

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja KOZINC

**RAZLIKE V CELJENJU RAN MED SPOLOMA PRI  
MIŠIH DIVJEGA TIPA IN MIŠIH BREZ GENA SF-1**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja KOZINC

**RAZLIKE V CELJENJU RAN MED SPOLOMA PRI MIŠIH DIVJEGA  
TIPA IN MIŠIH BREZ GENA SF-1**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SEX DIFFERENCES IN WOUND HEALING IN WILD TYPE MICE  
AND MICE LACKING SF-1 GENE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Centru za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 20. 6. 2012 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Majdiča in za recenzenta prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor MAJDIČ  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Član: prof. dr. Marko KREFT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 18. 9. 2012

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katja KOZINC

## KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 575:616:591.147:599.323(043.2)=163.6  
KG koža/celjenje ran/poškodbe/spolni hormoni/spolne značilnosti/geni/steroidogeni faktor 1/spolna diferenciacija/miši divjega tipa/miši brez gena *SF-1*/poskusi na živalih  
AV KOZINC, Katja  
SA MAJDIČ, Gregor (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2012  
IN RAZLIKE V CELJENJU RAN MED SPOLOMA PRI MIŠIH DIVJEGA TIPA IN MIŠIH BREZ GENA *SF-1*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 48 str., 2 pregl., 8 sl., 70 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Koža je največji organ telesa, ki predstavlja glavno zaščito pred zunanjimi vplivi. V primeru poškodbe se mora zaceliti. Celjenje rane je kompleksen proces, ki je sestavljen iz štirih prekrivajočih se faz: hemostaze, vnetja, proliferacije in preoblikovanja rane. Raziskave so pokazale, da spolni hormoni močno vplivajo na hitrost celjenja ran. Vloga estrogenov je, da zmanjšujejo vnetni odgovor, s čimer vplivajo na boljše celjenje ran, medtem ko imajo androgeni negativen učinek na celjenje, saj pospešujejo lokalno vnetje. V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti, če poleg spolnih hormonov tudi geni na spolnih kromosomih vplivajo na razlike v celjenju ran med spoloma. Uporabili smo miši divjega tipa, ki smo jim pred puberteto odstranili spolne žlezne in miši brez gena *SF-1*, ki se rodijo brez nadledvičnih in spolnih žlez, zaradi česar niso izpostavljeni spolnim hormonom med razvojem. Mišim smo naredili rano in jo po treh dneh odvzeli ter žival žrtvovali. Njeno celjenje smo spremljali na osnovi histološke preiskave, pri kateri smo merili širino rane in višino epitelija, ter imunohistokemične analize izraženosti iNOS. Rezultati niso pokazali nobenih statistično značilnih razlik glede na spol in genotip. Z našo raziskavo nismo uspeli potrditi razlik v celjenju ran med spoloma pri miših divjega tipa in miših brez gena *SF-1*, ki bi bile posledica vpliva genov na spolnih kromosomih. Raziskava kaže, da na razlike v celjenju ran med spoloma verjetneje vplivajo spolni hormoni.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 575:616:591.147:599.323(043.2)=163.6  
CX skin/wound healing/injuries/sex hormones/sexual characteristics/genes/  
steroidogenic factor 1/sexual differentiation/wild type mice/mice lacking  
*SF-1*/experiments on animals

AU KOZINC, Katja  
AA MAJDIČ, Gregor (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in  
Biotechnology  
PY 2012  
TI SEX DIFFERENCES IN WOUND HEALING IN WILD TYPE MICE AND MICE  
LACKING SF-1 GENE  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO XI, 48 p., 2 tab., 8 fig., 70 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB Skin is the largest body organ representing the main protection from external influences. In case of injury it has to heal itself. Wound healing is a complex process consisting of four overlapping phases: hemostasis, inflammation, proliferation and remodelling of the wound. Research has shown that sex steroid hormones have a strong influence on the length of wound healing. The role of estrogens is to reduce the inflammatory response, thus causing better wound healing, whereas androgens have a negative influence on healing, since they stimulate local inflammation. In our study we tried to determine whether, besides sex hormones, the genes on sex chromosomes influence the differences in wound healing between sexes as well. Wild type mice, gonadectomized before puberty, and mice lacking SF-1 gene were used, the latter being born without the adrenal glands and gonads and are therefore not exposed to sex steroid hormones during development. A wound in the skin was made on the back of mice and cut out after three days; the animals were then sacrificed. Wound healing was monitored on the basis of a histological examination, in which the width of the wound and the height of the epithelium as well as the number of iNOS expressing cells were determined. The results have not revealed any statistically significant differences according to sex and genotype. Our study did not succeed in confirming any differences in wound healing between the sexes in wild type gonadectomized mice and mice lacking SF-1 gene, which would be caused by genes on sex chromosomes. The study shows that sex steroid hormones more likely influence the differences in wound healing between sexes.

## KAZALO VSEBINE

Ključna informacijska dokumentacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 KOŽA	2
<b>2.1.1 Epidermis ali povrhnjica</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Dermis ali usnjica</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Hipodermis ali podkožje</b>	<b>4</b>
<b>2.1.4 Embrionalni razvoj kože</b>	<b>4</b>
2.2 CELJENJE RAN	4
<b>2.2.1 Hemostaza</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Vnetje</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3 Proliferacija</b>	<b>8</b>
2.2.3.1 Tvorba granulacijskega tkiva	8
2.2.3.2 Tvorba žil	9
<b>2.2.4 Preoblikovanje</b>	<b>9</b>
2.3 VLOGA TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ IN iNOS PRI CELJENJU RAN	10
<b>2.3.1 Transformirajoči rastni dejavnik <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</b>	<b>10</b>
<b>2.3.2 Transformirajoči rastni dejavnik <math>\beta</math>1 (TGF-<math>\beta</math>1)</b>	<b>10</b>
2.3.2.1 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)	11
2.3.2.2 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3)	12
<b>2.3.3 Dejavnik tumorske nekroze <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>12</b>
<b>2.3.4 Inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS)</b>	<b>13</b>
2.4 RAZLIKE V CELJENJU RAN MED SPOLOMA	14
<b>2.4.1 Vpliv estrogenov</b>	<b>16</b>

<b>2.4.2</b>	<b>Vpliv androgenov</b>	<b>17</b>
2.5	MIŠI BREZ GENA <i>SF-1</i>	17
<b>2.5.1</b>	<b>Steroidogeni dejavnik 1</b>	<b>17</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Mesto izražanja steroidogenega dejavnika 1</b>	<b>18</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Miši brez steroidogenega dejavnika 1</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>20</b>
3.1	ŽIVALI	20
<b>3.1.1</b>	<b>Vzreja živali</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Priprava poskusnih živali</b>	<b>20</b>
3.1.2.1	Genotipizacija	22
3.1.2.1.1	Razgradnja tkiva	22
3.1.2.1.2	Verižna reakcija s polimerazo	22
3.1.2.1.3	Elektroforeza	23
3.1.2.2	Odstranitev spolnih žlez in operacija miši SF-1 KO	24
3.1.2.3	Priprava kortikosteroidne mešanice	24
3.2	RANA	25
<b>3.2.1</b>	<b>Ranitev živali</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Odvzem rane</b>	<b>25</b>
3.3	IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE	25
3.4	BARVANJE PO HEMATOKSILINU IN EOZINU (HE BARVANJE)	27
3.5	ANALIZA PODATKOV	27
<b>3.5.1</b>	<b>Priprava slik, merjenje širine rane in višine epitelija</b>	<b>27</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Štetje celic</b>	<b>28</b>
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	28
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>29</b>
4.1	ŠIRINA RANE	29
4.2	VIŠINA EPITELIJA	30
4.3	ŠTETJE CELIC	32
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>34</b>
5.1	ŠIRINA RANE	34
5.2	VIŠINA EPITELIJA	35

5.3	DELEŽ ŽIVALI S PRISOTNIM EPITELIJEM	36
5.4	ŠTETJE CELIC	36
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>40</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Proces normalnega celjenja ran (Mathieu in sod., 2006)	6
Preglednica 2: Protokol ravnanja z mišmi SF-1 KO in mišmi WT	22

## KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek spolnih steroidnih hormonov (Gilliver in sod., 2007)	15
Slika 2: Celjejenje rane pod vplivom hormonov in brez (Gilliver in sod., 2007)	15
Slika 3: Merjenje širine rane od enega zunanjega roba do drugega	29
Slika 4: Povprečna širina rane v mm po skupinah živali in prikaz intervalov standardne napake	30
Slika 5: Merjenje višine epitelija	31
Slika 6: Povprečna višina epitelija v mm po skupinah živali in prikaz intervalov standardne napake	31
Slika 7: Odstotek živali z nastajajočim epitelijem po skupinah	32
Slika 8: Povprečno število celic iNOS po skupinah in prikaz intervalov standardne napake	33

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ADiol	androstenediol
ADione	androstenedion
C57BL/6J	uradna oznaka linije miši
DAB	3' 3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid
DHEA	dihidroepiandrosteron
DHT	dihidrotestosteron
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EGF	epidermalni rastni dejavnik ( <i>angl. epidermal growth factor</i> )
eNOS	endotelijkska sintaza dušikovega oksida
FGF	fibroblastni rastni dejavnik ( <i>angl. fibroblast growth factor</i> )
FGF-7	fibroblastni rastni dejavnik 7 ( <i>angl. fibroblast growth factor 7</i> )
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnRH	gonadotropin sproščajoči hormon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HCl	klorovodikova kislina
IL-1	interlevkin 1
IL-6	interlevkin 6
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
LH	luteinizirajoči hormon
LNCaP	prostatična rakava linija (androgene celice karcinoma prostate)
LPS	lipopolisaharid
MIF	zaviralni dejavnik migracije makrofagov ( <i>macrophage migration inhibitory factor</i> )
miš SF-1 KO	miš brez gena za steroidogeni dejavnik 1 (SF-1 knockout)
miš SF-1 <sup>+/−</sup>	heterozigotna žival za izbiti gen <i>SF-1</i>
nNOS	nevronska sintaza dušikovega oksida
NO	dušikov oksid
NOS	sintaza dušikovega oksida

NR5A1	jedrni receptor poddružine 5, skupina A, član 1
PBS	fosfatni pufer z NaCl ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	trombocitni rastni dejavnik ( <i>angl. platelet-derived growth factor</i> )
SF-1 KO	miši z izbitimi genom <i>SF-1</i> ( <i>angl. SF-1 knock out</i> )
SF-1	steroidogeni dejavnik 1
SHRP	streptavidin hrenova peroksidaza ( <i>peroxidase-conjugated streptavidin</i> )
<i>Smad3</i> gen	Mothers against decapentaplegic homolog 3 gen
TBE	Tris boratni EDTA pufer
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik β ( <i>angl. transforming growth factor β</i> )
TGF-β1	transformirajoči rastni dejavnik β1 ( <i>angl. transforming growth factor β1 - TGF-β1</i> )
TGF-β2	transformirajoči rastni dejavnik β2 ( <i>angl. transforming growth factor β2 - TGF-β2</i> )
TGF-β3	transformirajoči rastni dejavnik β3 ( <i>angl. transforming growth factor β3 - TGF-β3</i> )
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze ( <i>angl. tumor necrosis factor</i> )
UV žarki	ultravijolični žarki
VEGF	endotelni žilni rastni dejavnik ( <i>angl. vascular endothelial growth factor</i> )
VMH	ventromedialno jedro hipotalamusu
WT	divji tip živali

## 1 UVOD

Koža je največji organ telesa, ki predstavlja glavno zaščito pred zunanjimi vplivi. Izguba njene integritete, kot rezultat večje poškodbe ali bolezni, lahko vodi do hudih bolezenskih stanj ali celo smrti. Vsako leto po svetu mnogo ljudi utrpi opekline in kronične rane, ki so posledica nesreč, pritiska, venskega zastoja ali sladkorne bolezni. Glavni cilj zdravljenja je hitro zapiranje rane in funkcionalno ter estetsko zadovoljiva brazgotina (Singer in Clark, 1999).

Celjenje rane je normalen proces v človeškem telesu, katerega cilj je obnova kože. Pri njem usklajeno sodelujejo keratinociti, fibroblasti, endotelne celice, makrofagi in trombociti. Te celice z migracijo, infiltracijo, proliferacijo in diferenciacijo na mestu rane izzovejo njen celjenje, ki sestoji iz štirih faz: hemostaze, vnetja, proliferacije in preoblikovanja. Celjenje rane nadzirajo številni rastni dejavniki, citokini in kemokini (Barrientos in sod., 2008).

Raziskave Ashcroft in sodelavcev so pokazale, da estrogeni vplivajo na boljše celjenje ran, saj zavirajo lokalno vnetje in količino vnetnih celic, ki pridejo na mesto rane (Ashcroft in sod., 1997). Nadalje so ugotovili, da se rane slabše celijo moškim kot ženskam, saj se pri moških zmanjša nalaganje matriksa in poveča lokalno vnetje (Ashcroft in sod., 1999a). Iz tega lahko torej sklepamo, da na celjenje ran vplivajo spolni hormoni.

V nalogi smo žeeli preveriti, ali poleg spolnih hormonov tudi geni na spolnih kromosomih vplivajo na razlike v celjenju ran med spoloma. Pri miših divjega tipa in miših brez gena *SF-1* (steroidogeni dejavnik 1), ki se rodijo brez spolnih žlez in zato niso izpostavljeni spolnim hormonom med razvojem, smo ugotavljali celjenje rane na osnovi histološke preiskave ter imunohistokemične analize izraženosti iNOS (inducibilna sintaza dušikovega oksida).

Naša delovna hipoteza je bila, da so razlike pri celjenju rane med spoloma prisotne tudi pri miših brez gena *SF-1*, kar bi kazalo na vlogo spolnih kromosomov pri spolnih razlikah v celjenju rane.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KOŽA

Koža je največji organski sistem telesa, ki ločuje notranjost organizma od zunanjega sveta. Je čutilo, ki pokriva vso površino telesa, razen roženice in veznice, in varuje vse druge organe v organizmu pred zunanjimi dejavniki. Njena naloga je po eni strani, da varuje notranjost organizma pred zunanjostjo, po drugi strani pa, da stalno vzdržuje komunikacijo z okoljem. Koža je največji organ, ki obsega približno 16 % telesne teže. Njena morfologija glede debeline, gladkosti in poraščenosti variira na različnih delih telesa (Zorc, 2010).

Koža ima štiri glavne naloge: Prva naloga je zaščita telesa pred UV žarki, mehaničnimi, kemičnimi in topotnimi vplivi okolja. Roženi sloj je razmeroma neproposten, saj preprečuje dehidracijo in služi kot fizična prepreka pred vdorom mikroorganizmov. Druga naloga je zaznavanje dražljajev iz okolice, kar omogoča prisotnost receptorjev za dotik, pritisk, bolečino in temperaturo v koži. Tretja pomembna naloga je termoregulacija telesa. Izgubo toplotne preprečujejo dlake na površini kože in podkožno maščobno tkivo. Ohlajanje telesa pa omogoča izločanje znoja in povečan krvni pretok skozi usnjico. S tvorbo vitamina D v povrhnjici in s prisotnostjo podkožnega maščobnega tkiva, ki je največja zaloga energije, koža sodeluje v njeni četrti – presnovni nalogi (Young in Heath, 2000).

