστερόνη και τους αντίστοιχους *Crh+/+* την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος (*εικόνα 12*).



Εικόνα 12

**Ρυθμός τραυματικής επούλωσης των** *Crh-/-* μυών που έλαβαν κορτικοστερόνη συγκριτικά με τους *Crh+/+* μύες που έλαβαν έκδοχο. Η συνολική επιφάνεια κάθε τραύματος υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού NIH Image analysis Software όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών (<sup>∞</sup>) επαυξάνει σημαντικά (P<0,05) την τραυματική επούλωση στους *Crh-/-* μύες από τη δεύτερη έως και την πέμπτη ημέρα σε σχέση με τα ζώα ελέγχου (<sup>∞</sup>). Οι μετρήσεις κάθε ημέρας έχουν εκφραστεί ως ποσοστό της αρχικής επιφάνειας του τραύματος ανά μυ. Το διάγραμμα απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα [n=πέντε ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ζώων του ίδιου γονοτύπου που υπεβλήθησαν στις διαφορετικές επιδράσεις (P<0,05)].

#### Επιταχυνόμενη επαναεπιθηλιοποίηση στους Crh-/- μύες

Κατά την εξέταση τομών φυσιολογικού δέρματος που είχαν βαφτεί με H&E ή/και Masson τριχρωμική δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές διαφορές μεταξύ των *Crh-/-* μυών που έλαβαν γλυκοκορτικοειδή και αυτών που αποτελούσαν τα ζώα ελέγχου. Η πυκνότητα των ινών κολλαγόνου, όπως είχε παρατηρηθεί και προηγουμένως μακροσκοπικά, ήταν μεγαλύτερη στις προερχόμενες από *Crh-/-* ζώα τομές (με ή χωρίς κορτικοστερόνη) σε σχέση με εκείνες από τα ζώα αγρίου τύπου (*εικόνα 5.A*) παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε παρόλα αυτά μόνο για τα *Crh-/-* με κορτικοστερόνη από τις μετρήσεις σε ομογενοποίημα από βιοψίες ιστού με τη μεθόδου SIRCOL (εικόνα 13).



Εικόνα 13

Περιεχόμενο κολλαγόνου σε ομογενοποιήματα φυσιολογικού και τραυματισμένου δέρματος μετά από αποκατάσταση τω επιπέδων στο πλάσμα των γλυκοκορτικοειδών. Επίπεδα κολλαγόνου, όπως αυτά μετρήθηκαν με τη δοκιμή SIRCOL σε ομογενοποιήματα **A**) φυσιολογικού δέρματος και **B**) τραυματισμένου δέρματος, το οποίο ελήφθη πέντε ημέρες μετά την επαγωγή του τραύματος σε όλες τις ομάδες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι τα συνολικά τριών πειραμάτων, οι τιμές είναι κανονικοποιημένες προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης των ομογενοποιημάτων και έχουν εκφραστεί ως προς το μέσο όρο των μετρήσεων που ελήφθησαν από τους *Crh+/+* μύες [n=έξι ζώα ανά ομάδα, #: στατιστικώς σημαντική διαφορά επιδράσεων μεταξύ ζώων του ίδιου γονοτύπου (P<0,05), \*: στατιστικώς σημαντική

Επιπρόσθετα, η ιστολογική εκτίμηση των τομών έδειξε ότι η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους ανεπαρκείς για τη CRH μύες οδηγεί σε επιτάχυνση της φλεγμονώδους φάσης από την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος. Οι

τομές δερματικών τραυμάτων μίας ημέρας προερχόμενες από *Crh-/-* μύες μετά από χορήγηση κορτικοστερόνης χαρακτηρίζονται από περισσότερα πολυμορφοπύρηνα και μακροφάγα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (αγρίου τύπου και *Crh-/-* χωρίς χορήγηση κορτικοστερόνης) (εικόνα 5.Β). Δύο ημέρες μετά (ημέρα 3) η φλεγμονή είχε υποχωρήσει, ενώ οι τομές εμφάνιζαν ινώδη ιστό και πολλούς ινοβλάστες(εικόνα 5.Γ). Την πέμπτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος, η επαναεπιθηλιοποίηση είχε ολοκληρωθεί, όπως και στις τομές *Crh-/-* μυών που είχαν λάβει μόνο έκδοχο, ενώ δεν παρατηρούνταν πλέον καμία φλεγμονή (εικόνα 5.Δ).

## <u>Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στους Crh-/- μύες οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης</u> <u>του TGF-β και του TNF-α στην περιοχή του τραύματος</u>

Όπως παρατηρήθηκε στα πρώτα πειράματα, οι *Crh-/-* μύες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης TGF-β<sub>1</sub> κατά τη διάρκεια της τρίτης ημέρας της επούλωσης του τραύματος (εικόνα 9). Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους *Crh-/-* μύες είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων του TGF-β<sub>1</sub> σε αυτά των μυών αγρίου τύπου (εικόνα 14, B). Μείωση των επιπέδων του TNF-α την πρώτη ημέρα της τραυματικής επούλωσης παρατηρείται στους *Crh-/-* μύες στους οποίους χορηγήθηκε κορτικοστερόνη (εικόνα 14, Δ). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα ζώα αγρίου τύπου στα οποία χορηγήσαμε κορτικοστερόνη. Αντίθετα με τα επίπεδα του TGF-β1 και TNF-α τα οποία διαφοροποιήθηκαν μετά τη χορήγηση κορτικοστερόνης, τα επίπεδα της IL-6 παρέμειναν αμετάβλητα την πρώτη ημέρα της επαγωγής του τραύματος μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων και επιδράσεων (εικόνα 14, Γ).



Επίπεδα έκφρασης TGF-β, IL-6 και TNF-α σε ομογενοποίημα δέρματος κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από βιοψίες δέρματος την A) 1<sup>η</sup> και την B) 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκαν τα επίπεδα της ενεργής πρωτεΐνης του TGF-β στο εκχύλισμα με την τεχνική της ELISA. Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από βιοψίες δέρματος 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκαν τα επίπεδα της ενεργής πρωτεΐνης του TGF-β στο εκχύλισμα με την τεχνική της ELISA. Ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε από βιοψίες δέρματος 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος και καθορίστηκαν τα επίπεδα **Γ**) της IL-6 και Δ) του TNF-α στο εκχύλισμα με την τεχνική της ELISA. Τα αποτελέσματα τριών πειραμάτων που παρουσιάζονται είναι κανονικοποιημένα προς την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης και έχουν εκφραστεί ως προς το μέσο όρο των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου (*Crh+/+* άνευ χορήγησης κορτικοστερόνης). [n=έξι ζώα ανά ομάδα, \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονότυπων (P<0,05)].

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 30

#### MEAETH THE DPACHE THE CRH STOYS DEPMATIKOYS INOBAASTES

#### IN VITRO

Κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού της δερματικής τραυματικής επούλωσης, ινοβλάστες που βρίσκονται στα όρια του τραυματισμένου δέρματος μεταναστεύουν προς τη περιοχή του τραύματος και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται προκειμένου να την καλύψουν. Αυτή η διαδικασία συντονίζεται με εξαιρετικό τρόπο από τοπικά παραγόμενους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που λειτουργούν με αυτοκρινή ή/και παρακρινή τρόπο. Παλιότερες εργασίες από την ερευνητική ομάδα μας και άλλες έχουν δείξει ότι η CRH ρυθμίζει την έκφραση της IL-6 και άλλων κυτοκινών κατά τη διάρκεια της φλεγμονής ενώ, όπως περιγράψαμε προηγουμένως, οι ανεπαρκείς για την *Crh* μύες εμφανίζουν επιταχυμένη τραυματική επούλωση *in vivo* η οποία συνοδεύεται με αλλαγές στην έκφραση των κυτοκινών που παράγονται από ινοβλάστες και εμπλέκονται στη διαδικασία της επούλωσης. Βασιζόμενοι στα παραπάνω, επιδιώξαμε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής να αποσαφηνίσουμε το ρόλο της ενδογενούς CRH στη λειτουργία των πρωτογενών δερματικών ινοβλαστών *in vitro*.

#### Απομόνωση και ταυτοποίηση ινοβλαστών

Για την υλοποίηση του παραπάνω στόχου απομονώθηκαν ινοβλάστες από τη δερμίδα μυών ηλικίας 0-3 ημερών με τη μέθοδο της επέκτασης (expansion protocol). Το πρωτόκολλο αυτό στηρίζεται στην ικανότητα των ινοβλαστών να μεταναστεύουν από τεμάχια δερμίδας τα οποία έχουν προσκολληθεί στο τρυβλίο αλλιέργειας. Η παρουσία των ινοβλαστών στα τρυβλία επιβεβαιώθηκε από το χαρακτηριστικό αστεροειδές σχήμα που διαθέτουν (*εικόνα 15*).



Εικόνα 15

**Καλλιέργεια ινοβλαστών.** Καλλιέργεια πρωτογενών ινοβλαστών που έχουν απομονωθεί από **Α)** δέρμα *Crh+/+* μυός, **B)** δέρμα *Crh-/-* μυός, **Γ)** ανθρώπινο δέρμα. Χρησιμοποιήθηκε φακός 20x.

Η ταυτοποίηση τους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον της βιμεντίνης, ενός μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων, που αναγνωρίζουν κύτταρα ιστών μεσοδερμικής προέλευσης (εικόνα 16).

Η πιο συχνή πηγή επιμόλυνσης των πρωτογενών καλλιεργειών ινοβλαστών αποτελεί η ανατομικά γειτνιάζουσα επιδερμίδα. Πράγματι, μικρός πληθυσμός κερατινοκυττάρων ήταν διακριτός σε κάποιες καλλιέργειες ινοβλαστών στα πρώτα στάδια τους, ο οποίος, όμως, σταδιακά μειώνονταν και τελικά εξαφανίζονταν. Αυτό οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις Ca<sup>2+</sup> που περιέχει το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των ινοβλαστών και παρουσία των οποίων τα κερατινοκύτταρα οδηγούνται σε διαφοροποίηση και τελικά σε θάνατο {Liang, 2007}. Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα μεγάλο εύρος κερατινών (pan-keratins), ειδικούς δείκτες επιδερμικών κυττάρων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απουσία κερατινοκυττάρων στις καλλιέργειες ινοβλαστών κατά την φάση διεξαγωγής των πειραμάτων. Όπως φαίνεται και στην *εικόνα 16* δεν εντοπίστηκαν κύτταρα στα οποία να συνδέεται το αντίσωμα εναντίων μιας ευρείας γκάμας κερατινών, γεγονός που επιβεβαίωσε την αρχική μας παρατήρηση.

Όλα τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω, πραγματοποιήθηκαν σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών με αριθμό ανακαλλιέργειας (passage) μεταξύ 2-5 προκειμένου, να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα πρόσμιξης των καλλιεργειών ινοβλαστών από κερατινοκύτταραρα (passage μεγαλύτερο του 1) και επιπλέον να χρησιμοποιηθούν ινοβλάστες οι οποίοι δεν έχουν οδηγηθεί σε γήρανση (passage μικρότερο του 5).



#### Εικόνα 16

**Ταυτοποίηση ινοβλαστών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.** Για την ταυτοποίηση των ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα εναντίον της βιμεντίνης (anti-vimentin, μάρτυρας για κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης) και εναντίον των κερατινών (anti-pankeratin - μάρτυρας για κερατινοκύτταρα). **A)** καλλιέργεια ινοβλαστών που προέρχεται από δερμίδα μυός, **B)** καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών, (+): δείγματα στα οποία προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα. (-): δείγματα ελέγχου στα οποία δεν προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα. Χρησιμοποιήθηκε φακός 20χ

#### Ταυτοποίηση του συστήματος της CRH στους δερματικούς ινοβλάστες μυών

#### <u>Οι δερματικοί ινοβλάστες νεογνών μυών εκφράζουν και εκκρίνουν CRH</u>

Πληθώρα δεδομένων, κυρίως από ανθρώπινα δείγματα, προτείνουν ότι κυτταρικοί πληθυσμοί του δέρματος εκφράζουν το γονίδιο της CRH και των συγγενών προς αυτήν πεπτιδίων καθώς και των υποδοχέων τους. Για να ανιχνευθεί η παρουσία του συστήματος της CRH στους δερματικούς ινοβλάστες μυών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της RT-PCR. Για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας πιθανής επιμόλυνσης των δειγμάτων με γενομικό DNA, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση κατά τη διάρκεια σύνθεσης του cDNA (no RT) (εικόνα 17Α, στήλη 4), ενώ RNA προερχόμενο από εγκέφαλο μυός χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου (εικόνα 17Α, στήλη 1). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η Crh εκφράζεται στους νεογνικούς δερματικούς ινοβλάστες μυών αναμενόμενο, δεν ανιχνεύτηκε έκφραση της Crh στους ανεπαρκείς για την CRH ινοβλάστες (εικόνα 17Α, στήλη 3). Επιπλέον, ανοσοδραστική CRH (IR-CRH) ανιχνεύθηκε

στο θρεπτικό μέσο των ινοβλαστών σε συγκεντρώσεις της τάξης των 0.8±0.21 ng/mg ολικής πρωτεΐνης.



#### Εικόνα 17

Έκφρασης του συστήματος της CRH στους ινοβλάστες. (A) Ολικό RNA που απομονώθηκε από εγκέφαλο Crh+/+ μυός (στήλη 1), δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από Crh+/+ μύες (στήλη 2) και δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από Crh+/+ μύες (στήλη 2) και δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από Crh-/- μύες (στήλη 3) υποβλήθηκε σε RT-PCR για να εκτιμηθεί η έκφραση της Crh. Η στήλη 4 παριστάνει δείγμα χωρίς ανάστροφη μεταγραφάση (no RT) και η στήλη 5 παριστάνει δείγμα χωρίς cDNA. (B) Έκφραση του mRNA του Crf1 σε δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από Crh+/+ και Crh-/- μύες (στήλη 2, 3 αντίστοιχα). Η στήλη 1 αναπαριστάνει την έκφραση του mRNA του  $Crf_2$  σε δερματικούς cDNA. (Γ) Έκφραση του mRNA του  $Crf_2$  σε δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από crh+/+ και crh-/- μύες (στήλη 5 ένα δείγμα χωρίς cDNA. (Γ) Έκφραση του mRNA του  $Crf_2$  σε δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από crh+/+ και crh-/- μύες (στήλη 2, 3 αντίστοιχα). Η στήλη 4 αναπαριστάνει ένα δείγμα χωρίς RT (no RT) και η στήλη 5 ένα δείγμα χωρίς cDNA. (Γ) Έκφραση του mRNA του  $crf_2$  σε δερματικούς ινοβλάστες μυών που απομονώθηκαν από crh+/+ και crh-/-μύες (στήλη 2, 3 αντίστοιχα). Η στήλη 1 αναπαριστάνει ένα δείγμα χωρίς cDNA. Σε όλες τις φωτογραφίες η στήλη Μαναπαριστάνει δείκτη διαβαθμίσεων 100bp.

