

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Saša M. Vukelić

**Statini pospešuju zarastanje rana
blokirajući aktivaciju glukokortikoidnog
receptora farnezil pirofosfatom,
međuproizvodom u sintezi holesterola**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Saša M. Vukelić

**Statins improve wound healing through
inhibition of activation of the
glucocorticoid receptor by farnesyl
pirophosphate**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Mentor

Doc dr Svetlana Popadić
Medicinski fakultet u Beogradu

Komentor

Prof dr Marjana Tomić-Canić
Medicinski fakultet Majami Univerizteta

Članovi Komisije

Prof dr Ana Savić Radojević
Medicinski fakultet u Beogradu
Predsednik Komisije

Doc dr Snežana Minić
Medicinski fakultet u Beogradu

Prof dr Dejan Baskić
Medicinski fakultet u Kragujevcu

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se Doc. Dr Svetlani Popadić na mentorstvu, iskazanoj dobroj volji, strpljenju, velikom razumevanju i podršci na realizaciji ovog projekta.

Posebnu zahvalnost dugujem komentoru Prof. Dr Marijani Tomić-Canić u čijoj laboratoriji i uz čiji nadzor je realizovan ovaj rad. Pre svega hvala joj što je verovala u mene i omogućila mi da steknem iskustvo u radu sa najsavremenijim dostignućima i tehnikama iz oblasti imunologije i molekularne biologije. Dr Tomić-Canić me je vodila strpljivo kroz moje najbitnije, početne korake u nauci i celokupnom naučnom pristupu. Možda još važnije, uz Dr Marijanu Tomić-Canić i Dr Herberta Samuelsa naučio sam da iako ne znam svaki odgovor, uvek znam kako da postavim pitanje.

Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije Dr Oliveri Stojadinović, Dr Ireni Paštar, tehničarima Mr Konstantinosu Voutounisu i Mr Agati Križanovskoj koji su mi pomogli u savladavanju novih tehnika i izvođenju dela eksperimenata.

Specijalnu zahvalnost dugujem mojoj porodici na strpljenju, razumevanju i podršci tokom svih ovih godina. Zbog njih sav moj rad ima smisla.

Rad posvećujem svom ocu Milenku Vukeliću i ćerkama Sari i Sofiji.

Statini pospešuju zarastanje rana blokirajući aktivaciju glukokortikoidnog receptora farnezil pirofosfatom, međuproizvodom u sintezi holesterola

Saša M Vukelić

SAŽETAK

Uvod: Glukokortikoidni hormoni (GH) su mimo svog anti-inflamatornog dejstva i jedni od najpoznatijih inhibitora zarastanja rana. Nedavno je pokazano da farnezil pirofosfat (FPP), ključni međuprodukt mevalonatskog puta sinteze holesterola i farnezilacije proteina može delovati i kao agonista za nekoliko nuklearnih hormonskih receptora uključujući glukokortikoidni receptor (GR). Interesantno je da statini, lekovi koji se koriste u terapiji ateroskleroze, svoje dejstvo ostvaruju upravo inhibirajući ovaj sintetski put. Međutim, statini imaju i dodatne plejotropne efekte, koji se ostvaruju nezavisno od sniženja koncentracije holesterola u plazmi i značajno doprinose njihovom korisnom dejstvu u različitim bolestima. Jedan od dobro dokumentovanih plejotropnih efekata je poboljšana reparacija tkiva uključujući i zarastanje rana. Zanimljivo je da se upravo inhibicija farnezilacije signalnih molekula, usled sniženja nivo ćelijskog FPP-a, smatrala do sada ključnim mehanizmom kojim statini ostvaruju ove svoje dodatne efekte. Međutim otkriće da FPP može delovati kao ligand za GR otvara vrata za drugačiju interpretaciju mehanizma dejstva plejotropnih efekata statina i novu primenu ovih lekova.

Ciljevi: U ovoj disertaciji dokazivano je postojanje novog mehanizma dejstva statina, kojim oni mogu pospešiti zarastanje rana. Ovaj efekat se zasniva na sniženju koncentracije endogenog FPP-a u ćelijama kože, putem inhibicije HMG-CoA reduktaze. Osnovna hipoteza je da, s obzirom da statini svoje dejstvo ostvaruju upravo inhibirajući ovaj sintetski put, modifikuju FPP-GR signalizaciju i tako učestvuju u stimulaciji zarastanje rana. Prvi cilj istraživanja je bio da se dokaže da FPP deluje kao specifični agonista za glukokortikoidni receptor, dovodeći do aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta i stimulacije transkripcije gena. Potom je ispitatano da li povećanje nivoa endogenog FPP-a putem inhibicije enzima

skvalen sintetaze i farnezil transferaze ima isti efekat na aktivaciju glukokortikoidnog receptora kao i dodavanje egzogenog FPP-a. U cilju testiranja funkcionalnog značaja ovog rezultata ispitano je dejstvo FPP-a na procese u zarastanju rana *in vitro* i *ex vivo*. Finalni korak u dokazivanju postavljene hipoteze je bilo ispitivanje efekata statina, na aktivaciju GR i dinamiku zarastanja akutne rane.

Materijal i metode: U cilju ispitivanja efekata FPP-a na različite faze aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta korišćene su tehnike imunofluorescencije, imunoblota, esej imunoprecipitacije hromatina i tranzijentne transfekcije. U cilju testiranja funkcionalnog značaja ovih rezultata korišćene su tehnike mikronizova kojima su upoređivani transkripcioni profili u keratinocitima *in vitro* nakon tretmana sa GH i FPP. U daljem istraživanju korišćene su funkcionalne studije poput testa migracije keratinocita i *ex vivo* model epitelizacije rane, za procenu učinka FPP-a i statina na zarastanje akutnih rana.

Rezultati: Pokazano je da egzogeno dodati FPP može da aktivira glukokortikoidni signalni put delujući kao agonista GR, nezavisno od prisustva GH *in vitro* i *ex vivo*. Identičan rezultat dobili smo povišenjem nivoa endogenog FPP-a u ćelijama, inhibicijom enzima skvalen sintetaze zaragozinskom kiselinom (ZGA). U cilju testiranja funkcionalnog značaja ovog rezultata, korišćene su tehnike mikronizova kojima su upoređivani transkripcioni profili u keratinocitima *in vitro* nakon tretmana sa GH i FPP. Analiza genskih čipova pokazala je značajno, ali ne i potpuno, preklapanje između gena regulisanih glukokortikoidima i FPP-om. Ovaj rezultat pokazuje da FPP nije samo putativni ligand, već i agonista GR. U daljem istraživanju korišćeni su funkcionalni testovi za procenu učinka FPP na zarastanje rana. I FPP i ZGA su inhibirali migraciju keratinocita i epitelizaciju *in vitro* i *ex vivo*. Ovi efekti su proizilazili iz aktivacije GR i bili su nezavisni od procesa farnezilacije proteina. Pokazano je da je inhibicija zarastanja rana uzrokovana FPP, delom posledica represije keratina 6. Nadalje, pokazano je da mevastatin delujući kao inhibitor enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-reduktaze, ne samo da neutrališe efekat ZGA na aktivaciju GR i inhibiciju epitelizacije, već i sam stimuliše epitelizaciju akutnih rana snižavajući nivo endogenog FPP.

Zaključci: U ovoj studiji pokazano je da FPP, međuproizvod u biosintezi holesterola, može da inhibira epitelizaciju i zarastanje rana delujući kao agonista glukokortikoidnog receptora. Dalje, pokazano je da statini promovišu zarastanje rana novootkrivenim mehanizmom dejstva, koje se upravo zasniva na inhibiciji mevalonatskog sintetskog puta i sledstvenom smanjenju koncentracije endogenog FPP i njegovog dejstva na GR. Otkriće mehanizma dejstva kojim FPP može da inhibira migraciju keratinocita i epitelizaciju, predstavlja novi pomak u razumevanju biološke uloge steroidnih hormona i njihovih receptora, jer u ovom slučaju funkcionalna aktivacija glukokortikoidnog signalnog puta ne zavisi od prisustva GH i posledica je dejstva endogeno prisutnog metabolita koji ne pripada steroidnoj familiji molekula. Ovi rezultati pružaju uvid u do sada nepoznate mehanizme regulacije zarastanja rana i otvaraju mogućnost novih terapijskih pristupa u korišćenju statina kao lekova u terapiji, kako akutnih tako i hroničnih rana.

Ključne reči: Glukokortikoidi, farnezil pirofosfat, statini, zarastanje rana

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Dermatovenereologija

UDK:

Statins improve wound healing through inhibition of activation of the glucocorticoid receptor by farnesyl pyrophosphate

Saša M Vukelić

ABSTRACT

Introduction: Glucocorticoid hormones, in addition to their anti-inflammatory effect, are well known inhibitors of wound healing. Recent studies have shown that farnesyl pyrophosphate (FPP), a key intermediate in the mevalonate pathway of the cholesterol synthesis and protein farnesylation, can act as an agonist for several nuclear hormone receptors including glucocorticoid receptor (GR). Interestingly, mechanism of action of statins, drugs used in therapy of atherosclerosis, is based on inhibition of mevalonath pathway. However, statins might exert also additional pleiotropic, noncholesterol lowering effects which significantly contribute to their therapeutic action. One of the well known pleiotropic effects of the statins is stimulation of tissue repair, including wound healing. Interestingly, mechanism of pleiotropic effects is traditionally explained by statin mediated inhibition of the farnesylation of signaling molecules. By inhibiting the enzyme HMG-CoA reductase, statins prevent the synthesis of substrate for reaction, farnesylpyrophosphate. Given that is recently shown that FPP can act as a ligand for GR, it is not surprising that statins might have additional mechanisms of action beyond inhibition of the farnesylation. Better understanding of this mechanism may contribute to novel therapeutic roles for this drugs.

Objectives: In this study we are exploring new mechanism of action of statins that can contribute to improvement of wound healing. This effect is based on decreasing the levels of endogenous FPP in keratinocytes by inhibition of the HMG-CoA reductase. We postulate that statins, acting as an inhibitors of mevalonate pathway, stimulate wound healing through modulation of FPP-GR signal. The first step in in our study is to prove that the exogenous FPP, acting as an agonist for GR, can activate the glucocorticoid signaling pathway and regulate the transcription of the target genes. Second, will explore the effects of ZGA and B581, which both can increase the level of endogenous FPP, on activation of

glucocorticoid receptors. ZGA and B581 accomplish their effects through inhibition of squalene synthetase and farnesyl transferase respectively. To test the functional significance of this findings, we will explore effects of FPP on processes crucial for wound healing such as inflammation, migration and epithelization. Finally, to prove our hypothesis will test effects of statins on GR activation and acute wound healing.

Materials and methods: To detect the effect of FPP on various stages of glucocorticoid signaling pathway activation, we have used molecular biology techniques such as: immunofluorescence, Western blot, chromatin immunoprecipitation assay and transient transfection. To test the functional significance of this finding we utilized a large scale microarray to compare the specific transcriptional effects of DEX and FPP in keratinocytes *in vivo*. Finally, we used functional studies: scratch test and humans skin organ culture wound model to evaluate the effects of FPP and statins on the acute wound healing.

Results: In this study we show that elevation of levels of endogenous FPP by the squalene synthetase inhibitor zaragozic acid A (ZGA) or addition of FPP to the cell culture medium results in activation and nuclear translocation of the GR, a known wound healing inhibitor. To test the functional significance of this finding we utilized a large scale microarray to compare the specific transcriptional effects of DEX and FPP on keratinocytes *in vitro*. Microarray analyses showed significant, but not complete, overlapping between genes regulated by glucocorticoids and FPP. This result indicated that FPP is not just a putative ligand, but also an agonist for GR. Both GC and FPP regulate genes important for inflammation, cytoskeletal rearrangements and extracellular matrix remodeling in the same fashion. We used functional studies to evaluate the effects of FPP on wound healing. Both FPP and ZGA inhibited keratinocyte migration and epithelialization *in vitro* and *ex vivo*. These effects were independent of farnesylation and indicate that modulation of FPP levels in skin may be beneficial for wound healing. We conclude that FPP inhibits wound healing by acting as a GR agonist. FPP inhibition of keratinocyte migration and wound healing proceeds, in part, by repression of the keratin 6 gene. Furthermore, we show that the HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin, which blocks FPP formation, not only promotes epithelialization in acute wounds

but also reverses the effect of ZGA on activation of the GR and inhibition of epithelialization.

Conclusion: In the current study we show that farnesyl pyrophosphate, a key intermediate in the mevalonate pathway and cholesterol synthesis can inhibit epithelialization and wound healing, acting as an agonist for a glucocorticoid receptor. Conversely, we show that statins promote wound healing through novel mechanism of action, based upon the inhibition of the FPP synthesis and its effect on GR. The finding that FPP inhibits keratinocyte migration and epithelialization introduces a new paradigm shift, because the activation of GR does not depend on the presence of glucocorticoids. These results provide insight in novel mechanisms of inhibition of wound healing and open new therapeutic approaches in utilizing statins as drugs in therapy of acute and chronic wounds.

Keywords: Glucocorticoid, farnesyl pyrophosphate, statins, wound healing

Scientific area: Medicine

Specialised scientific area: Dermatovenereology

UDK:

1. UVOD	1
1.1. FAZE ZARASTANJA AKUTNIH RANA	1
1.2. HRONIČNE RANE KAO POSLEDICA POREMEĆAJA ZARASTANJA	3
1.3. INHIBITORNI SIGNALI U ZARASTANJU AKUTNIH RANA	4
1.4. GLUKOKORTIKOIDNI HORMONI KAO INHIBITORI ZARASTANJA RANE	5
1.5. SIGNALNI MEHANIZAM GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA	6
1.6. FARNEZILPIROFOSFAT (FPP) I MEVALONATNI BIOSINTETSKI PUT	8
1.7. FPP KAO LIGAND ZA NUKLEARNE RECEPTORE	9
1.8. FPP I PLEJOTROPNI EFEKTI STATINA	11
1.9. STATINI I ZARASTANJE RANA	11
2. CILJEVI	13
3. MATERIJAL I METODE	14
3.1. HUMANI UZORCI I EKSPERIMENTI ZARASTANJA RANE	14
3.2. ĆELIJSKA KULTURA	14
3.3. PRIPREMA KERATINOCITA ZA IMUNOCITOHEMIJSKE ANALIZE	15
3.4. HISTOPATOLOGIJA I IMUNOCITOHEMIJA	15
3.5. <i>IN VITRO</i> MODEL RANE, TEST MIGRACIJE KERATINOCITA (ENGL. SCRATCH TEST)	16
3.6. IZOLACIJA PROTEINA I IMUNOBLLOT	17
3.7. ESEJ IMUNOPRECIPITACIJE HROMATINA	18
3.8. TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA I PLAZMIDI	19
3.9. IZOLACIJA RNK I ODREĐIVANJE TRANSKRIPCIONIH PROFILA (DNK MIKROČIP)	20
3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	21
4. REZULTATI	22
4.1. FPP AKTIVIRA GR U PRIMARNIM HUMANIM KERATINOCITIMA	22
4.2. GR AKTIVIRAN FPP-OM MENJA EKSPRESIJU GENA VEZUJUĆI SE ZA ELEMENTE GLUKOKORTIKOIDNOG ODGOVORA U OKVIRU PROMOTORA	25
4.3. FPP I DEX IMAJU SLIČAN TRANSKRIPCIONI PROFIL	30
4.4. FPP INHIBIRA INTERFERON γ SIGNALNI PUT	32
4.5. FPP INHIBIRA MIGRACIJU KERATINOCITA	34
4.6. FPP INHIBIRA ZARASTANJE RANE <i>EX VIVO</i>	38
4.7. MEVASTATIN POSPEŠUJE ZARASTANJE RANE <i>EX VIVO</i>	41
5. DISKUSIJA	44
6. ZAKLJUČCI	52
7. LITERATURA	53

1. UVOD

1.1. Faze zarastanja akutnih rana

Akutne rane predstavljaju izuzetno značajan zdravstveni problem, pri čemu se samo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) godišnje medicinski zbrine preko 11 miliona ljudi sa traumatskim ranama [1]. Zarastanje rana je kompleksan biološki proces koji se odvija pod kontrolom mreže signalnih puteva [2], koji koordinišu različite biološke procese poput hemostaze, zapaljenja, ćelijske migracije, proliferacije i sinteze ekstracelularnog matriksa u cilju obavljanja zaštitne funkcije kože [3]. Akutno zarastanje rane je pod kontrolom biološkog programa, koji podrazumeva preciznu koordinaciju različitih tipova ćelija u procesu koji možemo podeliti na četiri faze [4]: hemostaza, akutna inflamacija, proliferacija i remodelovanje [5]. Iako se različite faze zarastanja rane delimično vremenski i prostorno preklapaju, za uspešno ostvarenje programa neophodno je njihovo sukcesivno smenjivanje i terminacija procesa koji predstavljaju suštinu prethodne faze [6, 7]. U pitanju je precizno regulisan proces, pri čemu poremećaji bilo koje faze ovog procesa mogu izazvati dalje oštećenje tkiva i poremećaje zarastanja poput hroničnih rana i keloida [8-10]. Na primer, bitno je vreme trajanja faze inflamacije, jer iako su prozapaljenski signali važni na početku zarastanja, mogu dovesti do razvoja hroničnih rana ukoliko nisu isključeni u kasnijem toku [9, 11].

Prva faza u zarastanju rana je faza hemostaze. Prilikom povrede kože dolazi do oštećenja krvnih sudova, što ima za posledicu aktivaciju trombocita, koji grupišući se i međusobno se povezujući formiraju čep na mestu povrede [12]. Istovremeno dolazi i do aktiviranja kaskade koagulacije koji ima za posledicu formiranje krvnog ugruška i zaustavljanja krvarenja. Aktivirani trombociti sekretuju veliku količinu proinflamatornih supstanci poput faktora rasta trombocita (PDGF, *engl.* Platelet Derived Growth Factor), interleukina 1 (IL1) i faktore transformacije rasta α i β (TGF- α , TGF- β , *engl.* Transforming Growth Factor), koji privlače inflamatorne ćelije poput leukocita, neutrofila i makrofaga pokrećući inflamatornu fazu akutnog zarastanja rana [13]. Međutim, nakon

povrede kože pored trombocita i epidermalni keratinociti (*engl.* Human Epidermal Keratinocyte, HEK) predstavljaju jedne od prvih ćelija koje reaguju na povredu [14-16], oslobađajući prethodno sintetisan i deponovani interleukin-1 (IL-1) [15]. U ovom kontekstu, IL-1 ima dvojaku autokrinu i parakrinu funkciju: aktivira keratinocite i deluje na okolne ćelije i tkiva. IL-1 potom pokreće zapaljenjsku kaskadu koju karakteriše oslobađanje dodatnih signalnih molekula kao što su: faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor, TNF), IL-6, monocitni hemotaktički protein 1 (*engl.* Monocyte Chemotactic Protein, MCP-1), faktor rasta sličan insulinu 1 (*engl.* Insulin Like Growth Factor, IGF-1) i interferon γ (IFN- γ) [2, 17]. Ova signalna kaskada privlači inflamatorne ćelije, koje produkuju dodatne zapaljenske medijatore i faktore rasta, što ima za posledicu pojačavanje inflamatorne faze procesa zarastanja rane. Međutim, istovremeno kao odgovor na ove signale, aktivirani keratinociti i fibroblasti počinju da migiraju i proliferišu [14, 15, 18], što označava i početak faze proliferacije. Izuzetno važna komponenta faze proliferacije je epitelizacija, koja se često koristi kao parametar za definisanje uspešnosti zarastanja rana [19]. U toku ove faze inflamatorne ćelije i keratinociti produkuju faktore rasta poput epidermalnog faktora rasta (*engl.* Epidermal Growth Factor, EGF), PDGF, keratinocitnog faktora rasta (*engl.* Keratinocyte Growth Factor, KGF) i fibroblastnog faktora rasta (*engl.* Fibroblast Growth Factor, FGF) [20, 21] koji delujući autokrino i parakrino stimulišu proliferaciju i migraciju keratinocita i fibroblasta. Fibroblasti popunjavaju dno rane i zajedno sa proliferišućim kapilarima formiraju granulaciono tkivo, dok keratinociti procesom epitelizacije formiraju neoepidermis. Da bi uspešno migirali, aktivirani keratinociti menjaju svoju citoskeletnu strukturu. Smanjuje se sadržaj keratina (K) 1 i 10 tipičnih za diferencirane keratinocite, dok se povećava proizvodnja K6, K16 i K17, koji predstavljaju rane markere epitelizacije rane i za koje se pretpostavlja da povećavaju viskoelasticitet ćelija što je neophodno za uspešnu migraciju [22]. Takođe dolazi i do promene u strukturi integrina i proizvodnje matriks metaloproteinaza (MMP), što omogućava ćelijama migraciju kroz novosintetisani ekstracelularni matriks [23-25].

Završnu fazu u zarastanju akutnih rana predstavlja faza remodelovanja. Kad je jednom postignuta restauracije epidermalnog integriteta uspešnom

reepitelizacijom, fibroblasti, miofibroblasti i keratinociti proizvode različite komponente privremenog ekstracelularnog matriksa poput kolagena III, fibrina i fibronektina [26]. Ovaj inicijalni provizorni matriks potom u toku faze remodelovanja biva zamenjen zrelim matriksom u kome dominira kolagen I i potom dolazi do kontrakcije rane zahvaljujući povećanju sadržaja molekula poput glatko mišićnog aktina i miozina u ćelijama [27]. U završnoj fazi uspešne reparacije tkiva dolazi do apoptoze ćelija poput miofibroblasta [28, 29] i deaktivacije i diferencijacije keratinocita [30]. Poremećaj ovog procesa može dovesti do razvoja patoloških struktura poput keloida i hipertrofičnih ožiljaka [31]. Uspešan završetak akutnog zarastanja rane omogućava ponovno uspostavljanje barijerne funkcije kože, kao primarnog odbrambenog sistema u odnosu na spoljnu sredinu [32, 33].