Koža je sestavljena iz dveh osnovnih plasti, pokožnice ali povrhnjice (*epidermis*) in usnjice (*dermis*). Podkožje (*hipodermis*) se ne šteje h koži (Zorc, 2010).

#### 2.1.1 Epidermis ali povrhnjica

Epidermis sestavlja večskladni ploščati epitelij in je sestavljen iz štirih različnih tipov celic; keratinocitov, melanocitov, Langerhansovih celic in Merklovih celic. Prevladujejo predvsem keratinociti, ki proizvajajo vlaknast protein keratin, ki ima pomembno vlogo pri zaščiti kože. Keratinociti se mitotično delijo v globljih plasteh epidermisa (bazalna plast in trnasta plast) in nato skozi plasti dozorevajo ter se pomikajo navzven, kjer tvorijo

poroženelo plast – plast odmrlih celic imenovanih korneociti. Pod mikroskopom lahko opazujemo plasti epidermisa, ki predstavljajo različne razvojne faze keratinocitov; bazalna plast (*stratum basale*), trnasta plast (*stratum spinosum*), zrnata plast (*stratum granulosum*), svetleča plast (*stratum lucidum*), rožena plast (*stratum corneum*) in odluščena plast (*stratum disjunctum*) (Zorc, 2010).

Melanociti se nahajajo v bazalni plasti epidermisa in sintetizirajo pigment melanin, ki je odgovoren za barvo kože. Izvirajo iz celic nevralnega grebena in po obliki sodijo med celice drevesaste oblike. Podaljški citoplazme melanocita se prepletajo med celicami bazalne plasti in lahko segajo celo do trnastih plasti. Pod vplivom ultravijolične svetlobe melanociti proizvajajo melanin, ki se oblikuje tako, da v keratinocitih pokrije jedro in posledično zaščiti jedrno DNK pred škodljivimi učinki sevanja (Celleno in Tamburi, 2009).

Langerhanske celice so dendritične celice, katerih naloga je odstranjevanje antigenov iz kože, ki jih fagocitirajo in predstavljajo limfocitom T. Te celice so torej krožeča populacija antigen predstavitvenih celic (Zorc, 2010).

Merklove celice nastajajo iz celic nevralnega grebena in se nahajajo v bazalni plasti. Zaenkrat tega še niso dokazali, vendar bi lahko služile kot senzorični mehanoreceptorji (za dotik) (Zorc, 2010).

### **2.1.2 Dermis ali usnjica**

Dermis (usnjica) je druga plast kože, ki leži pod epidermisom. Je njen najdebelejši del, ki je bogato ožiljen in oživčen. Epidermis in dermis sta med seboj ločena z basalno membrano, ki nadzoruje prenos celic in molekul med obema plastema. Preko prepleta žil v dermisu poteka prehranjevanje epidermisa. Tvorijo ga celice imenovane fibroblasti, ki proizvajajo kolagenska in elastična vlakna ter ekstracelularni matriks. Kolagenska vlakna dajejo obliko in strukturo koži, medtem ko ji elastičnost zagotavlja protein elastin. V dermisu se nahajajo tudi čutilni organi za dotik, pritisk, bolečino in temperaturo, ter lasni mešički, žleze znojnice in žleze lojnice (Celleno in Tamburi, 2009).

### 2.1.3 Hipodermis ali podkožje

Hipodermis leži direktno pod dermisom, vendar ni del kože (Zorc, 2010). Sestavljen je iz mehkega vezivnega tkiva in maščobe, ki služi kot izolator, ter pripenja dermis na spodaj ležeče mišice ali kosti (Monteiro-Riviere, 1998).

### 2.1.4 Embrionalni razvoj kože

Povrhnjica se v zarodku razvije iz površinskega ektoderma, spodaj ležeča usnjica pa iz mezoderma. Najprej se enoplastni površinski ektoderm podvoji in tvori enoskladni ploščati periderm in visokoprizmatsko bazalno plast. Obe plasti sta mitotsko zelo dejavni. Z delitvijo celic se najprej oblikuje tretja vmesna plast, ki leži med bazalno plastjo in peridermom (ta postopoma izgine). Dokočno se oblikuje povrhnjica, ki je sestavljena iz štirih plasti (opisane zgoraj). V razvoju povrhnjice vanjo vdirajo celice nevralnega grebena, melanoblasti, ki se delijo in tvorijo melanocite, ki preidejo v trnasto plast. Dendritične Lagerhansove celice izvirajo iz kostnega mozga, medtem ko izvor Merklovih celic ni jasen (Legan, 2005).

Usnjica nastane iz bočne plošče mezoderma in dermatomov somitov. Razvijejo se dermalne papile, ki se vrvajo v zgoraj ležečo povrhnjico. Elastična in kolagenska vlakna dajejo vlaknato strukturo papilarni coni in grobo trabekularno strukturo v retikularni coni dermisa. Proti koncu embrionalnega razvoja kože se v njej tvorijo kapilarne zanke v dermalnih papilah ter arterijska in venska mreža dermisa. S prostimi živčnimi končiči in senzornimi telesci dermatomi dobijo senzorično oživčenje (Legan, 2005).

## 2.2 CELJENJE RAN

Celjenje rane je evolucijsko ohranjen kompleksen večcelični proces, katerega cilj je obnova kože (Barrientos in sod., 2008). Sestavljen je iz štirih visoko integriranih in natačno programiranih prekrivajočih faz: hemostaza, vnetje, proliferacija in preoblikovanje tkiva (Gosain in DiPietro, 2004). Vse faze in njihove biofiziološke funkcije morajo potekati ob točno določenem času in zaporedju ter pri točno določeni intenziteti in trajanju

procesa. Razne prekinitve faz in motnje lahko vodijo do počasnejšega celjenja ran ali celo do kroničnih ran, ki se slabo celijo (Mathieu in sod., 2006).

Pri odraslih ljudeh optimalno celjenje rane vključuje sledeče dogodke: (1) hitra hemostaza, (2) vnetje, (3) diferenciacija mezenhimskih celic, njihova proliferacija in migracija na mesto rane, (4) tvorba žil, (5) ponovna epitelizacija področja rane, (6) pravilna siteza, prepletanje in razporeditev kolagena, ki celjenemu tkivu doprinese moč (Gosain in DiPietro, 2004; Mathieu in sod., 2006).

Preglednica 1: Proces normalnega celjenja ran (Mathieu in sod., 2006)

DAN	FAZA	CELIČNI IN BIOFIZIOLOŠKI DOGODEK	
0	Hemostaza	1. zoženje žil 2. agregacija trombocitov in degranulacija 3. tvorba fibrina (strdek)	
0-3		1. infiltracija nevtrofilcev	
		2. infiltracija monocitov in njihova diferenciacija v makrofage	
		3. infiltracija limfocitov	
		4. tvorba proteoglikanov v matriksu	
3-6	Proliferacija	1. ponovna epitelizacija	
		2. tvorba žil	
		3. tvorba kolagena	
		4. tvorba zunajceličnega matriksa	
		5. infiltracija fibroblastov in njihova proliferacija	
6-15	Preoblikovanje	1. preoblikovanje kolagena	
		2. zorenje žil	
		3. diferenciacija fibroblastov v fibrocite	

### 2.2.1 Hemostaza

Ob pojavu rane na koži se prekine epidermis in iz keratinocitov se sprosti interlevkin-1 (IL-1). IL-1 je prvi signal, ki sporoča okoliškim celicam, da je prišlo do poškodbe kože (Freedberg in sod, 2001). Poškodbo tkiva ponavadi spremlja poškodba žil, iz katerih izteka kri, zato je za začetek celjenja rane zelo pomembna vzpostavitev kaskade strjevanja krvi. Najprej pride do zožanja žil in nastanka krvnega strdka, ki inducira hemostazo, in služi kot zaščita ranjenega tkiva. Tvori tudi začasen zunajcelični matriks, preko katerega lahko migrirajo vnetne celice med samim procesom celjenja (Hantash in sod., 2008). Krvni strdek je sestavljen iz trombocitov, ujetih v mrežo iz fibrinskih vlaken, ki nastanejo s

pomočjo trombina, ki cepi fibrinogen v fibrin, in manjših količin plazmatskega fibronektina, vitronektina in trombospondina (Martin, 1997).

Nato se začnejo iz krvnega strdka oz. aktiviranih trombocitov in okolnega tkiva sproščati naslednji predvnetni citokini in rastni dejavniki: transformirajoči rastni dejavnik- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  - TGF- $\beta$ ), trombocitni rastni dejavnik (platelet-derived growth factor - PDGF), fibroblastni rastni dejavnik (fibroblast growth factor - FGF) in epidermalni rastni dejavnik (epidermal growth factor - EGF). Ko je krvavitev zaustavljena, vnetne celice s pomočjo kemotakse potujejo v rano, kjer sodelujejo v vnetni fazni (Gosain in DiPietro, 2004; Broughton in sod., 2006; Campos in sod., 2008).

### 2.2.2 Vnetje

PDGF skupaj s predvnetnim citokinom IL-1 privlači nevtrofilce na mesto rane, kjer se infiltrirajo in odstranjujejo tujke ter bakterije (Hantash in sod., 2008). Ko je njihovo delo končano, jih fagocitirajo makrofagi oz. se kasneje odstranijo skupaj s krasto (Brown, 1995).

Ko se monociti infiltrirajo v rano, se s pomočjo TGF- $\beta$  diferencirajo v makrofage, ki imajo pomembno vlogo pri vnetnem odgovoru. Tvoriti začnejo granulacijsko tkivo (nova stroma) in sproščati predvnetne citokine (IL-1 in IL-6) ter rastne dejavnike (FGF, EGF, TGF- $\beta$  in PDGF) (Hantash in sod., 2008). Makrofagi se preko svojih integrinskih receptorjev vežejo na specifične proteine v zunajceličnem matriksu in s tem spodbujajo fagocitozo (Brown, 1995) in monocite, da se preobrazijo v vnetne ali popravljalne makrofage. Z vezavo začnejo makrofagi in monociti proizvajati kolonije stimulirajoči dejavnik 1, citokin, ki je pomemben za preživetje monocitov in makrofagov; dejavnik tumorske nekroze (tumor necrosis factor – TNF- $\alpha$ ), ki je vnetni citokin in PDGF, ki je možen kemoatraktant in mitogen za fibroblaste (Rappolee in sod., 1988). Makrofagi so odgovorni tudi za apoptozo celic in kasneje tudi za njihovo čiščenje, kar počasi vodi do zaključka vnetne faze. Ko počistijo apoptotične celice, začnejo popravljalni makrofagi spodbujati delitev keratinocitov, fibroblastov in tvorbo žil, kar privede do regeneracije tkiva. Na ta način pričnejo s proliferativno fazo celjenja (Meszaros in sod., 2000; Mosser in Edwards, 2008).

### 2.2.3 Proliferacija

Proliferativna faza oz. faza ponovne epitelizacije sledi vnetni faz, s katero se lahko tudi prekriva. Zanjo je značilna proliferacija in migracija epitelnih celic skozi začasni zunajcelični matriks. V tej fazi se v celicah skrčijo znotrajcelični tonofilamenti in raztopi se večina dezmosomov, ki tvorijo fizične povezave med celicami. Tvorijo se periferni citoplazemski aktinski filamenti, ki omogočajo premikanje celic. Zaradi raztopljenih dezmosomov se epidermis in bazalna membrana ne stikata več, kar omogoča lateralno gibanje epidermisa (Goliger in sod., 1995). Migracija epidermalnih celic v rani povzroči ločitev suhe kraste od živega tkiva. Počasi se s kolagenazo in plazminom, ki hidrolizira fibrin, prične razkrajevati začasni zunajcelični matriks (Singer in Clark, 1999).

Dan ali dva po ranitvi začnejo celice ob robovih rane proliferirati za migrirajočimi celicami. Mehanizem, ki povzroča proliferacijo in migracijo epidermalnih celic pri ponovni epitelizaciji še ni popolnoma raziskan, vendar obstajata dve možnosti. Prva možnost je, da odsotnost sosednjih celic signalizira potrebo po migraciji in proliferaciji; in druga možnost, da lokalno sproščanje rastnih dejavnikov (EGF, TGF- $\alpha$  in FGF) in posledično povečanje receptorjev zanje, spodbuja ta proces (Werner in sod., 1994).

Ko se ponovna epitelizacija zaključi, se proteini bazalne membrane na novo uredijo in med seboj povežejo epidermis in dermis (Singer in Clark, 1999).

#### 2.2.3.1 Tvorba granulacijskega tkiva

Približno štiri dni po ranitvi, se prične na mestu rane tvoriti nova stroma, ki ji pravimo granulacijsko tkivo. Številne na novo nastale kapilare ji dajejo videz granulacije. Makrofagi, krvne žile in fibroblasti naenkrat vstopijo v predel rane. Makrofagi so stalen vir rastnih dejavnikov, ki spodbujajo nastanek fibroznega tkiva in tvorbo novih žil. Fibroblasti producirajo nov začasen zunajcelični matriks, ki ima vlogo pri proliferaciji celic. Krvne žile pa so pomembne zato, ker dostavljajo kisik in hrano za ohranjanje celičnega metabolizma (Singer in Clark, 1999).

Rastni dejavniki, predvsem PDGF in TGF- $\beta$  v sodelovanju s proteini zunajceličnega matriksa, spodbujajo proliferacijo fibroblastov. Fibroblasti so odgovorni za tvorbo, nalaganje in preoblikovanje začasnega zunajceličnega matriksa (Xu in Clark, 1996).

Začasen zunajcelični matriks se postopoma zamenja s kolagenskim matriksom. Ko ta napolni celo rano, fibroblasti prenehajo producirati kolagen in začne se tvoriti brazgotina z relativno malo celicami (Desmouliere in sod., 1995).

#### 2.2.3.2 Tvorba žil

Tvorba novih žil je pomembna za ohranjanje na novo nastalega granulacijskega tkiva. Je zapleten proces, ki je odvisen od začasnega zunajceličnega matriksa kot tudi od migracije in mitogenega spodbujanja endotelnih celic. Tvorbo novih žil spodbujajo predvsem endotelni žilni rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor - VEGF), TGF- $\beta$ , angiogenin, angiotropin, angiopoietin 1 in trombospondin. Nizek delni tlak kisika in zvišanje koncentracije mlečne kislina lahko tudi vpliva na pospešeno tvorbo novih žil. Ko je enkrat rana polna granulacijskega tkiva, se tvorba novih žil preneha in mnoge od teh žil preidejo v proces apoptoze. Programirano celično smrt najverjetneje urejajo trombospondin 1 in 2, angiotatin, endostatin in angiopoetin 2 (Singer in Clark, 1999).

#### 2.2.4 Preoblikovanje

Po proliferaciji celic in sintezi začasnega zunajceličnega matriksa, se začne obdobje preoblikovanja rane, ki lahko traja več let. V tej fazici se rana skrči, preoblikuje se začasen zunajcelični matriks, ki se približuje strukturi kožnega tkiva, in zmanjša se količina novonastalih žil, kar pomeni, da se odstrani granulacijsko tkivo. Na skrčenje rane vpliva več usklajenih interakcij med celicami, začasnim zunajceličnim matriksom in citokini. V drugem tednu celjenja rane se fibroblasti preoblikujejo v miofibroblaste, ki so odgovorni za krčenje rane (Barrientos in sod., 2008).