#### <u>Οι δερματικοί ινοβλάστες νεογνών μυών εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς της CRH</u>

Η CRH και τα συγγενή της πεπτίδια ασκούν τις δράσεις τους μέσω δύο κυρίως τύπων μεμβρανικών υποδοχέων, τον  $CRF_1$  και  $CRF_2$ . Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το σύστημα μας εκφράζει το mRNA των υποδοχέων της CRH πραγματοποιήσαμε τη μέθοδο της RT-PCR χρησιμοποιώντας ως θετικό δείγμα ελέγχου για τον  $CRF_1$  ολικό RNA

προερχόμενο από εγκέφαλο μυός και για τον CRF<sub>2</sub> ολικό RNA προερχόμενο από καρδιά μυός (εικόνα 17 Β,Γ, στήλη 1, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τόσο οι αγρίου τύπου, όσο και οι ινοβλάστες που προέρχονταν από μύες με γενετική ανεπάρκεια στη CRH εκφράζουν το mRNA και των δύο υποδοχέων της CRH (εικόνα 17Β,Γ, στήλες 2 και 3 αντίστοιχα).

Στους περισσότερους κυτταρικούς πληθυσμούς η σύνδεση τόσο της CRH όσο και των συγγενών προς αυτήν πεπτιδίων στους υποδοχείς της έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση G πρωτεϊνών οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση {Slominski, 2006}. Ο ρόλος της τελευταίας είναι η παραγωγή του κυκλικού νουκλεοτιδίου της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε τους υποδοχείς της CRH οι οποίοι βρίσκονται στους δερματικούς ινοβλάστες μυών, εξετάσαμε τόσο την ικανότητα δέσμευσης με τον προσδέτη καθώς επίσης και τη δυνατότητα να διεγείρουν την παραγωγή cAMP. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18Α, επίδραση των CRF1- και CRF2-εκλεκτικών ανταγωνιστών, ανταλαρμίνη και αστρεσσίνη 2B, αντίστοιχα, σε ομογενοποιήματα μεμβρανών που είχαν παρασκευαστεί από Crh+/+ ινοβλάστες ελάττωσε τη δέσμευση της 125I-Tyr0-σωβαζίνης γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη και των δύο τύπων υποδοχέων (CRF1 και CRF2) σε αυτά τα κύτταρα. Παρά την παρουσία των  $CRF_1$  και  $CRF_2$  στους Crh+/+ ινοβλάστες, η εξωγενώς προστιθέμενη CRH σε συγκεντρώσεις κορεσμού (250nM) δεν αύξησε σημαντικά τα ήδη υψηλά βασικά επίπεδα cAMP σε αυτά τα κύτταρα (εικόνα 18, B). Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στην υπόθεση ότι η ενδογενής CRH προκαλεί κορεσμό και στους δύο υποδοχείς που εκφράζονται στους ινοβλάστες και διεγείρει την υψηλή παραγωγή cAMP. Για να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση, μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης και η παραγωγή cAMP από ινοβλάστες που απομονώθηκαν από τους Crh-/- μύες. Όπως και στην περίπτωση των Crh+/+ ινοβλαστών, επίδραση με ανταλαρμίνη ή/και με αστρεσσίνη 2Β μείωσε τη δέσμευση της ραδιοσημασμένης σωβαζίνης (εικόνα 18Α) δηλώνοντας έμμεσα την παρουσία τόσο της CRF1 όσο και της CRF2 πρωτεΐνης στους Crh-/- ινοβλάστες. Εντούτοις, σε αντίθεση με τους Crh+/+ ινοβλάστες, η CRH σε συγκέντρωση 250 nM αύξησε σημαντικά την παραγωγή cAMP στους Crh-/- ινοβλάστες (εικόνα 18B) σε επίπεδα που πλησίαζαν τα βασικά ή τα διεγειρόμενα με CRH επίπεδα στους Crh+/+ ινοβλάστες. Τα παραπάνω δεδομένα ισχυροποιούν την υπόθεση ότι τόσο η CRH όσο και οι υποδοχείς της αποτελούν ένα λειτουργικό σύστημα των δερματικών ινοβλαστών στους μύες.



#### Εικόνα 18

**Χαρακτηρισμός υποδοχέων της CRH A**) Μελέτη ανταγωνιστικής δέσμευσης με [<sup>125</sup>I] Tyr0σωβαζίνη παρουσία και απουσία 1000 nM ανταλαρμίνης ή 1000 nM Αστρεσσίνης-2B (ανταγωνιστές του υποδοχέα CRF<sub>1</sub> και CRF<sub>2</sub>, αντίστοιχα) σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα ινοβλαστών με ή χωρίς ανεπάρκεια στην CRH. Οι κολώνες αναπαριστούν την % μείωση της ειδικής δέσμευσης. **B**) Μέτρηση παραγωγής cAMP από ανέπαφους *Crh+/+* και *Crh-/-* ινοβλάστες χωρίς και μετά από επίδραση με 250nM CRH. Τα αποτελέσματα και των δύο διαγραμμάτων αποτελούν το μέσο όρο±SEM τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων, στα οποία κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. \*, αναπαριστά στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0.05) μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων που εκτέθηκαν στο ίδια επίδραση και το # αναπαριστά στατιστικώς σημαντική διαφορά (P<0.05) μεταξύ των διαφορετικών επιδράσεων στον ίδιο γονότυπο.

### Μελέτη του ρόλου της CRH σε σημαντικές λειτουργίες των δερματικών ινοβλαστών μυών

## <u>Η γενετική ανεπάρκεια σε CRH οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των</u> <u>δερματικών ινοβλαστών μυών</u>

Ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για να επιτευχθεί η ολοκλήρωση της διαδικασίας. Προκειμένου, λοιπόν, να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η CRH επιδρά στη διαδικασία αυτή, μελετήσαμε το ρυθμό πολλαπλασιασμού ινοβλαστών που απομονωθήκαν από *Crh-/-* και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με εκείνα των *Crh+/+* ινοβλαστών με τη χρήση δύο διαφορετικών τεχνικών μέτρησης ρυθμού πολλαπλασιασμού, αυτή της ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης και αυτής που κάνει χρήση του αντιδραστηρίου MTT. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι ινοβλάστες που

προέρχονται από ανεπαρκείς για τη CRH μύες παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένο βασικό ρυθμό πολλαπλασιασμού συγκρινόμενο με αυτόν των αγρίου τύπου (εικόνα 19,Α). Παραδόξως, επίδραση των Crh-/- ινοβλαστών με 10nM CRH για 24 και 48 ώρες δεν μετάβαλλε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των τελευταίων (εικόνα 19,Γ).





#### Εικόνα 19

**Ρυθμός πολλαπλασιασμού των Crh+/+ και Crh-/- ινοβλαστών.** Ινοβλάστες που απομονώθηκαν από δερμίδα Crh+/+ και Crh-/- μυών καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 8x10<sup>3</sup> κύτταρα/οπή και διεγέρθηκαν με ή χωρίς 10nM CRH για 24 – 96 ώρες. **A)** Βασικός ρυθμός πολλαπλασιασμού Crh+/+ και Crh-/-. Το διάγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος. [n=4 οπές/επίδραση/πείραμα, τουλάχιστον 5 ανεξάρτητα πειράματα \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιδράσεων (P<0,05)].**(B), (Γ)** Ρυθμός

πολλαπλασιασμού *Crh+/+* και *Crh-/-* ινοβλαστών, αντίστοιχα, μετά από επίδραση με 10nM CRH. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως το % του μέσου όρου απορρόφησης των *Crh+/+* ινοβλαστών μετά από την επίδραση του εκδόχου την πρώτη ημέρα του πειράματος. [n=4 οπές/επίδραση/πείραμα, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιδράσεων (P<0,05)].

Θα πρέπει να διευκρινιστεί στο σημείο αυτό ότι, ενώ οι αρχικές μας παρατηρήσεις έγιναν με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης, τα δεδομένα που παρουσιάζονται παραπάνω πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του ΜΤΤ. Ο λόγος που επιλέχτηκε η τεχνική αυτή είναι γιατί διαθέτει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη μέθοδο της θυμιδίνης όπως: α. Δεν απαιτείται ραδιενεργή ουσία. β. Υπάρχει δυνατότητα να μετρηθούν περισσότερα δείγματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. γ. Η τεχνική παρέχει πληροφορίες για τον αριθμό των κυττάρων που συνθέτουν DNA κατά τη διάρκεια των τελευταίων ωρών της διαδικασίας.

## <u>Η αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Crh-/- ινοβλαστών, δεν οφείλεται σε αλλαγή</u> <u>του ρυθμού απόπτωσή τους</u>

Προκειμένου να ελεγχθεί αν ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των Crh-/ινοβλαστών συγκριτικά με τους Crh+/+ ινοβλάστες οφείλεται σε αλλαγές στην απόπτωση των Crh-/- κυττάρων, κύτταρα και των δυο γονοτύπων καλλιεργήθηκαν απουσία ορού στο θρεπτικό τους μέσο για διάφορες χρονικές περιόδους (24, 48, 72 ώρες) και στη συνέχεια μετρήθηκε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά από χρώση με ανεξίνη 5 και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα (εικόνα 20) δεν έδειξαν καμιά σημαντική διαφορά στο ρυθμό απόπτωσης μεταξύ των δύο γονοτύπων. Επιπλέον, προσθήκη 10 nM CRH στο θρεπτικό μέσο των ινοβλαστών δεν επηρέασε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε κανένα από τους δύο γονοτύπους.



#### Εικόνα 20

**Ρυθμός απόπτωσης** *Crh+/+* και *Crh-/-* **ινοβλαστών μετά από στέρηση ορού**. 10<sup>5</sup> κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ή απουσία ορού για 24, 48, και 72 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν και βάφτηκαν με Annexin σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απόπτωση μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι εικόνες παρουσιάζουν ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα στο οποίο η απόπτωση των κυττάρων μετρήθηκε μετά από 48 ώρες στέρησης ορού. Α) *Crh+/+* ινοβλάστες, B) *Crh-/-*, ινοβλάστες.

<u>Η γενετική ανεπάρκεια σε CRH οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού της μεταναστευτικής</u> <u>ικανότητας των ινοβλαστών</u>

Για να μελετήσουμε περαιτέρω τη δράση της έλλειψης CRH στη φυσιολογία των ινοβλαστών πραγματοποιήσαμε *in vitro* δοκιμή τραυματικής επούλωσης με δημιουργία εγκάρσιας τομής (scratch) στη μονοστοιβάδα των κυττάρων και στη συνέχεια παρακολούθηση της κίνησης των κυττάρων προς την τομή με τη λήψη φωτογραφιών, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Προκειμένου να αποκλειστεί η επίδραση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στην επούλωση της τομής, ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα: 1. καλλιέργεια σε συνθήκες στέρησης ορού, 2: καλλιέργεια παρουσίας 10µg/ml μιτομυκίνης, αντιβιοτικού που καταστέλλει τη σύνθεση του DNA. Όπως φαίνεται στην *εικόνα 21* σημαντικά λιγότεροι *Crh+/+* ινοβλάστες μετανάστευσαν στην περιοχή της τομής συγκριτικά με τους ανεπαρκείς για την CRH ινοβλάστες μετά από 24 και 48 ώρες από την επαγωγή του *in vitro* «τραύματος». Παρόμοια με το ρυθμό πολλαπλασιασμού, χορήγηση 10nM CRH δεν επηρέασε το ρυθμό μετανάστευσης κανενός από τους γονότυπους.



#### Εικόνα 21

**Ρυθμός μετανάστευσης ινοβλαστών**. Καλλιέργεια ινοβλαστών σε 100% πληρότητα υπέστη *in vitro* δοκιμή τραυματικής επούλωσης με εγκάρσια τομή και στη συνέχεια ελήφθησαν φωτογραφίες μετά από 0, 24 και 48 ώρες από τη δημιουργία της τομής. (**A**) Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το λογισμικό NIH Image analysis όπου μετρήθηκε η περιοχή που παρέμενε ακάλυπτη από κύτταρα (διαγράμματα). (**B**) Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος έχουν εκφραστεί ως προς την αρχική περιοχή του «τραύματος». [n=2 οπές/γονότυπο/πείραμα, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ γονότυπων (P<0,05)].

<u>Η γενετική ανεπάρκεια της CRH επηρεάζει την παραγωγή κολλαγόνου αλλά όχι τη</u> συσταλτική ικανότητα των ινοβλαστών

Ο ρόλος των ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της δερματικής τραυματικής επούλωσης είναι τόσο η αντικατάσταση του προσωρινού ινώδους που εναποτέθηκε στα πρώτα στάδια της επούλωσης με την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, κυρίως κολλαγόνου, όσο και η επαναπροσέγγιση των άκρων του τραύματος χάρη στη συσταλτική τους ικανότητα κατά τη διάρκεια της αναδόμησης. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η γενετική ανεπάρκεια σε CRH επηρεάζει οποιαδήποτε από τις παραπάνω δύο δράσεις των ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης μετρήσαμε το ποσό του κολλαγόνου που παράγεται στο θρεπτικό υλικό καθώς επίσης και τη συσταλτική ικανότητα τους, αντίστοιχα.



#### Εικόνα 22

Έκκριση κολλαγόνου από τους ινοβλάστες. Ινοβλάστες που απομονώθηκαν από *Crh+/+* και *Crh-/-* μύες καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 4 x10<sup>5</sup> κύτταρα/οπή και σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού για 24, 36 και 48 ώρες. Στο τέλος του πειράματος, μετρήθηκε το κολλαγόνο που είχε εκκριθεί στο θρεπτικό μέσο με τη δοκιμή SIRCOL, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το διάγραμμα απεικονίζει ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα. [n=2 οπές/γονότυπο/πείραμα, τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ γονότυπων την ίδια χρονική στιγμή (P<0,05)].