1.2. Hronične rane kao posledica poremećaja zarastanja

Hronične rane predstavljaju izuzetno značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta. Procenjuje se da u SAD 6 miliona, a u EU 4 miliona ljudi boluje od hroničnih rana [34]. Ovako visoka prevalencija oboljenja ima za posledicu izuzetno velike troškove lečenja i značajno finansijsko opterećenje za zdravstveni sistem, koje se procenjuju na 20 milijardi dolara samo u SAD [6, 35]. Incidencija hroničnih ulkusa koji nastaju kao posledica ishemije, dijabetesa, venske staze ili protraovanog pritiska, dostigla je epidemijsku stopu posebno u populacijama podložnim ovakvim poremećajima, kao što su stare osobe, oboleli od periferne vaskularne bolesti i dijabetesa, paraplegičari i bolesnici sa degenerativnim neurološkim oboljenjima [4]. Trenutno postojeće metode lečenja nisu dovoljno uspešne u kako pogledu prevencije tako i izlečenja. Iako podaci značajno variraju u zavisnosti of studije, procenjuje se da se uspešno zatvaranje hroničnih rana postiže u samo oko 50% slučajeva nakon 24 nedelje tradicionalnog tretmana [36]. Nepotpuno razumevanje kako molekularnih mehanizama koji regulišu zarastanje akutnih rana, tako i njihovog poremećaja u hroničnim ranama, ima za posledicu nedostatak adekvatne terapije, dramatično povećanje incidence amputacije ekstremiteta, kao i povećanje stope mortaliteta [5].

Hronični ulkusi u molekularno-biološkom smislu nastaju kao posledica poremećaja normalnog procesa zarastanja i karakteriše ih istovremeno prisustvo pojedinih elemenata svih faza zarastanja akutne rane. Recimo dok je aktiviran, proliferišući fenotip keratinocita značajan u ranim fazama zarastanja akutnih rana, njihova deaktivacije i diferencijacija je neophodna za uspešno okončanje procesa i ponovno uspostavljanje barijerne funkcije kože. Ovaj primer ukazuje na značaj fine regulacije stimulatora i inhibitora različitih bioloških procesa tokom zarastanja rane. Tipične biološke karakteristike hroničnih rana predstavljaju: protrahovana, autopotencirajuća, hronična inflamacija [37, 38]; inhibicija epitelizacije usled hiperproliferativnog statusa, poremećaja diferencijacije i motiliteta keratinocita [37, 39], zatim pojava senesentnih fibroblasta i poremećaj sinteze i remodelovanja ekstracelularnog matriksa [40]; kao i poremećaji angiogeneze i regrutovanja matičnih ćelija [41-43].

1.3. Inhibitorni signali u zarastanju akutnih rana

Uspešna reparacija nakon povrede tkiva zahteva prvo rezoluciju inflamacije tokom faze proliferacije, a potom i tranziciju epidermalnih keratiocita od aktiviranog ka diferenciranom fenotipu tokom faze remodelovanja. Hronična inflamacija i hiperproliferativni fenotip keratinocita su među ključnim karakteristikama nezarastajućih hroničnih rana [37, 38, 44]. Inhibicija ovih procesa je neophodan korak u uspešnom zarastanju akutnih rana. Dok su prozapaljenski i aktivacioni signalni molekuli poput IL-1, IL-6, IFN- γ ili TNF produkovani od strane keratinocita ili makrofaga dobro poznati, relativno malo se zna o endogenim inhibitornim epidermalnim signalima koji kontrolišu deaktivaciju keratinocita i prigušivanje inflamatornog odgovora. U toku procesa zarastanja rane dolazi do tranzicije makrofaga od proinflamatornog ka reparativnom fenotipu koji karakteriše sekrecija IGF-1, IL-10, IL-1 receptor antagoniste, TGF- β [45]. U novijoj literaturi navodi se mogućnost da i lokalna produkcija glukokortikoidnih hormona (*engl.* Glucocorticoid Hormons, GH) predstavlja značajnu komponentu ove negativne povratne sprege [46-49]. Naravno slično ekscesu inflamatornih signala i preterana aktivnost inhibitornih molekularnih signalnih puteva može imati za posledicu poremećaj zarastanja rane. U tom kontekstu interesantan je nalaz da

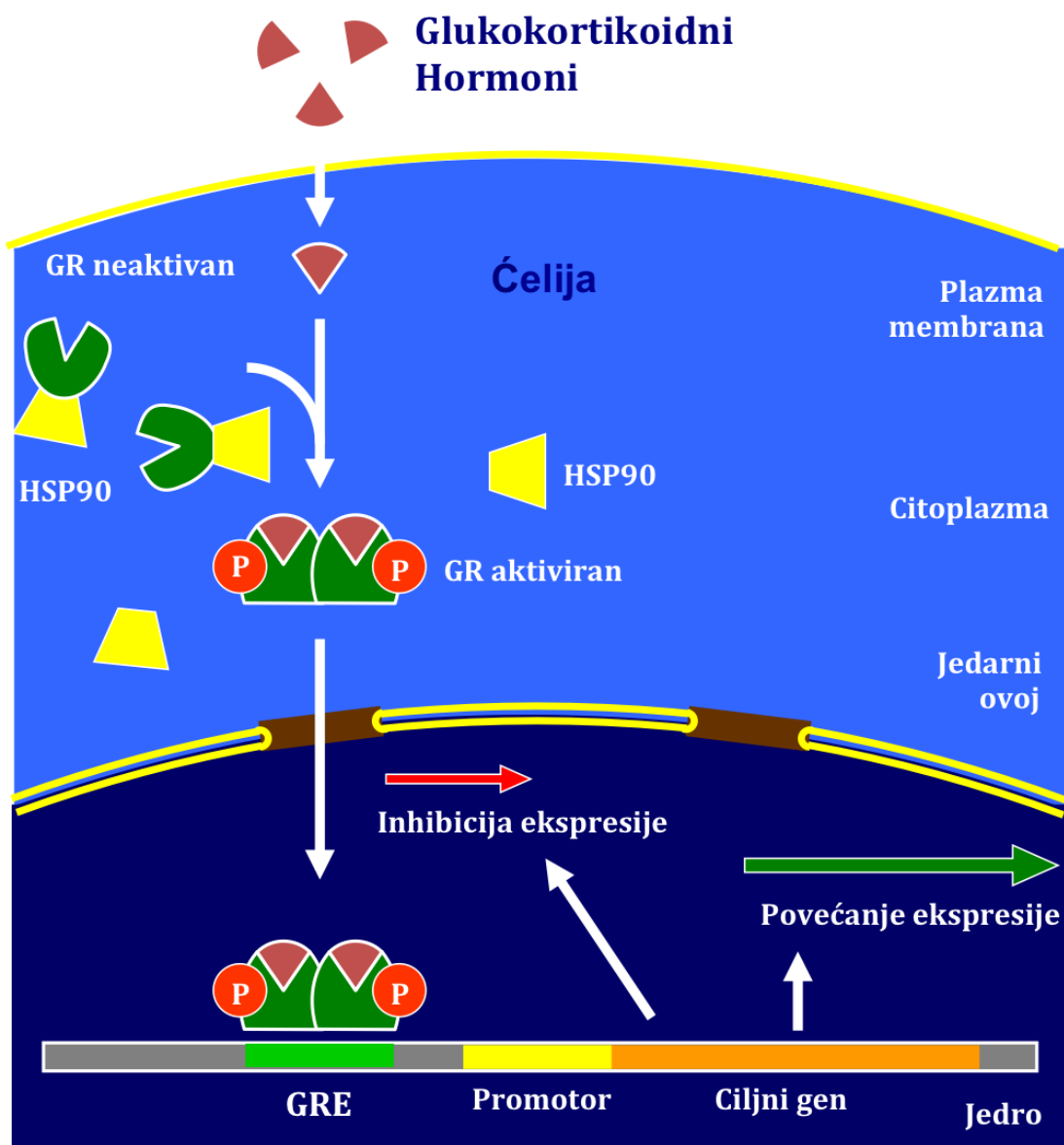
keratinociti mogu imati značajnu imunsku i regulatornu ulogu [15, 50, 51], na koju inhibitorno deluju lokalno i sistemski sintetisani glukokortikoidi [19, 47]. Pored kortizola, nedavno je pokazano da postoje i drugi endogeni ligandi za glukokortikoidni receptor, poput farnezil-pirofosfata (FPP), koji potencijalno mogu imati značajnu ulogu u regulaciji zarastanja akutnih i razvoju hroničnih rana [52-54].

1.4. *Glukokortikoidni hormoni kao inhibitori zarastanja rane*

Glukokortikoidni hormoni su poznati kao klasični inhibitori zarastanja rana [55-57]. Njihovo negativno dejstvo na zarastanje rana je opisano prvi put ubrzo nakon njihovog uvođenja u terapiju reumatoidnog artritisa 1949. godine [58]. GH deluju negativno na sve faze zarastanja rane inflamaciju, proliferaciju i remodelovanje [7, 47]. U prethodnim publikacijama identifikovali smo kompleksni mehanizam inhibicije epitelizacije i zarastanja rane posredovane glukokortikoidima. Pokazali smo da se supresija ranih gena odgovornih za zarastanje rane poput keratina K6 i K16 ostvaruje posredstvom jedinstvenog mehanizma koji uključuje β -katenin kao korepresor [7, 12, 59, 60]. Dalje, dokazali smo da GH mogu da inhibiraju ekspresiju gena značajnih za normalno funkcionisanje EGF, IFN- γ i TNF signalnih puteva [7, 60]. Glukokortikoidni hormoni su produkti korteksa nadbubrežne žlezde, koji je odgovoran za produkciju steroidnih hormona uključujući pored GH, i mineralokortikoide i polne hormone. Odrasle osobe proizvode oko 20 μ g kortizola dnevno sa naglašenim cirkadijalnim ritmom. Nivo u plazmi varira od 5-25 μ g/dL, ali je samo slobodna frakcija fiziološki aktivna, pri čemu je više od 95% kortizola u plazmi neaktivno i reverzibilno vezano za cirkulišuće proteine [61, 62]. Međutim, pored sistemske nedavno je pokazano da postoji i lokalna sinteza GH u koži, koja može uticati na dinamiku zarastanja rana i razvoj hroničnih ulkusa [19, 52, 62, 63]. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da lokalna regulacija GH signalnog puta može imati značajnu ulogu u fiziologiji i patologiji rana.

1.5. Signalni mehanizam glukokortikoidnih hormona

Signalni mehanizam kojim lokalno ili sistemski sintetisani glukokortikoidi ostvaruju svoja dejstva je sličan drugim hormonima koji deluju posredstvom nuklearnih receptora [64]. U odsustvu agoniste glukokortikoidni receptor (GR) je lokalizovan mahom u citoplazmi u obliku monomera u kompleksu sa molekulima poput proteina toplotnog stresa 90 (*engl.* heat shock protein, HSP 90). Po vezivanju GH za receptor, on se homodimerizuje i podleže specifičnoj fosforilaciji na serinu 211 (GR-P). Fosforilacija na serinu 211 menja konformaciju receptora, što mu omogućava da se veže za specifične DNK sekvence na hromozomima i utiče na transkripciju gena. Interesantno je da je prethodno pokazano da je transkripciona aktivnost GR u direktnoj korelaciji sa stepenom fosforilacije receptora na serinu 211, što ukazuje da ova postranslaciona modifikacije predstavlja biomarker za aktivirani glukokortikoidni receptor *in vivo* [65, 66]. Aktivirani GR potom prelazi u jedro i vezuje se za elemente glukokortikoidnog odgovora (GRE) u okviru regulatornog regiona ciljnih gena [66-68]. GRE predstavljaju specifičnu sekvencu DNK koja omogućava vezivanje aktiviranog glukokortikoidnog receptora. Po vezivanju za DNK aktivirani GR regrutuje različite korepresore i koaktivatore uz čiju pomoć menja u pozitivnom ili negativnom smislu ekspresiju velikog broja različitih gena, pri čemu se ovi procesi označavaju kao transaktivacija i transrepresija [68-70].



Prilog 1. Shema glukokortikoidnog signalnog puta

Dodatno, pored direktne transrepresije gena kao posledice vezivanja aktiviranog GR za takozvane negativne GRE i regrutovanja korepresora, postoji i indirektna koja se zasniva na vezivanju aktiviranog glukokortikoidnog receptora za druge transkripcione faktore poput NF- κ B, sprečavajući njihov efekat na kontrolu ekspresije gena koju normalno obavljaju [70, 71].

Pored ovog klasičnog genomskog signalnog puta koji se zasniva na vezivanju agoniste za receptor lokalizovan u citoplazmi, nedavno je opisano da

postoji i membranska frakcija GR [72] koja po vezivanju liganda može da aktivira i brze negenomske nishodne signalne puteve nezavisno od promene u transkripciji gena [71]. Jedan od ovih negenomskih mehanizama podrazumeva aktivaciju nereceptoske tirozin kinaze c-src po vezivanju hormona za receptor i sledstvenu promenu u aktivnosti signalnih molekula poput ekstracelularnim signalom regulisanih kinaza ili mitogen aktiviranih protein kinaza [73].

1.6. Farnezilpirofosfat (FPP) i mevalonatni biosintetski put

U kontekstu metabolizma, farnezil-pirofosfat je intermedijer, koji koji predstavlja biosintetsku tačku račvanja u mevalonatnom sintetskom putu. Zbog važnosti sterola u formiranju epitelnih barijera, epiderm je važno mesto biosinteze holesterola, pri čemu mevalonatni put ima centralnu ulogu u ovom procesu [61, 74].

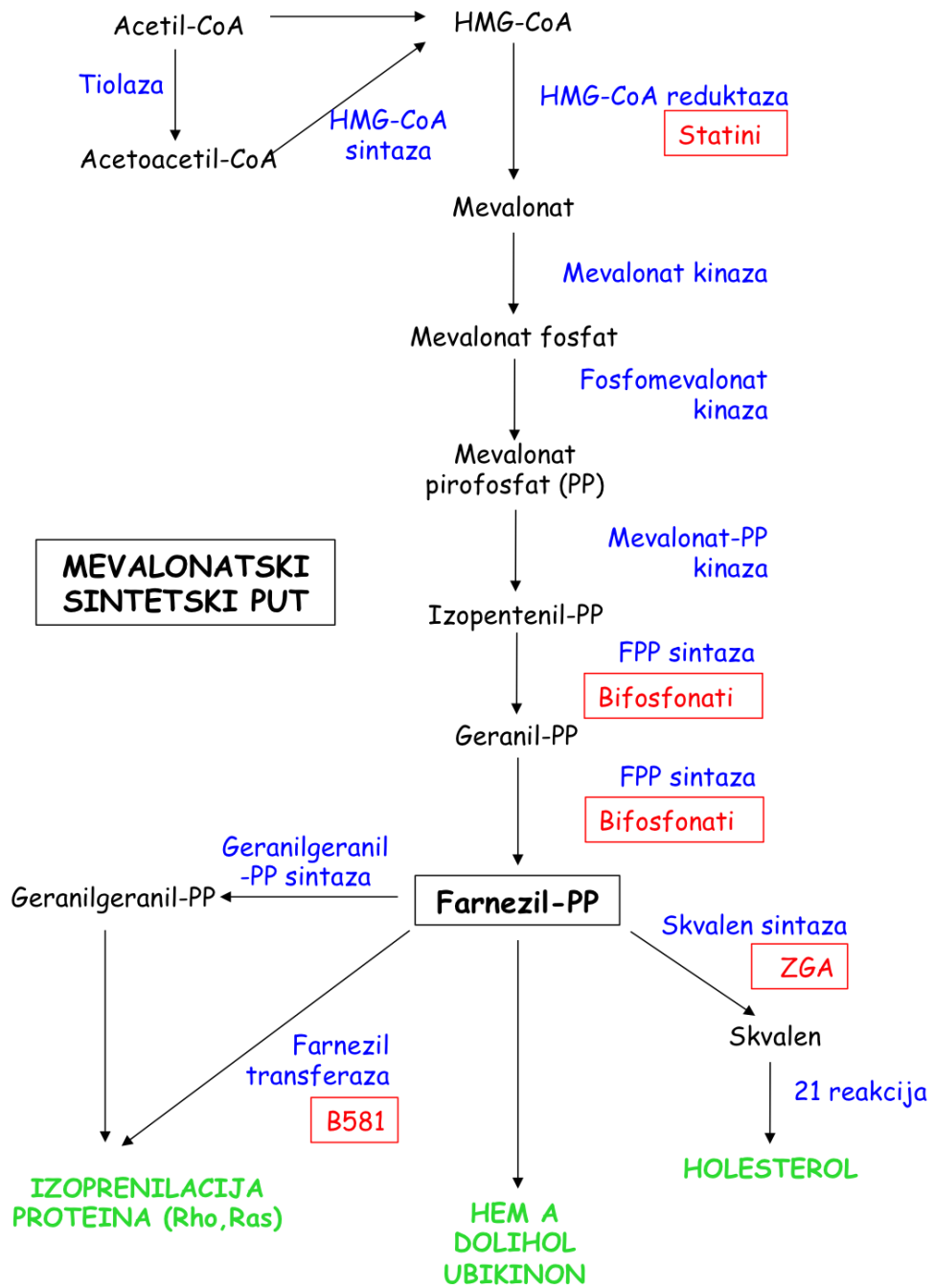
Ovaj put podrazumeva formiranje mevalonata redukcijom 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A CoA (HMG-CoA) pomoću HMG-CoA reduktaze [75] (ključni enzim sinteze holesterola), od koga zatim posredstvom procesa fosforilacije i dekarboksilacije dobijamo izopentenil-pirofosfat (IPP), osnovna jedinicu građe izoprenoida. Fuzijom tri molekula IPP, koju katalizuje enzim farnezil-pirofosfat sintaza (FPP sintaza) nastaje geranil-pirofosfat. Fuzijom geranil-pirofosfata sa još jednim molekulom IPP pod dejstvom FPP sintaze, nastaje farnezil-pirofosfat. Interesantno je da statini, lekovi koji se koriste u terapiji ateroskleroze, i bifosfonati, lekovi koji se koriste u terapiji osteoporoze, svoje dejstvo ostvaruju upravo inhibirajući ovaj sintetski put. Pri čemu statini deluju na HMG-CoA reduktazu [76], a bifosfonati na FPP sintazu [77]. Posledično, inhibicija HMG-CoA reduktaze statinima snižava nivo FPP u ćelijama. Sam FPP ima kao biosintetska tačka račvanja višestruku sudbinu: sinteza holesterola, sinteza dugolančanih izoprenoida (dolihol, ubikinon, hem A, geranilgeranil-pirofosfat) i farnezilacija/izoprenilacija proteina. Skvalen sintaza katalizuje kondenzaciju dva FPP molekula pri čemu nastaje skvalen, prvi korak u biosintezi holesterola. Inhibicija enzima skvalen sintaze zaragozinskom kiselinom (ZGA) dovodi do povećanja ćelijske koncentracije endogenog FPP [78]. FPP može da služi i kao

supstrat za enzim farnezil transferazu (FT), koji katalizuje farnezilaciju/izoprenilaciju različitih proteina.

Farnezilacije je posttranslaciona modifikacija koja se sastoji iz dodavanja izoprenoidne grupe na karboksi terminalni cistein [79]. Ova modifikacija omogućava pravilnu subcelularnu lokalizaciju određenih proteina, uključujući male GTP-vezujuće proteine kao što su Rho, Ras, i Rac [80], utičući tako na njihovu funkciju. Ovi molekuli imaju ključnu ulogu u prenosu signala u više signalnih puteva. Zbog toga, blokada farnezilacije dovodi do poremećaja funkcije većeg broja signalnih puteva. Enzim farnezil transferazu moguće je blokirati inhibitorom B581 a posledica je malo povećanje FPP u ćelijama [78].

1.7. FPP kao ligand za nuklearne receptore

Pored svoje uloge prekursora u sintezi važnih molekula poput holesterola, dugolančanih izoprenoida i farnezilacije proteina, poznato je da FPP može da deluje i kao ligand za pojedine receptore kao što su farnezoid X receptor [81], ali i više nuklearnih hormonskih receptora. Nedavno, Das i sar. su pokazali da FPP deluje kao funkcionalni ligand za estrogene, tiroidni i glukokortikoidni receptor [52, 53]. Ova studija je međutim bila ograničena na analizu efekta aktivacije Gal4-GR-LBD konstrukta nakon tranzijentne transfekcije, što otežava translaciju ovog rezultata na *in vivo* sistem, ali je ipak ukazala na mogućnost da postoje i drugi endogeni molekuli pored steroidnih hormona koji mogu da aktiviraju GR. Gal4-GR-LBD konstrukt koji je korišćen u ovim eksperimentima kodira fuzioni protein sadrži ligand vezujući domen (engl. Ligand Binding Domain LBD) glukokortikoidnog receptora vezan za GAL4 DNK vezujući domen. Ovakav konstrukt omogućava indirektno merenje aktivnosti potencijalnog liganda na aktivaciju transkripcije kroz glukokortikoidni receptor pomoću luciferaznog eseja [16].



Prilog 2. Shema mevalonatnog sintetskog puta

Funkcionalni značaj ovog dejstva FPP-a je međutim za sada nepoznat, iako ovaj rezultat otvara vrata za bolje razumevanje kako biološke uloge GH signalnog puta tako i za novu kliničku primenu i bolje razumevanje dejstva lekova čiji se

mehanizam zasniva na inhibiciji mevalonatnog sintetskog puta poput statina i bifosfonata.