Pri preoblikovanju matriksa torej pride do odstranitve granulacijskega tkiva, ki ga zamenjajo vlakna kolagena in elastina, ter proteoglikani in glikoproteini. Sinteza novega kolagena spodbuja TGF- $\beta$ , razgradnjo starega pa vrši PDGF. Končni produkt te faze je brazgotina (Barrientos in sod., 2008).

V prvih treh tednih dobi rana približno 20% končne čvrstosti, saj se fibrilarni kolagen hitro nalaga. Kasneje pa rana pridobiva na čvrstosti zelo počasi in na koncu doseže le 70 % moči, ki jo ima neranjena koža (Bailey in sod., 1975).

## 2.3 VLOGA TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ IN iNOS PRI CELJENJU RAN

### 2.3.1 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Družina TGF- $\beta$  je sestavljena iz strukturno podobnih citokinov, ki imajo različne vloge pri fizioloških in patoloških procesih, kot so celjenje ran, rak, imunomodulacija in ateroskleroza. Pri sesalcih so našli tri glavne oblike TGF- $\beta$  družine: transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$ 1 (angl. transforming growth factor  $\beta$ 1 - TGF- $\beta$ 1), transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$ 2 (angl. transforming growth factor  $\beta$ 2 - TGF- $\beta$ 2) in transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$ 3 (angl. transforming growth factor  $\beta$ 3 - TGF- $\beta$ 3), ki naj bi imeli podobne funkcije v *in vitro* pogojih, čeprav TGF- $\beta$ 2 in TGF- $\beta$ 3 še nista dobro raziskana (Grainger in sod., 2000).

### 2.3.2 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

TGF- $\beta$ 1 igra pomembno vlogo pri celjenju ran, saj sodeluje pri vnetni fazi, tvorbi novih žil, ponovni epitelizaciji in tvorbi vezivnega tkiva. Izločajo ga makrofagi, fibroblasti, keratinociti in trombociti (Kane in sod., 1991).

Z raziskavami *in vitro* so ugotovili, da TGF- $\beta$ 1 v makrofagih deaktivira produkcijo superoksidov, kar pomaga pri zaščiti okolnega tkiva in pripravi rano na izgradnjo granulacijskega tkiva (Tsunawaki, 1988) s tem, da poveča izraženost genov povezanih z oblikovanjem začasnega zunajceličnega matriksa, kot so geni za fibronektin, fibronektinski

receptor, kolagenske zaviralce proteaz in geni za spodbujanje tvorbe novih žil (VEGF) (Riedel in sod., 2007). Poleg tega so s poskusi *in vitro* dokazali, da ima TGF- $\beta$ 1 vlogo tudi pri krčenju rane, saj spodbuja krčenje fibroblastov v kolagenskem matriksu (Meckmongkol in sod., 2007).

Pri vlogi TGF- $\beta$ 1 v fazi ponovne epitelizacije, so različne raziskovalne skupine prišle do različnih ugotovitev. Več raziskav *in vivo* in *in vitro* je dokazalo, da TGF- $\beta$ 1 zavira prolifracijo keratinocitov (Amendt in sod., 1998). Nato pa je Ashcroft skupaj s sodelavci ugotovil, da je pri miših brez gena *Smad3*, ki vpliva na aktivnost ligandov družine TGF- $\beta$ , pospešeno celjenje ran v primerjavi z mišmi divjega tipa (Ashcroft in sod., 1999b). Spet druge študije so pokazale, da povečana ekspresija TGF- $\beta$ 1 pospeši proliferacijo keratinocitov predvsem v bolj poznih fazah celjenja rane. To nam pokaže kompleksnost sporočanja, ki je potrebno za uspešno koordinacijo v celjenju rane (Bottinger in sod., 1997).

Pri tvorbi začasnega zunajceličnega matriksa in v fazi preoblikovanja rane je TGF- $\beta$ 1 udeležen pri produkciji kolagena (predvsem tip I in III). Je tudi zaviralec metaloproteinaz, ki razgrajujejo zunajcelični matriks (Zeng in sod., 1996). TGF- $\beta$ 1 lahko spodbuja produkcijo kolagena do mere, da je lahko že patološko. Tak primer je patogeneza fiboze, kjer TGF- $\beta$ 1 stalno spodbuja aktivacijo keloidnih fibroblastov (Wang in sod., 2007).

#### 2.3.2.1 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)

TGF- $\beta$ 2 je udeležen pri vseh fazah celjenja rane, najprej pri dovodu vnetnih celic in fibroblastov na mesto rane. Raziskave *In vivo* so pokazale, da TGF- $\beta$ 2 spodbuja tvorbo granulacijskega tkiva in nastanek novih krvnih žil, ter pospešuje ponovno epitelizacijo. Med produkcijo začasnega zunajceličnega matriksa in preoblikovanja rane, TGF- $\beta$ 2 pospešuje izgradnjo proteinov, kolagena in celic. S spodbujanjem fibroblastov na mesto rane, povzroči povečano nalaganje kolagena (tip I in III) in brazgotinjenje (Cordeiro in sod., 1999; Roberts in sod., 1986).

### 2.3.2.2 Transformirajoči rastni dejavnik $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$ )

TGF- $\beta 3$  omogoča potovanje vnetnih celic, fibroblastov in keratinocitov na mesto rane. Študije so pokazale, da je tudi potencialen spodbujevalec nastajanja novi žil in zaviralec tvorbe DNK v človeških keratinocitih. Slednji izsledki podpirajo hipotezo, da je aktivacija TGF- $\beta 3$  pomembno sporočilo za končno diferenciacijo v tem tkivu (Schmid in sod., 1993). *In vivo* TGF- $\beta 3$  zavira brazgotinjenje in spodbuja boljšo organizacijo kolagena (Shah in sod., 1995).

### 2.3.3 Dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  vnetni citokin izločajo večinoma aktivirani makrofagi, ki jih povečano izločajo med vnetno fazo celjenja rane. TNF- $\alpha$  lahko sproži produkcijo fibroblastnega rastnega dejavnika 7 (FGF-7), ki posredno pospešuje ponovno epitelizacijo (Brauchle in sod., 1994).

Raziskave so pokazale, da TNF- $\alpha$  pri nižjih koncentracijah pospešuje celjenje ran, nasprotno pa ima pri višjih koncentracijah, posebno pri daljši izpostavljenosti, negativen učinek na celjenje. TNF- $\alpha$  na eni strani zavira tvorbo proteinov začasnega zunajceličnega matriksa in tvorbo tkivnega zaviralca metaloproteinaz, medtem ko na drugi strani pospešuje nastanek metaloproteinaz. Povišane količine negativno vplivajo tudi na zmožnost tvorbe novih žil. Koncentracija TNF- $\alpha$  je povišana pri kroničnih ranah, pri katerih je ponavadi prisotna tudi infekcija, ki prispeva k podaljšani vnetni fazi (So in sod., 1992). Poleg tega so v kroničnih ranah povečane količine kolagenaz, gelatinaz in stromelizinov, katerih indukcijo povzroči TNF- $\alpha$ . Povečana količina metaloproteinaz zavira potovanje celic skozi začasni zunajcelični matriks in nalaganje kolagena. Metaloproteinaze prav tako zavirajo aktivnost rastnih dejavnikov in njihovih tarčnih celičnih receptorjev (Tarnuzzer in sod., 1996).

### 2.3.4 Inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS)

Inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS) je ena izmed treh izoblik sintaze dušikovega oksida (NOS), ki se med seboj razlikujejo v aminokislinski sestavi, molekulski masi in regulacijskih mehanizmih. Ostali dve izobliki sta endotelijalska sintaza dušikovega oksida (eNOS) in nevronska sintaza dušikovega oksida (nNOS), ki se izražata stalno. Izražanje iNOS pa je pogojeno z izpostavljenostjo citokinom in bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). Najdemo jo v makrofagih, fibroblastih, pljučnem epiteliju in v jetrih. INOS v encimski reakciji katalizira nastanek dušikovega oksida (NO) (Nemec, 2009).

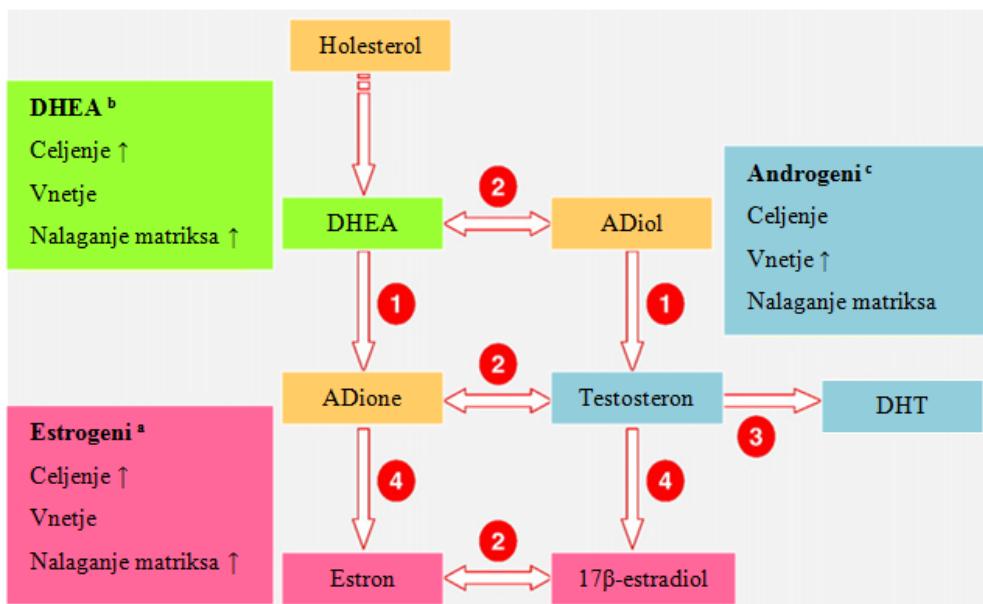
NO je brezbarven plin, ki nastaja iz L-arginina in se nato oksidira v nitrit in nitrat. V organizmu ima dušikov oksid pomembne vloge v ožilju, centralnem in perifernem živčnem sistemu, prirojeni imunosti, gastrointestinanem, dihalnem in urogenitalnem sistemu. Ureja tudi agregacijo trombocitov in sodeluje pri delovanju imunskega sistema (Straus, 1996).

Dušikov oksid ima pomembno, vendar do sedaj še nepopolnoma raziskano vlogo v celjenju ran. Vključen je v procese širjenja žil v koži, tvorbe novih žil, vnetja in v druge imunske odzive, ki so del celjenja ran (Shi in sod., 2001). Kot smo že omenili, NO tvori iNOS, ki se nahaja v makrofagih in fibroblastih. Pomembnost NO daje dejstvo, da ima antimikrobno funkcijo, saj uničuje bakterije na mestu rane (Park in Barbul, 2004).

Proliferacija, nastanek kolagena in preoblikovanje matriksa predstavljajo glavne funkcije fibroblastov, ki igrajo pomembno vlogo pri uspešnem celjenju ran. Fibroblasti v rani se razlikujejo od fibroblastov v normalni koži. Imajo zmanjšano proliferativno sposobnost, izboljšano sposobnost izgradnje kolagena, izboljšano krčenje matriksa, vendar podobno sintezo proteinov. Poleg tega fibroblasti v rani izražajo iNOS, ki proizvaja NO. Raziskave so pokazale, da je pri miših brez gena za *iNOS* zmanjšana proliferacija celic, znižana tvorba kolagena in upadla sposobnost krčenja kožnih fibroblastov v primerjavi z divjim tipom miši. Ti rezultati potrjujejo, da ima NO pomembno vlogo pri uspešnem celjenju ran (Shi in sod., 2001).

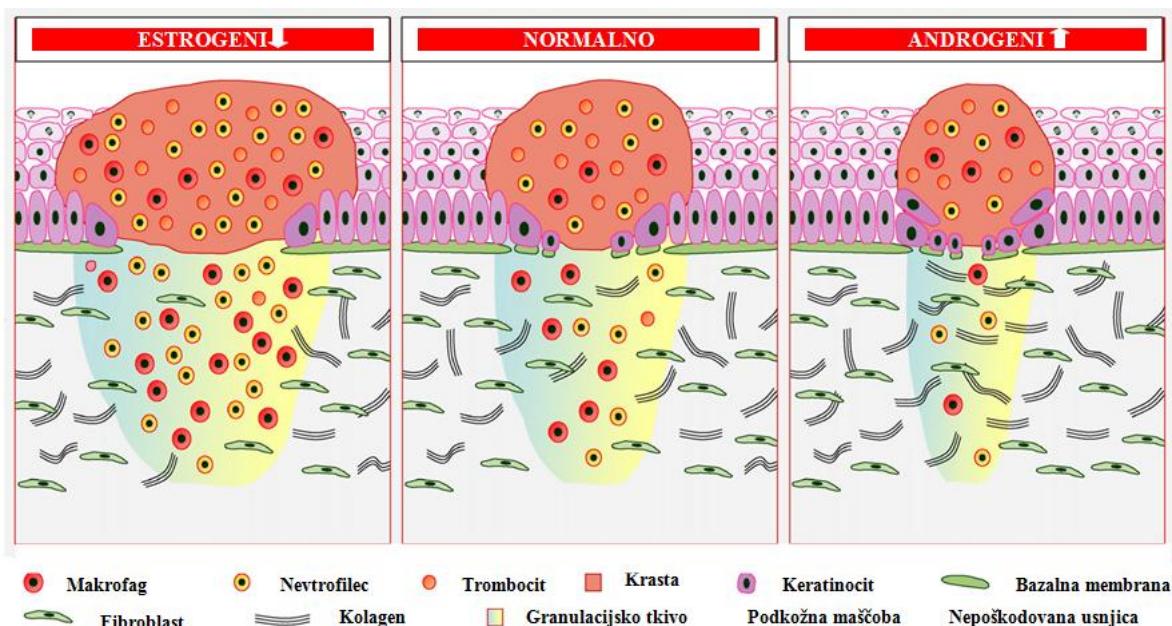
## 2.4 RAZLIKE V CELJENJU RAN MED SPOLOMA

Obstaja več dokazov, da staranje človeka negativno vpliva na celjenje akutnih ran. Slabše celjenje ran je rezultat podaljšane vnetne faze, povečane proteazne aktivnosti in zmanjšanega nalaganje matriksa. Ugotovili so, da imajo spolni steroidni hormoni velik vpliv na proces celjenja rane. Dehidroepiandrosteron (DHEA), ki nastaja v skorji nadledvične žleze, je steroidni predhodnik androgenih in estrogenih hormonov, kot sta  $5\alpha$ -dihidrotestosteron in  $17\beta$ -estradiol. Prav ti hormoni igrajo pomembno vlogo pri vnetni fazi celjenja rane. Dokazali so, da lokalno in sistemsko zdravljenje z estrogeni pospešuje celjenje akutnih ran pri moških in še posebno pri starejših ženskah, saj znižuje vnetni odgovor (Ashcroft in sod., 1997; Ashcroft in sod., 1999a). DHEA deluje na podoben način kot estrogeni, zato raziskave kažejo, da pospešuje celjenje ran preko pretvorbe v estrogene. V nasprotju pa androgeni testosteron znižuje sposobnost celjenja pri starejših moških, saj je pri njih močno povečan vnetni odgovor (Ashcroft in sod., 2002). Sicer zmanjšana prisotnost testosterona pri starejših moških razloži dejstvo, zakaj so se rane slabše celilile pri starejših moških, kot pri starejših ženskah, čeprav so bili vsi izpostavljeni enakemu načinu zdravljenja z estrogeni (Ashcroft in sod., 1999a). Upadanje estrogenov in DHEA v starosti pri obeh spolih se torej odrazi v slabšem celjenju ran.