Η μέτρηση του εκκρινόμενου, στο θρεπτικό μέσο, κολλαγόνου έδειξε σημαντική μείωση της παραγωγής του από τους *Crh-/-* ινοβλάστες μετά από 36 και 48 ώρες καλλιέργειας σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού (εικόνα 22), συγκριτικά με τους *Crh+/+* ινοβλάστες. Παρόλα αυτά, ο υπολογισμός της επιφάνειας των πηκτών (χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της επιπλέουσας μήτρας κολλαγόνου) έδειξε ότι η ανεπάρκεια σε CRH δεν επηρεάζει τη συσταλτικότητα των δερματικών ινοβλαστών (εικόνα 23).



#### Εικόνα 23

Συσταλτική ικανότητα δερματικών ινοβλαστών. Μέτρηση κυτταρικής συσταλτικότητας δερματικών ινοβλαστών προερχόμενων από *Crh+/+* και *Crh-/-* μύες με τη μέθοδο της επιπλέουσας μήτρας κολλαγόνου. **A)** Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το λογισμικό NIH Image analysis όπου μετρήθηκε η περίμετρο της πηκτής. **B)** Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος έχουν εκφραστεί ως % της αρχικής περίμετρος. [n=2 οπές/γονότυπο/πείραμα, 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ γονότυπων (P<0,05)].

<u>Οι Crh-/-ινοβλάστες χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκκριση IL-6 και TGF-β στο θρεπτικό</u> μέσο

Η πολύπλοκη διαδικασία της τραυματικής επούλωσης ενορχηστρώνεται από μια σειρά παραγόντων που απελευθερώνονται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του τραυματισμένου ιστού. Η IL-6 και ο TGF-β1 αποτελούν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκκρίνονται από μια πληθώρα κυττάρων στο σημείο του τραύματος, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών. Συνεπώς, μετρήσαμε την έκκριση των παραπάνω παραγόντων από τους ινοβλάστες και των δύο γονότυπων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 24A οι Crh-/- ινοβλάστες παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη έκκριση της IL-6 σε βασικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των 6 και 12 ωρών μετά την απομάκρυνση του ορού από το θρεπτικό μέσο σε σχέση με τους αντίστοιχους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Παρόμοια, στατιστικά σημαντική μείωση στην έκκριση TGF-β1 στο θρεπτικό μέσο χαρακτήριζε τους ανεπαρκείς για την CRH ινοβλάστες (εικόνα 24,B). Παραδόξως, επίδραση με 10nM CRH για 6 ή 12 ώρες δεν επέφερε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην έκκριση της IL-6 και του TGF-β1 σε κανένα γονότυπο.





Έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από Crh+/+ και Crh-/- ινοβλάστες. Δερματικοί ινοβλάστες που απομονώθηκαν από Crh+/+ και Crh-/- μύες καλλιεργηθήκαν σε αρχική συγκέντρωση 10<sup>5</sup> κύτταρα/οπή. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ELISA για A) IL-6 και B) ενεργό TGF-β1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με τη συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης και έχουν εκφραστεί ως το % του μέσου όρου απορρόφησης των Crh+/+ ινοβλαστών στις 6 (IL-6) ή στις 12 ώρες (TGF-β). [n=4 οπές/επίδραση/πείραμα, 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα #: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ γονότυπων (P<0,05)].

## <u>Ο TGF-β1 και η II-6 δεν ευθύνονται για τις αλλαγές που παρατηρούνται στο ρυθμό</u> <u>πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των Crh-/- ινοβλαστών</u>

Είναι γνωστό ότι ο TGF-β αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επιδρά τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στη μετανάστευση των ινοβλαστών. Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις του TGF-β που παράγονται από τους *Crh-/*ινοβλάστες συνδέονται με την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης τους, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοεξουδετέρωσης του εκκρινόμενου TGF-β με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε δεν επέφερε πλήρη ανοσοεξουδετέρωση, αφού η ποσότητα του TGFβ<sub>1</sub> στο θρεπτικό μέσο των ινοβλαστών μετά από επίδραση με 10μg/ml αντισώματος μειώθηκε μόνο κατά 30% και 45% της αρχικής συγκέντρωσης του παράγοντα στους *Crh+/+* και *Crh-/*- ινοβλάστες, αντίστοιχα. Η μείωση της κυτταροκίνης στο θρεπτικό μέσο των ινοβλαστών δεν επέφερε καμία διαφοροποίηση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των δερματικών ινοβλαστών και των δύο γονοτύπων.

Παράλληλα, μελετήθηκε ο ρόλος της ΙL-6 στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των ινοβλαστών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοεξουδετέρωση της εκκρινόμενης ΙL-6 με τη χρήση ειδικού αντισώματος σε συγκέντρωση 1μg/ml η οποία επέφερε μείωση της ΙL-6 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των ινοβλαστών κάτω από τα όρια ανίχνευσης της ELISA και στη συνέχεια μετρήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των τελευταίων. Η ανοσοεξουδετέρωση της ΙL-6 δεν οδήγησε σε αλλαγή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών κατω προσθήκη ΙL-6 στο θρεπτικό μέσο των *Crh-/-* ινοβλαστών σε συγκεντρώσεις 1μg/ml δεν επανάφερε το ρυθμό πολλαπλασιασμού στα επίπεδα εκείνου των *Crh+/+* ινοβλαστών. Παρόμοια, μελέτες *in vitro* τραυματικής επούλωσης μετά από ανοσοεξουδετέρωση της εκκρινόμενης των *Crh-/-* ινοβλαστών στο συγκεντρώσεις το στο στο συγκεντρώσεις των το μετανάστευσης των συθμό πολλαπλασιασμού στα επίπεδα εκείνου των *Crh+/+* ινοβλαστών. Παρόμοια, μελέτες *in vitro* τραυματικής επούλωσης μετά από ανοσοεξουδετέρωση της εκκρινόμενης ΙL-6 δεν όδειξαν επίσης καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά σε κανένα γονότυπο. Επομένως, η αύξηση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των *Crh-/-* ινοβλαστών δεν σχετίζεται άμεσα με τη μειωμένη έκκριση IL-6 από τους τελευταίους.

## <u>Η CRH διαμεσολαβεί παρόμοια ενδογενή μονοπάτια στους ανθρώπινους και στους</u> <u>ινοβλάστες των μυών</u>

Προκειμένου να επεκτείνουμε τα αποτελέσματα μας αλλά και να εξετάσουμε την πιθανή εφαρμογή τους στον άνθρωπο, χρησιμοποιήσαμε ανθρώπινους ινοβλάστες προερχόμενους από ακροποσθία εφήβων. Όπως και με τους ινοβλάστες μυών, η

παρουσία των ανθρώπινων ινοβλαστών στα τρυβλία επιβεβαιώθηκε από το χαρακτηριστικό αστεροειδές σχήμα που διαθέτουν (εικόνα 15,Γ). Η ταυτοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισώματος εναντίον της βιμεντίνης (εικόνα 16,Β) ενώ η απουσία κερατινοκυττάρων στην καλλιέργειας κατά την φάση πειραματισμού επιβεβαιώθηκε με το αντίσωμα pankeratin (εικόνα 16,Β).

Παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες εκφράζουν το γονίδιο της CRH και του υποδοχέα της CRF<sub>1</sub> {Slominski, 2001}. Επίδραση με 100nM ανταλαρμίνης (ειδικού ανταγωνιστή για τον υποδοχέα CRF<sub>1</sub>) ή 100nM α-hCRF (μη ειδικού ανταγωνιστή για τους υποδοχείς CRF<sub>1</sub> και CRF2) των ανθρώπινων ινοβλαστών είχε ως αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (εικόνα 25A,B), ενώ η ίδια συγκέντρωση αστρεσσίνης 2B (ειδικού ανταγωνιστή του CRF<sub>2</sub>) δεν είχε καμία επίδραση. Παρόλα αυτά, προσθήκη 10 ή 100nM CRF παρουσία ή απουσία ορού δεν είχε καμία στατιστικώς σημαντική επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων ινοβλαστών (εικόνα 25Γ).



#### Εικόνα 25

**Ρυθμός πολλαπλασιασμού ανθρώπινων ινοβλαστών απομονωμένων από ακροποσθία** εφήβων. Ανθρώπινοι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς **A**) 100nM ανταλαρμίνη (**B**), 100nM α-hCRF, (**Γ**) 100nM CRH, (**Δ**) 1μg/ml αντίσωμα εναντίων του TGF-β ή της IL-6, για 24 και 48 ώρες και ο πολλαπλασιασμός τους μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως το % του μέσου όρου απορρόφησης των *Crh+/+* ινοβλαστών υπό την επίδραση του εκδόχου για την αντίστοιχη χρονική στιγμή. [n=4 οπές/επίδραση/πείραμα, 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιδράσεων (P<0,05)].

Ο φαρμακολογικός αποκλεισμός του CRF<sub>1</sub> με τη χρήση ανταλαρμίνης προκάλεσε επίσης αύξηση του μεταναστευτικού ρυθμού των ινοβλαστών (εικόνα 27,A,B), ενώ μείωσε σημαντικά την έκκριση IL-6 από τα παραπάνω κύτταρα (εικόνα 26). Όπως και στους ινοβλάστες που προέρχονταν από μύες, ανοσοεξουδετέρωση με ειδικό αντίσωμα εναντίον της IL-6 ή του TGF-β δεν είχε επίδραση τόσο στο ρυθμό πολλαπλασιασμού (εικόνα 25,Δ) όσο και στο ρυθμό μετανάστευση τους (εικόνα 27,Γ,Δ). Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν παρόμοια ενδογενή μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από τη CRH τόσο στους ανθρώπινους, όσο και στους ινοβλάστες των μυών.



#### Εικόνα 26

Έκκριση IL-6 από ανθρώπινους ινοβλάστες. Δερματικοί ινοβλάστες που απομονώθηκαν από ακροποσθία εφήβων καλλιεργηθήκαν σε αρχική συγκέντρωση 10<sup>5</sup> κύτταρα/οπής μετά από επίδραση με 100 nM ανταλαρμίνης ή του εκδόχου. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ELISA για IL-6. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη συνολική πρωτεΐνη και έχουν εκφραστεί ως % του μέσου όρου απορρόφησης των ινοβλαστών με το έκδοχο στις 12h. [n=4 οπές/επίδραση/πείραμα, 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιδράσεων (P<0,05)].



139

#### Εικόνα 27

Έλεγχος επίδρασης IL-6 και TGFβ στο ρυθμό μετανάστευσης. Καλλιέργεια ινοβλαστών πλήρως καλυμμένη υπέστη *in vitro* δοκιμή τραυματικής επούλωσης με εγκάρσια τομή μετά από επίδραση με A,B) 100nM ανταλαρμίνης ή  $\Gamma$ ,Δ) 1μg/ml αντισώματος εναντίων του TGF-β ή της IL-6 και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε μετά από 0, 24 και 48 ώρες από την επαγωγή. (A, $\Gamma$ ) Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το λογισμικό NIH Image analysis και μετρήθηκε η περιοχή που παρέμενε ακάλυπτη από κύτταρα (διαγράμματα). (B,Δ) Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που παρουσιάζονται είναι από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα και έχουν εκφραστεί ως προς την αρχική περιοχή του «τραύματος». [n=2 οπές/επίδραση/πείραμα, 3 ανεξάρτητα επιτυχημένα πειράματα \*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιδράσεων (P<0,05)].

# δύζητηση

Η δερματική τραυματική επούλωση αποτελεί μία σύνθετη διαδικασία που, παρόλα αυτά, εξελίσσεται με προβλεπόμενο τρόπο όταν ένας ιστός υφίσταται λύση της συνέχειας του. Πιο συγκεκριμένα, αμέσως μετά τον τραυματισμό, ο κατεστραμμένος ιστός αποκαθίσταται προσωρινά με το σχηματισμό θρόμβου αίματος που κλείνει την προσβεβλημένη περιοχή. Τις επόμενες ώρες ενεργοποιούνται οι διαδικασίες οι οποίες θα οδηγήσουν τελικά στην αποκατάσταση του τραυματισμένου ιστού. Παραδοσιακά, η επούλωση χωρίζεται σε τρεις διαδοχικές αλλά και αλληλεπικαλυπτόμενες φάσης: 1) τη φάση της φλεγμονής που περιλαμβάνει την αιμοστασία ή την θρόμβωση και την μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο του τραύματος, 2) τη φάση πολλαπλασιασμού που εμπλέκει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων, ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγούν σε επαναεπιθηλιοποίηση, αγγειογένεση και δημιουργία κοκκιώδους ιστού και 3) φάση αναδόμησης που χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο διαδικασιών που σκοπό έχουν την αποκατάσταση της πλήρους λειτουργικότητας και της φυσιολογικής εμφάνισης του τραυματισμένου ιστού {Scopa, 1994} με βασικό στοιχείο την αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας {Mastorakos, 1995 }.

Η επιτυχία των μεταγενέστερων φάσεων εξαρτάται κυρίως από την πορεία των προηγούμενων. Ως εκ τούτου, η τραυματική επούλωση απαιτεί τη συλλογική συνεργασία πολλών διαφορετικών κυττάρων των οποίων η συντονισμένη δράση κατευθύνεται μέσα από παράγοντες που εκκρίνουν τα ίδια τα κύτταρα, στους οποίους περιλαμβάνονται διάφορες κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες καθώς και νευροπεπτίδια.

Αυξανόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα επισημαίνουν το σημαντικό ρόλο διαφόρων νευροπεπτίδιων στο δέρμα σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις {Roosterman, 2006}. Τα νευροπεπτίδια μπορεί να απελευθερώνονται από νευρικές απολήξεις στο δέρμα ή να παράγονται από τα αυτόχθονα κύτταρα. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι τα πεπτίδια που εμπλέκονται στον HPA άξονα, τον κυριότερο ενδοκρινικό άξονα που διαμεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες όπως η CRH και οι υποδοχείς της και η προοπιομελανοκορτίνη εκφράζονται στο δέρμα διαφόρων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου {Slominski, 2004}. Εντούτοις, η έκφραση των γονιδίων αυτών σε τραυματισμένο ιστό κατά τη διάρκεια της επούλωσης και η συμμετοχή των πεπτιδίων αυτών στη διαδικασία αυτή δεν έχει μελετηθεί ακόμα. Αντιθέτως, πολυάριθμες μελέτες έχουν προτείνει ότι η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών, το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του ΗΡΑ άξονα, στον ορό του αίματος, προκαλούν μη φυσιολογική επούλωση των πληγών σε ανθρώπους και πειραματικά μοντέλα. Η κατασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται κυρίως με την

αντιφλεγμονώδη δράση τους, καθώς οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι απαραίτητοι για την ομαλή μετάβαση στις όψιμες φάσεις της επούλωσης {Grose, 2002}.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της CRH, της κυριότερης ορμόνης που διαμεσολαβεί την απάντηση του οργανισμού στο στρες, στη δερματική τραυματική επούλωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε δυο πειραματικές προσεγγίσεις:

(ι) *in vivo*, με μύες στους οποίους έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου της CRH (*Crh-/-*) και
(ii) *in vitro*, μέσω πρωτογενών καλλιεργειών ινοβλαστών προερχόμενων από δερμίδα μυός και ανθρώπου.