1.8. FPP i plejotropni efekti statina

Tradicionalni mehanizam dejstva statina zasniva se na inhibiciji sinteze holesterola u jetri, sa posledičnim povećanjem katabolizma lipoproteina veoma male gustine (LDL) usled povećane ekspresije LDL receptora. Ovaj efekat statina dovodi do sniženja koncentracije LDL holesterola u plazmi [82], što se smatra osnovom njihovog terapijskog dejstva u aterosklerozi. Međutim postoje i drugi lekovi koji različitim mehanizmima mogu dovesti do sniženja koncentracije LDL holesterola u plazmi, ali njihov efekat nije na nivou statina. Ovo saznanje je dovelo do otkrića da pored tradicionalnog mehanizma dejstva postoje i dodatni na kojima se zasnivaju takozvani plejotropni efekti statina. Plejotropni efekti statina ostvaruju se nezavisno od sniženja koncentracije holesterola u plazmi i značajno doprinose njihovom korisnom dejstvu u različitim bolestima. U ove efekte spadaju između ostalog imunomodulacija, smanjenje stepena oksidativnog stresa, inhibicija tromboze, efekti na funkciju endotela, anabolički procesi u kostima i stimulacija zarastanja preloma i rana [76, 80, 83-85]. Zanimljivo je da se upravo inhibicija farnezilacije signalnih proteina, usled sniženja nivoa ćelijskog FPP-a do sada smatrala ključnim mehanizmom kojim statini ostvaruju svoje plejotropne efekte. Međutim otkriće da FPP može delovati kao ligand za GR i druge nuklearne hormonske receptore otvara vrata za drugačiju interpretaciju mehanizma plejotropnih efekata statina i novu primenu ovih lekova.

1.9. Statini i zarastanje rana

Postoji veći broj studija, koje su mahom u animalnim modelima, pokazale da statini potencijalno mogu imati pozitivno dejstvo na zarastanje rana [86, 87]. Kao mehanizam ovog efekta statina najčešće se navodi stimulacija angiogeneze kroz povećanu produkciju VEGF-a [87], kao i imunomodulatorna uloga značajna u zaceljivanju inficiranih rana [88]. Mali broj kliničkih studija se bavio ovim pitanjem [89], pri čemu rezultati zbog malog uzorka ili observacione prirode studije ne omogućavaju donošenje nedvosmislenog zaključka o potencijalnoj ulozi statina u

zarastanju rana. U ovom kontekstu izuzetno je interesantna mogućnost da FPP, važan intermedijer u mevalonatnom putu sinteze sterola i izopreniliranih ćelijskih metabolita, može delovati kao ligand za glukokortikoidni receptor, iako ne deli zajedničku strukturu sa GH [53]. Pošto je mevalonatni sintetski put aktivan u većem broju tkiva, a naročito u koži, izuzetno je zanimljiva mogućnost da endogeno proizvedeni FPP delujući kao agonista GR, održava bazičnu aktivnost glukokortikoidnog signalnog puta. Pošto je prethodno dokazano da oštećenje tkiva i zapaljenje može indukovati aktivnost HMG-CoA reduktaze [83] i posledično povećati intracelularnu koncentraciju farnezil pirofosfata, dejstvo endogenog FPP-a na GR bi moglo imati još veći biološki značaj u toku procesa zarastanja rana. U tom kontekstu smanjenje aktivnosti glukokortikoidnog signalnog puta, usled sniženja koncentracije endogenog FPP statinima, moglo bi da predstavlja novi mehanizam dejstva ovih lekova, kojim oni stimulišu zarastanje rana.

2. CILJEVI

1. Dokazati da promena koncentracije FPP menja aktivnost GR i utiče na transkripciju gena:

1.1. Izolovanim ljudskim keratinocitima *in vitro*

1.2. Koži ljudi *ex vivo*

2. Ispitati da li povećanje koncentracije endogenog FPP-a inhibicijom skvalen sintetaze i dodavanje egzogenog FPP-a imaju isti efekat na aktivaciju glukokortikoidnog receptora, produkciju proinflamatornih medijatora i migraciju izolovanih keratinocita *in vitro*.

3. Analizirati uticaj inhibicije izoprenilacije/farnezilacije proteina na aktivaciju glukokortikoidnog signalnog puta FPP-om.

4. Ispitati uticaj promena koncentracije FPP-a i aktivacije glukokortikoidnog receptora na dinamiku zarastanja akutnih rana *ex vivo*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. *Humani uzorci i eksperimenti zarastanja rane*

Korišćen je model zarastanja rane uspostavljen od strane Kratz-a [90]. Prema propisanom protokolu, primenom redukcione mamoplastike i abdominoplastike dobijeni su uzorci normalne humane kože koji su korišćeni za *ex vivo* model akutne rane. Ovaj model je našao široku primenu u ispitivanju epidermalnog zarastanja rane. Pod sterilnim uslovima uklonili smo subkutanu masnoću sa kožnih uzoraka (120 mm×50 mm) i nakon takve pripreme, uzorci su postavljeni na sterilnu ploču od polistirena. Dalja procedura je podrazumevala biopsiju i sečenje tkiva čime su napravljeni uzorci veličine 6 mm sa ranom u obliku diska od 3 mm u centru (SMS Inc.). Tako dobijeni uzorci su uzgajani u interfazi vazduha i tečnosti (Dulbekov modifikovani medijum, DMEM, *engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium) (BioWhittaker), u prisustvu antibiotika, antimikotika i delipidovanog fetalnog goveđeg seruma (Gemini Bio-Products) tokom 4 dana. Uzorci su kultivisani u inkubatorima sa definisanom koncentracijom gasova (5% CO₂), vlažnom atmosferom i fiksnom temperaturom od 37°C. Medijum za kultivaciju je menjan svakodnevno. Po potrebi uzorci su uzgajani u prisustvu ili odsustvu 1 µM deksametazona (DEX) (Sigma), 10 µM FPP (Sigma), 10 µM mevastatina (MEV) (Sigma), 50 µM zaragozinske kiseline (ZGA) (Sigma) ili kombinacijom ovih tretmana u zavisnosti od eksperimenta. Četiri dana nakon početka treatmenta uzorci tkiva su fiksirani u 4% paraformaldehidu (Sigma) preko noći na sobnoj temperaturi, dehidratirani etanolom, tretirani ksilenom i ukalupljeni u tečni parafin.

3.2. *Ćelijska kultura*

Normalni humani keratinociti su uzgajani u definisanom medijumu za kultivaciju keratinocita bez dodatka seruma, a u prisustvu ekstrakta goveđe hipofize i epidermalnog faktora rasta (Keratinocyte-SFM; GIBCO). Ćelije su propagirane kroz 2 do 4 ciklusa ćelijskih deoba pre nego što su dostigle 80% ili

90% konfluentnog rasta. Čelije su ispirane tri puta sa 1xPBS-om i inkubirane u bazalnom medijumu za kultivaciju keratinocita (Invitrogen), koji je napravljen uz ekskluziju fenol crvenog, hidrokortizona, tiroidnih hormona i ekstrakta goveđe hipofize. Po potrebi eksperimentalnih uslova ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu: 1 μ M dexametazona (Sigma), 10 μ M FPP (Sigma), 10 μ M MEV (Sigma), 50 μ M ZGA (Sigma), epidermalnog faktora rasta (EGF) (25 ng/ml) (Invitrogen), 0.7 μ M B581 (Sigma), 10 μ M RU486 (Sigma) ili kombinacijom tretmana u zavisnosti od eksperimenta u trajanju od 24 ili 48 sati.

3.3. Priprema keratinocita za imunocitohemijske analize

Normalni humani keratinociti su uzgajani u definisanom medijumu za kultivaciju keratinocita bez dodatka seruma, a u prisustvu ekstrakta goveđe hipofize i epidermalnog faktora rasta (Keratinocyte-SFM; GIBCO) u petri šoljama na sterilnim pokrovnim ljupticima do dostizanja 70% konfluencije. Čelije su 24 sata pre početka eksperimenta ispirane tri puta sa 1 x rastvorom fosfatnog pufera (*engl.* Phosphate Buffer Saline, PBS). i inkubirane u bazalnom medijumu za kultivaciju keratinocita (Invitrogen). U zavisnosti od eksperimentalnih uslova ćelije su potom inkubirane u prisustvu ili odsustvu: 1 μ M deksametazona (Sigma), 10 μ M FPP (Sigma), 10 μ M MEV (Sigma) ili 50 μ M ZGA (Sigma) tokom 24 sata. U drugom setu eksperimenata ćelije su tretirane sa 1 μ M deksametazona (Sigma), 10 μ M FPP (Sigma) ili 50 μ M ZGA (Sigma) tokom 4 sata, da bi potom bio dodavan interferon gama (100 ng/ml) (Sigma) tokom narednih 60 minuta. Čelije su fiksirane u rastvoru acetona-metanola (1:1) tokom 2 minuta, permeabilizovane rastvorom 0,1% Triton X-100 i potom ispirane tri puta 1 x PBS.

3.4. Histopatologija i imunocitohemija

Tkivo kože analizirano za model zarastanja rane je sečeno uz pomoć mikrotoma (HM 315, Carl Zeiss) na preseke debljine 7 μ m koji su potom postavljeni na pločice. Narezani uzorci tkiva su zatim obojeni kombinacijom hematoksilina i eozina. Digitalne slike preseka tkiva rane obojene hematoksilin-eozinom su analizirane tako što je merena površina dna rane pokrivena migracionim frontom keratinocita tokom epitelizacije. Potom su upoređivani

procenti epitelizacije rane u odnosu na različite eksperimentalne uslove. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Za svaki pojedinačni eksperiment korišćena je koža od samo jednog donora.

Po potrebi preseći tkiva su deparafinisani, a nakon toga rehidrirani i isprani sa 1x PBS da bi se pripremili za bojenje. U cilju demaskiranja antigena, preseći ukalupljeni u parafin su zagrevani na 95°C u odgovarajućem rastvoru (DAKO Corp.) u vodenom kupatilu nakon čega su ispirani. Za imunofluorescentno bojenje blokiranje je vršeno sa 5% BSA u PBS-u 30 minuta na sobnoj temperaturi. Preseći tkiva su inkubirani sa anti-Keratin 6 antitelima (poklon Dr Paolo Kolombo) u 5% BSA u PBS-u, preko noći na 4°C. Dalje, preseći su inkubirani sa Alexa Fluor 488-konjugovanim sa kozijim-antizečijim antitelom (Invitrogen) u trajanju od 1 sata na sobnoj temperaturi. U negativnoj kontroli umesto primarnog antitela upotrebljen je preimuni serum. Svi uzorci su tretirani propidijum jodidom u cilju vizuelizacije nukleusa.

Pokrovne ljušpice su inkubirane sa anti-STAT1 antitelima (Santa-Cruz, CA) rastvorenim u rastvoru 5% BSA u PBS-u, preko noći na 4°C, a zatim sa Alexa Fluor 488-konjugovanim sa kozijim-antizečijim antitelom (Invitrogen) u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi u tamnoj sobi. U negativnoj kontroli umesto primarnog antitela je korišćen je 1xPBS. Svi uzorci su tretirani propidijum jodidom u cilju vizuelizacije jedara.

Preseći tkiva i ćelije na pokrovnim ljušpicama su posmatrani pod Nikon Eclipse E800 mikroskopom, a digitalne slike su dobijene korišćenjem SPOT RT kamere i SPOT-Camera Advanced programa. Proces epitelizacije i zarastanja rane je kvantifikovan planimetrijom. Za statističku obradu rezultata je korišćen studentov t test.

3.5. *In vitro* model rane, test migracije keratinocita (engl. scratch test)

Ovaj eksperiment predstavlja najjednostavniji *in vitro* model zarastanja rane, koji ispituje efekte različitih tretmana na migraciju keratinocita nakon namernog oštećenja konfluentnog sloja ćelija. Scratch test omogućava kvantitativno praćenje dinamike prekrivanja praznine nastale oštećenjem. Ćelije su kultivisane do

dostizanja 80% konfluentnog rasta. Dvadeset četiri sata pre eksperimenta, ćelije su ispirane tri puta sa 1xPBS-om i inkubirane u bazalnom medijumu za kultivaciju keratinocita (Invitrogen), koji napravljen uz ekskluziju fenol crvenog, hidrokortizona, tiroidnih hormona i ekstrakta goveđe hipofize. Na dan početka eksperimenta, u cilju inhibicije proliferacije, ćelije su tretirane sa 10 mg/ml mitomicina C (Sigma) tokom jednog sata, i potom ispirane tri puta sa 1xPBS-om. Ogrebotine/rane u konfluentnoj kulturi keratinocita su napravljene pomoću vrha sterilnog nastavka pipete (200 μ L) i potom slikane uz pomoć Carl Zeiss mikroskopa i Sony digitalnog fotoaparata (DKC-500). Ćelije su inkubirane sa: 1 μ M dexametazona (Sigma), 10 μ M FPP (Sigma), 10 μ M MEV (Sigma), 50 μ M ZGA (Sigma), EGF 25 ng/ml (Invitrogen), 0.7 μ M B581 (Sigma), 10 μ M RU486 (Sigma) ili kombinacijom tretmana u zavisnosti od eksperimenta tokom 24 i 48 sati i potom ponovo slikane u istom području kao što je to učinjeno na početku eksperimenta. Uz pomoć ImageJ (NIH) programa kvantifikovana je površina rane nepokrivena migrirajućim talasom keratinocita posle 24 i 48 sati od početka eksperimenta i izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama za svaku vremensku tačku i eksperimentalno stanje. Tri slike su analizirane za svaku vremensku tačku i tretman. Eksperimenti su izvedeni u duplikatu, tri nezavisna puta.

3.6. Izolacija proteina i imunoblot

Za izolaciju proteina iz humanih keratinocita korišćen je komercijalno dostupan RIPA lizacioni pufer (Sigma) sa dodatkom proteaznih i fosfataznih inhibitora (Protease Inhibitor Mixture- Sigma, Phosphatase Inhibitor Mixture Set III - Calbiochem). Lizati su normalizovani u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina određenu Bredfordovom metodomn (REF), a uzorci su čuvani na -20 °C. Ekstrakti tkivnih proteina su kuvani 5 minuta u puferu za uzorke (2 \times Laemmli sample buffer) a potom su razdvajani 10% SDS-PAGE elektroforezom i transferovani na nitroceluloznu membranu (VWR) na voltaži od 100 V tokom 1 h u tris/glicin puferu za transfer. Membrana je blokirana sa 5% albuminom iz kravljeg seruma (*engl.* bovine serum albumin, BSA) u TBS-u (pH 7,4) (*engl.* Tris Buffered Saline, TBS) tokom 1 sata na sobnoj temperaturi a potom je inkubirana sa

primarnima antitelima, specifičnim za GR-P (serin 211) (Cell Signaling) i GAPDH (Santa-Cruz), preko noći na 4°C. Kao sekundarna antitela korišćena su anti-zečija i anti-kozija antitela konjugovana sa peroksidazom rena (Santa Cruz), a za vizuelizaciju imunskih kompleksa je primenjen Super Signal West Pico hemiluminescentni substrat (Pierce). Ekspozicija filma je vršena u skladu sa uputsvom proizvođača (HyBlot CL).

3.7. Esej imunoprecipitacije hromatina

Vezivanje aktiviranog GR za keratin 6 promotor u keratinocitima je ispitano pomoću eseja imunoprecipitacije hromatina (eng. chromatin immunoprecipitation, ChIP). Korišćen je komercijano dostupan kit ChIP-IT™ Express (Active Motif). Nakon 24 sata tretmana sa 1 µM dexametazonom (Sigma) ili 10 µM FPP (Sigma) kultura keratinocita je tretirana 10 min sa rastvorom za fiksaciju (50 mM HEPES, pH 8.0, 1% formaldehid, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, i 100 mM NaCl), kako bi se učvrstile veze (eng. cross-linking) između DNK i proteina i međusobne veze između proteina. Zatim su ćelije isprane dva puta sa rashlađenim 1xPBS-om. Fiksacija je zaustavljena inkubacijom ćelija 5 minuta u 125mM glicinskom rastvoru na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su dva puta ponovo isprane sa rashlađenim 1 x PBS-om. Ćelije su prikupljene, centrifugirane i resuspendovane u puferu za lizu (50 mM HEPES, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 5% Nonidet P-40, i 0.25% Triton X-100) uz dodatak mešavine proteaznih inhibitora (Protease Inhibitor Mixture, Sigma) tokom 10 minuta na 4°C. Ćelije su homogenizovane da bi se efikasnije oslobodila jedra. Homogenat je centrifugiran, supernatant odliven i potom je jedarni talog resuspendovan u RIPA puferu (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 5% glicerol, 0.1% natrijum deoksiholat, 0.1% natrijum dodecil sulfat i 1% Triton X-100). Zatim su uzorci sonifikovani uz pomoć Misonix 3000 sonikatora devet puta po 20 sekundi uz pauzu od 60 sekundi, u cilju fragmentacije hromatina. Ćelijski debris je uklonjen centrifugiranjem. Proteinsko-DNK kompleksi iz fragmentisanog hromatina su imunoprecipitirani uz pomoć magnetnih kuglica obloženih proteinom G, 10 µl pufera za ChIP i 5µg anti-GR (N499) antitela (poklon Dr Ines Rogacki) ili 2µg zečijeg IgG antitela (Santa Cruz). PCR je korišćen za amplifikaciju fragmenata K6 promotora iz pročišćene i

imunoprecipitirani hromozomske DNK. Za detekciju K6 promotora korišćeni su specifični prajmeri: K6 ushodni prajmer (AGGTGTGAATCTCACTATTTGTAAAGHC) i K6 nishodni prajmer (AGGAATCGGACTCCAGTAGCAGC). Uzorci su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu koji sadrži 0.5 µg/ml etidium bromida. Za vizuelizaciju je korišćena UV svetlost.

3.8. *Tranzijentna transfekcija i plazmidi*

Normalni humani keratinociti su transfektovani plazmidima pK6CAT (dar Dr Miroslava Blumenberga) i GRE-CAT (dar Dr Peter Chambon). pK6CAT klon sadrži 360 baznih parova regulatornog regiona Keratin 6b humanog gena koji je povezan za CAT reporter gen (gen za hloramfenikol acetiltransferazu) pod kontrolom K6 promotora i gen za rezistenciju na ampicilin. K6 regulatorni region sadrži KRE (element keratinskog odgovora), specijalizovan oblik GRE, koji funkcioniše kao negativni regulatorni element i za koji je karakteristično da po vezivanju ligandom aktiviranog GR dovodi negativne regulacije promotora i inhibicije transkripcije CAT gena. GRE-CAT sadrži CAT gen umetnut između 6 GRE (element glukokortikoidnog odgovora) povezanih za promotor i CaMV 35S sekvence za terminaciju transkripcije. Po vezivanju agonistom aktiviranog GR za GRE, pozitivni regulatorni element, dolazi do aktivacije transkripcije CAT gena.

Ćelije su zasejane u sterilne sudove sa 6 bunarića ravnog dna i uzgajane do postizanja 60% konfluentnog rasta. Keratinociti su gajeni pod normalnim uslovima, u definisanom medijumu za kultivaciju keratinocita kao što je prethodno opisano. Ćelije su 24 sata pre početka eksperimenta ispirane tri puta sa 1xPBS-om i inkubirane u bazalnom medijumu za kultivaciju keratinocita (Invitrogen), koji je napravljen bez fenol crvenog, hidrokortizona, tiroidnih hormona i ekstrakta goveđe hipofize. Kao sredstvo za transfekciju korišćen je FuGENE 6 reagens prema uputstvima proizvođača (Roche). Ukratko, plazmid (3 µg pK6CAT i 1 µg GR-CAT) je rastvoren u bazalnom medijumu. Zatim je pomešana i inkubirana rastvorena plazmidna DNK sa FuGEN6 reagensom rastvorenim u bazalnom medijumu. Tokom inkubacije formirani su kompleksi između FuGENE6 i DNK. Po isteku inkubacije, u svaki bunarić je dodato 100 µl FuGEN6-DNK kompleksa. Po dodavanju kompleksa keratinociti su inkubirani 4 sata na sobnoj temperaturi i potom isprani 3 puta sa

1xPBS-om. Po dodavanju bazalnog medijuma, transfektovane ćelije su tretirane 48 sati sa: 1 μ M dexametazonom (Sigma), 10 μ M FPP (Sigma) ili 50 μ M ZGA (Sigma). Ćelijski ekstrakti korišćeni za hloramfenikol acetiltransferaza (CAT) esej su normalizovani u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina određenu po metodi Bradford. Aktivnost hloramfenikol acetiltransferaze u uzorcima je izmerena uz pomoc FastCat kita (Molecular Dynamics) prema uputstvu proizvođača. Vrednosti CAT eseja u uzorcima su izmerene i kvantifikovane pomocu Flour Imager 575 (Molecular Dynamics). Svi rezultati su generisani na osnovu tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu.

3.9. Izolacija RNK i određivanje transkripcionih profila (DNK mikročip)

Izolacija i prečišćavanje RNK iz keratinocita tretiranih sa ZGA i DEX je izvršena primenom komercijalno dostupnog kita RNeasy (Qiagen). 5 μ g ukupne RNK je reverzno transkribovano, amplifikovano i obeleženo u skladu sa protokolom [91] uz pomoć automatizovanog Affymetrix-ovog GeneChip® uređaja za analizu genske ekspresije. Uređaj se sastojao od hibridizacijske peći (engl. GeneChip® hybridization oven), automatizovane jedinice za ispiranje i bojenje GeneChipa (engl. GeneChip® Fluidics station), uređaja za čitanje GeneChipa visoke rezolucije (engl. Agilent Gene Array scanner, Hewlett-Packard) i kompjutera s odgovarajućom programskom podrškom (Genespring 13). Obeležena komplementarna DNK (cDNK) je hibridizovana sa HGU95Av2 mikročipom (Affymetrix). Nakon ispiranja mikročipa i bojenja anti-biotin streptavidinificoeritin obeleženim antitelima pomoću Affymetrix jedinice za ispiranje i bojenje, rezultat je očitao pomoću Agilent Gene Array Scanner (Hewlett-Packard). Sirovi podaci su potom obrađeni i analizirani Genespring 13 programom. Osnovni kvantitativni podatak koji nam pruža analiza mikročipa je vrednost intenziteta signala za svaku probu. Ovako dobijena vrednost signala je direktno proporcionalna količini transkripta odgovarajućeg gena u ispitivanom uzorku. Razlike u genskoj ekspresiji između dva uzorka kvantifikovane su poređenjem vrednosti intenziteta signala proba sa kojima su ispitivani uzorci hibridizovani. U prvom koraku analize rezultata obavljena je normalizacija signala. U tom cilju je korišćen Afimetriks

protokol MAS5, pri čemu je normalizacija signala ostvarena u odnosu na intenzitet signala proba koje predstavljaju gene sa već poznatim intenzitetom signala, koji je sličan u svim ćelijama (engl. housekeeping genes). U daljem postupku, na osnovu dobijenog intenziteta signala izračunavana je promena ekspresije pojedinačnih gena u odnosu na kontrolnu vrednost. U ispitivanju statističke značajnosti promene ekspresije gena korišćen je moderirani dvosmerni t-test sa Benjamini-Hochberg-ovom korekcijom. Geni koji su postigli statistički značajan prag p-vrednosti od $p > 0.05$ i imali linearnu promenu od više od dva puta su korišćeni u daljim analizama transkripcionih profila deksametazona i FPP-a. Grupisanje gena po signalim putevima je postignuto korišćenjem kompjuterskog programa (Ingenuity Pathway Analysis IPA).