Slika 1: Nastanek spolnih steroidnih hormonov (Gilliver in sod., 2007)

DHEA, ki je predhodnik estrogenov in androgenov, se tvori iz holeresta. Testosteron nastane preko androstenediona (ADione) ali androstenediola (ADiol). Estrogena estron in 17 $\beta$ -estradiol se tvorita preko androstenediona in testosterona s pomočjo encima aromataze. Testosteron se preko encima 5 $\alpha$ -reduktaze pretvori v bolj aktivno obliko androgenov – dihidrotestosteron (DHT). Medtem ko estrogeni (a) in DHEA (b) pospešujejo celjenje z zaviranjem vnetja in povečanjem nalaganja matriksa, androgeni (c) negativno vplivajo na celjenje ran.



Slika 2: Celjenje rane pod vplivom hormonov in brez (Gilliver in sod., 2007)

Rana se v splošnem bolje celi pri samicah, vendar se pri miših, ki so bile sterilizirane, celi znantno počasneje. Mesto rane in lokalni vnetni odgovor se povečata, kar privede do kasnejše ponovne epitelizacije in zmanjšanega nalaganja kolagena. Na drugi strani je celjenje rane bolje pri kastriranih samcih, saj je lokalno vnetje zmanjšano in nalaganje kolagena povečano.

### 2.4.1 Vpliv estrogenov

Vloga estrogenov pri celjenju ran je, da uravnavajo vnetni odgovor, izražanje citokinov, nalaganje matriksa, pospešujejo ponovno epitelizacijo, tvorbo novih žil in krčenje rane. Pri steriliziranih mišjih samicah se rane znatno slabše celijo (slika 2). Mesto rane in lokalni vnetni odgovor se povečata, kar privede do kasnejše ponovne epitelizacije in zmanjšanega nalaganja kolagena (Ashcroft in sod., 1997; Ashcroft in sod., 1999a).

Estrogeni zmanjšajo lokalno vnetje, tako da zmanjšajo infiltracijo vnetnih celic in zavirajo produkcijo vnetnih citokinov ter zmanjšajo imigracijo nevtrofilcev. Zaviralni dejavnik migracije makrofagov (macrophage migration inhibitory factor – MIF) je vnetni citokin, ki ga v človeški koži proizvajajo monociti, makrofagi, nevtrofilci, endotelne celice in keratinociti. Na mišjem modelu so odkrili, da je MIF glavni urejevalec skozi katerega estrogeni vplivajo na vnetni odgovor. Estrogeni namreč zmanjšujejo izražanje MIF in TNF- $\alpha$  v monocitih, kar vodi do zmanjšanega vnetja, povečanega nalaganja matriksa in posledično napredovanega celjenja ran (Ashcroft in sod., 2003).

Estrogeni imajo mitogen učinek na keratinocite, saj pospešuje ponovno epitelizacijo po ranitvi. Preko neposrednega vpliva na endotelne celice, estrogeni vplivajo na tvorbo novih žil. Pri raziskavah *in vitro* so dokazali, da 17 $\beta$ -estradiol pospešuje prilepljanje humanih endotelnih celic na laminin, kolagen tipa I in IV, ter na fibronektin. Ugotovili so tudi, da povečuje zmožnost endotelnih celic, za tvorbo kapilarjam podobnih struktur (Morales in sod., 1995).

Estrogeni preko monocitov in makrofagov spodbujajo izražanje PDGF, ki je mitogen in kemotaktičen za dermalne fibroblaste ter spodbujajo krčenje rane. Estrogeni tudi povečajo izločanje TGF- $\beta$ 1 iz fibroblastov, katerega naloga je vzpodbuditev in zaviranje izgradnje in razgradnje zunajceličnega matriksa, spodbujanje nastanka granulacijskega tkiva in pospeševanje nalaganja kolagena (Ashcroft in sod., 1997).

### 2.4.2 Vpliv androgenov

Androgeni so negativni urejevalci celjenja rane. Vse raziskave nakazujejo, da androgeni omejujejo proces celjenja, saj pospešujejo lokalno vnetje (slika 2). Raziskave so pokazale, da se rane pri kastriranih samcih celijo hitreje kot pri njihovih kontrolah, ki imajo prisotna moda. Kastracija namreč zmanjša lokalno vnetje z infiltracijo makrofagov na mesto rane in zmanjšano produkcijo TNF- $\alpha$ , obenem pa se poveča nalaganje kolagena (Ashcroft in sod., 2002). Podobno deluje sistemsko zdravljenje s flutamidom, ki se veže na androgeni receptor, in tako pospeši celjenje in zmanjša vnetni odgovor (Gilliver in sod., 2006). V večih raziskavah so dokazali, da testosteron in DHT igrata ključno vlogo pri celjenju ran. Za testosteron so odkrili, da v mišjih makrofagih zavira produkcijo interlevkina 1 (IL-1) in v človeških monocitih produkcijo IL-6. DHT znižuje izražanje IL-6 v hondroцитih in spodbuja izločanje TGF- $\beta$ 1 iz rakavih celic prostate LNCaP. Pri podganjih samcih, ki so jih tretirali z zavircem 5 $\alpha$ -reduktaze, so dokazali napredovano celjenje rane in zmanjšano lokalno vnetje. Ti rezultati so dokaz, da bi se morda v prihodnosti zaviranje produkcije DHT lahko uporabljalo kot pomoč pri zdravljenju ran pri starejših moških (Gilliver in sod., 2006).

V kliničnih študijah so dokazali, da androgeni zavirajo proces celjenja rane. V skupini starejših moških, ki so imeli povečan serumski testosteron, je prišlo do slabšega celjenja ran v primerjavi s kontrolno skupino. Poleg tega so androgeni povezani tudi s kroničnimi ranami. Vrednosti DHT v serumu so bile znatno povisane pri starejših moških pacientih z venskimi razjedami, v primerjavi z zdravimi enako starimi moškimi v kontrolni skupini (Gilliver in sod., 2006).

## 2.5 MIŠI BREZ GENA *SF-1*

### 2.5.1 Steroidogeni dejavnik 1

Steroidogeni dejavnik 1 (SF-1), imenovan tudi jedrni receptor poddružine 5, skupina A, član 1 (NR5A1), je prepisovalni dejavnik, ki spada v družino jedrnih receptorjev (Lala in sod., 1992). Naloga prepisovalnih dejavnikov v celici je, da se vežejo na specifično mesto

na molekuli deoksiribonukleinske kisline (DNK), kjer nadzorujejo prepis genov in s tem urejajo številne procese, ki so pomembni za razvoj organizma. Steroidogeni dejavnik 1 je bil najprej opisan kot urejevalec izražanja različnih encimov iz skupine citokromov P450 (Lala in sod., 1992). Sprva je SF-1 spadal v skupino jedrnih receptorjev sirot, za katere se ni vedelo natančno, če je za njihovo delovanje potrebna vezava z drugo spojino ali lahko delujejo sami. Li je s sodelavci ugotovil, da se SF-1 lahko aktivira s pomočjo metabolitov holesterola (Li in sod., 2005). S proučevanjem gensko spremenjenih miši brez gena za SF-1 so prišli do spoznanja, da steroidogeni dejavnik ureja delovanje hipotalamus, hipofize in steroidogenih tkiv. V teh tkivih uravnava prepisovanje številnih genov kot so encimi, ki sodelujejo pri nastanku steroidnih hormonov, steroidogenega akutnega regulatornega proteina, receptorja za ACTH (adrenokortikotropni hormon), antimüllerjevega hormona,  $\alpha$ -podenote glikoproteinskih hormonov,  $\beta$ -podenote LH (luteinizirajoči hormon) in FSH (folikle stimulirajoči hormon) in njunih receptorjev, receptorja GnRH (gonadotropin sproščajoči hormon) in drugih (Parker in Schimmer, 1997).

### **2.5.2 Mesto izražanja steroidogenega dejavnika 1**

Ugotovili so, da se SF-1 izraža v spolnih in nadledvičnih žlezah, v možganih v ventromedialnem jedru hipotalamus (VMH), v parenhimu vranice (Bakke in sod., 2001), placenti, kostnem mozgu in v prebavnem traktu (Ninomiya in sod., 1995; Sadovsky in sod., 1995).

V embrionalnem obdobju je steroidogeni dejavnik 1 nujno potreben pri spolni diferenciaciji zarodka, zato so njegovo izraženost zasledili že pri 9 dni starih mišjih zarodkih v celicah urogenitalnega grebena, iz katerih se razvijejo ledvice, skorja nadlevičnih žlez in spolne žleze. Kasneje so ga zasledili le v celicah, ki se razvijejo v skorjo nadlevičnih žlez in spolne žleze (Ikeda in sod., 1994). Pri odraslih samicah se njegovo izražanje poveča med zorenjem foliklov, kjer v celicah teke in granuloze ureja izražanje genov pomembnih za tvorbo steroidnih hormonov v jajčniku (Hanley, 2000). Pri samicah je steroidogeni dejavnik 1 prisoten v leydigovih celicah, ki izločajo androgene hormone, in v sertolijevih celicah (samo v zarodku), ki v času razvoja zarodka izločajo antimüllerjev hormon (Ikeda in sod., 1994). Njegovo prisotnost so zasledili tudi pri mišjih

zarodkih v vmesnih možganih, kjer ostane izražen do rojstva. Pri odraslih živalih pa ga najdemo v ventromedialnem jedru hipotalamus (Ikeda in sod., 1994).

### **2.5.3 Miši brez steroidogenega dejavnika 1**

Zaradi odsotnosti steroidogenega dejavnika 1 v embrionalnem razvoju se spolne žleze in nadledvična žleza ne razvijejo. Vse miši SF-1 KO, ne glede na genotip, se zato rodijo z razvito maternico, jajcevodi in zunanjimi ženskimi spolnimi organi, torej se fenotipsko razvijejo kot samice (Zhao in sod., 2001; Zhao in sod., 2004). Ker miši SF-1 KO zaradi odsotnosti nadledvičene žleze poginejo nekje do 8. dneva starosti, jih ohranjam pri življenju z dnevnimi aplikacijami mešanice kortikosteroidnih hormonov. 7. dan starosti jim presadimo nadledvično žlezo in s tem omogočimo, da se razvijejo v odraslo žival, ki jo proučujemo (Majdič in sod., 2002).

Ugotovili so, da je zgradba VMH pri miših SF-1 KO spremenjena (Ikeda in sod., 1995). Naloga VMH je poleg uravnavanja homeostaze v telesu in tudi uravnavanje gibanja ter spolnega, socialnega in starševskega obnašanja (Canteras in sod., 2002; McClellan in sod., 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

Za delo z živalmi je Veterinarska uprava Republike Slovenije izdala dovoljenje (št. 34401-2/2009/6), celotno delo je bilo izvedeno v skladu z etičnimi standardi in načeli.

#### 3.1 ŽIVALI

##### 3.1.1 Vzreja živali

Za poskus smo uporabili miši (*Mus musculus*) seva C57BL/6J, ki smo jih gojili na Centru za genomiko živali Veterinarske fakultete v Ljubljani. Izpostavljene so bile standardnim laboratorijskim pogojem, ki obsegajo temperaturo 20-25°C, vlago 40-60 % in 12 ur umetne svetlobe ter 12 ur teme. Živali so imele stalno na razpolago krmo brez fitoestrogenov (Harlan Tekland 2016, Velika Britanija) in vodovodno vodo z dodatkom klorovodikove kisline (1ml HCl/500ml vode; pH vode 3,0). Živali so bile nastanjene v polikarbonatnih kletkah, na nastilu iz žagovine (Lignocel, Rosenberg, Nemčija).

##### 3.1.2 Priprava poskusnih živali

Raziskavo smo naredili na divjem tipu miši (angl. wild type, WT), ki nimajo spremenjenega genotipa in na miših s spremenjenim genotipom, ki so homozigotne za izbiti gen za *SF-1* (SF-1 KO, angl. knockout).

Ker smo želeli pridobiti miši brez gena *SF-1* (SF-1 KO), ki so neplodne, smo med seboj parili heterozigotne samce in samice za izbiti gen za *SF-1* (*SF-1*<sup>+/−</sup>). Po kotitvi so vsi mladiči vsak dan do vključno 7. dne starosti, to je do genotipizacije, prejemali podkožne injekcije 50 µl mešanice kortikosteroidnih hormonov (400 µg/ml hidrokortizona (Sigma, Steinheim, Germany), 40 ng/ml deksametazona (Sigma) in 25 ng/ml fludrokortizon acetata (Sigma)) v koruznem olju (Sigma). S tem korakom smo preprečili, da bi mladiči SF-1 KO, ki so rojeni brez nadledvičnih in spolnih žlez, poginili. Ker takoj ob rojstvu ne moremo določiti genotipa le po fenotipskih znakih, vsi mladiči, ne glede na genotip, prejemajo injekcije kortikosteroidov. Za določitev genotipa smo mladičem starim od 4 do 6 dni

odvzeli biološki material. Živali smo genotipizirali z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Luo in sod., 1994). Takoj po genotipizaciji (7. dan starosti) smo mladičem SF-1 KO presadili nadledvične žleze (Majdic in sod., 2002). Namen tega je bil doseči preživetje mladičev SF-1 KO brez apliciranja kortikosteroidov. Kot darovalce zanje smo vedno uporabili samice WT iz istega gnezda, ki so imele prisoten gen *SF-1*. V primeru, če nismo imeli na voljo samice WT iz istega gnezda, smo uporabili samice WT iz drugih gnezd, ki se niso smelete od prejemnika nadledvičnih žlez v starosti razlikovati za več kot tri dni. Po žrtvovanju samic WT smo s pomočjo urarskih pincet izolirali nadledvične žleze in jih prenesli v hladno sterilno raztopino rekombinantnega človeškega rastnega dejavnika fibroblastov (angl. fibroblast growth factor, FGF) (25 ng/ml; Sigma) v 0,05 M fosfatnem pufru z NaCl (pH 7,3) (angl. phosphate buffered saline, PBS). Takoj po izolaciji smo prejemniku nadledvične žleze naredili vbodno rano z iglo (21G x 19/16" 0,8 x 40 mm, Novico, Italija) v levem podpazdušnem območju in mu z urarsko pinceto v podkožje vstavili po dve nadledvični žlezi. Ker so bile heterozigotne miši za izbiti gen *SF-1* (*SF-1*<sup>+-</sup>) povratno parjene že več kot 10 generacij in predstavljajo kongenetsko linijo, po presaditvi ni prišlo do zavrnitvenih reakcij. Mišim WT smo namesto presaditve nadledvičnih žlez, ki jih imajo normalno prisotne, v podpazdušnem območju naredili vbodno rano. Miši SF-1 KO in miši WT so nato v presledkih prejemale injekcije kortikosteroidnih hormonov še 9., 12. in 16. dan starosti. Ko so bili mladiči stari 21. dni, smo jih odstavili od matere in jih skupaj pustili do 25. dneva ( $\pm$  2 dni) starosti.