#### Η CRΗ συμμετέχει στην επούλωση του δερματικού τραύματος μυών

Η CRH έχει ανιχνευτεί, εκτός του εγκεφάλου, σε πολλούς περιφερικούς ιστούς και φαίνεται ότι τα επίπεδα της αυξάνονται παρουσία συνυπάρχουσας φλεγμονής. Οι ανοσορυθμιστικές δράσεις της CRH είναι πλέον αποδεδειγμένες, όπως επίσης και ο προφλεγμονώδης ρόλος της σε αρκετά μοντέλα πειραματικής φλεγμονής {Karalis, 1991}. Η δυνατότητα δημιουργίας μυών με συγκεκριμένες κληρονομήσιμες γενετικές μεταλλάξεις έχει διευκολύνει τη διαλεύκανση του *in vivo* φυσιολογικού ρόλου πολλών πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένης της CRH. Οι ανεπαρκείς για την CRH (*Crh-/-*) μύες παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στον ορό του αίματος. Για το λόγο αυτόν παρέχουν ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της συμβολής της CRH, άμεσης ή έμμεσης μέσω της τροποποίησης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών, σε πολλαπλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η τραυματική επούλωση.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, μελετήσαμε την πορεία της τραυματικής επούλωσης σε μύες ανεπαρκείς για την CRH με τη δημιουργία κυκλικών εκτομών στη ραχιαία περιοχή *Crh-/-* και «φυσιολογικών» *Crh+/+* μυών. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη σε μελέτες τραυματικής επούλωσης σε μύες. Πρωταρχικό και απαραίτητο βήμα της μελέτης μας ήταν να χαρακτηρισθεί η έκφραση της CRH και των υποδοχέων της σε δέρμα φυσιολογικών μυών κατά τις διάφορες φάσεις της τραυματικής επούλωσης. Οι μελέτες μας περιγράφουν για πρώτη φορά έκφραση της CRH στο δέρμα μυός, πριν και κατόπιν τραυματικής λύσης της συνέχειάς του. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί η έκφραση του γονίδιου της CRH στο ανθρώπινο δέρμα αλλά όχι στο δέρμα ενήλικου μυός {Slominski, 2000; Slominski,

πιθανόν η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων μας συγκριτικά με τις προηγούμενες μελέτες να οφείλεται στο διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των μυών που χρησιμοποιηθήκαν (ανάμεικτο C57/ *BL*6x129Sv). Εναλλακτικά, η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο διαφορετικό χρόνο του κύκλου της τρίχας, γεγονός που έχει αναφερθεί και σε δημοσιευμένες μελέτες {Roloff, 1998 ; Kauser, 2006}.

Παράλληλα ελέγξαμε την έκφραση των υποδοχέων της CRH στην περιοχή του τραύματος. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν την έκφραση των Crf1 και Crf2 στο φυσιολογικό δέρμα των μυών, όπως έχει αναφερθεί σε παλαιότερες μελέτες {Slominski, 1999}. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η έκφραση του Crf1 καταστέλλεται την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος στους Crh+/+ μύες (συγκριτικά με την έκφραση του στο φυσιολογικό δέρμα) και επανέρχεται σε παρόμοια επίπεδα με τα φυσιολογικά την τρίτη ημέρα. Μείωση στα επίπεδα έκφρασης του Crf1 παρατηρείται και στους Crh-/- μύες την πρώτη ημέρα, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Η απουσία έκφρασης του Crf1 στους μύες αγρίου τύπου μόνο κατά την πρώτη ημέρα της επούλωσης μπορεί να εξηγηθεί από την παρατηρούμενη αύξηση των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα των μυών αυτών σε σχέση με τους αντίστοιχους Crh-/όπως αναφέρεται παρακάτω.

Πράγματι, βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν τους ανεπαρκείς για την CRH μύες (*Crh-/-*), οι οποίοι εμφανίζουν ταυτόχρονη ελάττωση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια {Venihaki, 1999} δείχνουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης του CRF1 στον PVN στους μύες {Makino, 2005}.

Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν (εικόνα 2) αλλαγές στην έκφραση του *Crf2*, κατά την πρώτη και τρίτη ημέρα ενισχύει την υπόθεση που είχαν θέσει προηγούμενες δημοσιευμένες έρευνες ότι ο υπότυπος αυτός ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο από τον *Crf1* {Brunson, 2002; Moriyama, 2005}. Επειδή έχει δειχθεί ότι η CRH έχει χαμηλότερη συγγένεια με τον *Crf2*, η επίδραση της ουροκορτίνης - το φυσικό ενδογενές πεπτίδιο με υψηλή συγγένεια στον *Crf2*, το οποίο φαίνεται να εκφράζεται στο δέρμα των φυσιολογικών μυών {Slominski, 2001} στην έκφραση και την ικανότητα πρόσδεσης του χρειάζεται αξιολόγηση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε μακροσκοπικά η διαδικασία της επούλωσης στους μύες μετρώντας τη συνολική επιφάνεια κάθε τραύματος για 5 συνεχείς ημέρες. Ως θετικό δείγμα ελέγχου του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν ανεπαρκείς για την IL-6 (*Il6-/-*) μύες στους οποίους είναι γνωστό ότι η τραυματική επούλωση καθυστερεί

δραματικά {Gallucci, 2000; Lin, 2003}. Οπως δείχνουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας (εικόνα 3) οι Crh-/- μύες παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της επιφάνειας του τραύματος από τη δεύτερη έως και την πέμπτη ημέρα από την επαγωγή του σε σχέση με τους Crh+/+ μύες. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν τη σημασία της CRH στις αρχικές φάσεις της επούλωσης (φλεγμονώδης, πολλαπλασιασμού) δερματικού τραύματος.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα ευρήματα αυτά μελετήσαμε ιστολογικά τομές προερχόμενες από την περιοχή του τραύματος οι οποίες ελήφθησαν σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την επαγωγή του (1 έως 5 ημέρες). Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του δέρματος μελετήθηκαν με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. Εκτίμηση των πλακιδίων από παθολογοανατόμο δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην επούλωση κατά την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος. Εντούτοις, οι Crh-/μύες εμφανίζουν περισσότερα φλεγμονώδη στοιχεία (κυρίως πολυμορφοπύρηνα) και κοκκιώδη ιστό, κατά την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς μύες που χαρακτηρίζονταν από ηπιότερη φλεγμονή, γεγονός που πιθανόν να αντανακλά τα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο αίμα των Crh-/- μυών. Κατά την πέμπτη ημέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές ιστολογικές διαφορές σε επίπεδο φλεγμονής και κοκκιώδους και ουλώδους ιστού μεταξύ των δύο γονοτύπων. Η ακριβής στοιχειομετρική κατανομή των εμπλεκομένων φλεγμονωδών κυττάρων θα συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των γεγονότων που διαδραματίζονται τις πρώτες ημέρες της επούλωσης στους Crh-/- μύες.

Επιπλέον, η διαδικασία της επαναεπιθηλιοποίησης ξεκινά (κατά την τρίτη ημέρα) και ολοκληρώνεται νωρίτερα (κατά την πέμπτη ημέρα) στους *Crh-/-* μύες, σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου όπου η επαναεπιθηλιοποίηση δεν έχει ολοκληρωθεί την πέμπτη ημέρα. Οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν με τα αποτελέσματα των μακροσκοπικών μελετών και με το γεγονός ότι η έλλειψη της CRH επάγει την επαναεπιθηλιοποίηση στην τραυματική επούλωση. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται επίσης σε δημοσιευμένες *in vitro* μελέτες που υποστηρίζουν ότι η CRH καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό ενώ παράλληλα επάγει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων {Zbytek, 2005; Zbytek, 2005}.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στην τραυματική επούλωση των Crh-/- μυών σε σχέση με τη διαδικασία στους Crh+/+ μύες δεν οφείλονται σε προϋπάρχουσες μορφολογικές τους διαφορές (κολλαγόνο και λοιπά στοιχεία δέρματος), όπως έδειξε η

εξέταση τομών φυσιολογικού δέρματος παρακείμενου στο τραύμα. Επειδή η δοκιμή Sircol μετράει νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο και όχι ομοιοπολικά συνδεδεμένες ίνες, η έλλειψη διαφοράς μεταξύ των δύο γονοτύπων στο φυσιολογικό δέρμα δείχνει παρόμοιο βαθμό σύνθεσης κολλαγόνου. Αντίθετα, η ιστολογική παρατήρηση ότι το δέρμα των *Crh-/-* διαθέτει περισσότερο κολλαγόνο από ότι των μυών αγρίου τύπου αντανακλά το συνολικό κολλαγόνο της τομής. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών που εμφανίζουν οι ανεπαρκείς για την CRH μύες, τα οποία ως γνωστών μπορούν να διασπάσουν το κολλαγόνο στα αμινοξέα του και να επιβραδύνουν την εναπόθεση του {Houck, 1968}.

Μια ομάδα κυττάρων με σημαντικό ρόλο στην τραυματική επούλωση που έχει δειχθεί ότι οι λειτουργίες τους τροποποιούνται από την CRH είναι τα ιστιοκύτταρα {Cao, 2005; Donelan, 2006; Cao, 2006}. Μέσα σε λίγες ώρες από τον τραυματισμό, τα αυτόχθονα ιστιοκύτταρα αποκοκκιοποιούνται αποτελώντας έτσι σημαντική πηγή προφλεγμονωδών παραγόντων και κυτταροκινών ικανών να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση και αλλαγές στα αγγεία. Τα επίπεδα των ιστιοκυττάρων επιστρέφουν στα φυσιολογικά περίπου 48 ώρες μετά τον τραυματισμό ενώ αυξάνουν ξανά σε αριθμό όσο η τραυματική επούλωση προχωρά {Eming, 2007}. Φλεγμονώδεις καταστάσεις του δέρματος που σχετίζονται με το στρες φαίνεται επίσης να διαμεσολαβούνται από τα ιστιοκύτταρα. Μελέτες της ομάδας του Theoharides έδειξαν ότι η CRH επάγει την αποκοκκιοποίηση των ιστιοκυττάρων και την αγγειοδιαστολή {Donelan, 2006}. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύσαμε διαφορές στον αριθμό των ιστιοκυττάρων κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης μεταξύ των δύο γονοτύπων πιθανόν να οφείλεται (εκτός από την πραγματική έλλειψη διαφοράς μεταξύ των γονοτύπων) σε φαινομενική έλλειψη η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στην ηλικία των τραυμάτων ή στο γεγονός ότι τα αποκοκκιωμένα ιστιοκύτταρα είναι δύσκολο να διακριθούν με μια απλή ιστολογική χρώση {Pesci, 1993}. Δεδομένου ότι τα ιστιοκύτταρα αποτελούν πηγή πληθώρας σημαντικών παραγόντων για την τραυματική επούλωση, μια πιο ενδελεχής μελέτη θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για να ελεγχθεί η παραπάνω ιστολογική παρατήρηση.

*In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η CRH ασκεί διεγερτικές δράσεις στην παραγωγή της IL-1, IL-2, και IL-6 {Singh, 1990; Leu, 1992} και στην έκφραση του υποδοχέα της IL-2 {Singh, 1989} ενώ επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών της οξείας φάσης στο ήπαρ {Hagan, 1993}. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι *Crh-/-* μύες έχουν 2-3 φορές υψηλότερα επίπεδα πλάσματος TNFα και IL-1β μετά από σήψη επαγόμενη από LPS καθώς επίσης και επίπεδα IL-6 μετά από τοπική φλεγμονή επαγόμενη από

διαλυτικό {Karalis, 1997; Venihaki, 2001}. Αντίθετα, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν αντιφλεγμονώδη ρόλο καταστέλλοντας την έκφραση των παραπάνω παραγόντων {Hubner, 1996}. Οι παραπάνω παράγοντες απελευθερώνονται στο σημείο του τραύματος κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους φάσης, κυρίως από μακροφάγα, και ενορχηστρώνουν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών τύπων αλλά και επάγουν την έκκριση άλλων παραγόντων που είναι σημαντικοί για την μετάβαση της διαδικασίας στις επόμενες φάσεις της επούλωσης.

Τα αποτελέσματα μας δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση του *TNFa* και της *IL-1β* κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας μετά την επαγωγή του τραύματος μεταξύ των δύο γονοτύπων, όπως αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο της RT-PCR. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση των παραπάνω παραγόντων ξεκινά πολύ νωρίς (3 ώρες) μετά την επαγωγή του τραύματος και συνεπώς, πιθανή διαφορά στην έκφραση τους θα μπορούσε να έχει αποκατασταθεί μετά από μία ημέρα όταν εμείς ελέγξαμε την έκφραση τους {Bryan, 2005}. Την ίδια ημέρα δε μετρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης του TNF-α στον ιστό μεταξύ των δύο γονοτύπων. Επειδή οι κύριες πηγές TNF-α αποτελούν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα του τραύματος, η έλλειψη διαφοράς που παρατηρείται ιστολογικά στη φλεγμονώδη αντίδραση κατά την πρώτη ημέρα μεταξύ ανεπαρκών για την CRH και μη μυών μπορεί να εξηγεί αυτό το εύρημα.

Παρόλο που οι Crh-/- μύες εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της Il-6 σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα τραύματα μυών αγρίου τύπου, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ποσότητα της ενεργούς πρωτεΐνης στο εκχύλισμα των πληγών μεταξύ των δύο γονοτύπων. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί, όπως και στην περίπτωση του TNF-α, από την έλλειψη διαφοράς στον αριθμό φλεγμονωδών στοιχείων κατά την πρώτη ημέρα της επούλωσης μεταξύ των δύο γονοτύπων.