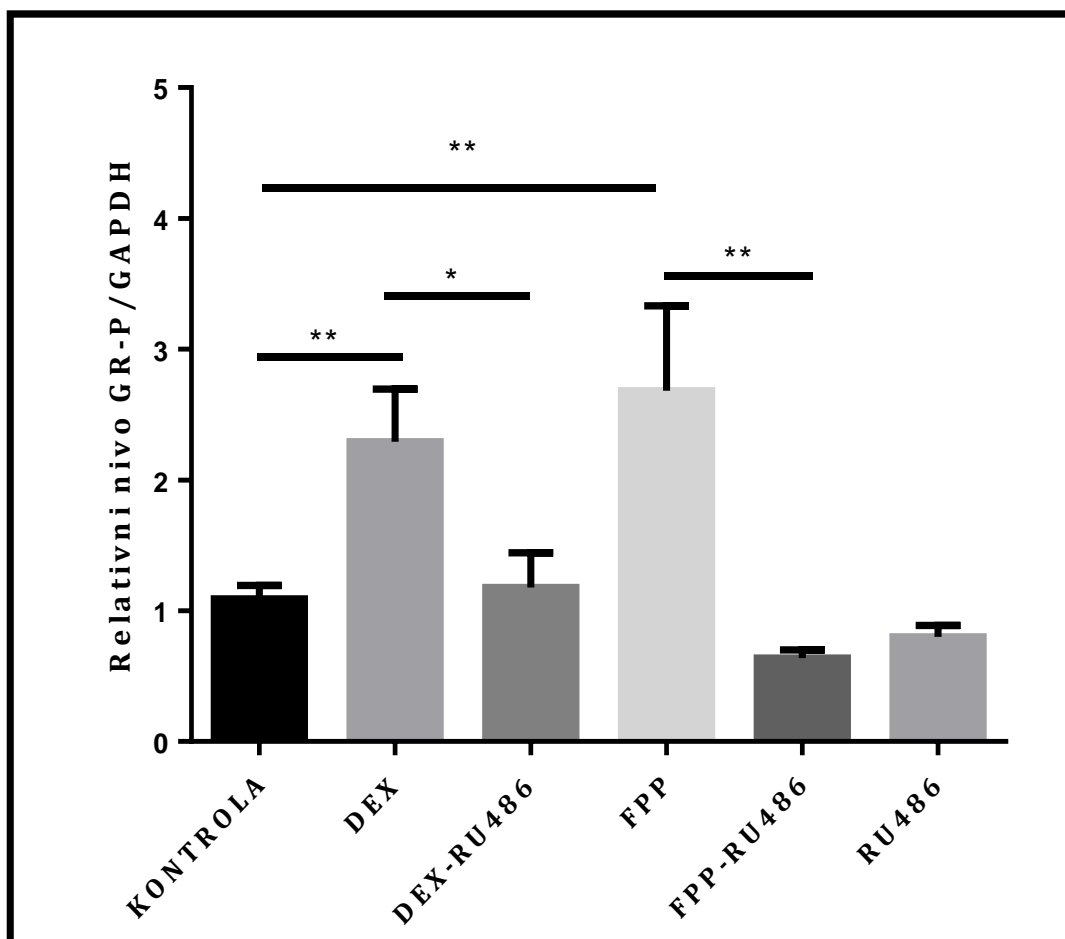
3.10. Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani pomoću SPSS 15.0 programa. U ovom programu su izračunate srednja vrednost, standardna greška i devijacija za ispitivane parametre. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Za statističku obradu rezultata migracije i epitelizacije korišćen je studentov t test.

4. REZULTATI

4.1. *FPP aktivira GR u primarnim humanim keratinocitima*

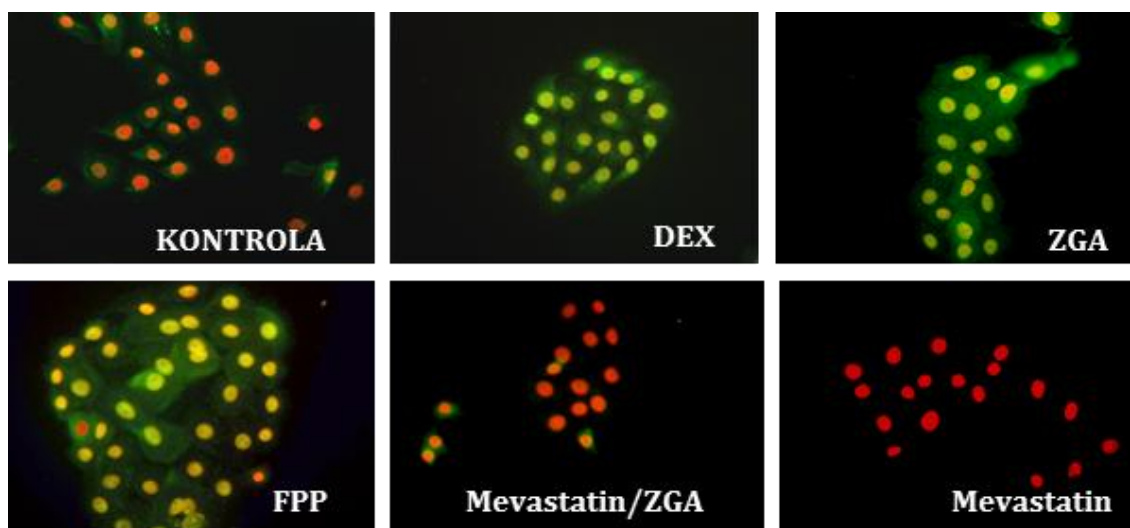
U nedavno publikovanoj studiji pokazano je da FPP, intermedijarni metabolit u mevalonatnom sintetskom putu, može slobodno ući u ćelije u kulturi i vezati se za GR kao ligand (12). Da bi dokazali da FPP može da deluje ne samo kao ligand, već i kao funkcionalni agonista za GR, pristupili smo nizu eksperimenata u kojima smo ispitivali efekte FPP-a na različite faze u glukokortikoidnom signalnom putu. U odsustvu agoniste, glukokortikoidni receptor je lokalizovan mahom u citoplazmi u kompleksu sa proteinima poput HSP90. Po vezivanju GH za receptor, on menja konformaciju i podleže specifičnoj fosforilaciji na serinu 211 (GR-P). Ova karakteristična posttranslaciona modifikacija predstavlja početni, esencijalni korak u glukokortikoidnom signalnom putu nakon aktivacije receptora funkcionalnim agonistom poput DEX-a, koju potom sledi translokacija u jedro [65]. Kad se jednom nađe u jedru receptor se vezuje za elemente glukokortikoidnog odgovora u okviru promotora različitih gena. Po vezivanju za DNK, aktivirani GR regrutuje različite korepresore i koaktivatore uz čiju pomoć menja ekspresiju velikog broja različitih gena [71]. Kako bi utvrdili da li vezivanje FPP-a za glukokortikoidni receptor vodi njegovoj specifičnoj fosforilaciji na serinu 211 analogno dejstvu klasičnog agoniste DEX-a, izmerena je relativna količina GR-P u keratinocitima u kulturi korišćenjem imunoblot analize i anti-fosfoserin 211 GR specifičnih antitela. U keratinocitima tretiranim 4 sata agonistom DEX-om uočeno je značajno povećanje nivoa GR-P u odnosu na netretirane kontrolne ćelije. Dodavanje egzogenog FPP imalo je isti efekat. Kao inhibitor korišćena je RU486, supstanca za koju je prethodno pokazano da deluje kao kompetitivni inhibitor glukokortikoidnih hormona. Očekivano, pokazano je da kotretman sa RU486 neutrališe efekat i DEX-a i FPP-a na fosforilaciju glukokortikoidnog receptora, što ukazuje na mogućnost da FPP nije samo ligand, već i agonista za GR (Prilog 1)



Prilog 1. Aktivacija GR farnezil-pirofosfatom

Imunoblot analiza proteinskog ekstrakta keratinocita antitelom na fosfoserin 211 GR (GR-P). Vrednosti izmerenog nivoa GR-P normalizovane su u odnosu na nivo GAPDH i predstavljene su kao stepen promene u odnosu na vrednost intenziteta kontrole. DEX i FPP indukuju sličan stepen povećanja fosforilacije GR na serinu 211. RU486 delujući kao antagonista glukokortikoidnog receptora blokira ovaj efekat. Statistička značajnost: (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Pošto je prethodno pokazano da je transkripciona aktivnost GR u direktnoj korelaciji sa količinom GR-P u jedru, u sledećem eksperimentu ispitivana je translokacija fosforilisanog GR u jedro, kao biomarker aktivnosti glukokortikoidnog signalnog puta [66]. Primarni humani keratinociti su tretirani sa DEX-om, FPP-om ili ZGA (ZGA dovodi do povećanja koncentracije endogenog FPP u ćelijama blokirajući njegovu konverziju u skvalen) tokom 24 sata (Prilog 2).



Prilog 2. FPP aktivira GR dovodeći do njegove fosforilacije i translokacije u jedro

A, Imunofluorescentno obeležavanje primarnih humanih keratinocita antitelom na fosfoserin 211 GR (zelena boja). Vizualizacija jedara je postignuta bojenjem sa propidijum jodidom. Slab signal za GR-P je prisutan u citoplazmi i jedru netretiranih ćelija. Nasuprot tome intenzivan signal prisutan u keratinocitima tretiranim DEX-om, FPP-om i ZGA, potvrdio je fosforilaciju i translokaciju agonistom aktiviranog GR u jedro. Mevastatin inhibira efekat ZGA na aktivaciju GR usled smanjenja nivoa endogenog FPP-a.

Kontrolnim ćelijama smo dodat je 1xPBS ili mevastatin. Po završenom tretmanu, HEK su bojene anti-fosfoserin 211 GR antitelom. U netretiranim ćelijama detektovano je prisustvo slabog signala za GR-P i u citoplazmi i u jedru. Nasuprot tome u keratinocitima tretiranim DEX-om, u većini jedara bio je prisutan intenzivan signal za GR-P. Interesantno je da je sličan rezultat dobijen i kao posledica inkubacije ćelija sa FPP-om ili ZGA, na osnovu čega se nameće zaključak da dodavanje egzogenog ili akumulacija endogenog FPP dovodi do aktivacije GR, detektovane na osnovu fosforilacije i nuklearne translokacije receptora. U cilju potvrde da je dejstvo ZGA na aktivaciju GR posledica povećanja koncentracije endogenog FPP i njegovog vezivanja za receptor kao agoniste, koinkubirane su ćelije sa mevastatinom i ZGA. Tretman sa mevastatinom inhibira 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktazu, uzvodni enzim u biosintetskom putu mevalonata,

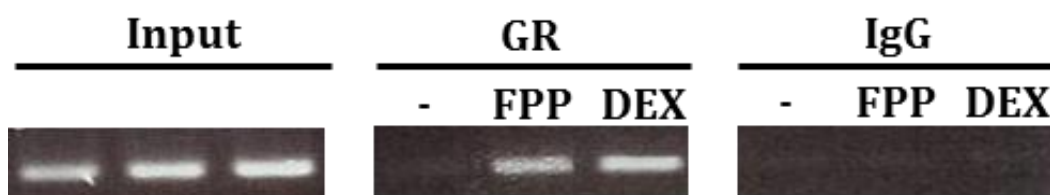
sprečavajući sintezu FPP i posledično njegovu akumulaciju odstrane ZGA. Kao što je i očekivano, koinkubacija sa mevastatinom je sprečila ZGA-om indukovanu aktivaciju GR. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da i egzogeno dodati i endogeno sintetisani FPP mogu delovati kao agonisti GR, dovodeći do fosforilacije receptora i njegove translokacije u jedro.

4.2. GR aktiviran FPP-om menja ekspresiju gena vezujući se za elemente glukokortikoidnog odgovora u okviru promotora

Da bi ostvario svoje dejstvo na promenu transkripcije različitih GH responsivnih gena, GR po nuklearnoj translokaciji mora da se veže za elemente glukokortikoidnog odgovora (GRE) u okviru regulatornih sekvenci ogovarajućih gena. Prethodno je pokazano da agonistom aktiviran GR može da inhibira ekspresiju keratin 6 gena na ovaj način [68].

Pomoću eseja imunoprecipitacije hromatina ispitano je da li se FPP-om aktivirani GR vezuje za GRE *in vitro*. Keratinociti su gajeni do postizanja 70% konfluentnog rasta i nakon toga tretirani 24 sata sa DEX-om ili FPP-om. U kontrolne ćelije je dodat 1xPBS. Keratinociti su potom tretirani formaldehidom u cilju uvrščivanja veza između DNK i proteina i proteina međusobno. Nakon toga je izolovan i ultrazvukom fragmentisan kroslinkovani hromatin. U sledećem koraku, izdena je imunoprecipitacija identične količine ukupne genomske, fragmentisane DNK (input Prilog 3) sa anti-GR antitelom. Na ovaj način su koncentrisani fragmenti hromatina koji imaju za sebe vezan GR. Zečije anti-imunoglobulin G antitelo (IgG Prilog 3) je korišćeno kao negativna kontrola imunoprecipitacije, s obzirom da ovo antitelo ne prepoznaje DNK-vezujuće proteine. Po uklanjanju proteina iz hromatina dobijena je prečišćena DNK, koja je potom služila kao matrica za umnožavanje DNK regiona od interesa. Zatim je PCR reakcijom, korišćenjem specifičnih prajmera za K6 promotor, amplifikovana DNK dobijena nakon imunoprecipitacije sa anti-GR antitelom kao i DNK za odgovarajuće kontrole imunoprecipitacije. Kao pozitivna kontrola PCR reakcije korišćena je neimunoprecipitovana, fragmentisana DNK nakon uklanjanja proteina (Input Prilog 3). Kao negativnu kontrolu imunoprecipitacije koristili smo DNK dobijenu imunoprecipitacijom fragmentisanog hromatina sa IgG (IgG Prilog 3). Nakon

razdvajanja PCR produkta agaroznom elektroforezom, u materijalu dobijenom iz ćelija tretiranih DEX-om i FPP-om, uočena je traka od 122 bp koja odgovara K6 promotoru. Interesanto je da traka nije detektovana u materijalu iz kontrolnih ne tretiranih ćelija (Prilog 3). Slično, signal nije uočen ni kada je kao matrica korišćena genomska DNK dobijena imunoprecipitacijom sa IgG. Ovaj rezultat je ukazivao da se GR aktiviran i DEX i FPP vezuje na sličan način za GRE u okviru K6 promotora *in vitro*. Pošto je vezivanje aktiviranog GR za GRE neophodan korak u regulaciji genske ekspresije agonistom, ovaj rezultat predstavlja još jedan dokaz da FPP može da deluje kao funkcionalni agonista glukokortikoidnog signalnog puta.



Prilog 3. GR aktiviran FPP-om se vezuje za promotor keratina 6

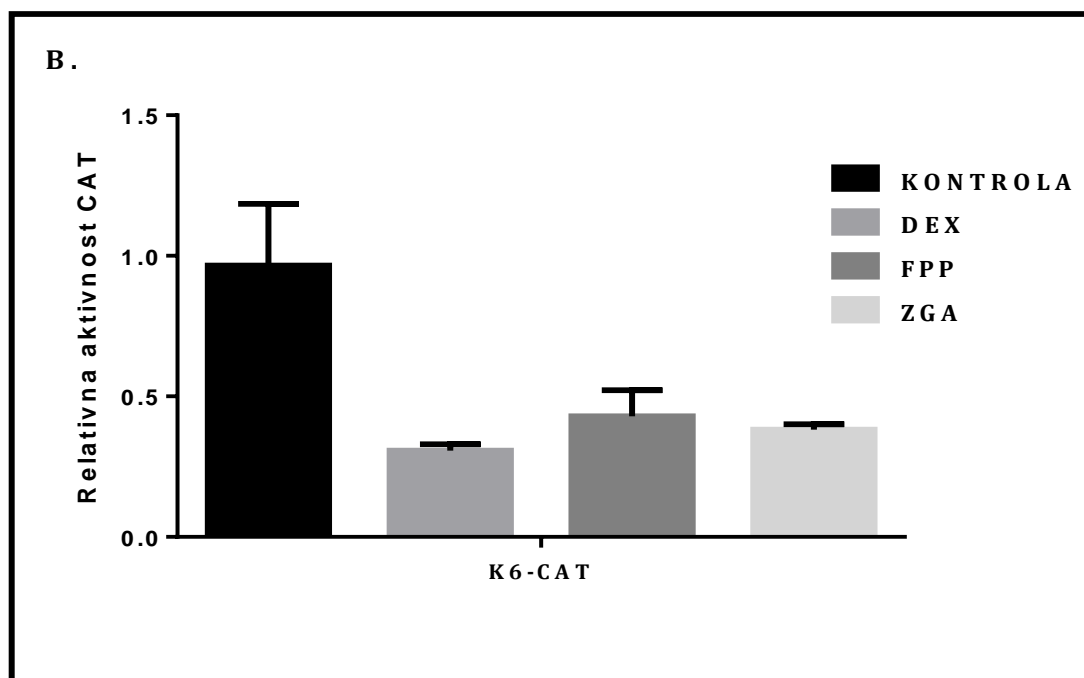
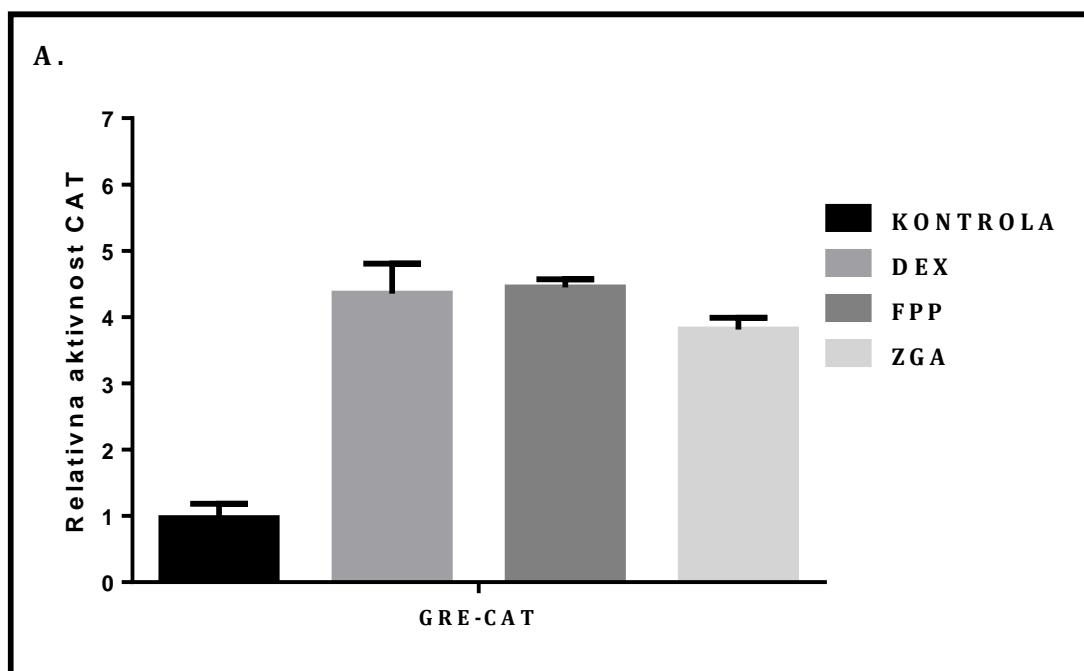
HEK su inkubirani sa DEX-om, FPP-om ili bez njih (-) tokom 24 sata (n = 3). Identična količina genomske DNK (input) korišćena je za svaki tretman. Sekvence keratin 6 promotora su amplifikovane PCR tehnikom nakon imunoprecipitacije sa anti-GR antitelom ili zečijim IgG.

Da bi ispitali da li aktivacija glukokortikoidnog receptora FPP-om može da promeni ekspresije ciljnih gena u keratinocitima, slično dejstvu klasičnog agoniste DEX-a, korišćeni su tranzijentna transfekcija i CAT esej. GR aktiviran agonistom menja konformaciju i u stanju je da po vezivanju za GRE u regulatornom regionu promotora, regrutuje korepresore ili koaktivatore i tako promeni ekspresiju gena. Za ispitivanje pozitivne regulacije genske transkripcije korišćen je GRE-CAT plazmid. Ovaj plazmid sastoji se od CAT gena umetnutog između regulatornog regiona promotora, koji sadrži 6 konsenzus GRE sekvenci i CaMV 35S sekvencu za terminaciju transkripcije. Po vezivanju agonistom aktiviranog GR za GRE, receptor regrutuje različite koaktivatore dovodeći do transaktivacije CAT gena. Enzimska

aktivnost dobijenog produkta, hloramfenikol acetiltransferaze je u direktnoj korelaciji sa intenzitetom transkripcije, što omogućava da indirektno određivanje uticaja različitih molekula na ekspresiju gena pod kontrolom glukokortikoidnog signalnog puta.