Kot kontrolne živali so nam služile miši WT iz istih gnezd ali drugih gnezd, ki so bila časovno primerljiva. Miši SF-1 KO smo primerjali z mišmi WT, zato smo pri kontrolnih živalih izvajali enake postopke kot pri miših SF-1 KO. Na 25. dan ( $\pm$  2 dni) starosti smo mišim WT odstranili jajčnike ali moda z namenom prekinitev vpliva spolnih hormonov, ki se začnejo izločati v puberteti. Kontrolne živali so bile torej podobno izpostavljene spolnim hormonom, kot miši SF-1 KO. Operativni poseg smo izvedli tudi na miših SF-1 KO, katerim smo naredili samo zarezo brez odstranitve spolnih žlez, saj te pri njih niso prisotne. Po operaciji smo miši izolirali v veliko kletko, ki smo jo pokrili s pokrovom.

Preglednica 2: Protokol ravnanja z mišmi SF-1 KO in mišmi WT

<b>STAROST (DNI)</b>	<b>TRETMA</b>
0	injekcija vsi
1	injekcija vsi
2	injekcija vsi
3	injekcija vsi
4	injekcija vsi
5	injekcija vsi
6	injekcija vsi + odvzem tkiva za genotipizacijo
7	injekcija vsi + genotipizacija + presaditev nadledvične žleze pri miših SF-1 KO, vbod pri miših WT
9	injekcija miši SF-1 KO in miši WT
12	injekcija miši SF-1 KO in miši WT
16	injekcija miši SF-1 KO in miši WT
21	Odstavitev od mame
22-25	Odstranitev spolnih žlez pri miših WT + operativni poseg pri miših SF-1 KO

### 3.1.2.1 Genotipizacija

#### 3.1.2.1.1 Razgradnja tkiva

Vsem mladičem starim 4-6 dni smo odvzeli delčke tkiva prstov na zadnjih nogah. V istem gnezdu je bilo potrebno vsakemu mladiču odvzeti delček tkiva drugega prsta, saj smo jih s tem tudi označili glede na položaj prsta s številkami 1-10. Za razgradnjo tkiva smo uporabili 200 µl pufra za razgradnjo (Taq DNA lysis buffer, Promega, WI, ZDA) in 15 µl proteinaze K (15 mg/ml; Sigma) ter ga pustili čez noč na stresalniku (Thermomixer Compact, Eppendorf) pri 400 obr/min in 55°C.

#### 3.1.2.1.2 Verižna reakcija s polimerazo

Za določitev genotipa mladičev smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) po protokolu (Luo in sod., 1994). Za genotipizacijo enega vzorca smo uporabili 3 µl izlata razgrajenega tkiva, kateremu smo dodali 50 ng vsakega

oligonukleotidnega začetnika in sterilno destilirano vodo do končnega volumna 10 µl. Pri 95 °C smo dodali 10 µl master miksa, ki je vseboval nukleotide in polimerazo DNK (Promega). S tem korakom (dodajanjem polimeraze pri 95 °C) smo zmanjšali nastanek nespecifičnih produktov PCR. Za določitev spola živali in genotipa za SF-1 smo uporabili naslednje oligonukleotidne začetnike:

- SF-1 F 5'-ACAAGCATTACACGTGCACC-3' in SF-1 R 5'-TGAATGCAACCACCTTGCC-3' za določitev alela WT,
- SF-1-neo R 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' za določitev alela SF-1KO ter
- F 5'-AGGCGCCCCATGAATGCATT-3' in R 5'-TCCATGAGGCTGATATTATAG-3' za določitev prisotnosti gena *Sry*.

PCR reakcijo smo izvedli v PCR aparaturi (Thermal cycler 2720, Applied biosystems, Kalifornija, ZDA)

### 3.1.2.1.3 Elektroforeza

Po končani PCR reakciji smo nastale PCR produkte ločili na gelski elektroforezi. Najprej smo pripravili 2% agarozni gel, za katerega smo potrebovali 50 ml 0,5 M TBE pufer (Tris boratni EDTA pufer) in 1 g agaroze (Sigma). Vse skupaj smo segreli do vretja v mikrovalovni pečici, da se je agarozna raztopila. Ko se je raztopina malce ohladila, smo dodali 0,7 µl etidijevega bromida (Promega), ki se vgradi med baze DNK in fluorescira pri svetlobi valovne dolžine 300 nm. Tako pripravljen gel vlijemo v model in vanj vstavimo glavnice. Ko se je gel strdil, smo ga prenesli v enoto za elektroforezo v 0,5 M TBE pufer. V prvi žepek smo odpipetirali 5 µl dolžinskih markerjev (100 bp). V naslednje pa smo nato nanašali po 10 µl vzorcev. Elektroforezno enoto smo zatem priklopili na vir napetosti 230 V. Po približno 20 min smo pod UV lučjo lahko opazovali nastale PCR produkte, ki so se ločili po velikosti (*Sry* = 200 bp, SF-1 = 500 bp in SF-1-neo = 600bp).

### 3.1.2.2 Odstranitev spolnih žlez in operacija miši SF-1 KO

Pred odstranitvijo spolnih žlez, smo miši WT anestezirali s 50 µl mešanice anestetikov Ketamina (Vetoquinol Biowet, Gorzowie, Polska, 100 µg/g telesne teže), Acepromazina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 2 µg/g telesne teže) in Xilazina (Chanelle Pharmaceuticals Ltd., Loughrea, Ireland; 10 µg/g telesne teže). Miši smo najprej populili dlako in predel razkužili. Pri samcih smo odstranili moda in nadmodek skozi zarezi na vsaki strani penisa, jajčnike pri samicah pa skozi zarezo v trebušni votlini, kjer poteka bela črta. Po odstranitvi spolnih žlez, smo mišim zašili rano z resorbtivno kirurško nitjo 6/0 HR17 (Braun, Tuttlingen, Nemčija) in jim pod kožo aplicirali dve injekciji v štiriurnem razmiku po 50 µl analgetika Butorfanola (Turbogesic, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, ZDA; 3 mg/kg telesne teže). Enak protokol smo izvedli tudi na miših SF-1 KO, vendar s to razliko, da jim nismo odstranjevali spolnih žlez, ker jih zaradi neaktivnega gena za *SF-1* nimajo.

### 3.1.2.3 Priprava kortikosteroidne mešanice

Za pripravo mešanice kortikosteroidnih hormonov smo uporabili koruzno olje (Sigma), hidrokortizon (H4001, Sigma), deksametazon (Deksametazon 21-fosfat, D1159, Sigma) in fludrokortizon acetat (F6127, Sigma). Založni raztopini hidrokortizona 4 mg/ml in fludrokortizona acetata 5 mg/ml smo vsako posebej pripravili v 95% etanolu (Merck, Dermstadt, Nemčija). Založno raztopino deksametazona smo pripravili v destilirani vodi. Vse raztopine smo prefiltrirali skozi celuloznoacetatno filtrirno membrano s porami premera 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Nemčija). Skozi takšno membrano smo prefiltrirali tudi 18 ml koruznega olja, v katerega smo iz založnih raztopin odpipetirali 2 ml hidrokortizona, 2 µl deksametazona in 2 µl fludrokortizona acetata. Končne koncentracije steroidnih hormonov v mešanici so bile 400 µg/ml hidrokortizona, 40 ng/ml deksametazona in 25 ng/ml fludrokortizona acetata.

### 3.2 RANA

#### 3.2.1 Ranitev živali

Okoli 60. dneva (+10 dni) starosti smo miši naredili rano. Čas ranitve je bil vedno enak: okoli 12. ure. Najprej smo miš anestezirali intramuskularno z mešanico Ketamina, Acepromazina in Xilazina ter ji po hrbtnu populili dlako. Populjen predel smo razkužili in s pomočjo škarij in pincete prerezali kožo in podkožni mišični sloj. Miš smo ranili 1 cm pod bazo lobanje, na levi in desni strani hrbta, na vsaki strani 1 cm od sredine. Dolžina obeh ran je bila približno 1 cm. Miš smo po prejetju analgetika s podkožno injekcijo Butorfanola izolirali v svojo kletko.

#### 3.2.2 Odvzem rane

3. dan po ranitvi smo rani odvzeli in žival žrtvovali. Žrtvovanje je bilo vedno ob enakem času: ob 12. uri. Miš smo najprej anestezirali intramuskularno z mešanico Ketamina, Acepromazina in Xilazina. Nato smo izrezali predel prve rane in ga potopili v fiksativ bouin, kjer je ostal čez noč. Naslednji dan smo ga prenesli v 70 % etanol (Merck) in nato po standardnem protokolu vklopili v parafin.

Irezali smo tudi predel druge rane, ki smo ga potopili v tekoči dušik in nato zamrznili na -80°C. Ta vzorec se bo lahko nadalje uporabil za druge raziskave.

### 3.3 IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE

Vzorce ran, zalite v parafinski blok, smo narezali z mikrotomom na 7 µm debele rezine in jih nato nanesli na predmetnice, prekrite s silanom (APES, Sigma) in polilizinom (poli-L-lizin hidrobromid; MwMalls 70000-150000 (P1274), Sigma), ki smo jih predhodno razporedili na rob vodne kopeli Leica Hi 1210 (Leica Microsystems, Nussloch, Nemčija) s temperaturo 42-43°C, da so se rezine lažje razvile. Po prekonočnem sušenju rezin v inkubatorju (Inkubator Termo 120V, Elektromehanika Labonova, Ilirska Bistrica, Slo) na 45°C smo jih najprej sprali v ksilenu (Xylene, Merck), da smo odstranili parafin, čemur je

nato sledila rehidracija v padajočih koncentracijah etanolov (Merck) (100 %, 5 min; 96 %, 5 min; 70 %, 5 min) in destilirani vodi (5 min) na stresalniku (Vibromix 31, Tehnica, Železniki, Slo). Zatem smo spirali rezine 5 min na stresalniku v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20 (Sigma), ki vpliva na propustnost celičnih membran. Po prvem spiranju smo inkubirali rezine 20 min na stresalniku v 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck), da smo blokirali endogene peroksidaze, kateremu je sledilo drugo spiranje v svežem 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20. Nato smo rezine inkubirali v 0,01 M Na-citratu (Sigma) v mikrovalovni pečici na počasnem vrenju 20 min, s čimer smo razbili proteinske križne povezave, ki jih je tvoril fiksativ bouin, in razkrili epitope, kar je povečalo intenziteto končnega obarvanja. Pred spiranjem v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20 5 min na stresalniku smo rezine pustili ohlajati v Na-citratu na sobni temperaturi približno 20 min. Na rezine smo nato nanesli raztopino 5 % normalega kozjega seruma (angl. normal goat serum, NGS, Chemicon, CA, ZDA) v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20, s katerim smo zmanjšali obarvanje ozadja, in ga inkubirali od 30 do 120 min na sobni temperaturi. Zatem smo na rezine nanesli ustrezno razredčitev primarnih protiteles, ki smo jo pripravili v raztopini 5 % normalega kozjega seruma v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20, in jih pokrili s krovnimi stekelci ter inkubirali čez noč na 4°C. Uporabili smo primarna zajčja poliklonska protitelesa proti iNOS (Anti-iNOS/NOSII, Millipore, CA, ZDA) v razredčitvi 1:100. Naslednji dan smo nevezana primarna protitelesa sprali dvakrat po 5 min na stresalniku v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20 in nato rezine inkubirali od 30 min do 60 min na sobni temperaturi z ustrezno razredčitvijo sekundarnih protiteles, ki so imela vezano beljakovino biotin. Uporabili smo biotinizirana oslovska proti-zajčja protitelesa (angl. donkey anti rabbit, Jackson immunoresearch, West Grove, PA, ZDA), ki smo jih razredčili 1:500 z 1 x PBS pufrom z 0,5 % detergentom Tween 20. Zatem smo nevezana biotinizirana sekundarna protitelesa sprali dvakrat po 5 min na stresalniku v 1 x PBS pufru z 0,5 % detergentom Tween 20 in nato inkubirali rezine od 30 do 60 min na sobni temperaturi v ustrezni razredčitvi streptavidin hrenove peroksidaze (SHRP, angl. peroxidase-conjugated streptavidin; Jackson immunoresearch), s katero ojačamo signal po dodatku substrata. SHRP smo razredčili 1:500 z 0,05 M TBS (angl. Tris-buffered saline, Sigma). Sledilo je spiranje dvakrat po 5 min na stresalniku v 0,05 M TBS. Nato smo na rezine nanesli raztopino 0,05 % substrata DAB (3' 3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid, Sigma) v 0,05 M TBS z 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s čimer smo

lokalizirali protitelesa, ki so se vezala na ustrezne beljakovine. V prisotnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se DAB z encimom peroksidazo (ki je vezana na sekundarno Ab) pretvori v rjav precipitat, ki je netopen v alkoholih, in v vodo. Reakcijo smo prekinili z inkubacijo rezin v destilirani vodi dvakrat po 5 min na stresalniku. Strukture rezin smo nato obarvali s hematoksilinom (Haematoxylin, Sigma) 15-60 s in barvo razvijali 5 min v navadni vodovodni vodi. Zatem smo rezine dehidrirali v naraščajočih koncentracijah etanolov (70 %, 5 min; 96 %, 5 min; 100 %, 5 min) in ksilenu (5 min) ter na koncu rezine pokrili s pokrovnim medijem (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija) in tako pripravili trajen mikroskopski preparat.

### 3.4 BARVANJE PO HEMATOKSILINU IN EOZINU (HE BARVANJE)

Vzorce ran smo narezali in jih nanesli na predmetnice po protokolu, ki je opisan v poglavju Imunohistokemija. Po 2 do 3 urnem sušenju rezin v inkubatorju na 45-50°C smo jih najprej sprali v ksilenu, da smo odstranili parafin, čemur je nato sledila rehidracija v padajočih koncentracijah etanolov (100 %, 5 min; 96 %, 5 min; 70 %, 5 min) in destilirani vodi (5 min). Nato smo inkubirali rezine 15-60 s v hematoksilinu in nato razvijali barvo 5 min v navadni vodovodni vodi. Zatem je sledila 15 s inkubacija v eozinu (Eosin, Sigma) in hitro spiranje v navadni vodovodni vodi ter dehidracija v naraščajočih koncentracijah etanolov (70 %, 96 %, 100 %), saj se eozin v alkoholih spira. Po inkubaciji v ksilenu (5 min) smo rezine pokrili s pokrovnim medijem Pertex.