Τέλος, η μέτρηση της ενεργής μορφής του TGF-β1 σε εκχύλισμα τραυματισμένου δέρματος έδειξε ότι οι *Crh-/-* μύες παράγουν υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα την τρίτη ημέρα του τραύματος. Κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους αντίδρασης μετά από τραυματισμό, αιμοπετάλια, ινοβλάστες, μυοινοβλάστες και ηωσινόφιλα απελευθερώνουν TGF-β ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών καθώς και άλλων επιδιορθωτικών κυττάρων και τη σύνθεση εξωκυττάριας ύλης από τα παραπάνω κύτταρα. Παρόλο που έχει αναφερθεί ότι υψηλά επίπεδα TGF-β συνδέονται με υψηλά επίπεδα ουλώδους ιστού, η ιστολογική εκτίμηση τον τομών δεν αποκάλυψε διαφορές στον ουλώδη ιστό μεταξύ των δύο γονοτύπων.

Η φλεγμονή και ο πολλαπλασιασμός βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων, από τους οποίους ο NF-κB θεωρείται ότι διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο {Tak, 2001}. Στα περισσότερα κύτταρα ο NF-κB είναι παρών σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με τον παράγοντα ΙκΒ. Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και διάφοροι παράγοντες, όπως ο TNF-α, οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB, αποδέσμευση από τον ΙκΒ και μετανάστευση προς τον πυρήνα, όπου ο NF-κB ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων μέσω ειδικών θέσεων πρόσδεσης {Li, 2002}. Ο NF-κΒ διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών φλεγμονωδών και ανοσολογικών γονιδίων και η αλληλεπίδραση του με τα γλυκοκορτικοειδή πιθανό να καταστέλλει την έκφραση αυτών των γονιδίων {Barnes, 1998}. Παλαιότερες μελέτες από την ερευνητική μας ομάδα έχουν δείξει ότι η CRH μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει τον παράγοντα NF-κB σε λεμφοκύτταρα μυός προερχόμενα τόσο από πρωτογενείς καλλιέργειες όσο και σε κυτταρικές σειρές ανάλογα με τον ποιο υπότυπο υποδοχέα της CRH εκφράζουν {Zhao, 2002}. Πιο συγκεκριμένα, ο NF-κΒ καταστέλλεται μετά από επίδραση με CRH στα κύτταρα που εκφράζουν CRF1, ενώ επάγεται στα κύτταρα που εκφράζουν CRF2. Στα κορτικοτρόφα κύτταρα AtT20, η CRH καταστέλλει την ενεργότητα του NF-κB που επάγεται μετά από επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> {Lezoualc'h, 2002}, ενώ στα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT, εξασθενεί την ενεργότητα του NFκΒ που έχει αυξηθεί από την απομάκρυνση των αυξητικών παραγόντων {Zbytek, 2004}.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο NF-κB ενεργοποιείται τη πρώτη ημέρα στους *Crh-/-* μύες και αυξάνεται επιπλέον την τρίτη ημέρα. Αντίθετα, δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού την πρώτη ημέρα στα ζώα αγρίου τύπου, ενώ την τρίτη μέρα σημειώνεται αύξηση, αλλά σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται στους *Crh-/-* μύες. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η έλλειψη της CRH ή/και η ανεπάρκεια σε γλυκοκορτικοειδή στους *Crh-/-* μύες είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του NF-κB που παρατηρείται πολύ νωρίς κατά την τραυματική επούλωση στους συγκεκριμένους μύες.

# Μελέτες δράσης ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στην επούλωση δερματικών τραυμάτων

Είναι γνωστό από έναν μεγάλο αριθμό εργαστηριακών και κλινικών δεδομένων ότι η ενεργοποίηση του άξονα του ψυχικό ή σωματικό στρες και η επακόλουθη αύξηση των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα καταστέλλει την επούλωση τυχόν συνυπάρχοντος

τραύματος γεγονός που έχει συνδεθεί κυρίως με την αντιφλεγμονώδη δράση των τελευταίων. Η επαγωγή ενός τραύματος στο δέρμα παρόλα αυτά καθώς και η επακόλουθη φλεγμονώδης αντίδραση δεν είναι ικανές να επάγουν σημαντική αύξηση των επιπέδων των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στον ορό του αίματος σε επίπεδα που χαρακτηρίζουν καταστάσεις στρες, όπως έχουν δείξει και προηγούμενες μελέτες {Grose, 2002}. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης κατά την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος που παρουσιάζουν οι Crh+/+ αλλά όχι οι Crh-/- μύες πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση του άξονα του στρες εξαιτίας του πόνου {Schafer, 1997}. Όπως είναι γνωστό, η επαγωγή τραύματος μπορεί να οδηγήσει σε μέτριο έως οξύ άλγος. Στην πραγματικότητα, τα αρχικά πειράματα στα οποία αντιστοιχεί το παραπάνω αποτέλεσμα (εικόνα 7) πραγματοποιήθηκαν χωρίς τη χορήγηση αναλγητικού. Στα επόμενα πειράματα που χρησιμοποιήσαμε το αναλγητικό φεντανύλη, ένα ισχυρό ηρεμιστικό/αναλγητικό - αγωνιστή των μ οπιοειδών υποδοχέων {GREEN, 1981; Dahan, 2005} δεν παρατηρήσαμε αλλαγές στην συγκέντρωση της κορτικοστερόνης στο αίμα μετά την επαγωγή του τραύματος σε κανένα από τους δύο γονοτύπους.

Επειδή όμως τα *Crh-/-* ζώα έχουν χρόνια ανεπάρκεια σε γλυκοκορτικοειδή η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τη διαδικασία της τραυματικής επούλωσης και σε αντιπαραβολή με το δεδομένο αυτό, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν προτείνει ότι η εκφραζόμενη σε φλεγμαίνοντες ιστούς CRH έχει άμεσο προφλεγμονώδη ρόλο θεωρήσαμε σκόπιμο να ελέγξουμε την πιθανότητα ότι τα ευρήματα μας αναφορικά με την επιταχυνόμενη επούλωση στους *Crh-/-* μύες σχετίζονται με τη γλυκοκορτικοειδική ανεπάρκεια μέσω των παρακάτω βημάτων:

- Αποκατάστασης επιπέδων γλυκοκορτικοειδών στους ανεπαρκείς για την CRH μύες
- Φαρμακολογικού αποκλεισμού της δράσης των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών σε Crh+/+ μύες

α. Φαρμακολογικού αποκλεισμού του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών - Πείραμα με RU486

β. Φαρμακολογικός αποκλεισμός της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια - Πείραμα Φαρμακολογικής επινεφριδιεκτομής (PhADx)

#### Αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών

Αντίθετα με την CRH, η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση έχει μελετηθεί εκτενώς. Από ένα μεγάλο αριθμό κλινικών και πειραματικών μελετών έχει βρεθεί ότι τόσο η αύξηση των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα του αίματος μετά από ενεργοποίηση του άξονα του στρες όσο και η εξωγενής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών είναι επιζήμια για την τραυματική επούλωση {Grose, 2002; Padgett, 1998}. Αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών παρατηρούνται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις που συχνά σχετίζονται με προβλήματα στην τραυματική επούλωση, όπως παχυσαρκία και διαβήτης {Bitar, 1998}. Η κατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται κυρίως με την αντιφλεγμονώδη δράση τους {Grose, 2002. Τα γλυκοκορτικοειδή, σε φαρμακολογικές δόσεις, επηρεάζουν την φλεγμονώδη φάση της τραυματικής επούλωσης ρυθμίζοντας την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, αυξητικών παράγοντων και πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Στην ίδια συγκέντρωση καταστέλλουν τη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων και μακροφάγων στο σημείο της πληγής και ταυτόχρονα μειώνουν την ικανότητα φαγοκυττάρωσης {Beer, 2000} και την παραγωγή ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών από τα μακροφάγα.

Επιπρόσθετα, η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών στον ορό του αίματος, οφειλόμενη σε ενεργοποίηση του άξονα του στρες από κάποιον επιβλαβή παράγοντα οδηγεί σε καθυστέρηση στην τραυματική επούλωση κυρίως κατά τις πρώτες ημέρες της επούλωσης επιβεβαιώνοντας την κατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στην φάση της φλεγμονής. Ένας πιθανός στόχος των γλυκοκορτικοειδών είναι τα μακροφάγα του ιστού, η δράση των οποίων έχει δειχτεί ότι επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών, επεκτείνεται, όμως, και στις φάσεις πολλαπλασιασμού και αναδόμησης καθώς πολλοί από τους παραπάνω παράγοντες που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα και που η παραγωγή τους καταστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή ευθύνονται για την μετάβαση στις φάσεις αυτές {Beer, 2000; Horan, 2005}.

Αντίθετα, λίγες εργασίες αναφέρονται στο ρόλο των φυσιολογικών επιπέδων των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Ο Grose και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μύες που εξέφραζαν έναν μεταλλαγμένο τύπο του υποδοχέα GR ο οποίος δεν είχε την ικανότητα να συνδέεται στο DNA, ότι, αντίθετα με τη δραματική επίδραση των εξωγενών γλυκοκορτικοειδών, τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή, όταν βρίσκονται σε φυσιολογικές τιμές φαίνεται να ασκούν κατασταλτική δράση στα αρχικά στάδια της τραυματικής επούλωσης {Grose, 2002}.
Προκειμένου να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι τα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο αίμα των Crh-/- μυών αποτελούν την αιτία για την παρατηρούμενη επιταχυμένη τραυματική επούλωση προχωρήσαμε σε αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους μύες αυτούς. Καμία σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύτηκε στα επίπεδα της κορτικοστερόνης του ορού μεταξύ των Crh+/+ και των Crh-/- μετά την χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών μέσω του πόσιμου νερού γεγονός που επιβεβαίωσε ότι η χορηγούμενη δόση ήταν επαρκής για να αποκαταστήσει τη συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών στον ορό των Crh-/- μυών στα επίπεδα των φυσιολογικών μυών. Παραδόξως, η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στους Crh-/- μύες οδήγησε σε μεγαλύτερη, μακροσκοπικά, μείωση της επιφάνειας του τραύματος κατά την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του σε σχέση με τους Crh-/- μύες γεγονός που συνηγορεί στην υπόθεση ότι η επιτάχυνση στην επουλωτική διαδικασία που παρατηρήθηκε στους Crh-/- μύες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην έλλειψη της CRH. Η ιστολογική εκτίμηση των πλακιδίων έδειξε ότι η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους ανεπαρκείς για τη CRH μύες οδηγεί σε συντόμευση της φλεγμονώδους φάσης από την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος. Οι τομές δερματικών τραυμάτων μίας ημέρας προερχόμενες από Crh-/- μύες μετά από χορήγηση κορτικοστερόνης χαρακτηρίζονται από περισσότερα πολυμορφοπύρηνα και μακροφάγα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Την τρίτη ημέρα, τα φλεγμονώδη στοιχεία έχουν υποχωρήσει, ενώ οι τομές εμφανίζουν ινώδη ιστό και πολλούς ινοβλάστες. Την πέμπτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος, η επαναεπιθηλιοποίηση έχει ολοκληρωθεί, όπως και στις τομές Crh-/- μυών που τους χορηγούνταν το έκδοχο, ενώ δεν παρατηρούνται πλέον φλεγμονώδη στοιχεία. Τα δεδομένα θα μπορούσαν να ερμηνευτούν με βάση τον προφλεγμονώδη ρόλο της CRH στην περιφέρεια. Στους μύες αγρίου τύπου, όπου εκφράζεται η CRH και παράγονται γλυκοκορτικοειδή φαίνεται οι παραπάνω παράγοντες να διαθέτουν αντίθετες δράσεις στη φλεγμονώδη φάση. Στην περίπτωση των Crh-/- μυών που χαρακτηρίζονται από παντελή έλλειψη CRH και χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, η επούλωση πραγματοποιείται με γοργότερους ρυθμούς που ενισχύονται όταν πραγματοποιηθεί αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στα παραπάνω ζώα και συνεπώς της φλεγμονώδης απόκρισης {Martin, 2005 #666}, {Stramer, 2007; Eming, 2007}.

Η πορεία της επαναεπιθηλιοποίησης των *Crh-/-* μυών με ή χωρίς αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών υποδεικνύει ότι η έλλειψη της CRH είναι η αιτία της επιτάχυνσης της επαναεπιθηλιοποίησης.

Όπως είδαμε παραπάνω, οι *Crh-/-* μύες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα TGF-β1 κατά τη διάρκεια της τρίτης ημέρας επούλωσης. Η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών στους *Crh-/-* μύες επανέφερε τα επίπεδα του TGF-β1 σε αυτά των μυών αγρίου τύπου γεγονός που προτείνει ότι τα χαμηλά επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών που παρατηρούνται στους *Crh-/-* μύες είναι η αιτία για την αύξηση του TGF-β στο σημείο του τραύματος. Οι πιο πιθανές πηγές TGF-β1 κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου είναι τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες. Επειδή, οι *in vitro* μελέτες μας έδειξαν ότι οι *Crh-/-* ινοβλάστες εκκρίνουν λιγότερο TGF-β1 σε σχέση με τους *Crh+/+*, πιθανόν τα μακροφάγα να ευθύνονται για την υπερρέκκριση TGF-β1 κατά την τρίτη ημέρα της επούλωσης.

Μείωση των επιπέδων του TNF-α την πρώτη ημέρα της τραυματικής επούλωσης παρατηρείται στους *Crh-/-* μύες που λάμβαναν γλυκοκορτικοειδή. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα ζώα αγρίου τύπου στα οποία χορηγούσαμε κορτικοστερόνη. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι CRH και γλυκοκορτικοειδή διαθέτουν συνδυασμένη και αντίθετη δράση όσον αφορά την παραγωγή TNF-α στα ζώα αγρίου τύπου. Η ταυτόχρονη ανεπάρκεια και των δύο παραγόντων στους *Crh-/-* μύες δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη συγκέντρωση του TNF-α την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος, όμως η αποκατάσταση των γλυκοκορτικοειδών μειώνει σημαντικά την έκκρισή του.

Κατά τη διάρκεια της επούλωσης, η ΙL-6 παράγεται από επιδερμικά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα και η συγκέντρωση της εμφανίζει δύο μέγιστα. Το πρώτο μέγιστο συμβαίνει 16h περίπου και το δεύτερο ξεκινά μετά από 48h μετά την επαγωγή του τραύματος {Kondo, 1996; Mateo, 1994}. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της IL-6 δεν παρουσιάζουν διαφορές την πρώτη ημέρα μετά την επαγωγή του τραύματος μεταξύ των *Crh+/+* και *Crh-/-*. Πιθανόν, την τρίτη ημέρα να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο γονοτύπων αφού ιστολογικά παρατηρήθηκαν αλλαγές στις κυριότερες κυτταρικές πηγές που την εκκρίνουν στην φάση αυτή (κερατινοκύτταρα και τα μακροφάγα).