Kao primer za represiju genske transkripcije GR-om korišćen je plazmid pK6CAT. pK6CAT klon sadrži 360 baznih parova regulatornog regiona keratin 6b humanog gena koji je povezan sa CAT reporter genom pod kontrolom K6 promotora. K6 regulatorni region sadrži KRE, specijalizovani oblik GRE koji funkcioniše kao negativni regulatorni element. Interakcija između GR i KRE aktiviranih ligandom dovodi do negativne regulacije promotora i transrepresije CAT gena [68, 92].

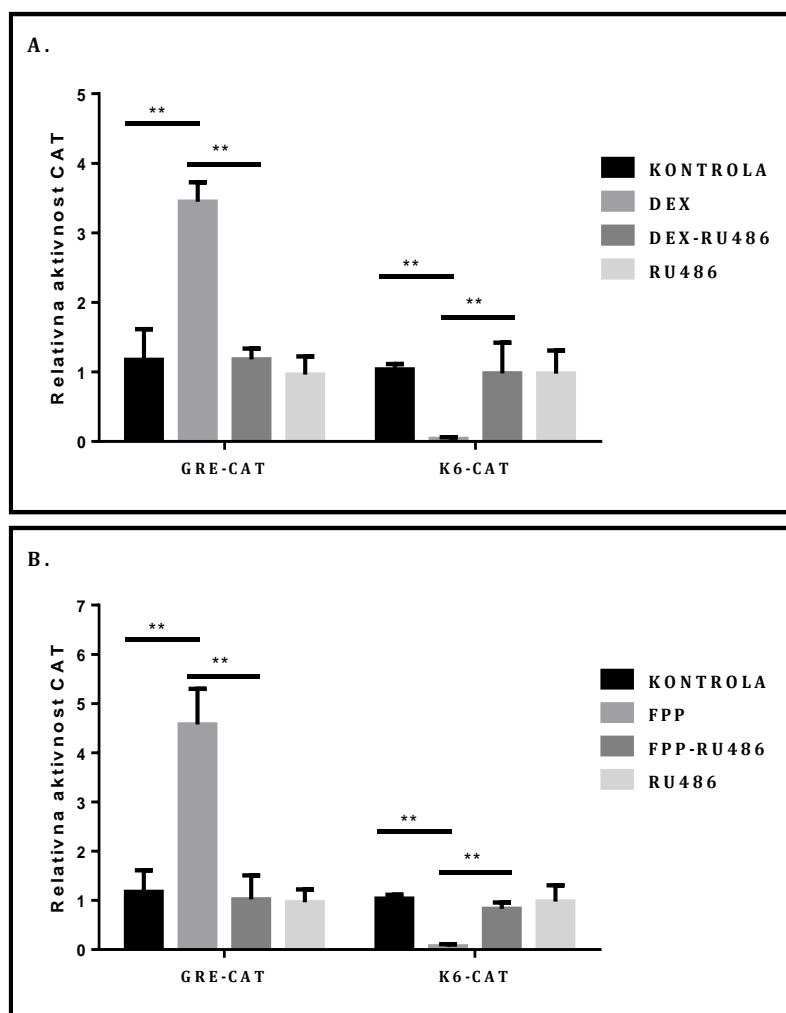
Ćelije su zasejane u sterilne sudove sa 6 bunarića ravnog dna i gajene do postizanja 60% konfluentnog rasta. Za prolaznu transfekciju keratinocita sa GRE-CAT i K6-CAT korišćen je FuGENE6 reagens. Po uspešnoj transfekciji ćelije su tretirane 48 sati sa: 1 μM DEX-a, 10 μM FPP-a ili 50 μM ZGA. Kao što je bilo i očekivano na osnovu rezultata prethodnih eksperimenata, DEX je stimulisao ekspresiju GRE-CAT, a inhibirao ekspresiju K6-CAT. Interesantno je da su i egzogeno dodati i endogeno akumulirani FPP (posredstvom inhibicije skvalen sintetaze sa ZGA) imitirali efekat DEX-a u pogledu transrepresije K6-CAT reportera i stimulacije ekspresije GRE-CAT (Prilog 4).



Prilog 4. FPP dovodi do GR posredovane transkripcione regulacije GRE-CAT i K6-CAT u keratinocitima

Prolazna transfekcija HEK sa GRE-CAT i K6-CAT reporter genima. Rezultati predstavljaju relativnu aktivnost CAT normalizovanu u odnosu na totalnu količinu proteina u ćelijskom ekstraktu. FPP i ZGA, slično efektu DEX-a, dovode do represije K6 promotora i stimulacije GRE-CAT reportera (n = 4).

Da bi dokazali da je ovaj efekat FPP posledica njegovog vezivanja za GR u vidu liganda, izveden je sledeći eksperiment u kome su keratinociti transfektovani sa GRE-CAT i K6-CAT tretirani sa DEX-om, FPP-om, RU486 ili kombinacijom DEX-RU486 i FPP-RU486 tokom 48 sati. RU486 je kompetitivni inhibitor glukokortikoidnih hormona koji deluje kao antagonista za GR. I DEX i FPP su ponovo uspešno stimulisali ekspresiju GRE-CAT, a inhibirali ekspresiju K6-CAT. Međutim ukoliko je transfektovanim ćelijama dodavan i RU486, efekti DEX-a i FPP-a na promenu ekspresije GRE-CAT i K6-CAT su bili sprečeni (Prilog 5).



Prilog 5. Transkripciona aktivnost FPP je posredovana aktivacijom GR

Tranzijentna transfekcija HEK GRE-CAT i K6-CAT reporter genima. Predstavljeni rezultati predstavljaju relativnu aktivnost CAT normalizovanu u odnosu na totalnu količinu proteina u ćelijskom ekstraktu. FPP i DEX dovde do statistički značajne ($p < 0,01$) transrepresije K6 promotora i transaktivacije GRE-CAT reportera slično efektu DEX-a. RU486 delujući kao antagonista GR blokira efekat FPP-a i DEX-a. ($n = 4$).

4.3. FPP i DEX imaju sličan transkripcioni profil

Da bi dodatno potvrdili da endogeno sintetisani FPP deluje kao funkcionalni agonista glukokortikoidnog signalnog puta ispitan je njegov transkripcioni profil i upoređen sa profilom klasičnog agoniste GR DEX-a pomoću DNK mikročip tehnike. U cilju povećanja nivoa endogeno sintetisanog FPP u ćelijama, keratinociti su tretirani sa ZGA, inhibitorom skvalen sintetaze tokom 48 i 72 sata. Kao pozitivna kontrola su korišćene ćelije inkubirane tokom istog vremenskog perioda sa DEX-om. Od 12653 ukupno analiziranih gena, 6285 su bili eksprimirani u koži (49,7%). Ovaj rezultat je bio u skladu sa rezultatima iz drugih laboratorija [91, 93]. U cilju poređenja rezultata eksperimenata u različitim vremenskim tačkama, izvedena je klaster analiza pomoću Genespring TM 5.1 kompjuterskog programa, pri čemu je svaka vremenska tačka predstavljala odvojene eksperimente. Interesantno je da je pronađeno značajno preklapanje između gena regulisanih posle 48 i 72 sati tretmana (Prilog 4). Većina gena regulisanih i DEX-om i ZGA-om nakon 48 sati inkubacije ostalo je regulisano na isti način i posle 72 sata. Tretman sa DEX-om doveo je do statistički značajne promene ekspresije od dva ili više puta 394 gena, a tretman sa ZGA-om rezultirao je u promeni ekspresije 460 gena u dva nezavisna eksperimenta.

A.

Systematic	DEX		ZGA		Common	Function
	48h	72h	48h	72h		
39586_at	2.2	2.2	-4.8	-4.0	DSG1	Adhesion, desmosomal
33410_at	2.4	-1.9	1.0	-3.7	ITGA6	Adhesion, integrin
41739_at	-1.7	-1.9	-2.7	-2.7	CALD1	Adhesion, junctional
32531_at	-3.1	-3.3	-3.0	-5.6	GJA1	Adhesion, junctional
34311_at	2.6	9.7	2.2	1.8	GLRX	Antioxidant
37014_at	-7.8	-3.7	-12.3	-10.3	MX1	Apoptosis
36423_at	2.1	2.4	3.5	2.7	P8	Apoptosis
1867_at	1.3	1.3	-1.5	2.7	CFLAR	Apoptosis inhibitor
34281_at	-10.0	-10.2	-2.5	-1.8	VSNL1	Ca binding
38326_at	-12.5	6.8	2.9	3.0	G0S2	Cell cycle
35303_at	1.2	1.0	-2.6	2.6	INSIG1	Cell cycle
37028_at	2.0	3.9	3.1	2.2	PPP1R15A	Cell cycle
1597_at	-2.4	-2.5	-2.3	-2.5	GAS6	Cell cycle inhibitor
38772_at	1.0	-1.7	-2.0	-3.5	CYR61	Cell growth, proliferation
36931_at	-13.6	-16.5	-6.2	-5.8	TAGLN	Cytoskeletal
36601_at	-1.7	-3.0	2.2	-1.5	VCL	Cytoskeletal
39329_at	-4.0	-3.0	-3.0	2.3	ACTN1	Cytoskeletal, actin
39542_at	-3.9	-4.3	-3.0	2.3	ENC1	Cytoskeletal, actin
39070_at	6.8	-3.3	2.7	-1.5	FSCN1	Cytoskeletal, actin
36791_g_at	-4.0	-4.8	-1.3	2.0	TPM1	Cytoskeletal, actin
32847_at	-2.9	-2.9	-4.2	-2.8	MYLK	Cytoskeletal, myosin
151_s_at	-2.7	-1.9	-1.9	-2.6	TUBB	Cytoskeletal, tubulin
318_at	1.5	3.0	2.0	1.4	H1FX	DNA binding, histone
37018_at	2.6	6.9	4.8	10.2	HIST1H1C	DNA binding, histone
1521_at	-1.9	-1.9	-2.1	-1.9	NME1	DNA repair, synthesis
41618_at	-2.4	-3.2	-1.1	-3.2	COL17A1	ECM
37909_at	-3.2	-2.5	-1.8	-3.2	LAMA3	ECM
35281_at	-4.0	-5.1	-3.1	-5.4	LAMC2	ECM
115_at	-6.0	-6.4	-1.4	-2.3	THBS1	ECM
31705_at	-2.7	-6.7	-1.6	-3.4	ARS	Epidermal differentiation
1057_at	-4.3	-7.9	-3.8	-3.7	CRABP2	Epidermal differentiation
41096_at	-13.7	-73.8	-1.5	2.3	S100A8	Epidermal differentiation
41471_at	8.1	-9.8	-1.2	2.3	S100A9	Epidermal differentiation
34319_at	4.2	3.5	2.6	2.3	S100P	Epidermal differentiation
31688_at	6.7	13.4	3.3	1.1	SPRL1B	Epidermal differentiation
40637_at	-1.0	1.5	-1.7	3.8	HSPA8	Heat shock, chaperone
37383_f_at	3.1	3.3	2.1	-2.0	HLA-C	Immune response, HLA related
38432_at	-5.0	-11.0	-22.7	-15.7	G1P2	Interferon-regulated
32814_at	-12.8	-19.9	-2.7	-2.0	IFIT1	Interferon-regulated
38584_at	-11.9	-12.6	-2.5	-2.3	IFIT4	Interferon-regulated
675_at	-7.6	-26.7	-6.6	-7.1	IFITM1	Interferon-regulated
41745_at	-3.3	-5.3	-3.2	-3.5	IFITM3	Interferon-regulated
411_i_at	2.6	2.1	-3.7	-3.6	IFITM3	Interferon-regulated
36412_s_at	-3.4	-3.4	-2.6	-2.8	IRF7	Interferon-regulated
879_at	-2.2	-3.0	-2.0	-1.3	MX2	Interferon-regulated
38389_at	-3.5	-3.5	-2.0	-1.6	OAS1	Interferon-regulated
34378_at	2.4	1.9	9.8	12.2	ADFP	Membrane protein
31610_at	-4.7	-7.1	-2.3	-2.5	MAP17	Membrane protein
37360_at	-4.4	-8.6	-3.3	-2.7	LY6E	Membrane/cell surface
40522_at	8.1	6.1	2.3	1.4	GLUL	Metabolism, amino acid
32775_r_at	-5.0	-7.1	-2.2	-1.4	PLSCR1	Metabolism, lipid
33802_at	4.8	12.7	7.4	2.9	HMOX1	Metabolism, other
36203_at	-11.1	-8.4	-3.3	-4.4	ODC1	Metabolism, other
39425_at	3.4	6.9	5.0	6.3	TXNRD1	Mitochondrial, antioxidant
31637_s_at	2.2	5.4	2.4	4.2	NR1D1	Nuclear receptor
37230_at	2.3	3.2	2.9	3.1	KIAA0469	Protein binding
37310_at	-5.4	-7.6	-3.4	-2.5	PLAU	Protein kinase
41544_at	-1.6	-2.7	-2.6	-1.7	PLK2	Protein kinase
133_at	-3.7	-5.9	-2.3	2.3	CTSC	Proteolysis
36543_at	-1.9	-2.7	2.3	2.4	F3	Proteolysis
1549_s_at	-20.8	-22.6	-1.8	-2.6	SERPINB3	Proteolysis inhibitor
1343_s_at	3.8	2.5	2.5	-5.1	SERPINB3	Proteolysis inhibitor
672_at	1.3	-1.1	-3.5	-8.2	SERPINE1	Proteolysis inhibitor
1693_s_at	3.1	4.0	3.5	5.3	TIMP1	Proteolysis inhibitor, extracellular
31859_at	-45.1	-40.1	-5.1	-5.0	MMP9	Proteolysis, extracellular
634_at	5.9	11.0	3.0	2.9	PRSS8	Proteolysis, extracellular
41171_at	-3.4	-4.4	-2.5	-1.8	PSME2	Proteolysis, proteasome
40505_at	-4.6	-6.7	-4.4	-4.8	UBE2L6	Proteolysis, ubiquitin
39530_at	-4.2	-4.1	2.1	2.2	PDLIM7	Receptor
38433_at	-4.2	-3.7	1.0	-2.0	AXL	Receptor, growth factor

B.

Systematic	DEX		ZGA		Common	Function
	48h	72h	48h	72h		
41076_at	2.2	2.4	-1.7	-2.6	GJB3	Adhesion, junctional
37701_at	13.5	6.9	-4.1	-3.1	RGS2	Cell cycle
32382_at	2.1	1.5	-3.5	-3.1	UPK1B	Cytoskeletal, membrane
1826_at	1.6	2.6	-1.4	-2.4	RHOB	Cytoskeletal, Rho, Cdc42 pathw
41772_at	2.8	1.1	-2.3	-2.1	MAOA	Detoxification
31508_at	2.0	2.0	1.5	-4.4	TXNIP	Energy/Detox
40882_at	2.3	1.9	-1.9	-2.6	CES2	Enzyme
39991_at	2.6	4.4	1.0	-2.2	CDSN	Epidermal differentiation
35947_at	4.0	5.1	-1.7	-2.4	TGM1	Epidermal differentiation

Prilog 6. Mikročip analiza transkripcionog profila DEX i ZGA

Tretman sa DEX-om doveo je do statistički značajne promene ekspresije 394 gena, a tretman sa ZGA rezultirao je u promeni ekspresije 460 gena u dva nezavisna eksperimenta.

A, 106 gena je imalo sličan profil ekspresije u DEX i FPP tretiranim ćelijama

B, 11 gena je regulisano na suprotan način.

Otkrili smo da postoji opsežno preklapanje između gena regulisanih DEX-om i endogenim FPP-om. 106 gena je imalo sličan profil (supresija ili indukcija), a samo 11 gena je regulisano na suprotan način (Prilog 6A i B). Ovi podaci ukazuju da FPP, delujući kao GR agonista, dovodi do promene transkripcije slične grupe gena kao i GH. Sa druge strane postoji i značajan broj gena koji nisu regulisani na isti način. Jedno od mogućih objašnjenja za otkrivenu razliku u profilu genske ekspresije GH i FPP je aktivacija i drugih nuklearnih receptora FPP-om [53].

Kako bi dodatno analizirali rezultate dobijene mikročipom, dalji rad je fokusiran na skupove gena od značaja za različite faze procesa zarastanja rana. Korišćenjem komparativne genomske analize upoređeni su transkripcioni profili DEX i FPP tretiranih keratinocita [7]. Pronađeno je da su u naročito obogaćeni geni značajni za regulaciju gena koji kodiraju proteine koji učestvuju u formiranju citoskeleta, citomotilitetu, remodelovanju ekstracelularnog matriksa i interferon γ signalni put.

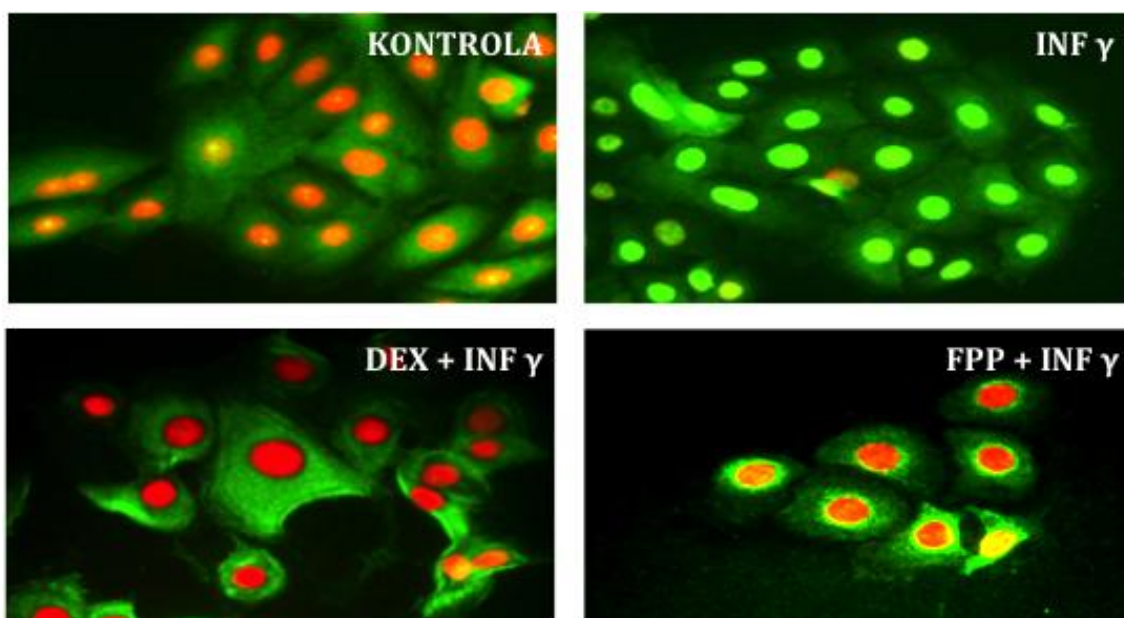
4.4. FPP inhibira interferon γ signalni put

Interferon γ predstavlja važnu komponentu zapaljenske faze zarastanja rane [22]. Analizom ekspresije gena sa sličnim profilom ekspresije i u DEX i ZGA tretiranim keratinocitima, pronađeno je da su IRF7, STAT-1 i 5 drugih gena povezanih sa interferon γ signalnim putem suprimirani dejstvom oba tretmana (Prilog 7B). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da postoji izvesno preklapanje između imunosupresivnih efekata GH i FPP. Za potvrdu funkcionalnog značaja ovog nalaza korišćena je tehnika imunofluorescencije kako bi se otkrilo da li FPP može da blokira aktivaciju STAT1 signalnog puta indukovanu interferonom γ .

Interferon γ po vezivanju za receptor dovodi do njegove konformacione promene sa posledičnom aktivacijom Janus kinaze 1 (JAK1) koja fosforiliše STAT1 na tirozinu 701. Fosfo-modifikovani STAT1 dimerizuje i prelazi u jedro, gde se potom vezuje za gama aktivirane sekvence (GAS), regulatorne elemente u okviru promotora gena regulisanih interferonom. U eksperimentu su korišćena četiri uslova kultivacije: a) kontrola, ne tretirani keratinociti b) keratinociti pretretirani

sa DEX-om 4 sata kako bi se omogućilo aktiviranje glukokortikoidnog receptora, a zatim se inkubirani tokom 30 minuta sa interferonom γ ; c) keratinociti pretretirani sa FPP-om 4 sata kako bi se omogućilo aktiviranje glukokortikoidnog receptora, a zatim se inkubirani tokom 30 minuta sa interferonom γ ; i d) keratinociti inkubirani tokom 30 minuta sa interferonom γ kao pozitivna kontrola.

A.



B.

Systematic	Fold Change	DEX		ZGA		Common	Function
		48h	72h	48h	72h		
33338_at	-11.10989	-9.7	-19.6	-7.5	-5.3	STAT1	Regulator, STAT
38432_at	-4.250012	-5.0	-11.0	-22.7	-18.7	G1P2	Interferon-regulated
32814_at	-14.28071	-12.8	-19.9	-2.7	-2.0	IFIT1	Interferon-regulated
38584_at	-14.60402	-11.9	-12.6	-2.5	-2.3	IFIT4	Interferon-regulated
675_at	-6.619554	-7.6	-26.7	-6.6	-7.1	IFITM1	Interferon-regulated
41745_at	-2.344682	-3.3	-5.3	-3.2	-3.5	IFITM3	Interferon-regulated
411_i_at	-1.732418	-2.6	-2.1	-3.7	-3.6	IFITM3	Interferon-regulated

Prilog 7. FPP blokira interferon γ signalni put

A, HEK obojeni anti-STAT1 antitelom (zelena boja). Vizualizacija jedara je postignuta bojenjem sa propidijum jodidom. keratinociti tretirani interferonom γ pokazuju translokaciju STAT1 u jedro. DEX i FPP kotretman blokira STAT-1 aktivaciju i translokaciju u jedro.