### 3.5 ANALIZA PODATKOV

#### 3.5.1 Priprava slik, merjenje širine rane in višine epitelija

Trajne mikroskopske preparate ran, ki smo jih obarvali s hematoksilinom in eozinom, smo slikali in na digitalnih slikah izmerili širino rane. Slikali smo s pomočjo mikroskopa Eclipse 80i (Nikon, Japonska) pod 4-kratno povečavo z vgrajeno digitalno kamero (DS-Fi1, Nikon) in programske opreme NIS-elements (NIS-Elements F 2.20 (Build 237), Nikon). Digitalne slike smo nato obdelali s prosto dostopnim programom Image J verzija 1.34 (NIH, MD, ZDA). Izmerili smo širino rane od enega zunanjega roba do drugega in višino na novo nastajajočega epitelija. Na posamezni predmetnici so bile rezine ene živali

v medsebojnem razmiku približno 60 µm in smo jih označili kot 1. plast, 2. plast in 3. plast. Vsako rano smo s programom Image J izmerili 10-krat in izračunali povprečje meritev, da smo zmanjšali vpliv merske napake. Nato smo izračunali še povprečje meritev vseh treh plasti ran ene živali.

Za merjenje višine na novo nastajajočega epitelija smo rano slikali pod 20-kratno povečavo. Zatem smo po celotnem dnu rane na rezini v 2. plasti merili višino epitelija (približno 15 meritev na rano) in nato izračunali povprečje meritev.

### 3.5.2 Štetje celic

Na vzorcih ran, na katerih smo naredili imunohistokemično barvanje, smo pod mikroskopom Eclipse 80i pri 20-kratni povečavi prešteli rjavo obarvane celice (celice, ki so izražale iNOS). Pri ožjih ranah smo šteli celice v enem vidnem polju, pri širših v dveh. Na posamezni predmetnici sta bili po dve zaporedni rezini iz 1. plasti in po dve zaporedni rezini iz 2. plasti. Na dnu vsake rane smo pod mikroskopom prešteli št. celic in po posameznih plasteh izračunali povprečje. Na koncu smo izračunali tudi povprečje celic v obeh plasteh.

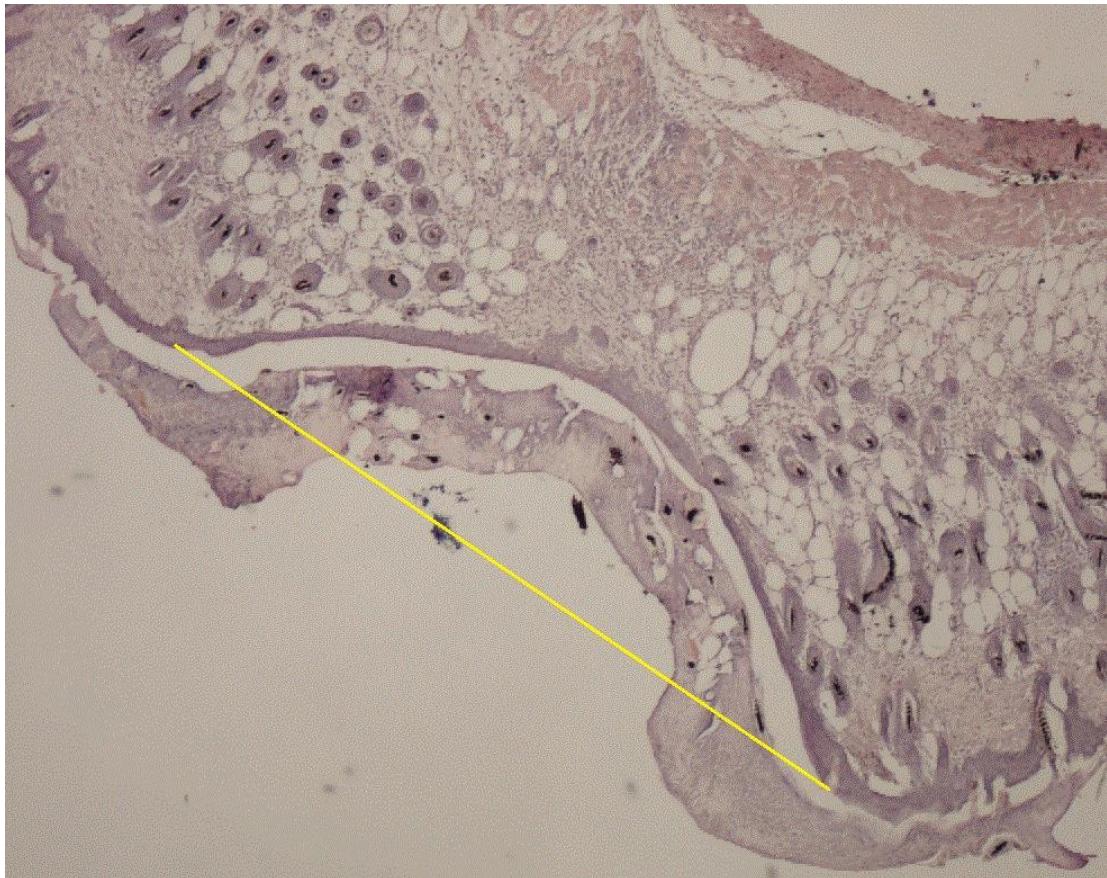
## 3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke o širini rane, višini epitelija ter številu celic, ki so izražale iNOS smo analizirali z dvosmerno analizo variance, pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki. Ker se je epitelij na dnu rane pojavil samo pri nekaterih miših, smo morebitne razlike med skupinami v hitrosti celjenja (pojav epitelija na dnu rane) preverili s testom H-kvadrat. Za vse analize smo kot statistično značilne razlike določili p < 0,05.

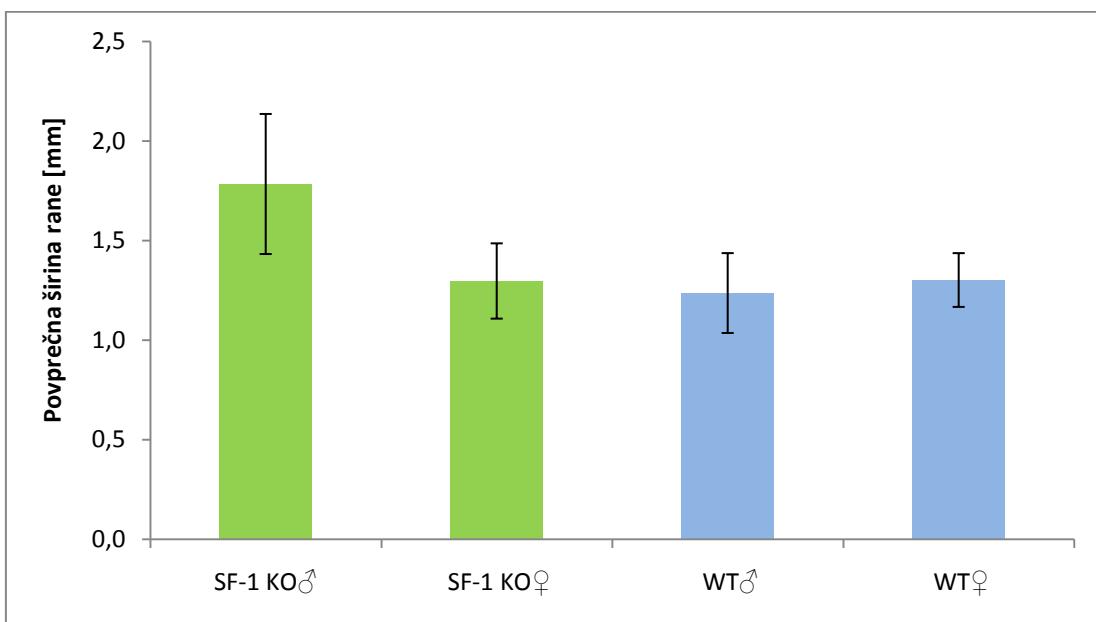
## 4 REZULTATI

### 4.1 ŠIRINA RANE

Na rezinah pobravanih s hematoksilinom in eozinom smo merili širino rane s pomočjo programa Image J od enega zunanjega roba do drugega (Slika 3). Vsako rezino smo izmerili 10-krat, da smo izničili vpliv merske napake, in izračunali povprečje meritev. Ker smo na vsako žival imeli po 3 rezine, smo izračunali še povprečje meritev širine rane teh treh rezin. Na koncu smo izračunali še povprečje meritev širine rane na vsako skupino živali (Slika 4). Imeli smo poskusno in kontrolno skupino živali. V poskusni skupini je bilo 9 samic SF-1 KO in 6 samcev SF-1 KO, v kontrolni pa 6 samic WT in 8 samcev WT. Dvosmerna analiza variance pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki, ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik.



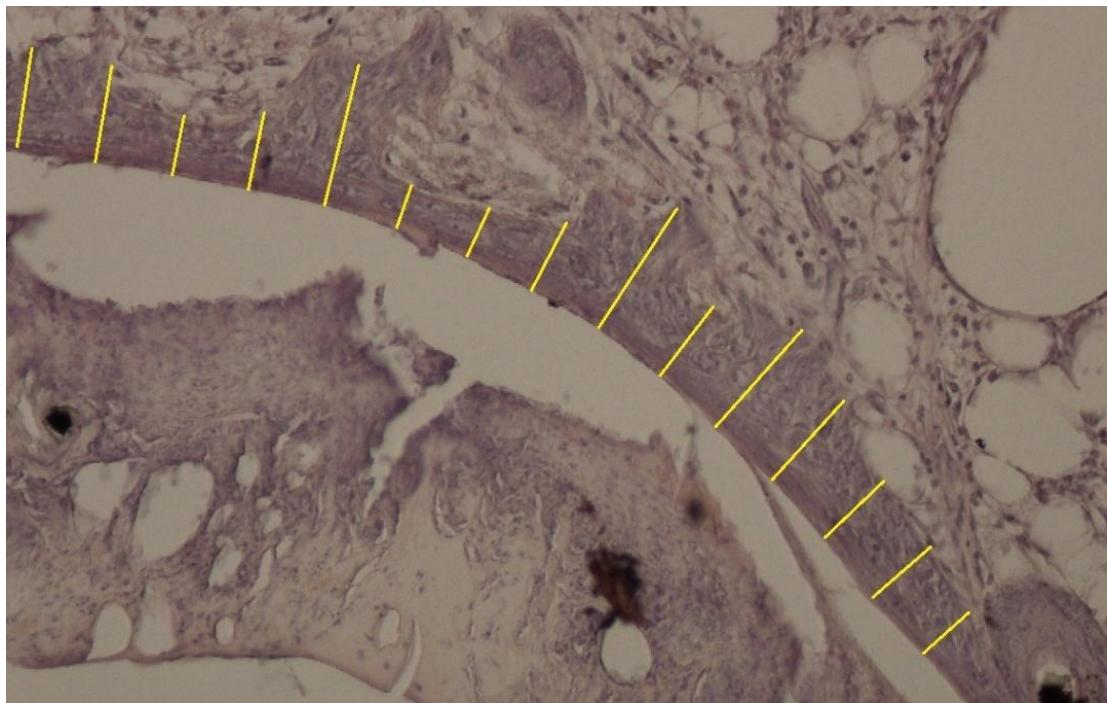
Slika 3: Merjenje širine rane od enega zunanjega roba do drugega



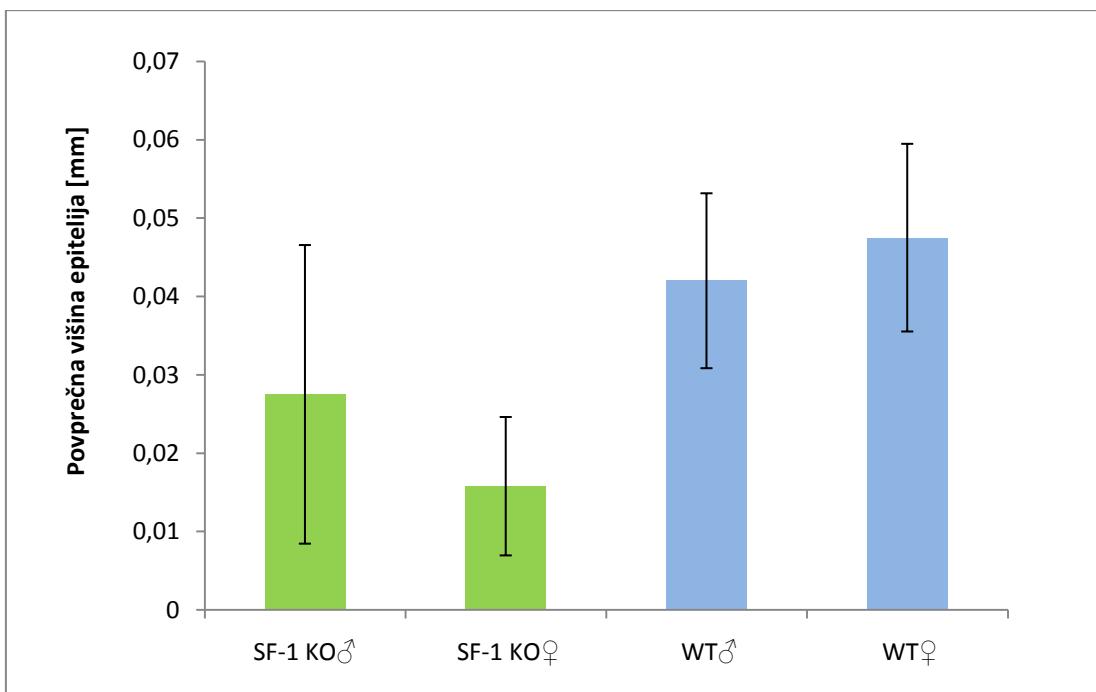
Slika 4: Povprečna širina rane v mm po skupinah živali in prikaz intervalov standardne napake  
Legenda: SF-1 KO ♂ - samec brez gena *SF-1*, SF-1 KO ♀ - samica brez gena *SF-1*, WT ♂ - samec divjega tipa, WT ♀ - samica divjega tipa

#### 4.2 VIŠINA EPITELIJA

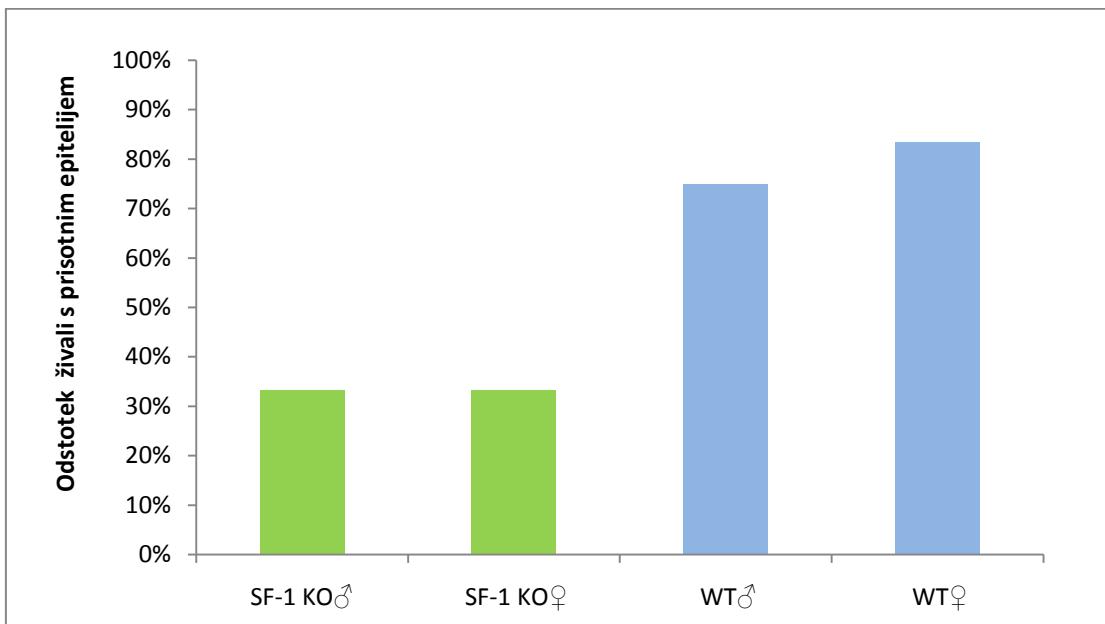
Na rezinah pobravanih s hematoksilinom in eozinom smo merili višino na novo nastajajočega epitelija (Slika 5). Na rezini v 2. plasti smo na dnu rane izmerili višino epitelija (približno 15 meritev na rano) in nato izračunali povprečje meritev. Na koncu smo izračunali povprečje meritev višine epitelija na vsako skupino živali (Slika 6). Imeli smo poskusno in kontrolno skupino živali. V poskusni skupini je bilo 9 SF-1 KO samic in 6 SF-1 KO samcev, v kontrolni pa 6 WT samic in 8 WT samcev. Epitelij je bil prisoten pri 3 samicah SF-1 KO in 2 samcih SF-1 KO ter pri 5 samicah WT in 5 samcih WT. Izračunali smo delež živali z nastajajočim epitelijem (Slika 7). Dvosmerna analiza variance pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki, ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik. Z njo smo ugotavljali razlike v povprečni višini epitelija med skupinami. S testom H-kvadrat, ki tudi ni pokazal nobenih statistično značilnih razlik, smo ugotavljali razlike med skupinami v deležu živali s prisotnim epitelijem.