#### Φαρμακολογικός αποκλεισμός των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στην τραυματική επούλωση, χρησιμοποιήσαμε δύο μοντέλα αποκλεισμού της δράσεως τους. Το πρώτο μοντέλο αφορούσε το φαρμακολογικό αποκλεισμό της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια (φαρμακολογική επινεφριδεκτομή με χρήση μετυραπόνης) και με τον οποίο σκοπό

είχαμε να μειώσουμε τη σύνθεση γλυκοκοτρικοειδών σε ζώα αγρίου τύπου και στη συνέχεια να μελετήσουμε την εξέλιξη της τραυματικής επούλωσης. Το δεύτερο μοντέλο στόχευε στο φαρμακολογικό αποκλεισμό του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τη χρήση μιφεπριστόνης (RU486), ενός μη ειδικού ανταγωνιστή των υποδοχέων τύπου ΙΙ των γλυκοκορτικοειδών. Σε αυτή την περίπτωση η τραυματική επούλωση θα μελετούνταν παρουσία ανενεργών γλυκοκορτικοειδών καθώς δεν θα υπήρχε η δυνατότητα σύνδεσης στον ενδοκυτταρικό υποδοχέα τους.

Δυστυχώς, τα αποτελέσματα από τα δύο πειραματικά μοντέλα δεν παρείχαν σαφείς ενδείξεις για το ρόλο των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών. Και στις δύο περιπτώσεις η θνησιμότητα των ζώων και των δύο γονοτύπων ήταν υψηλή μετά τη χορήγηση των φαρμάκων. Στην περίπτωση της φαρμακολογικής επινεφριδεκτομής η χορηγούμενη μετυραπόνη προκάλεσε νωθρότητα στους μύες οι οποίοι επιπλέον παρουσίαζαν μικρή ευαισθησία στο χορηγούμενο αναισθητικό που ενίετο προκείμενου να πραγματοποιηθεί το τραύμα. Οι παρατηρήσεις αυτές μας ανάγκασαν να εγκαταλείψουμε το μοντέλο της φαρμακολογικής αδρεναλεκτομής.

Στην περίπτωση της ενδοδερμικής χορήγησης μιφεπριστόνης (διαλυμένη σε DMSO) η θνησιμότητα πλησίαζε το 100% γεγονός που δεν παρατηρήθηκε με τη χορήγηση μόνο του εκδόχου. Σε αρκετά από τα πειράματα μας η χορήγηση μιφεπριστόνης συνοδευόταν με εκχυμώσεις στους οφθαλμούς, σπασμούς και γενικευμένη νοσηρότητα. Η αλλαγή του εκδόχου σε PEG-400 οδήγησε σε ανεξέλεγκτο κνησμό και τραυματισμό του δέρματος από τα ίδια τα ζώα στο σημείο της ένεσης (στην ράχη).

#### Μελέτη του τρόπου δράσης της CRH στην λειτουργία των δερματικών ινοβλαστών

Οι ινοβλάστες αποτελούν τα πιο σημαντικά μεσεγχυματικά κύτταρα που εμπλέκονται στην τραυματική επούλωση. Ο ρόλος τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της επούλωσης είναι να παράγουν εξωκυττάρια ουσία, κυρίως κολλαγόνο, που θα αντικαταστήσει το προσωρινό ινώδες, ενώ είναι επίσης υπεύθυνοι για την επαναπροσέγγιση των άκρων του τραύματος λόγω της συσταλτικής τους ικανότητας κατά τη διάρκεια της αναδόμησης. Φυσιολογικές λειτουργίες των ινοβλαστών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας είναι σημαντικές για την αναγέννηση μιας λειτουργικής δερμίδας {Baum, 2005}.

Κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού στην τραυματική επούλωση, ινοβλάστες που βρίσκονται στα όρια του τραυματισμένου δέρματος μεταναστεύουν προς τη περιοχή του τραύματος και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται προκειμένου να την καλύψουν. Αυτή η διαδικασία συντονίζεται με εξαιρετικό τρόπο από τοπικά παραγόμενους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που λειτουργούν με αυτοκρινή ή/και παρακρινή τρόπο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από παλαιότερες μελέτες, η CRH ρυθμίζει την έκφραση της IL-6 κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι οι ανεπαρκείς για την *Crh* μύες εμφανίζουν επιταχυμένη τραυματική επούλωση *in vivo* και κατασταλμένη έκφραση της IL-6 στον ιστό. Βασιζόμενοι στα παραπάνω, κρίναμε αναγκαίο να διαλευκάνουμε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής το ρόλο της ενδογενούς CRH στη λειτουργία των πρωτογενών δερματικών ινοβλαστών *in vitro*.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ινοβλάστες προερχόμενους από δέρμα νεογνών μυών ανεπαρκών ή μη για την CRH. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες προερχόμενοι από ανθρώπινη ακροποσθία. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι οι ινοβλάστες μυός εκφράζουν τη CRH και ότι η έκφρασή του επηρεάζει μια πληθώρα σημαντικών λειτουργιών των ινοβλαστών. Τα δεδομένα προτείνουν ότι η τοπικά παραγόμενη CRH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογία αυτών των κυττάρων, επίδραση που σχετίζεται με την παρατήρησή μας από τους Crh+/+ και Crh-/μύες καθώς και τους ανθρώπινους ινοβλάστες. Πιο ειδικά, αποδείξαμε ότι οι νεογνικοί ινοβλάστες μυός εκφράζουν CRH σε αντίθεση με την αναφορά ότι οι ινοβλάστες των έφηβων ή ενήλικων μυών δεν εκφράζουν. Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική πηγή ινοβλαστών, στην ηλικία ή στο αναπτυξιακό στάδιο. Επίσης, δείξαμε ότι και οι δύο τύποι υποδοχέων, CRF1 και CRF2 εκφράζονται στους δερματικούς ινοβλάστες μυών και των δύο γονοτύπων και η ενεργοποίηση τους έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή cAMP. Αυτά τα δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες στις οποίες έχει δειχθεί ότι οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες εκφράζουν τον υποδοχέα CRF<sub>1</sub> του οποίου η ενεργότητα ρυθμίζεται από την εξωγενή χορήγηση CRH μέσω ενεργοποίησης cAMP και IP3. Προς έκπληξη μας δεν παρατηρήσαμε αύξηση στα επίπεδα του cAMP στους ινοβλάστες αγρίου τύπου μετά την επίδραση με CRH. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις του ενδοκυτταρικού cAMP πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρα κύτταρα – intact - που πιθανόν να διατηρούν την ικανότητα να παράγουν τα ίδια CRH. Επομένως είναι πιθανό ότι η ενδογενής CRH που παράγεται και εκκρίνεται από τους ινοβλάστες προερχόμενους από μύες αγρίου τύπου προκαλεί κορεσμό των υποδοχέων  $CRF_1$  και  $CRF_2$ , που εκφράζονται σε αυτά τα

κύτταρα διεγείροντας στο μέγιστο την εξαρτώμενη από τους υποδοχείς της CRH συσσώρευση cAMP. Για να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω υπόθεση, καλλιεργήσαμε ινοβλάστες αγρίου τύπου παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης 2β, δύο ειδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων της CRF<sub>1</sub> και CRF<sub>2</sub>, αντίστοιχα. Καθένας από τους ανταγωνιστές οδήγησε σε μείωση των επιπέδων cAMP γεγονός που συνηγορεί στην αρχική υπόθεση.

Ακολούθως, βρήκαμε επιταχυμένο πολλαπλασιασμό καθώς και ρυθμό μετανάστευσης σε βασικές συνθήκες στους πρωτογενείς *Crh-/-* ινοβλάστες σε σχέση με τους αντίστοιχους *Crh+/+* με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων έκκρισης IL-6 και TGFβ1. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ειδική επίδραση της ενδογενούς CRH σε διάφορους ανεξάρτητους δείκτες της βιολογίας των ινοβλαστών τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και μετά από *in vitro* επαγωγή τραύματος.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι, παρόλο που το σύστημα CRH/CRF υποδοχείς εκφράζεται τόσο στο ανθρώπινο όσο και στο δέρμα μυός διαδραματίζοντας σπουδαίο φυσιολογικό ρόλο, εντούτοις, έχουν καταγραφεί διαφοροποιήσεις, όπως η έκφραση ενός κυρίαρχου τύπου υποδοχέα. Παραδόξως, ο φαρμακολογικός αποκλεισμός της CRH σε πρωτογενείς δερματικούς ινοβλάστες που προέρχονται από ανθρώπινη ακροποσθία επάγει παρόμοιο φαινότυπο με αυτόν που παρατηρήσαμε στους Crh-/- ινοβλάστες.

Μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας είχαν επισημάνει αλλαγή στα επίπεδα της IL-6 στους Crh-/- μύες που είχαν υποστεί επαγωγή αποστήματος μετά από επίδραση με διαλυτικό (turpentine). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε δερματικούς ινοβλάστες, αν και έδειξαν αλλαγές στα επίπεδα της IL-6, είχαν αντίθετη κατεύθυνση. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να αφορά στον διαφορετικό ανατομικό εντοπισμό συγκεκριμένων υπότυπων (ή ισομορφών) του υποδοχέα και/ή στην ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών που συνοδεύουν τη διέγερση του υποδοχέα στο συγκεκριμένο ιστό. Επιπρόσθετα, άλλοι παράγοντες που εκφράζονται στους δερματικούς ινοβλάστες μπορεί να παρέχουν μια εξήγηση για τα παραπάνω ευρήματα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ IL-6 και TGF-β1 στους δερματικούς ινοβλάστες δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Σε άλλους ιστούς, όπως οι πνεύμονες, η υπορρύθμιση (downregulation) της IL-6 ακυρώνει την επαγωγή του πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο TGF-β1 στους ινοβλάστες {Gallelli, 2008}, ενώ ο TGF-β1 αυξάνει τα επίπεδα της ενδογενούς IL-6 {Roosterman, 2006}. Ομοίως, η έκφραση του TGF-β1 επάγεται σε ινοβλάστες ανεπαρκείς για την 116 όταν εκείνοι καλλιεργούνται παρουσία ανασυνδυασμένης IL-6 {Luckett-Chastain, 2009}.

Συμπερασματικά, τα *in vitro* πειράματα μας σε ινοβλάστες που προέρχονταν από μύες ανεπαρκείς στη CRH και τους αντίστοιχους αγρίου τύπου, καθώς και σε ανθρώπινους ινοβλάστες ακροποσθίας προτείνουν ότι η ενδογενής CRH διαδραματίζει έναν πολύ σπουδαίο φυσιολογικό ρόλο σε διάφορες παραμέτρους της λειτουργίας των ινοβλαστών στο δέρμα. Στην ουσία, η πρωταρχική επίδραση της ενδογενούς CRH φαίνεται να είναι κατασταλτική και προφλεγμονώδης. Τα δεδομένα μας προσθέτουν στις προηγούμενες αναφορές για τη φυσιολογική σημασία των νευροπεπτιδίων του στρες στη λειτουργία των ινοβλαστών και στην τραυματική επούλωση. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά μας μπορεί να έχουν σημαντική εφαρμογή στη σχεδίαση νέων θεραπευτικών ανταγωνιστών που να στοχεύουν τους δερματικούς ινοβλάστες κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης.

# ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

#### ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τριάντα χρόνια μετά από την απομόνωση της από εκχυλίσματα υποθαλάμου προβάτου, η CRH εξακολουθεί να κεντρίζει το ενδιαφέρον ως παράγοντας-κλειδί σε καταστάσεις στρες, όπως είναι η φλεγμονώδης αντίδραση. Η ικανότητα δημιουργίας μυών με συγκεκριμένες κληρονομήσιμες γενετικές μεταλλάξεις μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυονικά, βλαστικά κύτταρα έχει διευκολύνει στη διαλεύκανση του *in vivo* φυσιολογικού ρόλου πολλών νευροπεπτιδίων, όπως η CRH.

Η τραυματική επούλωση αναπαριστά την έκβαση ενός μεγάλου αριθμού αλληλεπικαλυπτομένων βιολογικών γεγονότων τα οποία οργανώνονται πάνω σε μια προσωρινή βάση σε ανταπόκριση του οργανισμού στον τραυματισμό και το μικροπεριβάλλον του τραύματος. Πρόοδοι στην κατανόηση της βιολογίας των τραυμάτων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών οι οποίες προσφέρουν στους ασθενείς με έλκη, ελπίδα. Η CRH έχει δειχθεί ότι εκφράζεται σε πολλές περιφερικές θέσεις συμπεριλαμβανόμενου και του δέρματος. Η διασαφήνιση του ρόλου της CRH κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης εμπλουτίζει τις γνώσεις μας και την κατανόηση των μονοπατιών που μεσολαβούν σε αυτή τη διαδικασία. Με βάση την πρόσφατη ανάπτυξη ειδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων της CRH για κλινική χρήση, τα ευρήματά μας μπορεί να βοηθήσουν να αναπτυχθούν νέα θεραπευτικά σχήματα για φλεγμονώδεις καταστάσεις σχετιζόμενες με αυξημένη τοπική έκφραση της CRH οι οποίες συνδέονται επίσης με μη φυσιολογική αποκατάσταση τραυματισμένου ιστού.

Ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας διατριβής είναι η επιτάχυνση της επανεπιθηλιοποίησης λόγω της απουσίας της CRH. Τα κερατινοκύτταρα δεν είναι απλά ο δομικός λίθος της επιδερμίδας, αλλά αποτελούν ρυθμιστές μιας πλειάδας διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στην επιδερμίδα {Barker, 1991}. Ο ρόλος τους στην ανοσολογική απόκριση μπορεί να εμπλέκει την έκφραση των Toll-like υποδοχέων ή τη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων κυτοκινών ή των υποδοχέων τους, αντιγόνων του συμπλόκου τύπου ΙΙ του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (major histocompability complex II antigens) και μορίων πρόσφυσης {Barker, 1991}. Τα κερατινοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς διαφόρων νευρομεταβιβαστών συμπεριλαμβανομένων των κατεχολαμινών, ενώ παράγουν ορμόνες και εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς όπως στοιχεία που απαρτίζουν τον HPA άξονα {Slominski, 2000}.