B, Mikročip analiza transkripcionog profila DEX i ZGA u keratinocitima pokazala je identičnu inhibiciju gena značajnih za interferon γ signalni put

Stimulacija HEK sa interferonom γ dovodi do snažne jedarne lokalizacije aktiviranog STAT-1 molekula. Nasuprot tome pretretman sa FPP-om, slično

dejstvu GH, blokira interferonom γ indukovanu STAT-1 aktivaciju i translokaciju u jedro (Prilog 7A). Dakle, moguće je zaključiti da FPP delujući kao agonista za GR, može da blokira dejstvo interferona γ . Ovaj efekat FPP ostvaruje ne samo smanjenjem ekspresije STAT-1, već i sprečavanjem njegove aktivacije u okviru JAK1-STAT1 signalnog puta.

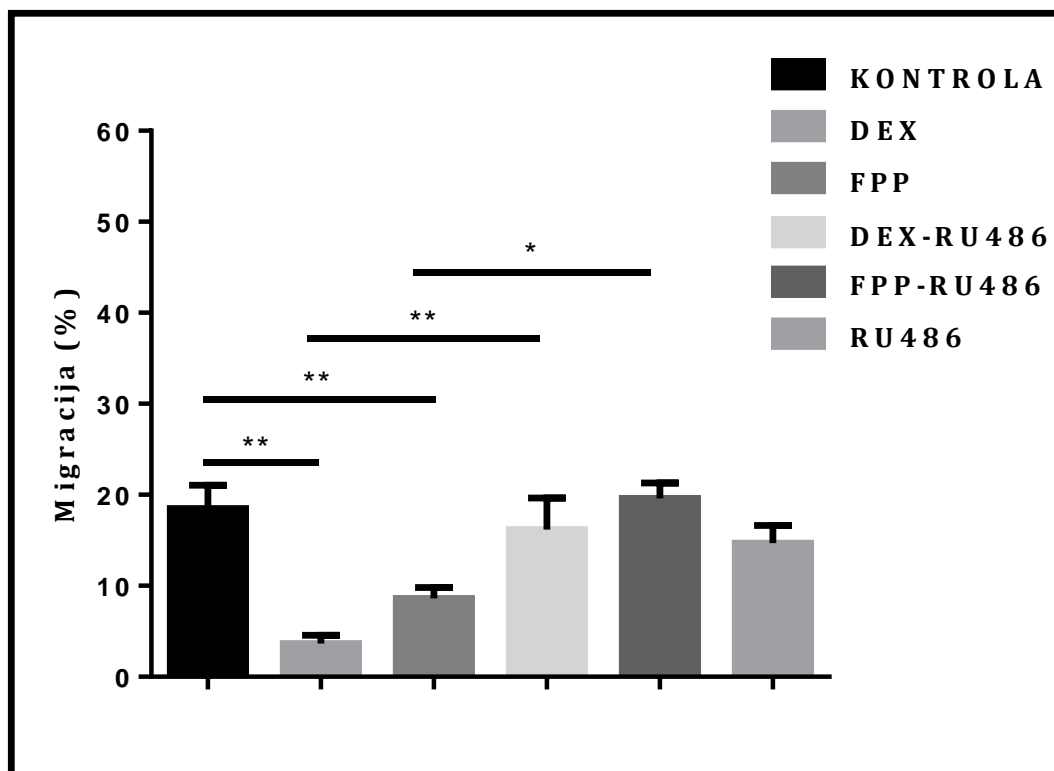
4.5. FPP inhibira migraciju keratinocita

Analiza mikročip rezultata pokazala je da postoji značajno preklapanje između DEX i ZGA u regulaciji gena koji učestvuju u procesima sinteze i remodelovanja citoskeleta i ekscelularnog matriksa, neophodnih u ćelijskoj migraciji. Karakterističan je nalaz inhibicije sinteze α aktina, β tubulina, matriks metaloproteinaze 9 (MMP9) i trombospondina-1. Adhezioni molekuli kao što su desmoglein1, integrin $\alpha 6$ i laminin 5 su takođe suprimirani posle 48, odnosno 72 sata tretmana, što ukazuje na inhibiciju formiranja fokalnih adhezija neophodnih za migraciju keratinocita. Da bi potvrdili funkcionalni značaja ovih rezultata, testirano je dejstvo FPP i ZGA na migraciju keratinocita.

Ranije je pokazano da GH inhibiraju migraciju keratinocita i štaviše poništavaju stimulatorni efekat EGF-a [60]. Da bi utvrdili da li će FPP, delujući kao agonista GH imati sličan inhibitorni učinak na migraciju, korišćen je test migracije keratinocita (*engl.* scratch test). Ćelije su kultivisane do dostizanja 80% konfluentnog rasta. Dvadeset četiri sata pre eksperimenta, ćelije su ispirane i inkubirane u bazalnom medijumu za kultivaciju keratinocita. Na dan početka eksperimenta u cilju inhibicije proliferacije, ćelije su tretirane sa mitomicinom C. Ogrobotine na konfluentnoj kulturi keratinocita su napravljene pomoću vrha sterilnog nastavka pipete (200 μ L) i potom slikane pomoću Carl Zeiss mikroskopa i Sony digitalnog fotoaparata.

Keratinociti su potom inkubirani u prisustvu ili odsustvu DEX, FPP, RU486, RU486/DEX ili RU486/FPP. Posle 48 sati od pravljenja ogrobotine, kultura ćelija je potom ponovo slikana u istom području kao što je to učinjeno na početku eksperimenta. Površina rane nepokrivena migrirajućim talasom keratinocita je kvantifikovana posle 48 sati uz pomoć ImageJ programa i izražena kao procenat od

inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama za svaku vremensku tačku i eksperimentalno stanje.



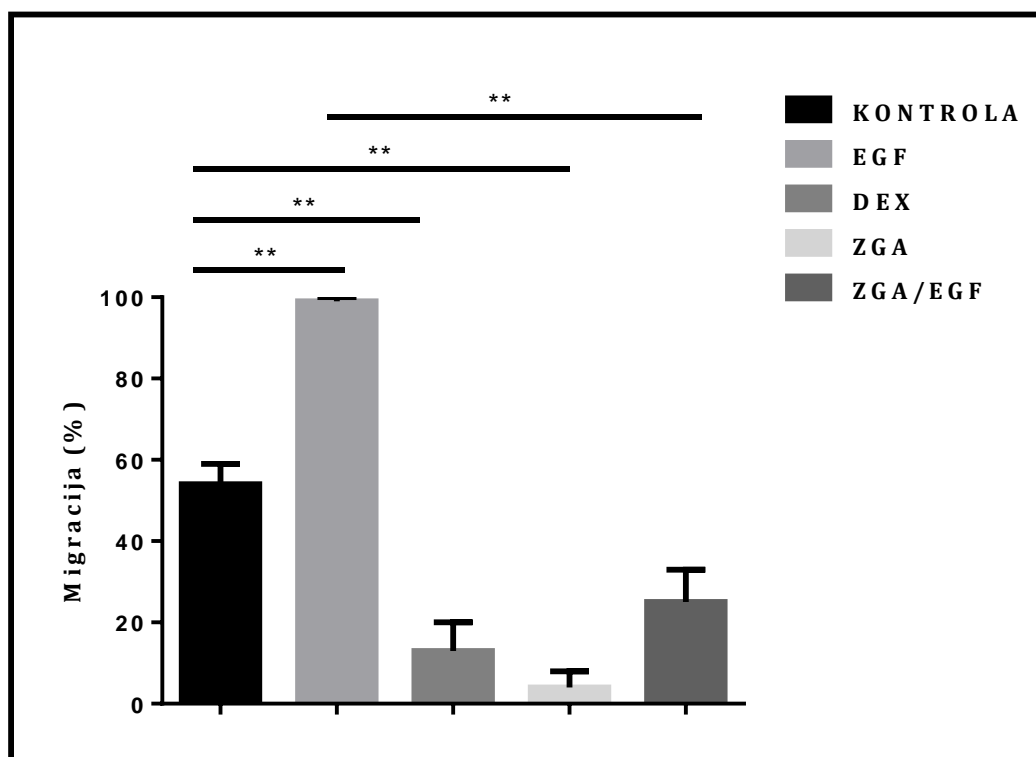
Prilog 8. FPP inhibira migraciju keratinocita.

DEX i FPP inhibiraju migraciju keratinocita. RU486 kao kompetitivni antagonista dovodi do poništava ovaj efekat. Migracija je izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama nakon 48 sati tretmana. Statistička značajnost: (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Kao što je i očekivano DEX i FPP su gotovo u potpunosti blokirali migraciju keratinocita. Da bi ispitali da li je ovaj efekat posredovan GR ćelije su tretirane istovremeno sa FPP i RU486 odnosno DEX i RU486. RU 486, koji deluje kao antagonista za GR, gotovo u potpunosti je preokrenuo inhibitorski efekat i DEX i FPP na migraciju keratinocita ukazujući da oni ostvaruju svoje dejstvo kroz glukokortikoidni receptor (Prilog 8).

Pošto je utvrđeno da egzogeno dodati FPP blokira migraciju keratinocita delujući kao agonista glukokortikoidnog signalnog puta, provereno je i da li endogeno sintetisani FPP ima isti efekat. Po istom modelu ćelije su inkubirane sa DEX, EGF, ZGA ili kombinacijom ZGA/EGF (Prilog 9). Netretirani keratinociti su

služili kao kontrola. ZGA je slično DEX blokirao kako bazalnu tako i migraciju keratinocita stimulisanu EGF-om nakon 48 sati tretmana. Ovaj rezultat je ukazao na mogućnost da porast nivoa endogeno sintetisanog FPP, usled inhibicije skvalen sintetaze sa ZGA aktivira GR i tako dovodi do inhibicije migracije keratinocita.

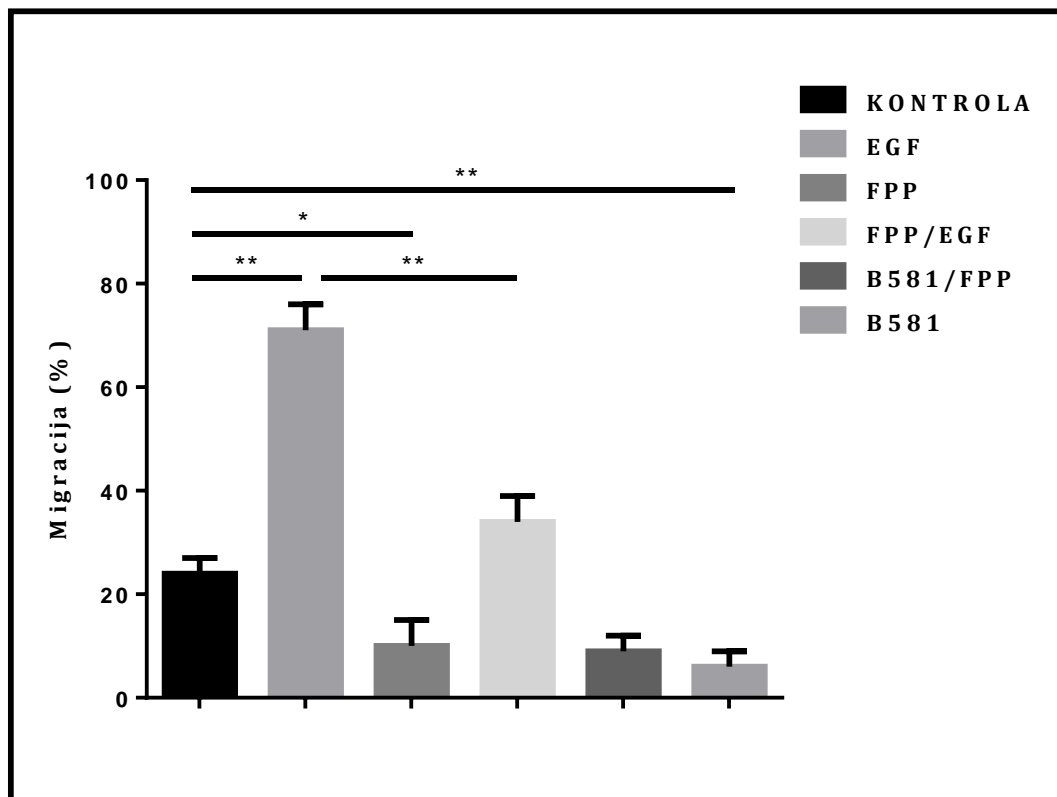


Prilog 9. ZGA inhibira migraciju keratinocita.

DEX i ZGA inhibiraju migraciju keratinocita. EGF je korišćen kao pozitivna kontrola. Migracija je izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama nakon 48 sati tretmana. Statistička značajnost: (**) $p < 0,01$.

FPP pored sinteze holesterola ima još jednu važnu ulogu u ćeliji i služi kao supstrat za farnezilaciju proteina. Farnezilacija je posttranskripciona modifikacija koja omogućava pravilno funkcionisanje mnogih signalnih molekula kao što su RAS, Rho i RAC. Kako bi dokazali da je ZGA efekat na migraciju posledica aktivacije GR endogeno sintetisanim FPP-om, a ne povećanja intenziteta farnezilacije signalnih molekula izveden je eksperiment u kome je nakon pravljenja ogrebotine, konfluentna kultura keratinocita tretirana sa FPP-om, EGF-om, EGF/FPP,

B581/FPP i B581. Posle 48 sati kvantifikovan je uticaj različitih tretmana na migraciju keratinocita *in vitro* (Prilog 10).



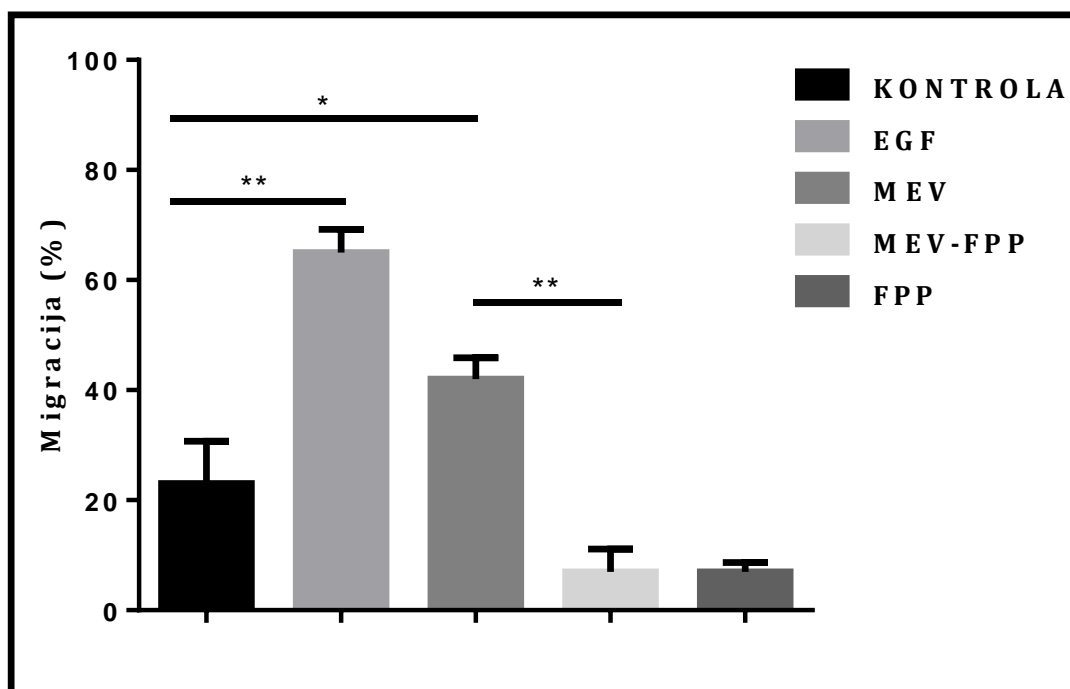
Prilog 10. B581 i FPP inhibiraju migraciju keratinocita.

FPP inhibira bazalnu i EGF-om stimulisanu migraciju keratinocita B581, ima sličan efekat na migraciju i ne modifikuje dalje efekat FPP-a. Migracija je izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama nakon 48 sati tretmana. Statistička značajnost: (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Dokazano je da FPP inhibira i bazalnu i EGF-om stimulisanu migraciju keratinocita. Interesantno je da B581 inhibitor farnezilacije proteina, ima sličan efekat na migraciju HEK i ne modifikuje dalje efekat FPP-a. Ovaj rezultat predstavlja dokaz da je FPP-om indukovana inhibicija migracije keratinocita posredovana njegovim dejstvom na GR, a ne posledica povećanja intenziteta farnezilacije proteina.

Pošto mevastatin, inhibitor HMG-CoA reduktaze uzvodnog enzima u biosintezi holesterola, dovodi do smanjenja bazalnog nivoa FPP u ćelijama [81, 94]

ispitan je njegov efekat na migraciju keratinocita korišćenjem scratch testa u kontekstu prethodnih rezultata. Mevastatin je nakon 48 sati tretmana doveo do dvostrukog povećanja migracije keratinocita u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije (Prilog 11).



Prilog 11. Mevastatin stimuliše migraciju HEK inhibicijom sinteze endogenog FPP.

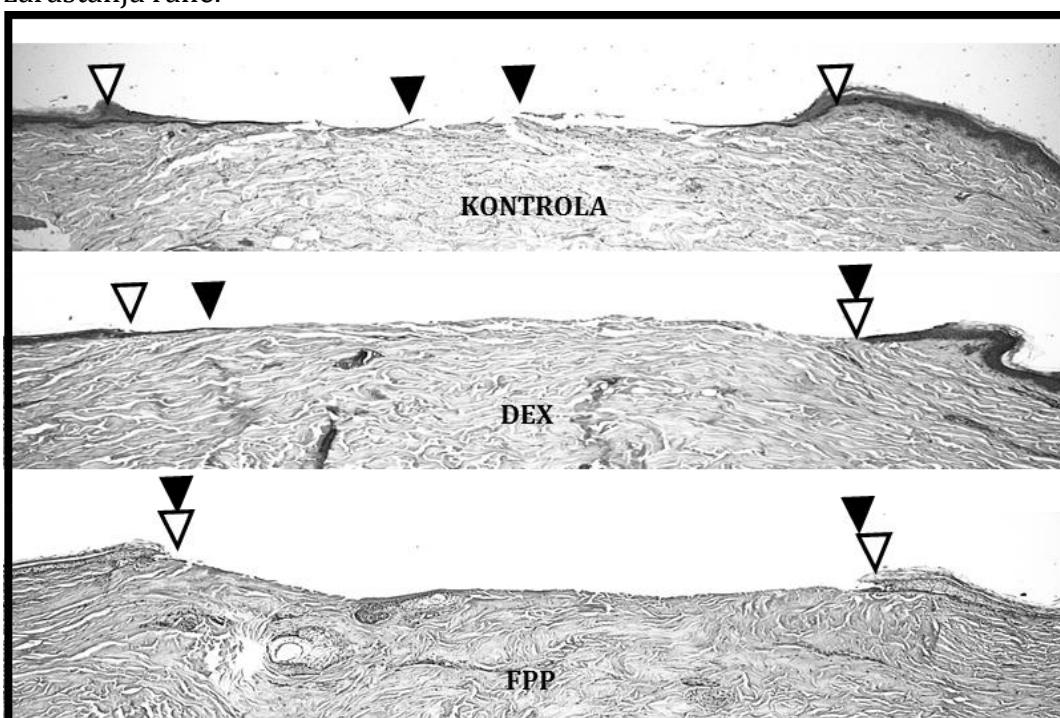
Mevastatin (MEV) stimuliše migraciju keratinocita. Kotretman sa FPP dovodi poništava ovaj efekat. Migracija je izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama nakon 48 sati tretmana. Statistička značajnost: (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Međutim simultani tretman sa FPP-om je ne samo sprečio ovaj efekat mevastatina, već je i doveo do dalje inhibicije migracije slične korišćenju FPP-a samostalno. Ovi rezultati govore u prilog hipoteze, da FPP delujući kao agonista GR inhibira migraciju keratinocita, dok statini mogu pospešiti migraciju blokirajući upravo sintezu endogenog FPP.