Slika 5: Merjenje višine epitelija



Slika 6: Povprečna višina epitelija v mm po skupinah živali in prikaz intervalov standardne napake  
Legenda: SF-1 KO ♂ - samec brez gena *SF-1*, SF-1 KO ♀ - samica brez gena *SF-1*, WT ♂ - samec divjega tipa, WT ♀ - samica divjega tipa

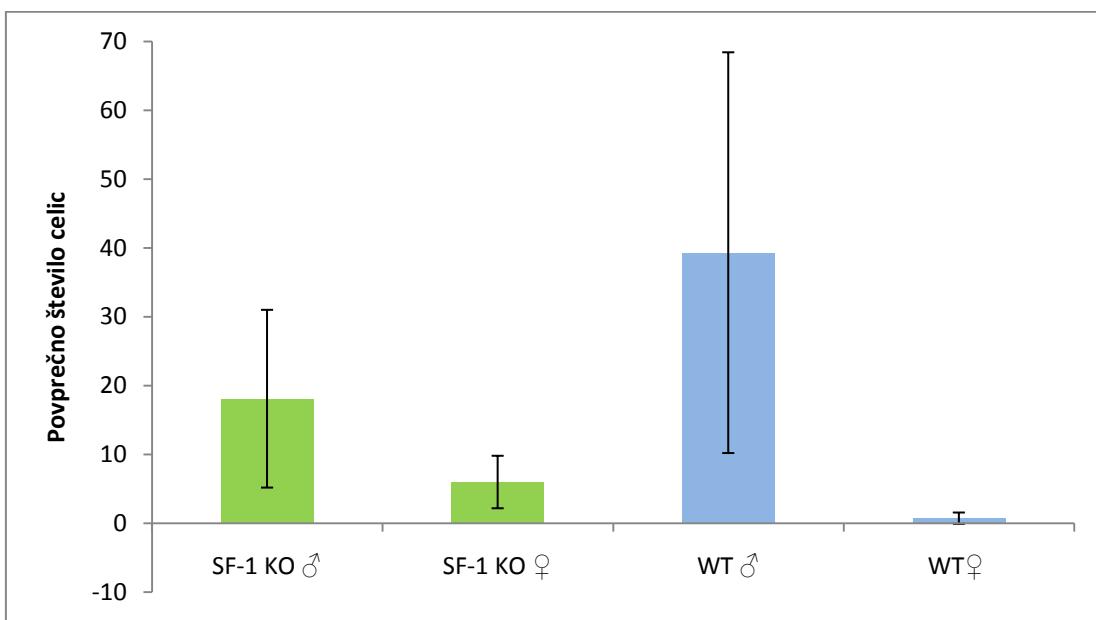


Slika 7: Odstotek živali z nastajajočim epitelijem po skupinah

Legenda: SF-1 KO ♂ - samec brez gena *SF-1*, SF-1 KO ♀ - samica brez gena *SF-1*, WT ♂ - samec divjega tipa, WT ♀ - samica divjega tipa

#### 4.3 ŠTETJE CELIC

Pod mikroskopom smo šteli rjavo obarvane celice, ki so izražale iNOS. Za vsako žival smo izračunali povprečno število celic in na koncu še povprečje števila celic po skupinah živali (Slika 8). Imeli smo poskusno in kontrolno skupino živali. V poskusni skupini je bilo 8 SF-1 KO samic in 5 SF-1 KO samcev, v kontrolni pa 6 WT samic in 8 WT samcev. Dvosmerna analiza variance s spremenljivkama spol in genotip ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik med skupinami.



Slika 8: Povprečno število celic iNOS po skupinah in prikaz intervalov standardne napake  
Legenda: SF-1 KO ♂ - samec brez gena *SF-1*, SF-1 KO ♀ - samica brez gena *SF-1*, WT ♂ - samec divjega tipa, WT ♀ - samica divjega tipa

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V literaturi je veliko znanega glede vpliva spolnih hormonov na celjenje ran pri miših in pri ljudeh, zato smo se odločili, da na mišjem modelu preverimo, če poleg spolnih hormonov tudi geni na spolnih kromosomih vplivajo na razlike v celjenju ran med spoloma. Uporabili smo miši brez gena *SF-1*, ki se rodijo brez nadledvičnih in spolnih žlez in zato niso izpostavljeni spolnim hormonom med razvojem. Kot kontrole pa smo uporabili miši divjega tipa, ki smo jim odstranili jajčnike ali moda, da smo izničili neposredni vpliv spolnih hormonov na celjenje rane. Spolni hormoni se pri teh živalih začnejo izločati že v maternici, vendar je njihova aktivnost izločanja večja v puberteti. V naši raziskavi smo mišim WT odstranili spolne žleze pred puberteto, zato da smo izničili neposredni (aktivacijski) vpliv spolnih hormonov na celjenje rane. Kontrolne živali so zato bolj primerljive mišim brez gena *SF-1*, ki nimajo prisotnih spolnih hormonov.

### 5.1 ŠIRINA RANE

Z merjenjem širine rane tretji dan po ranitvi od enega zunanjega roba rane do drugega smo želeli ugotoviti hitrost celjenja, oziroma če je med skupinama prišlo do kakšnih razlik pri krčenju rane. Ker smo želeli izničiti vpliv merske napake, smo širino vsake rane izmerili 10-krat. Za bolj reprezentativen končni rezultat smo na vsako žival imeli po 3 rezine z ranami, iz katerih smo izračunali povprečje meritev širine rane. Na koncu smo izračunali še povprečje meritev širine rane na vsako skupino živali.

Dvosmerna analiza variance, pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki, ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik ne med spoloma in ne med genotipi miši.

Skrčenje rane je zadnja izmed štirih faz celjenja rane, ki naj bi se začela pri človeku nekje od 6 do 15 dneva po ranitvi (Barrientos in sod., 2008), pri miših pa naj bi se rane začele krčiti že v prvih 48 urah, ko je že prisotnih nekaj miofibroblastov (Bullard in sod., 1999). Nanjo vpliva več usklajenih interakcij med celicami, začasnim zunajceličnim matriksom in citokni. Fibroblasti se preoblikujejo v miofibroblaste, ki so odgovorni za krčenje rane

(Barrientos in sod., 2008). V koži miši je prisoten podkožni mišični sloj, ki ga ljudje nimamo, *panniculus carnosus*, ki je odgovoren za hitro skrčitev kože po poškodbi (Wong in sod., 2011). Mišim se torej rana skrči takoj po poškodbi in potem se še dokončno krči med procesom celjenja. Med celjenjem rane estrogeni pospešujejo krčenje rane, medtem ko ga androgeni zavirajo. Ker miši v našem poskusu niso imele prisotnih spolnih hormonov, neposredno vpliva tega dejavnika nismo proučevali. Posredno pa smo lahko predvidevali, da imajo verjeten vpliv na celjenje, saj pri miših v našem poskusu nismo opazili statistično značilne razlike v širini rane med spoloma, medtem ko so te razlike dobro znane iz literature. Naša raziskava torej kaže, da na razlike v hitrosti celjenja rane in krčenja rane verjetneje vplivajo spolni hormoni.

## 5.2 VIŠINA EPITELIJA

Na rezini v 2. plasti smo na dnu rane izmerili višino epitelija (približno 15 meritev na rano) in nato izračunali povprečje meritev. Na koncu smo izračunali povprečje meritev višine epitelija za vsako skupino živali in naredili grafikon, ki predstavlja povprečno višino epitelija po skupinah.

Z dvosmerno analizo variance, pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki, nismo ugotovili nobenih statistično značilnih razlik. Statistično značilno ni bilo med skupinami živali nobenih razlik, vendar se na grafikonu kaže trend višje povprečne višine epitelija pri živalih WT. To bi lahko pripisali temu, da so bile živali WT v maternici in po rojstvu do odstranitve spolnih žlez izpostavljene spolnim hormonom, kar bi morda lahko vplivalo na boljše celjenje ran (Ashcroft in sod., 2002). Druga razloga pa bi lahko bil tudi neposreden vpliv gena *SF-1*. Ta se namreč izraža tudi v vranici in kostnem mozgu (Bakke in sod., 2001), ki sodeluje pri delovanju imunskega sistema. Pri miših brez gena *SF-1* bi zato bilo možno, da imunski sistem nepravilno deluje, kar bi lahko privelo tudi do slabšega celjenja rane.

Z raziskavo višine epitelija lahko predvidevamo, da tudi na hitrost nastanka novega epitelija verjetneje vplivajo spolni hormoni, saj nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinami živali.

### 5.3 DELEŽ ŽIVALI S PRISOTNIM EPITELIJEM

Epitelij je bil prisoten le pri nekaterih živalih, zato smo izračunali delež živali s prisotnim epitelijem po skupinah. Za statistično analizo morebitnih razlik med skupinami v hitrosti celjenja (pojav epitelija na dnu rane) smo uporabili test H-kvadrat. Tudi ta test ni pokazal statistično značilnih razlik med skupinami v deležu živali s prisotnim epitelijem, vendar se na grafikonu kaže trend večje prisotnosti epitelija pri miših WT. To lahko povežemo z izpostavljenostjo miši WT spolnim hormonom pred in po rojstvu ali pa z morebitnim slabšim delovanjem imunskega sistema zarado odsotnosti gna *SF-1* v vranici in kostnem mozgu, kot smo to opisali pri višini epitelija.

Raziskava zopet kaže, da na razlike v celjenju ran verjetneje vplivajo spolni hormoni, saj med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Pri vseh živalih, ki so imele prisoten epitelij, se ta pri nekaterih ni pojavil po celotnem dnu rane, ampak je bil prekinjen na sredini. Ta ugotovitev se sklada z raziskavami Wernerja in sodelavcev, ki so odkrili, da dan ali dva po ranitvi začnejo celice ob robovih rane proliferirati za migrirajočimi celicami. To pomeni, da se tvorba epitelija prične ob robovih rane in prehaja v njeno dno (Werner in sod., 1994).

### 5.4 ŠTETJE CELIC

Pod mikroskopom smo šteli rjavoobarvane celice, ki so izražale iNOS. Za vsako žival smo izračunali povprečno število celic in na koncu še povprečje števila celic po skupinah živali. Dvosmerna analiza variance s spremenljivkama spol in genotip ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik med skupinami.

iNOS se nahaja v makrofagih in fibroblastih, kjer proizvaja dušikov oksid (NO), ki ima pomembno vlogo pri celjenju ran (Shi in sod., 2001). Uspešno celjenje ran se odrazi v večjih količinah makrofagov in fibroblastov, kar posledično pomeni tudi povečano število celic, ki so bile prisotne v rani.

Iz grafikona Povprečno število celic iNOS po skupinah je viden trend povišanih celic pri samcih WT, pri vseh ostalih skupinah pa zelo nizko število celic, ki so izražale iNOS. To bi lahko pripisali temu, da so se morebiti rane pri živalih, ki niso imele veliko celic, hitreje celile in je že prišlo do epitelizacije in posledično do odsotnosti celic. Visok delež celic pri samcih WT bi lahko pripisali izpostavljenost živali androgenim hormonom v maternici in v obdobju po rojstvu. Raziskave kažejo, da androgeni omejujejo proces celjenja, saj pospešujejo lokalno vnetje (Ashcroft in sod., 2002). Androgenom, sicer pred samim poskusom celjenja rane, pa so bili v naši raziskavi v obdobju pred in po rojstvu izpostavljeni samo samci WT. Ker makrofagi sodelujejo v vnetni fazи, ki je pri miših WT po predpostavki pospešena, je tudi posledično prisotnih več celic, ki izražajo iNOS. Iz grafikona je razvidno, da pri samicah WT ni prisotnih skoraj nič celic. To lahko morebiti razložimo z izpostavljenostjo spolnim hormonom pred sterilizacijo, saj estrogeni pospešujejo celjenje ran. Posledično je možno, da so bile rane že zaceljene in zato nismo opazili nobenih celic, ki bi izražale iNOS.

Iz tega, da ni prisotnih statistično značilnih razlik, lahko ponovno predvidevamo, da na razlike v celjenju ran verjetneje vplivajo spolni hormoni.

Sklep: Z našo raziskavo nismo uspeli potrditi razlik v celjenju ran med spoloma pri miših divjega tipa in miših brez gena *SF-1*, ki bi bile posledica vpliva genov na spolnih kromosomih. Ker se rezultati merjenja širine rane, višine epitelija, delež živali s prisotnim epitelijem in število celic, ki so izražale iNOS, niso statistično razlikovali glede na spol in genotip, naša raziskava kaže, da na razlike v celjenju ran med spoloma verjetneje vplivajo spolni hormoni.

Le obsežnejša raziskava z večjimi vzorci bi lahko v celoti odgovorila na vprašanje, ali med skupinami ni nobenih pomembnih razlik in torej na razliko v celjenju ran med spoloma ni vpliva genov.

## 6 POVZETEK

Celjenje ran je kompleksen biološki proces, ki ga sestavljajo hemostaza, vnetje, proliferacija in preoblikovanje tkiva. Pri njem sodelujejo različni tipi celic, kot so: nevtronfilci, makrofagi, limfociti, keratinociti, fibroblasti in endotelne celice. Na celjenje ran lahko vpliva več dejavnikov, ki delujejo na različne faze celjenja.