Η CRH καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό τόσο των πρωτογενών όσο και των αθανατοποιημένων κερατινοκυττάρων {Quevedo, 2001}. Επιπλεόν, η CRH αυξάνει την παραγωγή του cAMP σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταραs {Quevedo, 2001} και τα

### ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

επίπεδα του ασβεστίου τόσο σε αθανατοποιημένα όσο και σε πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα {Slominski, 1999}. Η CRH αυξάνει την παραγωγή της IL-6 και της IL-11 στα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα και αυξάνει την έκφραση τόσο του ανθρώπινου αντιγόνου λευκοκυττάρων (HLA-DR) όσο και του μεσοκυτταρικού μορίου πρόσφυσης 1 (ICAM-1) στα πρωτογενή ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Βασιζόμενοι στις παραπάνω πληροφορίες και στα δικά μας αποτελέσματα όσον αφορά την τραυματική επούλωση, το επόμενο βήμα είναι η *in vitro* μελέτη της έλλειψης της CRH στη λειτουργία των κερατινοκυττάρων κατά τη διάρκεια της τραυματικής επούλωσης. Δεδομένου του μεγάλου ενδιαφέροντος που προσελκύουν διάφορες παθολογικές καταστάσεις του δέρματος που εμπλέκουν κερατινοκύτταρα, όπως η ψωρίαση και οι οποίες ενισχύονται από καταστάσεις στρες, γίνεται κατανοητή η σημασία των παραπάνω μελετών.

- 1. Chen, R., et al., *Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8967-71.
- 2. Stratakis, C.A. and G.P. Chrousos, *Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **771**: p. 1-18.
- Vale, W., et al., Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science, 1981.
   213(4514): p. 1394-7.
- 4. Suda, T., et al., *Distribution and characterization of immunoreactive corticotropinreleasing factor in human tissues.* J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(5): p. 861-6.
- 5. Boorse, G.C. and R.J. Denver, *Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides.* Gen Comp Endocrinol, 2006. **146**(1): p. 9-18.
- 6. Lovejoy, D.A. and R.J. Balment, *Evolution and physiology of the corticotropinreleasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates.* Gen Comp Endocrinol, 1999. **115**(1): p. 1-22.
- 7. Vamvakopoulos, N.C. and G.P. Chrousos, *Hormonal regulation of human* corticotropin-releasing hormone gene expression: implications for the stress response and immune/inflammatory reaction. Endocr Rev, 1994. **15**(4): p. 409-20.
- 8. Spengler, D., et al., *Identification and characterization of a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the human corticotropin-releasing hormone gene promoter.* Mol Endocrinol, 1992. **6**(11): p. 1931-41.
- 9. Seasholtz, A.F., R.C. Thompson, and J.O. Douglass, *Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin-releasing hormone gene.* Mol Endocrinol, 1988. **2**(12): p. 1311-9.
- 10.Guardiola-Diaz, H.M., et al., Negative glucorticoid regulation of cyclic adenosine 3',<br/>5'-monophosphate-stimulated<br/>expression in AtT-20 cells. Mol Endocrinol, 1996. 10(3): p. 317-29.
- 11. Malkoski, S.P. and R.I. Dorin, *Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene.* Mol Endocrinol, 1999. **13**(10): p. 1629-44.
- 12. Lovejoy, D.A. and S. Jahan, *Phylogeny of the corticotropin-releasing factor family of peptides in the metazoa.* Gen Comp Endocrinol, 2006. **146**(1): p. 1-8.
- Pallai, P.V., et al., Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(22): p. 6770-4.

- 14. Montecucchi, P.C., et al., *Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog Phyllomedusa sauvagei.* Int J Pept Protein Res, 1980. **16**(3): p. 191-9.
- 15. Montecucchi, P.C. and A. Henschen, *Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of Phyllomedusa sauvagei.* Int J Pept Protein Res, 1981. **18**(2): p. 113-20.
- Lederis, K., et al., Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from Catostomus. Science, 1982. 218(4568):
   p. 162-5.
- 17. Vaughan, J., et al., *Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor.* Nature, 1995. **378**(6554): p. 287-92.
- 18. Zhao, L., et al., *The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN).* Genomics, 1998. **50**(1): p. 23-33.
- 19. Weninger, S.C., et al., *Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8283-8.
- 20. Pan, W. and A.J. Kastin, *Urocortin and the brain.* Prog Neurobiol, 2008. **84**(2): p. 148-56.
- Okosi, A., et al., *Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes.* Neuropeptides, 1998. **32**(2): p. 167-71.
- 22. Nishikimi, T., et al., Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000.
  279(6): p. H3031-9.
- 23. Fukuda, T., et al., *Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(8): p. 4671-8.
- 24. Kageyama, K., et al., Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5651-8.
- 25. Seres, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 965-70.
- 26. Slominski, A., et al., *Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors.* Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1678-93.
- 27. Asaba, K., S. Makino, and K. Hashimoto, *Effect of urocortin on ACTH secretion from rat anterior pituitary in vitro and in vivo: comparison with corticotropin-releasing hormone.* Brain Res, 1998. **806**(1): p. 95-103.

- 28. Skelton, K.H., M.J. Owens, and C.B. Nemeroff, *The neurobiology of urocortin.* Regul Pept, 2000. **93**(1-3): p. 85-92.
- 29. Koob, G.F. and S.C. Heinrichs, *A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors.* Brain Res, 1999. **848**(1-2): p. 141-52.
- 30. Reyes, T.M., et al., Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (*CRF*) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 *CRF* receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2843-8.
- 31. Skorzewska, A., et al., *The localization of brain sites of anxiogenic-like effects of urocortin-2.* Neuropeptides, 2011. **45**(1): p. 83-92.
- 32. Takahashi, K., et al., Urocortins as cardiovascular peptides. Peptides, 2004.
  25(10): p. 1723-31.
- 33. Kageyama, K., K. Hanada, and T. Suda, *Differential regulation and roles of urocortins in human adrenal H295R cells.* Regul Pept, 2010. **162**(1-3): p. 18-25.
- 34. Novembri, R., et al., *Urocortin2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response.* Mol Hum Reprod, 2011. **17**(9):587-93
- 35. Chen, A., et al., Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2445-57.
- 36. Slominski, A., et al., *Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system.* Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 941-50.
- 37. Kageyama, K., et al., Vasodilative effects of urocortin II via protein kinase A and a mitogen-activated protein kinase in rat thoracic aorta. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. 42(4): p. 561-5.
- 38. Chanalaris, A., et al., *Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(10): p. 1295-305.
- 39. Lewis, K., et al., Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7570-5.
- 40. Venihaki, M., et al., Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropinreleasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxietylike behaviours. J Neuroendocrinol, 2004. **16**(5): p. 411-22.

- 41. Li, C., et al., *Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression.* J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 991-1001.
- 42. Saruta, M., et al., Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. Peptides, 2005. **26**(7): p. 1196-206.
- 43. Li, C., et al., *Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion.* Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3216-24.
- 44. Hsu, S.Y. and A.J. Hsueh, *Human stresscopin and stresscopin-related peptide are* selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 605-11.
- 45. Arzt, E. and F. Holsboer, *CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS.* Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(10): p. 531-8.
- 46. Grigoriadis, D.E., et al., *Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **780**: p. 60-80.
- 47. Grammatopoulos, D.K. and G.P. Chrousos, *Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists.* Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(10): p. 436-44.
- 48. Todorovic, C., et al., *Suppression of the MEK/ERK signaling pathway reverses depression-like behaviors of CRF2-deficient mice.* Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(6): p. 1416-26.
- 49. Sanchez, M.M., et al., *Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain.* J Comp Neurol, 1999. **408**(3): p. 365-77.
- 50. Chatzaki, E., et al., Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. J Neurochem, 2004. **88**(1): p. 1-11.
- 51. Lovenberg, T.W., et al., *CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues.* Endocrinology, 1995. **136**(9): p. 4139-42.
- 52. Perrin, M.H. and W.W. Vale, *Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family.* Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 312-28.
- 53. Kostich, W.A., et al., *Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(8): p. 1077-85.

- 54. Reubi, J.C., et al., *Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3312-20.
- 55. Suda, T., et al., *Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro.* J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2790-5.
- 56. Arai, M., I.Q. Assil, and A.B. Abou-Samra, *Characterization of three corticotropinreleasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis.* Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 446-54.
- 57. Muglia, L., et al., *Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need.* Nature, 1995. **373**(6513): p. 427-32.
- 58. Venihaki, M., et al., *Circadian rise in maternal glucocorticoid prevents pulmonary dysplasia in fetal mice with adrenal insufficiency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000.
  97(13): p. 7336-41.
- 59. Muglia, L.J., et al., *The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice.* Peptides, 2001. **22**(5): p. 725-31.
- 60. Jacobson, L., et al., *CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors.* Neuroendocrinology, 2000. **71**(2): p. 79-87.
- 61. Weninger, S.C., L.L. Peters, and J.A. Majzoub, *Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency*. Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 256-63.
- 62. Gysling, K., et al., *Corticotropin-releasing hormone and urocortin: redundant or distinctive functions?* Brain Res Brain Res Rev, 2004. **47**(1-3): p. 116-25.
- 63. Bateman, A., et al., *The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* Endocr Rev, 1989. **10**(1): p. 92-112.
- 64. Blalock, J.E., Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. Ann N Y Acad Sci, 1994. **741**: p. 292-8.
- 65. Bamberger, C.M. and A.M. Bamberger, *The peripheral CRH/urocortin system*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 290-6.
- 66. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms.*Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
- 67. Aird, F., et al., *Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 7104-7108.
- 68. Karalis, K., et al., *CRH and the immune system.* J Neuroimmunol, 1997. 72(2): p. 131-6.

- 69. Karalis, K., et al., *Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropinreleasing hormone in vivo.* Science, 1991. **254**(5030): p. 421-3.
- 70. Crofford, L.J., et al., *Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* J Immunol, 1993. 151(3): p. 1587-96.
- 71. Crofford, L.J., et al., *Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis.* J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2555-64.
- 72. Scopa, C.D., et al., *Presence of immunoreactive corticotropin releasing hormone in thyroid lesions*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1159-67.
- 73. van Tol, E.A., et al., Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. Gut, 1996. **39**(3): p. 385-92.
- 74. Mastorakos, G., et al., *Immune corticotropin-releasing hormone is present in the eyes of and promotes experimental autoimmune uveoretinitis in rodents.* . Endocrinology, 1995 **136**: p. 4650-4658.
- 75. Webster, E., et al., *Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation.* J Rheumatol, 2002. **29**: p. 1252-1261.
- 76. Angioni, S., et al., Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. Life Sci, 1993. 53(23): p. 1735-1742.
- 77. McGillis, J., et al., *Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropinreleasing factor.* J Neurosci Res, 1989. **23**: p. 346-352.
- 78. Jessop, D.S., et al., *An antisense oligodeoxynucleotide complementary to corticotropin-releasing hormone mRNA inhibits rat splenocyte proliferation in vitro.* J Neuroimmunol, 1997. **75**(1-2): p. 135-40.
- 79. Poliak, S., et al., Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropinreleasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. J Immunol, 1997 **158**: p. 5751-5756.
- 80. Correa, S., et al., *Modulation of the inflammatory response by corticotropinreleasing factor.*. Eur J Pharmacol, 1997. **319**: p. 85-90.
- 81. Agnello, D., et al., *Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin.* Am J Physiol, 1998. **275**: p. E757-762.

- 82. Karalis, K.P., et al., *Corticotropin-releasing hormone deficiency unmasks the proinflammatory effect of epinephrine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7093-7.
- 83. Venihaki, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation.* J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1159-66.
- 84. Zhao, J. and K.P. Karalis, *Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropinreleasing hormone in mouse thymocytes.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(11): p. 2561-70.
- 85. Benou, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone contributes to the peripheral inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5407-13.
- 86. Slominski, A. and J. Wortsman, *Neuroendocrinology of the skin.* Endocr Rev, 2000.
  21(5): p. 457-87.
- 87. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.*Eur J Dermatol, 2002. **12**(4): p. 390-9; quiz 400-1.
- 88. Ikuta, S., et al., *Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin.* Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(11): p. 2669-75.
- Hedrich, H.J., G.R. Bullock, and ScienceDirect (Online service), *The laboratory mouse[ electronic resource]*. The handbook of experimental animals. 2004, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. xvi, 600 p.
- 90. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblast heterogeneity: more than skin deep.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 5): p. 667-75.
- 91. Roosterman, D., et al., *Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ.* Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1309-79.
- 92. Bos, J.D., Skin immune system (SIS): cutaneous immunology and clinical immunodermatology. 1997: Boca Raton : CRC Press.
- 93. Ito, N., et al., Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1332-4.
- 94. Slominski, A., et al., *Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress.* Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 979-1020.
- 95. Slominski, A.T., et al., *Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a "skin stress response system?".* Ann N Y Acad Sci, 1999. **885**: p. 287-311.

- 96. Roloff, B., et al., *Hair cycle-dependent expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptors in murine skin.* Faseb J, 1998. **12**(3): p. 287-97.
- 97. Slominski, A., et al., *Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 1020-4.
- 98. Slominski, A., et al., *Ultraviolet B stimulates production of corticotropin releasing factor (CRF) by human melanocytes.* FEBS Lett, 1996. **399**(1-2): p. 175-6.
- 99. Slominski, A., et al., *The skin produces urocortin.* J Clin Endocrinol Metab, 2000.
  85(2): p. 815-23.
- 100. Slominski, A., A. Szczesniewski, and J. Wortsman, *Liquid chromatography-mass* spectrometry detection of corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin-derived peptides in human skin. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3582-8.
- 101. Kauser, S., et al., *Modulation of the human hair follicle pigmentary unit by corticotropin-releasing hormone and urocortin peptides.* FASEB J, 2006. **20**(7): p. 882-95.
- 102. Zouboulis, C.C., et al., *Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(10): p. 7148-53.
- 103. Cao, J., et al., *Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH)* receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7665-75.
- 104. Slominski, A., et al., *Corticotropin releasing hormone and the skin.* Front Biosci, 2006. 11: p. 2230-48.
- 105. Kono, M., et al., *In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin.* Faseb J, 2001. **15**(12): p. 2297-9.
- 106. Ito, N., et al., *The human hair bulb is a source and target of CRH.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(1): p. 235-7.
- 107. Quevedo, M.E., et al., *Pleiotropic effects of corticotropin releasing hormone on normal human skin keratinocytes.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001. **37**(1): p. 50-4.
- 108. Coste, S.C., et al., *IL-1alpha and TNFalpha down-regulate CRH receptor-2 mRNA expression in the mouse heart.* Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3537-45.
- 109. Slominski, A., et al., *The expression of proopiomelanocortin (POMC) and of corticotropin releasing hormone receptor (CRH-R) genes in mouse skin.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1289**(2): p. 247-51.