4.6. FPP inhibira zarastanje rane ex vivo

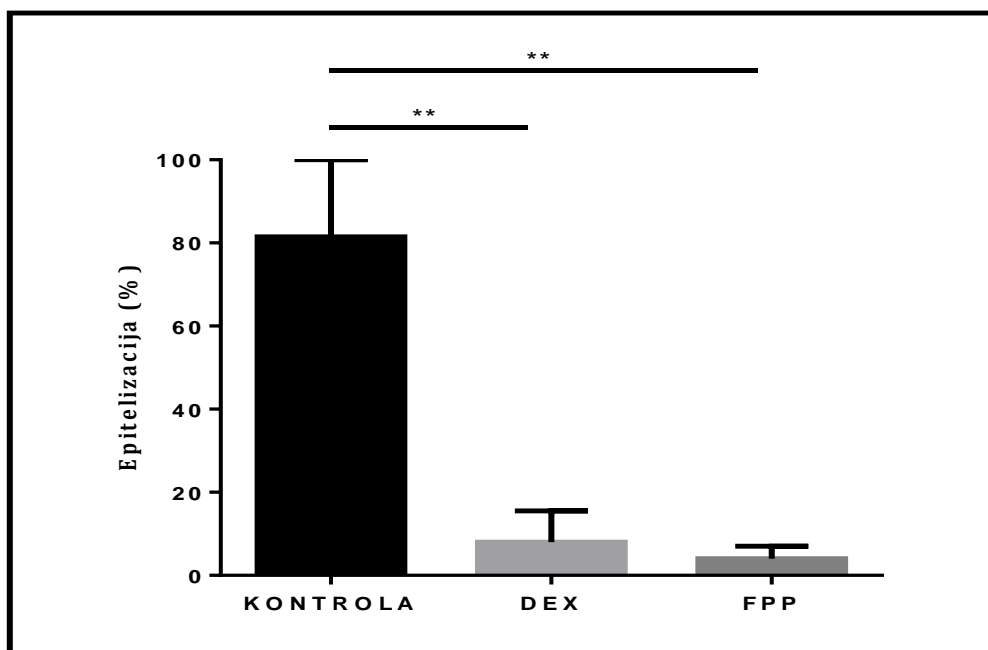
Pošto smo prethodno pokazali da FPP može da inhibira migraciju keratinocita analogno DEX, pristupili smo ispitivanju efekta FPP na epitelizaciju rane, koristeći *ex vivo* model organo-kuture akutne rane ljudske kože. Uzorci

normalne ljudske kože dobijene abdominoplastikom i redukcijom mamoplastikom su očišćeni od subkutane masnoće. Dalja procedura je podrazumevala biopsiju i sečenje tkiva čime su napravljeni uzorci veličine 6 mm sa ranom u obliku diska od 3 mm u centru i koja zahvata epidermis i površni papilarni sloj dermisa. Tako dobijeni uzorci su uzgajani u interfazi vazduha i tečnosti u inkubatoru. Po potrebi eksperimenta uzorci su uzgajani u prisustvu ili odsustvu 1 μ M deksametazona ili 10 μ M FPP-a. Tretman deksametazonom je korišćen kao negativna kontrola epitelizacije. Četiri dana nakon početka tretmana, uzorci tkiva su fiksirani u 4% paraformaldehidu, obrađeni i ukalupljeni u tečni parafin. Tkivo je potom secirano pomoću mikrotoma i preseki tkiva su potom obojeni kombinacijom hematoksilina i eozina. Potom je proces epitelizacije i zarastanja rane kvantifikovan planimetrijom (Prilog 12 A i B). Kao što je i očekivano FPP je slično deksametazonu gotovo u potpunosti inhibirao epitelizaciju i zarastanje rane u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Na osnovu ovog rezultata zaključeno je da egzogeno dodati FPP inhibira epitelizaciju tokom akutnog zarastanja rane.



Prilog 12 A. FPP inhibira zarastanje ljudske rane ex vivo

Hematoksin i eozin bojenje pokazuje usporenu epitelizaciju nakon tretmana akutnih humanih *ex vivo* rana DEX-om i FPP-om. Prazne strelice pokazuju ivice rane nakon nanošenja povrede, dok pune strelice ukazuju na epitelizovane ivice migratorne zone 4 dana nakon nanošenja povrede.

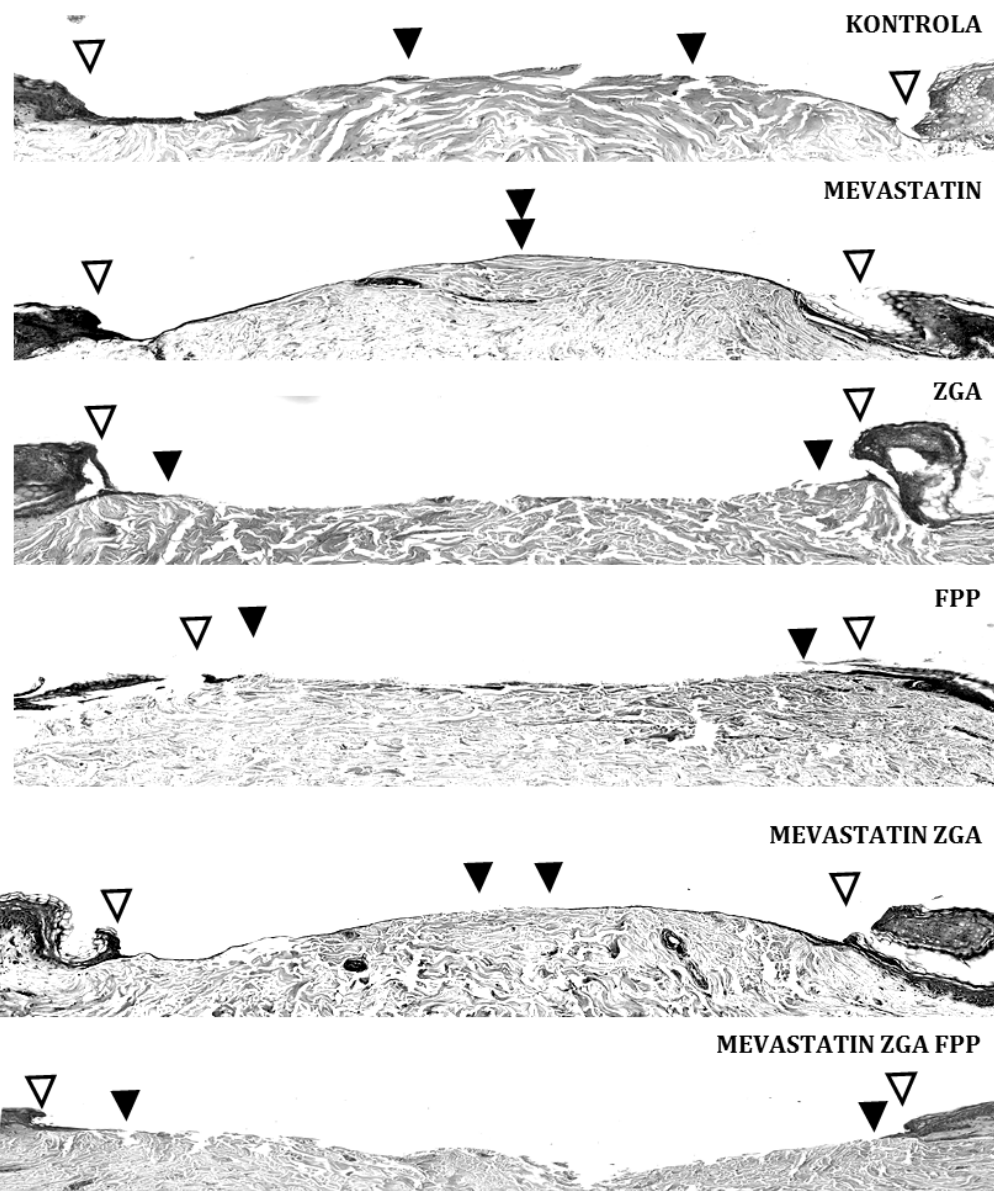


Prilog 12B. FPP inhibira zarastanje ljudske rane ex vivo

Ekperiment prikazan u Prilogu 12 A je ponovljen tri puta u triplikatu. I DEX i FPP dovode do statistički značajne ($p < 0.01$) inhibicije epitelizacije humanih *ex vivo* rana. Epitelizacija je izražena kao procenat inicijalne površine rane nepokrivene ćelijama nakon 4 dana tretmana.

4.7. Mevastatin pospešuje zarastanje rane ex vivo

U narednom eksperimentu ispitano je da li promena nivoa endogenog FPP može da utiče na zarastanja rane.



Prilog 13. Mevastatin pospešuje zarastanje ljudske rane ex vivo

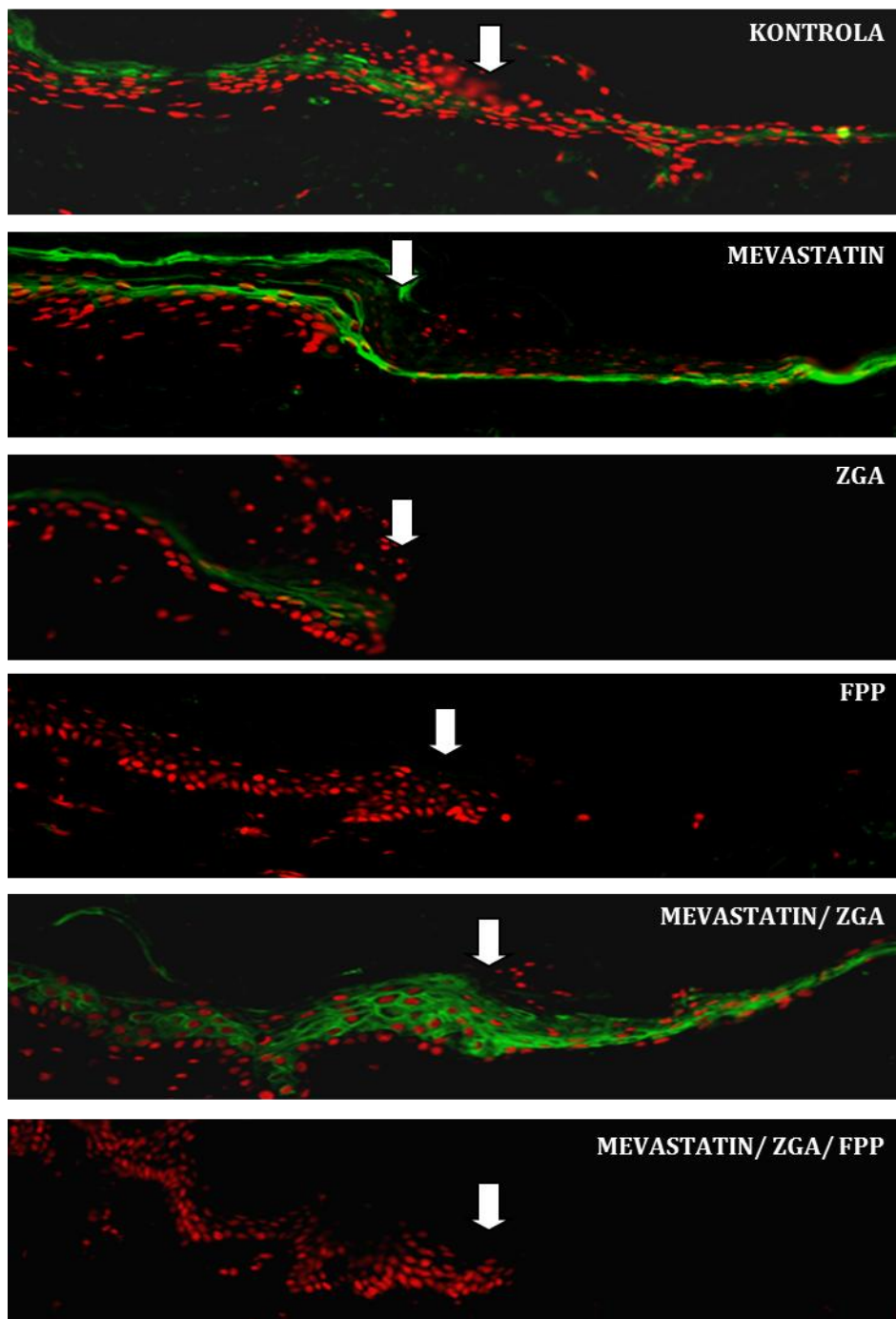
Ubrzana epitelijalizacija akutnih humanih *ex vivo* rana sa pod dejstvom mevastatina. ZGA i FPP inhibiraju epitelizaciju. Kotretman sa mevastatinom je poništio efekat ZGA, ali ne i u slučaju dodavanja egzogenog FPP-a. Hematoksilin i eozin bojenje. Prazne strelice pokazuju ivice rane nakon nanošenja povrede, dok pune strelice ukazuju na epitelizovane ivice migratorne zone 4 dana nakon nanošenja povrede.

Uzorci kože sa nanešenim akutnim ranama su inkubirani u prisustvu ili odsustvu 10 μM FPP, 10 μM mevastatina, 50 μM ZGA ili kombinacija mevastatin/ZGA i mevastatin/ZGA/FPP. Tretman rana sa ZGA je inhibirao epitelizaciju i zarastanje rana u odnosu na kontrolu, identično efektima egzogenog FPP-a (Prilog 13). Ovo je najverovatnije posledica akumulacije endogenog FPP-a pod dejstvom ZGA, jer je ovaj efekat u potpunosti blokiran kotretmanom sa mevastatinom. Mevastatin sprečava akumulaciju endogenog FPP usled inhibicije uzvodnog enzima HMG-CoA reduktaze. Dodatno, dodavanje egzogenog FPP ranama inkubiranim sa mevastatinom i ZGA dovodi opet do inhibicije epitalizacije. Na osnovu ovog rezultata nameće se zaključak da je inhibitorski efekat ZGA posledica povećanja nivoa FPP, a ne inhibicije farnezilacije ili smanjenja sinteze holesterola kao finalnog proizvoda mevalonatnog sintetskog puta.

Nasuprot efektu FPP i ZGA, samostalna primena mevastatina je čak i podstakla epitelizaciju i poboljšala stepen zarastanja u odnosu na kontrolu, najverovatnije usled smanjena bazalnog nivoa FPP u ćelijama i njegovog dejstva na GR (Prilog 13).

Pošto je prethodno pokazano da se efekat glukortikoidnih hormona na inhibiciju epitelizacije i zarastanja rane delimično ostvaruje i posredstvom inhibicije ekspresije ranog markera epitelizacije keratina 6, želeli smo da ispitamo da li se dejstvo FPP i ZGA zasniva na istom mehanizmu. U tom cilju koristili smo opet model zarastanja akutne rane *ex vivo*.

Po potrebi eksperimenta uzorci su kultivisani u prisustvu ili odsustvu 10 μM FPP, 10 μM mevastatina, 50 μM ZGA ili kombinacije treatmana: mevastatin/ZGA i mevastatin/ZGA/FPP. Nakon četiri dana tkivo kože kojoj je izazvana rana smo pripremili za imunofluorescentno bojenje sa specifičnim anti-keratin 6 antitelom. U kontrolnim, netretiranim ranama uočena je jasna reepitelizacija dna rana uz prisustvo signala za K6 i u ivici rane i u migrirajućem frontu keratinocita koji su učestvovali u reepitelizaciji. Tretman sa mevastatinom je stimulisao robusnu ekspresiju K6 u ivici rane i frontu reepitelizacije. Nasuprot tome ZGA i FPP su u potpunosti blokirali ekspresiju K6. Kotretman sa mevastatinom je preokrenuo efekat ZGA, ali ne i u slučaju dodavanja egzogenog FPP-a (Prilog 14).



Prilog 14. Povećanje koncentracije endogenog FPP usporava epitelizaciju rane usled inhibicije ekspresije keratina 6, dok mevastatin ima suprotan efekat.

Humane *ex vivo* rane obojene anti-K6 antitelom (zelena boja). Vizualizacija jedara je postignuta bojenjem sa propidijum jodidom. U kontrolnim ranama K6 je lokalizovan u keratinocitima na ivici rane i frontu epitelizacije. ZGA i FPP suprimiraju ekspresiju K6 i usporavaju epitelizaciju. Mevastatin je ustanju da preokrene efekat ZGA usled ushodnog bloka u sintezi FPP. Međutim, dodavanje egzogenog FPP-a ponovo uspostavlja inhibiciju epitelizacije i ekspresije K6.

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji pokazano je da FPP, međuproizvod u biosintezi holesterola, može da inhibira epitelizaciju i zatvaranje rana delujući kao agonista glukokortikoidnog receptora. S druge strane, pokazano je da statini promovišu zarastanje rana novootkrivenim mehanizmom dejstva, koje se upravo zasniva na inhibiciji mevalonatnog sintetskog puta i konsekvantnom smanjenju nivoa endogenog FPP kao i njegovog dejstva na GR. Otkriće mehanizma kojim FPP može da inhibira migraciju keratinocita i epitelizaciju, predstavlja novi pomak u razumevanju biološke uloge steroidnih hormona i njihovih receptora, jer u ovom slučaju funkcionalna aktivacija glukokortikoidnog signalnog puta ne zavisi od prisustva GH i posledica je dejstva endogeno prisutnog metabolita koji ne pripada steroidnoj familiji molekula. Ovi rezultati pružaju uvid u do sada nepoznate mehanizme regulacije zarastanja rana i otvaraju mogućnost novih terapijskih pristupa u korišćenju statina kao lekova u terapiji, kako akutnih tako i hroničnih rana.

Dokazi iznešeni u ovoj disertaciji snažno podupiru tvrdnju da FPP inhibira zarastanje rana delujući putem aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta, a ne putem alternativnih mehanizma poput dejstva na farnezilaciju proteina ili biosintezu sterola.

Prvo, dokazano je da inkubacija ćelija sa FPP dovodi do aktivacije GR. Ovaj efekat je jasno pokazan na osnovu dramatičnog povećanja količine glukokortikoidnog receptora fosforilisanog na serinu 211 (Prilog 1) i njegove translokacije u jedro (Prilog 2), što predstavlja prvi, neophodni korak u ostvarivanju efekata glukokortikoida na ekspresiju ciljnih gena. Ova karakteristična posttranslaciona modifikacija je direktna posledica vezivanja funkcionalnog agoniste poput DEX za ligand vezujući domen GR i izostaje ukoliko se za receptor veže antagonist poput RU486. Prethodno je pokazano da stepen fosforilacije GR na serinu 211 direktno korelira sa intenzitetom efekta glukokortikoidnih hormona na transkripciju ciljnih gena, što nam ukazuje na mogućnost da FPP deluje kao agonista u GH signalnom putu [65]. Dodatni dokaz predstavlja i rezultat da pored egzogeno dodatog i akumulacija endogenog FPP-a,

posredstvom inhibicije enzima skvalen sintaze zaragozinskom kiselinom dovodi do aktivacije GR. ZGA dovodi do povećanja nivoa endogenog FPP sprečavajući njegov dalji metabolizam u pravcu biosinteze holesterola, što ukazuje da aktivacija glukokortikoidnog receptora FPP-om nije posledica povećane biosinteze holesterola i steroidnih hormona u ćelijama kože, već direktnog dejstva ovog metabolita na receptor. Ovu hipotezu potvrđuje i činjenica da ko-inkubacija sa mevastatinom, koji blokira sintezu FPP inhibirajući ushodni enzim HMG-CoA reduktazu (Shema 2), sprečava aktivaciju GR sa ZGA (Prilog 2).

Drugo, i DEX i FPP dovode do vezivanja GR za regulatorne elemente GRE u okviru promotora ciljnih gena poput keratina 6, što je dokazano esejom imunoprecipitacije hromatina (Prilog 3). GRE predstavljaju specifičnu sekvencu DNK regulatornog regiona gena, koja omogućava vezivanje aktiviranog glukokortikoidnog receptora. Po vezivanju za GRE receptor potom regrutuje različite ko-represore i ko-aktivatore uz čiju pomoć dovodi do transaktivacije i transrepresije ciljnih gena [68-70]. U ovom eksperimentu centar interesa je bio na K6, jer pored direktne transrepresije gena kao posledice vezivanja GR za takozvane negativne GRE i regrutovanja ko-represora, postoji i indirektna (*eng. tethered*) koja se zasniva na vezivanju glukokortikoidnog receptora za druge transkripcione faktore poput NF- κ B, sa posledičnom blokadom ekspresije njihovih ciljnih gena [70]. Pošto je prethodno pokazano da glukokortikoidi kao agonisti indukuju vezivanja glukokortikoidnog receptora za specifične negativne GRE, pod nazivom KRE, u okviru promotora gena za keratin 6 i dovode do direktne transrepresije [95, 96], rezultat iz ove disertacije pruža dodatni nivo dokaza da FPP deluje kao agonista za GR na identičan način kao i GH, a ne posredstvom sekvestracije drugih transkripcionih faktora.

Treće, pokazano je da vezivanje FPP-om aktiviranog receptora za DNK ima i funkcionalni značaj, jer dovodi do inhibicije ili aktivacije ekspresije ciljnih gena dejstvom na njihov promotor, identično dejstvu agoniste kao što je DEX (Prilog 4). Dodatni dokaz da ove efekte FPP ostvaruje kao agonista glukokortikoidnog receptora, predstavlja nalaz da koinkubacija sa RU486, kompetitivnim inhibitorom

glukokortikoidnih hormona koji deluje kao antagonista za GR, sprečava supresiju ili aktivaciju ekspresije ciljnih gena indukovanu i FPP-om i DEX-om (Prilog 5).

Pošto su *in vitro* eksperimenti pokazali da FPP, delujući kao agonista GR, može da izazove slične efekte na ekspresiju nekih ciljnih gena kao i glukokortikoidni hormoni, postavlja se pitanje šireg fiziološkog značaja ovog nalaza. Interesantno je da je analiza genske ekspresije 12653 gena mikročip tehnikom (Prilog 6), pokazala značajno, iako ne potpuno preklapanje genomskih efekata GH i FPP-a. Tretman sa GH doveo je do statistički značajne promene ekspresije 394 gena, dok je endogeni FPP doveo do promene u ekspresiji 460. Pri čemu je 106 gena imalo sličan profil, dok je 11 gena regulisano na suprotan način.