Čedalje bolj postaja jasno dejstvo, da so spolni hormoni ključni igralci pri celjenju ran. Androgeni in estrogeni imajo namreč velik vpliv na funkcijo vnetnih celic, saj sodelujejo pri procesih kemotakse, aktivacije in izločanja vnetnih citokinov. Vloga estrogenov pri celjenju ran je, da uravnavajo vnetni odgovor, izražanje citokinov, nalaganje matriksa, pospešujejo ponovno epitelizacijo, tvorbo novih žil in krčenje rane, s čimer vplivajo na boljše celjenje ran (Ashcroft in sod., 1997; Ashcroft in sod., 1999a). Nasprotno pa androgeni negativno vplivajo na celjenje ran, saj pospešujejo lokalno vnetje.

V diplomske nalogi smo poskušali ugotoviti, če poleg spolnih hormonov tudi geni na spolnih kromosomih vplivajo na razlike v celjenju ran med spoloma. Pri raziskavi smo uporabili miši divjega tipa in miši brez gena *SF-1*, ki se rodijo brez nadledvičnih in spolnih žlez in zato niso izpostavljeni spolnim hormonom med razvojem.

Okoli 60. dneva (+10 dni) starosti smo miši naredili rano, ki smo jo po treh dneh odvzeli (izrezali smo predel rane) in žival žrtvovali. Rano smo nato potopili v fiksativ bouin in jo po standardnem postopku vklopili v parafin. Na osnovi histološke preiskave ter imunohistokemične analize izraženosti iNOS smo poskušali ugotoviti morebitne razlike v celjenju ran med skupinami živali.

Histološke rezine, ki smo jih pobarvali z barviloma hematoksilin in eozin, smo poslikali in na digitalnih slikah merili širino rane od enega zunanjega roba rane do drugega in višino epitelija na dnu rane.

Izražanje iNOS smo analizirali z metodo imunohistokemičnega barvanja, pri katerem smo uporabili primarna zajčja poliklonska protitelesa proti iNOS (Anti-iNOS/NOSII).

Podatke smo analizirali z dvosmerno analizo variance, pri kateri smo uporabili spol in genotip živali kot dve neodvisni spremenljivki. Zaradi pojava epitelija na dnu rane le pri nekaterih živalih, smo morebitne razlike med skupinami glede na prisotnost epitelija preverili s testom H-kvadrat. Za vse analize smo kot statistično značilne razlike določili  $p < 0,05$ .

Rezultati merjenja širine rane, višine epitelija, delež živali s prisotnim epitelijem in število celic, ki so izražale iNOS, ne kažejo statistično značilnih razlik glede na spol in genotip.

Z našo raziskavo nismo uspeli potrditi razlik v celjenju ran med spoloma pri miših divjega tipa in miših brez gena *SF-1*, ki bi bile posledica vpliva genov na spolnih kromosomih. Naša raziskava kaže, da na razlike v celjenju ran med spoloma verjetneje vplivajo spolni hormoni.

## 7 VIRI

Amendt C., Schirmacher P., Weber H., Blessing M. 1998. Expression of a dominant negative type II TGF- $\beta$  receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene*, 17, 1: 25–34

Ashcroft G. S., Dodsworth J., van Boxtel E., Tarnuzzer R.W., Horan M.A., Schultz G.S. in Ferguson M. W. 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- $\beta$  levels. *Nature Medicine*, 3, 11: 1209-1215

Ashcroft G. S., Mills S.J. 2002. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *The Journal of Clinical Investigation*, 110, 5: 615-624

Ashcroft G.S., Greenwell-Wild T., Horan M.A., Wahl S.M., Ferguson M.W. 1999a. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *The American Journal of Pathology*, 155, 4:1137-1146

Ashcroft G.S., Mills S.J., Lei K. , Gibbons L., Jeong M.J., Taniguchi M., Burow M., Horan M.A., Wahl S.M., Nakayama T. 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, 9:1309-1318

Ashcroft G.S., Yang X., Glick A.B., Weinstein M., Letterio J.L., Mizel D.E., Anzano M., Greenwell-Wild T., Wahl S.M., Deng C., Roberts A.B. 1999b. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology*, 1: 260–266

Bailey A.J., Bazin S., Sims T.J., Le Lous M., Nicholetis C., Delaunay A. 1975. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochimica et Biophysica Acta*, 405, 2: 412-421

Bakke M., Zhao L., Hanley N.A., Parker K.L. 2001. SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Molecular and Cell Endocrinology*, 171, 1/2: 5-7

Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S., Brem H., Tomic-Cenic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 5: 585-601

Bottinger E.P., Letterio J.J., Roberts A.B. 1997. Biology of TGF $\beta$  in knockout and transgenic mouse models. *Kidney International*, 51, 5: 1355–1360

Brauchle M., Angermeyer K., Hubner G., Werner S. 1994. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene*, 9, 11: 3199–3204

Broughton G. 2nd, Janis J.E., Attinger C.E. 2006. The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 7: 12-34

Brown E.J. 1995. Phagocytosis. *Bioessays*, 17, 2: 109-117

Bullard K.M., Lund L., Mudgett J.S., Mellin T.N., Hunt T.K., Murphy B., Ronan J., Werb Z., Banda M.J., 1999. Impaired Wound Contraction in Stromelysin-1–Deficient Mice. *Annals of Surgery*, 230, 2: 260

Campos A.C., Groth A.K., Branco A.B. 2008. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11, 3: 281-288

Canteras N.S. 2002. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 71, 3: 481-491

Celleno L., Tamburi F. 2009. Structure and Function of the Skin. V: Nutritional Cosmetics: Beauty from Within. Tabor A., Blair R. M. (eds.). 1st edition. New York, William Andrew: 3-45

Cordeiro M.F., Reichel M.B., Gay J.A., D'Esposita F., Alexander R.A., Khaw P.T. 1999. Transforming growth factor- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 in vivo: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40: 1975-1982

Desmouliere A., Redard M., Darby I., Gabbiani G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*, 146, 1: 56-66

Freedberg I.M., Tomic-Canic M., Komine M., Blumenberg M. 2001. Keratins and the Keratinocyte Activation Cycle. *The Journal of Investigation Dermatology*, 116, 5: 633-40

G. S., Greenwell-Wild T., Horan M. A., Wahl S. M. in Ferguson M. W. 1999. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *The American Journal of Pathology*, 155, 4: 1137-1146

Gilliver S., Ashworth J., Mills S., Hardman M., Ashcroft G. 2006. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *Journal of Cell Science*, 119: 722-732

Gilliver S.C., Ashworth J.J., Aschroft G.S. 2007. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25, 1: 56-72

Goliger J.A., Paul D.L. 1995. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular Biology of the Cell*, 6, 11: 1491-501

Gosain A., DiPietro L.A. 2004. Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, 28, 3: 321-326

Grainger D.J., Mosedale D.E., Metcalfe J.C. 2000. TGF- $\beta$  in blood: a complex problem.  
*Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11, 1-2: 133-145

Hanley N.A., Ikeda Y., Luo X., Parker K.L. 2000. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for ovarian development and function. *Molecular and Cell Endocrinology*, 163: 27-32

Hantash B.M., Zhao L., Knowles J.A., Lorenz H.P. 2008. Adult and Fetal Wound Healing.  
*Frontiers in Bioscience*, 13: 51–61  
<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2011/969618/> (10. sept. 2012)

Ikeda Y., Shen W.H., Ingraham H.A., Parker K.L. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*, 8, 5: 654-62

Kane C.J., Hebda P.A., Mansbridge J.N., Hanawalt P.C. 1991. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor  $\beta$  1 expression during cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 148, 1: 157–73

Lala D.S., Rice D.A., Parker K.L. 1992. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Molecular Endocrinology*, 6, 8: 1249-1258

Legan M. 2005. Razvoj skletno-mišičnega sistema in kože. *Medicinski razgledi*, 44: 435-445

Li Y., Choi M., Cavey G. Daugherty J., Suino K., Kovach A., Bingham N.C., Kliever S.A., Xu H.E. 2005. Crystallographic identification and functional characterization of

phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1.  
*Molecular Cell*, 17, 4: 491-502

Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 4: 481-90

Majdic G., Young M., Gomez-Sanchez E., Anderson P., Szczepaniak L.S., Dobbins R.L., McGarry J.D., Parker K.L. 2002. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143, 2: 607-614

Martin P. 1997. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276, 5309: 75-81

Mathieu D., Linke J.C., Wattel F. 2006. Non-healing wounds. V: *Handbook on hyperbaric medicine*. Mathieu D. (ed.). Netherlands, Springer: 401-427

McClellan K.M., Parker K.L., Tobet S. 2006. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27, 2: 193-209

Meckmongkol T.T., Harmon R., McKeown-Longo P., Van De Water L. 2007. The fibronectin synergy site modulates TGF $\beta$ -dependent fibroblast contraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360, 4: 709–714

Meszaros A.J., Reichner J.S., Albina J.E. 2000. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *The Journal of Immunology*, 165, 1: 435-441

Monteiro-Riviere N.A. 1998. Integument. V: *Textbook of Veterinary Histology*. Dellman H. D., Eurell J. (eds.), 5th edition. Baltimore, Williams & Wilkins: 303-332

Morales D.E., McGowan K.A., Grant D.S., Maheshwari S., Bhartiya D., Cid M.C., Kleinman H.K., Schnaper H.W. 1995. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*, 91: 755-763

Mosser D.M., Edwards J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation.  
Nature Reviews Immunology, 8, 12: 958-969

Nemec A. 2009. Vpliv peroralne okužbe z bakterijo *Porphyromonas gingivalis* na  
sistemske raven dušikovega oksida pri miših. Doktorska disertacija. Ljubljana,  
Veterinarska fakulteta: 86 str.

Ninomiya Y., Okada M., Kotomura N., Suzuki K., Tsukiyama T., Niwa O. 1995. Genomic  
organization and isoforms of the mouse ELP gene. The Journal of Biochemistry, 118,  
2: 380-389

Park J.E., Barbul A. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing.  
The American Journal of Surgery, 187, 5A: 11S-16S

Parker K.L., Schimmer B.P. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine  
development and function. Endocrine Reviews, 18, 3: 361-377

Rappolee D.A., MarkD., Banda M.J., Werb Z. 1988. Wound macrophages express TGF- $\alpha$   
and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. Science, 241, 4866:  
708-12

Riedel K., Riedel F., Goessler U.R., Germann G., Sauerbier M. 2007. Tgf- $\beta$  antisense  
therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. Archives of  
Medical Research, 38, 1: 45–51

Roberts A.B., Sporn M.B., Assoian R.K., Smith J.M., Roche N.S., Wakefield L.M., Heine  
U.I., Liotta L.A., Falanga V., Kehrl J.H., Fauci A.S. 1986. Transforming growth factor  
type  $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen  
formation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 83, 12:  
4167-4171

Sadovsky Y., Crawford P.A., Woodson K.G., Polish J.A., Clements M.A., Tourtellotte L.M., Simbuker K., Milbrandt J. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proceedings of the National Academi of Sciences U S A*, 92: 10939-10943

Schmid P., Cox D., Bilbe G., McMaster G., Morrison C., Stahelin H., Luscher N., Seiler W. 1993. TGF- $\beta$  s and TGF- $\beta$  type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *The Journal of Pathology*, 171, 3: 191-197

Shah M., Foreman D.M., Ferguson M.W. 1995. Neutralisation of TGF- $\beta$  1 and TGF- $\beta$  2 or exogenous addition of TGF- $\beta$  3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Jornal of Cell Sciences*, 108, 3: 985–1002

Shi P.S., Efron D.T., Most D., Barbul A. 2001. The role of iNOS in wound healing. *Surgery*, 130, 2: 225-229

Singer A.J., Clark R. A. F. 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 10: 738-746

So T., Ito A., Sato T., Mori Y., Hirakawa S. 1992. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biology of Reproduction*, 46, 5: 772-778

Štrus B. 1996. Dušikov oksid i njegove funkcije. *Biochemia Medica*, 6, 1: 13-21

Tarnuzzer R.W., Schultz G.S. 1996. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration*, 4, 3: 321–325

Tsunawaki S., Sporn M., Ding A., Nathan C. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . *Nature*, 334, 6179: 260–262

Wang Z., Gao Z., Shi Y., Sun Y., Lin Z., Jiang H., Hou T., Wang Q., Yuan X., Zhu X., Wu H., Jin Y. 2007. Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *Journal of Plastic and Reconstructive Aesthetic Surgery*, 60, 11: 1193–1199

Werner S., Smola H., Liao X., Longaker M.T., Krieg T., Hofschneider P.H., Williams L.T. 1994. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*, 266, 5186: 819-822

Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Longaker M.T., Gurtner G.C., 2011. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2011/969618/> (10. sept. 2012)

Xu J., Clark R.A.F. 1996. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *The Journal of Cell Biology*, 132, 1/2: 239-249

Young B., Heath J.W. 2000. Wheater's Functional Histology. A text and colour atlas. 4th edition. Edinburgh, Churchill Livingstone: 413 str.

Zeng G., McCue H.M., Mastrangelo L., Millis A.J. 1996. Endogenous TGF- $\beta$  activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Experimental Cell Research*, 228, 2: 271–276

Zhao L., Bakke M., Hanley N.A., Majdic G., Stallings N.R., Jeyasuria P., Parker K.L. 2004. Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1. *Molecular and Cell Endocrinology*, 215, 1-2: 89-94

Zhao L., Bakke M., Parker K.L. 2001. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Molecular and Cell Endocrinology*, 185, 1-2: 27-32

Zorc M. 2010. Koža. V: Histologija. Učbenik. Petrovič D., Zorc M. (ur.). Ljubljana,  
Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo: 115-123

## ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Gregorju Majdiču, da mi je omogočil raziskavo, ki mi je prinesla vpogled v popolnoma nov svet – svet dela z laboratorijskimi živalmi. Izkušnje in znanja, ki sem jih pridobila ob tem so neprecenljiva. Zahvaljujem se Vam za vodenje, svetovanje in vso pomoč, ki sem je bila deležna med izdelavo diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Marku Kreftu za izredno hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se party labu ☺ (osebju laboratorija Centra za genomiko živali na Veterinarski fakulteti, da ne bo pomote) za vse čudovite urice preživete v laboratoriju in izven njega. Brez vsakega posameznika bi bilo delo drugačno. Takšno kot je bilo, je bilo čudovito.

Najlepša hvala Tomažu za uvajanje pri delu z miškami in v laboratoriju. Hvala za potrpljenje, izdatne razlage na moja vprašanja in vso pomoč pri delu.

Hvala tudi ženskemu delu: Katerini, Tanji, Nini, Jasmini in Neži za pogovore, nasvete in prijazno pomoč pri delu. Hvala vam za vzpodbudne besede pri pisanju diplomskega dela. Vaš pozitivizem mi je pomenil veliko.

Nataša, hvala za kakav....in vse kar je spadalo zraven... Posebno hvala, ker sem ti smela kuhati vodo. ☺

Luka, hvala za vse vzpodbudne besede pri opravljanju skupnih zadnjih izpitov.

Hvala vam sošolci in prijatelji, za čudovita študentska leta, ki smo jih preživeli skupaj. Za vso medsebojno pomoč na faksu in sproščena druženja v prostem času.

Hvala družini za vso pomoč tekom študija.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli pomagali pri nastanku tega diplomskega dela.

IN NAZADNJE HVALA TEBI JURE...KER SI...