- 110. Martin, P., Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science, 1997.
  276(5309): p. 75-81.
- 111. Coulombe, P.A., *Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 219-30.
- 112. Bahou, W.F. and D.V. Gnatenko, *Platelet transcriptome: the application of microarray analysis to platelets.* Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 473-84.
- 113. Noli, C. and A. Miolo, *The mast cell in wound healing*. Vet Dermatol, 2001. 12(6): p. 303-13.
- 114. Jameson, J.M., et al., *Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 2640-51.
- 115. Cumberbatch, M., et al., *Langerhans cell migration*. Clin Exp Dermatol, 2000.
  25(5): p. 413-8.
- 116. Kim, M.H., et al., Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. J Invest Dermatol, 2008.
   128(7): p. 1812-20.
- 117. Weiss, S.J., *Tissue destruction by neutrophils*. N Engl J Med, 1989. **320**(6): p. 365-76.
- 118. Dovi, J.V., A.M. Szpaderska, and L.A. DiPietro, *Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury?* Thromb Haemost, 2004. **92**(2): p. 275-80.
- 119. Theilgaard-Monch, K., et al., *The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing.* J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7684-93.
- 120. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 514-25.
- 121. Tonnesen, M.G., X. Feng, and R.A. Clark, *Angiogenesis in wound healing.* J Investig Dermatol Symp Proc, 2000. **5**(1): p. 40-6.
- 122. Deonarine, K., et al., *Gene expression profiling of cutaneous wound healing.* J Transl Med, 2007. **5**: p. 11.
- 123. Schafer, M. and S. Werner, *Oxidative stress in normal and impaired wound repair*. Pharmacol Res, 2008. **58**(2): p. 165-71.
- 124. Weller, K., et al., *Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice.* FASEB J, 2006. **20**(13): p. 2366-8.
- 125. Ng, M.F., *The role of mast cells in wound healing*. Int Wound J, 2010. 7(1): p. 55-61.
- 126. Artuc, M., et al., *Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders?* Exp Dermatol, 1999. **8**(1): p. 1-16.

- 127. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *Wound healing: an overview.* Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
- 128. Clark, R.A., *Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I.* J Am Acad Dermatol, 1985. **13**(5 Pt 1): p. 701-25.
- 129. Grinnell, F., *Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation*. J Cell Sci, 1992. **101 ( Pt 1)**: p. 1-5.
- 130. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999.
  341(10): p. 738-46.
- Baum, C.L. and C.J. Arpey, Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Dermatol Surg, 2005. 31(6): p. 674-86; discussion 686.
- 132. Clark, R.A., *Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair.* Am J Med Sci, 1993. **306**(1): p. 42-8.
- 133. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-37.
- 134. Abe, R., et al., *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites.* J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7556-62.
- 135. Fernandes, K.J., et al., *A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1082-93.
- 136. Rajkumar, V.S., et al., Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. Am J Pathol, 2006. 169(6): p. 2254-65.
- 137. Shaw, T.J. and P. Martin, *Wound repair at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 18): p. 3209-13.
- 138. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblasts-a diverse population at the center of it all.* Int Rev Cell Mol Biol, 2009. **276**: p. 161-214.
- 139. Beanes, S.R., et al., *Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta.*Expert Rev Mol Med, 2003. 5(8): p. 1-22.
- 140. Lin, Z.Q., et al., Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol, 2003.
  73(6): p. 713-21.
- 141. Faler, B.J., et al., *Transforming growth factor-beta and wound healing*. Perspect Vasc Surg Endovasc Ther, 2006. 18(1): p. 55-62.
- 142. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing.* Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.

- 143. Montesano, R. and L. Orci, *Transforming growth factor beta stimulates collagenmatrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4894-7.
- 144. Desmouliere, A., et al., *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, 1993. **122**(1): p. 103-11.
- 145. McFarland-Mancini, M.M., et al., *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor.* J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7219-28.
- 146. Sehgal, P.B., *Interleukin-6: molecular pathophysiology*. J Invest Dermatol, 1990.94(6 Suppl): p. 2S-6S.
- 147. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.* Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.
- 148. Kupper, T.S., et al., *Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity.* Ann N Y Acad Sci, 1989. **557**: p. 454-64; discussion 464-5.
- 149. Fong, Y., et al., *Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man.* J Immunol, 1989. **142**(7): p. 2321-4.
- 150. Helfgott, D.C., et al., *Multiple forms of IFN-beta 2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection.* J Immunol, 1989. **142**(3): p. 948-53.
- 151. Paquet, P. and G.E. Pierard, *Interleukin-6 and the skin.* Int Arch Allergy Immunol, 1996. 109(4): p. 308-17.
- 152. Gallucci, R.M., E.G. Lee, and J.J. Tomasek, *IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(3): p. 561-8.
- 153. Sato, M., et al., In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. Arch Dermatol Res, 1999.
  291(7-8): p. 400-4.
- 154. Grossman, R.M., et al., Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(16): p. 6367-71.
- 155. Sawamura, D., et al., Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5633-9.

- 156. Turksen, K., et al., *Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 5068-72.
- 157. Koch, A.E., et al., *In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease.*Pathobiology, 1993. 61(5-6): p. 239-46.
- 158. Fugger, L., et al., *IL-6 gene polymorphism in rheumatoid arthritis, pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and in healthy Danes.*J Immunogenet, 1989. 16(6): p. 461-5.
- 159. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6deficient mice.* Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
- Hubner, G. and S. Werner, Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes. Exp Cell Res, 1996. 228(1): p. 106-13.
- 161. Kondo, T. and T. Ohshima, *The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination.* Int J Legal Med, 1996. **108**(5): p. 231-6.
- Mateo, R.B., J.S. Reichner, and J.E. Albina, *Interleukin-6 activity in wounds*. Am J Physiol, 1994. 266(6 Pt 2): p. R1840-4.
- 163. Giuliani, A.L., et al., *Fibroblasts increase adhesion to neutrophils after stimulation with phorbol ester and cytokines.* Cell Immunol, 1993. **149**(1): p. 208-22.
- 164. Chedid, M., et al., *Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1.* J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10753-7.
- 165. Brauchle, M., et al., *Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts.* Oncogene, 1994. **9**(11): p. 3199-204.
- 166. Gallucci, R.M., et al., *Interleukin-6 treatment augments cutaneous wound healing in immunosuppressed mice.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(8): p. 603-9.
- 167. Gallucci, R.M., et al., *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice.* Faseb J, 2000. **14**(15): p. 2525-31.
- 168. Hartner, A., et al., *Differential regulation of chemokines by leukemia inhibitory factor, interleukin-6 and oncostatin M.* Kidney Int, 1997. **51**(6): p. 1754-60.
- 169. Fenton, R.R., et al., *Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(3): p. 737-43.
- 170. Smith, R.E., et al., *TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycininduced lung injury.* J Leukoc Biol, 1998. **64**(4): p. 528-36.

- 171. Cole, N., et al., *Effects of exogenous interleukin-6 during Pseudomonas aeruginosa corneal infection.* Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 4116-9.
- 172. Lemay, S., et al., Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. Transplantation, 2000. **69**(5): p. 959-63.
- 173. Grose, R., et al., *A role for endogenous glucocorticoids in wound repair*. EMBO Rep, 2002. **3**(6): p. 575-82.
- 174. Padgett, D.A., P.T. Marucha, and J.F. Sheridan, *Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice*. Brain Behav Immun, 1998. **12**(1): p. 64-73.
- 175. Bitar, M.S., *Glucocorticoid dynamics and impaired wound healing in diabetes mellitus.* Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 547-54.
- 176. Beer, H.D., R. Fassler, and S. Werner, *Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair.* Vitam Horm, 2000. **59**: p. 217-39.
- 177. Mercado, A.M., et al., Altered kinetics of IL-1 alpha, IL-1 beta, and KGF-1 gene expression in early wounds of restrained mice. Brain Behav Immun, 2002. 16(2): p. 150-62.
- 178. Rojas, I.G., et al., *Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing.* Brain Behav Immun, 2002. **16**(1): p. 74-84.
- Horan, M.P., et al., Impaired wound contraction and delayed myofibroblast differentiation in restraint-stressed mice. Brain Behav Immun, 2005. 19(3): p. 207-16.
- 180. Reichardt, H.M., et al., *DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival.* Cell, 1998. **93**(4): p. 531-41.
- 181. Wei, E.T. and H.A. Thomas, *Anti-inflammatory peptide agonists*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. **33**: p. 91-108.
- Wei, E.T., G.C. Gao, and H.A. Thomas, *Peripheral anti-inflammatory actions of corticotropin-releasing factor*. Ciba Found Symp, 1993. **172**: p. 258-68; discussion 268-76.
- 183. Schafer, M., S.A. Mousa, and C. Stein, *Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation*. European Journal of Pharmacology, 1997(323): p. 1–10.
- 184. Zbytek, B., L.M. Pfeffer, and A.T. Slominski, *Corticotropin-releasing hormone stimulates NF-kappaB in human epidermal keratinocytes.* J Endocrinol, 2004.
  181(3): p. R1-7.

- 185. Zbytek, B. and A.T. Slominski, *Corticotropin-releasing hormone induces keratinocyte differentiation in the adult human epidermis.* J Cell Physiol, 2005.
  203(1): p. 118-26.
- 186. Slominski, A., et al., *CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E701-6.
- 187. Wu, C.F., DOUBLE-STAINING IN TOTO WITH HEMATOXYLIN AND EOSIN. Science, 1940. 92(2396): p. 515-6.
- 188. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.* Histochem J, 1979. **11**(4): p. 447-55.
- 189. Toren, D.A., *A GIEMSA-TRICHROME STAIN FOR MAST CELLS IN PARAFFIN SECTIONS.* Stain Technol, 1963. **38**: p. 249-50.
- 190. Papakonstanti, E.A., et al., *Early alterations of actin cytoskeleton in OK cells by opioids*. J Cell Biochem, 1998. **70**(1): p. 60-9.
- 191. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 192. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.* Nat Protoc, 2007. 2(2): p. 329-33.
- 193. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.* J Immunol Methods, 1986. **89**(2): p. 271-7.
- 194. Basu, A., et al., *Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein* SPARC (osteonectin, BM-40). BMC Cell Biol, 2001. **2**: p. 15.
- 195. Slominski, A., et al., *CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin.* J Cell Physiol, 2006. **206**(3): p. 780-91.
- 196. De Bosscher, K. and G. Haegeman (2009). "Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids." <u>Mol Endocrinol</u> 23(3): 281-91.
- 197. Roosterman, D., et al., *Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ.* Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1309-79.
- 198. Venihaki, M. and J.A. Majzoub, *Animal models of CRH deficiency*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(2): p. 122-45.

- 199. Makino, S., et al., *Expression of type 1 corticotropin-releasing hormone (CRH)* receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following restraint stress in CRH-deficient mice. Brain Res, 2005. **1048**(1-2): p. 131-7.
- 200. Brunson, K.L., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain.* Exp Neurol, 2002. **176**(1): p. 75-86.
- 201. Moriyama, T., et al., Differential regulation of corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF1 receptor) mRNA via protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways in rat anterior pituitary cells. Mol Cell Endocrinol, 2005.
   243(1-2): p. 74-9.
- 202. Lin, Z.Q., et al., Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol, 2003.
  73(6): p. 713-21.
- 203. Zbytek, B., et al., *Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes.* Br J Dermatol, 2005. **152**(3): p. 474-80.
- 204. Houck, J.C., et al., *Induction of collagenolytic and proteolytic activities by antiinflammatory drugs in the skin and fibroblast.* Biochem Pharmacol, 1968. **17**(10):
   p. 2081-90.
- 205. Donelan, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7759-64.
- 206. Cao, J., C.L. Cetrulo, and T.C. Theoharides, *Corticotropin-releasing hormone induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells via the cAMP/protein kinase A/p38 mitogen-activated protein kinase pathway.* Mol Pharmacol, 2006. **69**(3): p. 998-1006.
- 207. Pesci, A., et al., *Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(3): p. 684-9.
- 208. Singh, V.K. and S.J. Leu, Enhancing effect of corticotropin-releasing neurohormone on the production of interleukin-1 and interleukin-2. Neurosci Lett 1990. 120: p. 151-154.
- 209. Leu, S.J. and V.K. Singh, *Stimulation of interleukin-6 production by corticotropinreleasing factor.* Cell Immunol, 1992(143): p. 220-227.
- 210. Singh, V.K., *Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression.* J Neuroimmunol 1989(23): p. 257-262.

- 211. Hagan, P.M., S. Poole, and A.F. Bristow, *Corticotrophin-releasing factor as a mediator of the acute-phase response in rats, mice and rabbits.* J Endocrinol, 1993(136): p. 207-216.
- Hubner, G., et al., Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine, 1996. 8(7): p. 548-56.
- 213. Bryan, D., et al., *Cytokine gene expression in a murine wound healing model.* Cytokine, 2005(31): p. 429-438.
- 214. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.* J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
- Li, Q. and I.M. Verma, *NF-κB regulation in the immune system*. Nature Reviews.
   Immunology 2002(2): p. 725–734.
- Lezoualc'h, F., et al., Corticotropinreleasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid \_ precursor protein and with the suppression of NF-κB. Molecular Endocrinology, 2002 (14): p. 147–159.
- 217. GREEN, C.J., et al., *Metomidate, etomidate and fentanyl as injectable anaesthetic agents in mice.* Laboratory Animals, 1981(15): p. 171-175.
- 218. Dahan, A., et al., Comparison of the respiratory effects of intravenous buprenorphine and fentanyl in humans and rats. British Journal of Anaesthesia, 2005. 94(6): p. 825–34.
- 219. Martin, P. and S. J. Leibovich (2005). "Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly." <u>Trends Cell Biol</u> 15(11): 599-607.
- Stramer, B. M., R. Mori, et al. (2007). "The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair." <u>I Invest Dermatol</u> **127**(5): 1009-17.
- 221. Gallelli, L., et al., Interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 inhibits TGF-betainduced proliferation of human lung fibroblasts. Cell Prolif, 2008. 41(3): p. 393-407.
- 222. Luckett-Chastain, L.R. and R.M. Gallucci, *Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor-beta expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice.* Br J Dermatol, 2009. **161**(2): p. 237-48.
- Barker, J.N., et al., *Keratinocytes as initiators of inflammation*. Lancet, 1991.
  337(8735): p. 211-4.