Ova razlika verovatno ima dvojako poreklo. Sa jedne strane prethodno je pokazano da pored GR, FPP može da deluje kao ligand i za nekoliko drugih nuklearnih receptora poput tiroidnog i estrogenog [53], što bi moglo delimično da objasni zašto su neki geni regulisani samo FPP-om, a ne i GH. Drugi potencijalni mehanizam ovih razlika je mnogo složeniji. Mehanizam kojim agonisti nuklearnih receptora poput GR regulišu ekspresiju ciljnih gena je kompleksan. Po vezivanju agoniste za centralnu šupljinu u ligand vezujućem domenu receptora dolazi do konformacione promene DNK vezujućeg domena, što će omogućiti interakciju sa regulatornim regionom gena. Međutim istovremeno dolazi i do reorijentacije heliksa 12 čime se stvara hidrofobna brazda na površini receptora [97, 98]. Ova hidrofobna površina potom služi kao sidrište za vezivanje ko-represora ili ko-aktivatora, koji omogućavaju GR da ostvari puni efekat na ekspresiju ciljnog gena. Interesantno je da tip ko-regulatora koji će se vezati za GR ne zavisi samo od konformacione promene receptora uzrokovane agonistom, već i dodatne promene tercijarne strukture uzrokovane vezivanjem za DNK regulatornog regiona specifičnog gena. Antagonisti poput RU486 vezuju se za ligand vezujući domen receptora na način koji onemogućava formiranje funkcionalnog sidrišta za ko-regulatore i na taj način blokiraju efekat GR na ekspresiju gena [99]. Međutim, posledice vezivanje mešovitim antagonista-agonista su mnogo kompleksnije, jer konformaciona promena receptora koju oni uzrokuju je samo delimično drugačija u odnosu na klasične agoniste. Ovo ima za posledicu da će u zavisnosti ciljnog gena, GR aktiviran mešovitim antagonist-agonistom biti u stanju da imitira efekat

agoniste, nema efekat ili će pak vezati širi spektar ko-regulatora. Mi smo prethodno pokazali u eksperimentima sa tranzijentnom transfekcijom da u kontekstu K6 promotora, GR aktiviran i FPP-om i DEX-om je u stanju da regrutuje ko-regulatore β -katenin i protein arginin metiltransferazu CARM-1 i tako potencira transrepresiju K6 gena [54]. Nasuprot tome, kada je korišćen plazmid koji sadrži 6 konsenzus sekvenci pozitivnog GRE u okviru regulacionog regiona GRE-CAT reporter gena, FPP-om aktiviran glukokortikoidni receptor nasuprot dejstvu DEX-a nije bio u stanju da regrutuje CARM-1 i β -katenin i tako potencira dejstvo na stimulaciju ekspresije [54].

Interesantno je da je mikročip analiza pokazala značajno preklapanje u regulaciji gena koji imaju ulogu u različitim fazama zarastanja rana poput inflamatornih molekula uključenih u IFN γ signalni put, adhezionih molekula kao i gena koji učestvuju u regulaciji i remodelovanju citoskeleta i ekstracelularnog matriksa neophodnog u ćelijskoj migraciji. Za potvrdu funkcionalnog značaja ovih rezultata, testirali smo dejstvo FPP-a na IFN γ signalni put i pokazali da ovaj molekul poput GH dovodi do blokade STAT1 translokacije u jedro (Prilog 7A i B). Ovaj rezultat ukazuje da FPP kao ligand za glukokortikoidni receptor, bar delimično ostvaruje neke od antizapaljenskih efekata GH, što zajedno sa supresijom gena značajnih za faze proliferacije i remodelovanja doprinosi njegovom inhibitornom dejstvu na zarastanje rana.

U funkcionalnom smislu izuzetno je značajno da i egzogeni i endogeni FPP ostvaruju identičan inhibitorni efekat na migraciju keratinocita i epitelizaciju na sličan način kao i DEX, posredstvom aktivacije GR (Prilog 8, 9, 12 i 13). Povećanje intracelularne koncentracije FPP u eksperimentima koji su deo ove disertacije postizano je blokadom u njegovog daljeg metabolizma u pravcu sterola, inhibicijom enzima skvalen sintetaze. Ovaj efekat ZGA je u potpunosti blokiran koinkubacijom sa mevastatinom, koji dovodi do deplecije endogenog FPP-a, inhibicijom početnog enzima u mevalonatnom sintetskom putu, HMG-CoA reduktaze. Ovaj rezultat dodatno dokazuje da se inhibitorni efekat ZGA ostvaruje posredstvom dejstva endogenog FPP na glukokortikoidni receptor, a ne usled sniženja proizvodnje holestrola. Međutim tu se postavlja pitanje da li povećanje

nivoa FPP-a u ćelijama možda dovodi do inhibicije migracije promenom aktivnosti farnezilaziji proteina. Ovo pitanje naročito dobija na značaju jer je pokazano da mevastatin ne samo da sprečava inhibitorski efekat ZGA, već i sam po sebi pospešuje migraciju i epitelizaciju (Prilog 11 i 13). Naša hipoteza je da je ovo posledica sniženja nivoa endogenog FPP u ćelijama i posledičnog smanjenja aktivacije GR.

Klasični mehanizam dejstva kojim se objašnjavaju plejotropni efekti statina poput imunomodulacije i smanjenje oksidativnog stresa je inhibicija farnezilacije, usled smanjenja nivoa endogenog FPP-a [100]. Farnezilacija predstavlja posttranslacionu modifikaciju kojom se na cistein proteina dodaje farnezil grupa u formi tioetra. Farnezilacija, zbog hidrofobnog karaktera ove grupe, omogućava vezivanje modifikovanog proteina za ćelijsku membranu [101]. Ciljni proteini su najčešće mali signalni molekuli iz Ras familije GTPaza, za čije je dejstvo u prenosu signala sa intracelularnog domena membranskih receptora neophodna membranska lokalizacija [102]. Ovi molekuli učestvuju u čitavom nizu signalnih puteva kojima se regulišu ćelijska proliferacija, genska transkripcija, inflamacija i oksidativni stress [103-105]. Ova sposobnost statina da sniženjem nivoa FPP-a u ćelijama utiču na funkciju čitavog niza signalnih molekula i puteva, dugo je korišćena kao osnovno objašnjenje mehanizma kojim se ostvaruju plejotropni efekti ovih lekova, a koji su značajni za njihovu potencijalnu terapijsku ulogu u nizu poremećaja poput ateroskleroze, reumatoloških oboljenja, kancera i preeklampsije [106-108].

Pošto u našim eksperimentima i egzogeno dodati i endogeni FPP inhibiraju migraciju keratinocita i epitelizaciju rana (Prilog 8, 9 i 12), nametnulo se logično pitanje da li povećanje nivoa FPP u ćelijama dovodi do stimulacije farnezilacije signalnih molekula i tako doprinosi negativnoj regulaciji ovih procesa. Međutim, eksperiment u kome su keratinociti tretirani sa B581, inhibitorom farnezil transferaze, pokazao je da povećanje intenziteta farnezilacije ne doprinosi inhibitorskom efektu FPP na migraciju (Prilog 10), jer inhibicija ovog procesa takođe dovodi do usporavanja migracije. Intrigantno je da je prethodno pokazano da inhibicija farnezilacije dovodi do povećanja nivoa ćelijskog FPP slično dejstvu ZGA [109], čime se može objasniti ovaj efekat. Sa druge strane, ovaj rezultat je

potvrdio i da stimulacija migracije keratinocita i epitelizacije rane statinima, nije posredovana inhibicijom farnezilacije, jer blokada farnezil transferaze sama po sebi ima suprotan učinak. Dakle, malo je verovatno da mevastatin pospešuje migraciju keratinocita i zarastanje rana kroz inhibiciju farnezilacije proteina.

Ovo istraživanje takođe ne podupire mogućnost da je učinak mevastatina na stimulaciju migracije posledica inhibicije sinteze holesterola. Pokazano je da mevastatin inhibicijom sinteze endogenog FPP-a (Prilog 13 i 14) pospešuje zarastanje kako kontrolnih, tako i rana inhibiranih sa ZGA. Nasuprot tome, kada je dodat egzogeni FPP ranama inkubiranim sa mevastatinom i ZGA epitalizacije je opet bila inhibirana. Dakle, pošto i ZGA (koji inhibira sintezu holesterola, ali povećava nivo endogenog FPP) i egzogeni FPP (koji kao supstrat povećava sintezu holesterola) inhibiraju migraciju keratinocita, može se zaključiti da je stimulatorni efekat mevastatina bio posledica sniženja nivoa FPP, a ne inhibicije sinteze sterola. Na ovaj način je pokazano da efekti na farnezilaciju i inhibiciju sinteze sterola, nemaju značajnu ulogu kako u mehanizmu inhibicije migracije i epitelizacije FPP-om, tako i u mehanizmu stimulacije ovih procesa statinima.

Na osnovu mikročip analize može se zaključiti da je mehanizam kojim FPP posredstvom aktivacije GR dovodi do inhibicije zarastanja rana veoma kompleksan i uključuje dejstvo na važne komponente različitih faza ovog procesa. Mi smo prethodno pokazali da GH delimično ostvaruju inhibiciju zarastanja rane represijom K6 i K16, citoskeletnih proteina koji predstavljaju rane markere epitelizacije rane i za koje se pretpostavlja da povećavaju viskoelasticitet ćelija neophodan za uspešnu migraciju. U ovom istraživanju je pokazano da FPP inhibira epitelizaciju sličnim mehanizmom koji uključuje represiju K6 (Prilog 14). Interesantan je nalaz da mevastatin povećava sadržaj ovog ranog markera zarastanja rane u koži.

Iako se pune biološke implikacije ovih rezultata tek treba da razjasne, oni otvaraju niz zanimljivih puteva za dalje istraživanje. Pošto je prethodno pokazano da FPP može delovati kao ligand za nekoliko nuklearnih receptora, otkriće da statini mogu da menjaju aktivnost gluokortikoidnog signalnog puta modulacijom koncentracije endogenog FPP koji deluje kao agonista za GR, predstavlja novi mehanizam dejstva kojim se mogu da objasne neki od plejotropnih učinaka statina.

Jedan od dobro dokumentovanih plejotropnih efekata je poboljšana reparacija tkiva [88, 110-113]. Nedavno je pokazano da simvastatin pospešuje zaceljivanje rana, kako kod dijabetičnih miševa i tako i kod njihovih normoglikemičnih parnjaka [87].

U ovoj studiji pokazano je da povećanje nivoa endogenog FPP dovodi do aktivacije glukokortikoidnog signalnog puta i posledično do inhibicije migracije HEK i zarastanja rana *ex vivo*. Štaviše, taj učinak bio je nezavisan o modulaciji izoprenilacije i sterologeneze i može biti poništen pomoću mevastatina. Od posebnog interesa je nalaz da topikalna primena mevastatina podstiče zatvaranje rane. Prema tome, moguće je da terapija statinima može izazvati pozitivno dejstvo na zarastanje kako akutnih tako i hroničnih rana *in vivo* kod ljudi. Međutim, delotvornost takve terapije zavisi od toga da li postoji dovoljan bazalni nivo FPP u ćelijama da ostvari efekat na aktivaciju GR u koži *in vivo*, a naročito u patološkim stanjima kao što su hronične rane. Interesantno je da je koža jedno od tkiva sa visokim intenzitetom sinteze holestrola. Dodatno, prethodno je pokazano da faktori rasta, hormoni i oštećenje kože mogu izazvati indukciju epidermalne HMG-CoA reduktaze [114-116], što povećava koncentraciju endogenog FPP. Od naročitog značaja u ovom kontekstu je studija koja je pokazala da je bazalni nivo FPP u ćelijama jetre oko 5 μM i da se povećava na 140 μM nakon primene ZGA [117]. U ovom istraživanju pokazano je da je dodatak od samo 10 μM egzogenog FPP u medijum za ćelijsku kulturu bio dovoljan da dovede do aktivacije GR i izazove duboke posledice na migraciju keratinocita. Stoga možemo zaključiti da smanjenje bazalnog nivoa FPP u koži može potencijalno imati terapijski značaj u stimulaciji zarastanja rana *in vivo*. Dodatna istraživanja koja su neophodna u cilju dokazivanja ove hipoteze su opravdana, jer topikalna primena statina može biti siguran i klinički izuzetno koristan terapijski pristup kod pacijenata sa hroničnim rana rezistentnim na standardne načine lečenja [118, 119].

Potencijalni značaj našeg istraživanja je višestruk. Sa aspekta razumevanja fizioloških mehanizama izuzetno je interesantan nalaz da FPP, važan intermedijer u mevalonatnom putu sinteze sterola i izopreniliranih ćelijskih metabolita, može da deluje kao ligand za glukokortikoidni receptor, iako ne deli zajedničku strukturu sa steroidnim hormonima. Pošto je mevalonatni put aktivan u većem

broju tkiva, izuzetno je zanimljiva hipoteza da prisutni endogeni FPP dejstvom na GR, održava bazičnu aktivnost glukokortikoidnog signalnog puta i tako obezbeđuje kontrolu imunološkog odgovora u koži i drugim tkivima. Takođe, izuzetno je začajan i nalaz, da statini smanjuju aktivnost glukokortikoidnog signalnog puta i tako pospešuju migraciju keratinocita i zarastanje rana, posredstvom inhibicije sinteze FPP-a u ćelijama. Pošto je prethodno pokazano da FPP pored glukokortikoidnog, može delovati i kao ligand za niz drugih nuklearnih receptora, ovaj rad predstavlja osnovu za razumevanje novootkrivenog mehanizma dejstva statina, kojim bi se mogli objasniti neki od njihovih plejotropnih efekta.

6. ZAKLJUČCI

1. Farnezil-pirofosfat, intermedijarni metabolit u mevalonatnom biosintetskom putu, deluje kao agonista glukokortikoidnog signalnog puta aktivirajući glukokortikoidni receptor i izazivajući njegovu translokaciju u jedro.
2. Farnezil-pirofosfat može da aktivira ili inhibira ekspresiju kortikosteroid-senzitivnih gena delujući kao funkcionalni agonista GR, sličnim mehanizmom dejstva kao i glukokortikoidni hormoni.
3. Transkripcioni profil farnezil-pirofosfata pokazuje značajno preklapanje sa transkripcionim profilom glukokortikoidnih hormona. Ove sličnosti su naročito izražene u kontekstu regulacije gena značajnih za ćelijsku migraciju, inflamaciju, remodelovanje citoskeleta i ekstraselularnog matriksa.
4. Povećanje koncentracije endogenog farnezil-pirofosfata inhibira ćelijsku migraciju *in vitro* aktivacijom glukokortikoidnog signalnog puta.
5. Statini snižavaju nivo intracelularnog farnezil-pirofosfata inhibicijom HMG-CoA reduktaze i pospešuju migraciju keratinocita.
6. Farnezil-pirofosfat inhibira zarastanje ljudske rane *ex vivo* posredstvom inhibicije ekspresije keratina 6.
7. Statini pospešuju zarastanje ljudske rane *ex vivo* inhibirajući sintezu endogenog farnezil-pirofosfata.

7. LITERATURA

1. Pitts SR, Niska RW, Xu J, Burt CW, 2008. **National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2006 emergency department summary.** *Natl Health Stat Report*, 1-38. [[PubMed](#)]
2. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M, 2008. **Growth factors and cytokines in wound healing.** *Wound Repair Regen* 16, 585-601. [[PubMed](#)]
3. Brem H, Tomic-Canic M, 2007. **Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes.** *J Clin Invest* 117, 1219-1222. [[PubMed](#)]
4. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA, 2012. **Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair.** *Stem Cells Transl Med* 1, 142-149. [[PubMed](#)]
5. Falanga V, 2005. **Wound healing and its impairment in the diabetic foot.** *Lancet* 366, 1736-1743. [[PubMed](#)]

6. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF, 2007. **Impaired wound healing.** *Clin Dermatol* 25, 19-25. [[PubMed](#)]
7. Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M, 2007. **Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation.** *J Biol Chem* 282, 4021-4034. [[PubMed](#)]
8. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E, 1998. **Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds.** *J Invest Dermatol* 111, 850-857. [[PubMed](#)]
9. Robson MC, 1997. **The role of growth factors in the healing of chronic wounds.** *Wound Repair Regen* 5, 12-17. [[PubMed](#)]
10. Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Kan YW, Werner S, 2002. **Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound.** *Mol Cell Biol* 22, 5492-5505. [[PubMed](#)]
11. Mast BA, Schultz GS, 1996. **Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds.** *Wound Repair Regen* 4, 411-420. [[PubMed](#)]
12. Gale AJ, 2011. **Continuing education course #2: current understanding of hemostasis.** *Toxicol Pathol* 39, 273-280. [[PubMed](#)]

13. Weyrich AS, Zimmerman GA, 2004. **Platelets: signaling cells in the immune continuum.** *Trends Immunol* 25, 489-495. [[PubMed](#)]
14. Gazel A, Ramphal P, Rosdy M, De Wever B, Tornier C, Hosein N, Lee B, Tomic-Canic M, Blumenberg M, 2003. **Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays.** *J Invest Dermatol* 121, 1459-1468. [[PubMed](#)]
15. Kupper TS, 1990. **The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses.** *J Invest Dermatol* 94, 146S-150S. [[PubMed](#)]
16. Mahajan MA, Samuels HH, 2000. **A new family of nuclear receptor coregulators that integrate nuclear receptor signaling through CREB-binding protein.** *Mol Cell Biol* 20, 5048-5063. [[PubMed](#)]
17. Pastar I, Stojadinovic O, Tomic-Canic M, 2008. **Role of keratinocytes in healing of chronic wounds.** *Surg Technol Int* 17, 105-112. [[PubMed](#)]
18. Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M, 1998. **Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes.** *J Dermatol Sci* 17, 167-181. [[PubMed](#)]
19. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic-Canic M, 2011. **Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury.** *J Biol Chem* 286, 10265-10275. [[PubMed](#)]

20. Greenhalgh DG, 1996. **The role of growth factors in wound healing.** *J Trauma* 41, 159-167. [[PubMed](#)]
21. Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, Spaas JH, 2015. **Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments.** *Cell Physiol Biochem* 36, 1-23. [[PubMed](#)]
22. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M, 2001. **Keratins and the keratinocyte activation cycle.** *J Invest Dermatol* 116, 633-640. [[PubMed](#)]
23. Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A, 1993. **Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans.** *J Invest Dermatol* 101, 600-604. [[PubMed](#)]
24. Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A, De Luca M, 1995. **Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing.** *J Cell Biol* 129, 853-865. [[PubMed](#)]
25. Rohani MG, Parks WC, 2015. **Matrix remodeling by MMPs during wound repair.** *Matrix Biol* 44-46, 113-121. [[PubMed](#)]
26. Barker TH, 2011. **The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine.** *Biomaterials* 32, 4211-4214. [[PubMed](#)]

27. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA, 2002. **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363. [[PubMed](#)]
28. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G, 1995. **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** *Am J Pathol* 146, 56-66. [[PubMed](#)]
29. Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A, 2016. **The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair.** *Cell Mol Life Sci* 73, 1145-1157. [[PubMed](#)]
30. Cheng TL, Wu YT, Lai CH, Kao YC, Kuo CH, Liu SL, Hsu YY, Chen PK, Cho CF, Wang KC *et al*, 2013. **Thrombomodulin regulates keratinocyte differentiation and promotes wound healing.** *J Invest Dermatol* 133, 1638-1645. [[PubMed](#)]
31. Seifert O, Mrowietz U, 2009. **Keloid scarring: bench and bedside.** *Arch Dermatol Res* 301, 259-272. [[PubMed](#)]
32. Elias PM, 2008. **Skin barrier function.** *Curr Allergy Asthma Rep* 8, 299-305. [[PubMed](#)]
33. Man MQ, Lin TK, Santiago JL, Celli A, Zhong L, Huang ZM, Roelandt T, Hupe M, Sundberg JP, Silva KA *et al*, 2014. **Basis for enhanced barrier function of pigmented skin.** *J Invest Dermatol* 134, 2399-2407. [[PubMed](#)]

34. Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G, 2009. **The resource impact of wounds on health-care providers in Europe.** *J Wound Care* 18, 154-161. [[PubMed](#)]
35. Frykberg RG, Banks J, 2015. **Challenges in the Treatment of Chronic Wounds.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4, 560-582. [[PubMed](#)]
36. Johnson GW, 2001. **Improving the treatment of leg ulcers.** *Med J Aust* 175, 670. [[PubMed](#)]
37. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M, 2014. **Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 445-464. [[PubMed](#)]
38. Eming SA, Krieg T, Davidson JM, 2007. **Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.** *J Invest Dermatol* 127, 514-525. [[PubMed](#)]
39. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE, 2008. **Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds.** *J Histochem Cytochem* 56, 687-696. [[PubMed](#)]
40. Ben-Porath I, Weinberg RA, 2005. **The signals and pathways activating cellular senescence.** *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976. [[PubMed](#)]

41. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC, 2005. **Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds.** *Vasc Endovascular Surg* 39, 293-306. [[PubMed](#)]
42. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O, 2015. **Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications.** *Int J Mol Sci* 16, 25476-25501. [[PubMed](#)]
43. Stojadinovic O, Pastar I, Nusbaum AG, Vukelic S, Krzyzanowska A, Tomic-Canic M, 2014. **Deregulation of epidermal stem cell niche contributes to pathogenesis of nonhealing venous ulcers.** *Wound Repair Regen* 22, 220-227. [[PubMed](#)]
44. Diegelmann RF, Evans MC, 2004. **Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.** *Front Biosci* 9, 283-289. [[PubMed](#)]
45. Brancato SK, Albina JE, 2011. **Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function.** *Am J Pathol* 178, 19-25. [[PubMed](#)]
46. Coste A, Dubuquoy L, Barnouin R, Annicotte JS, Magnier B, Notti M, Corazza N, Antal MC, Metzger D, Desreumaux P *et al*, 2007. **LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13098-13103. [[PubMed](#)]
47. Lee B, Tomic-Canic M: **Tissue specificity of steroid action: Glucocorticoids in epidermis.** In: *Molecular Mechanisms Of Action Of Steroid Hormone Receptors.* edn. Edited by Krstic - Demonacos M, Demonacos C. Kerala, India: Research Signpost; 2002: 1-25.

48. Noti M, Corazza N, Mueller C, Berger B, Brunner T, 2010. **TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis.** *J Exp Med* 207, 1057-1066. [[PubMed](#)]
49. Noti M, Corazza N, Tuffin G, Schoonjans K, Brunner T, 2010. **Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner.** *FASEB J* 24, 1340-1346. [[PubMed](#)]
50. Kondo S, 1999. **The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation.** *J Invest Dermatol Symp Proc* 4, 177-183. [[PubMed](#)]
51. Steinhoff M, Brzoska T, Luger TA, 2001. **Keratinocytes in epidermal immune responses.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1, 469-476. [[PubMed](#)]
52. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Vouthounis C, Krzyzanowska A, Das S, Samuels HH, Tomic-Canic M, 2010. **Farnesyl pyrophosphate inhibits epithelialization and wound healing through the glucocorticoid receptor.** *J Biol Chem* 285, 1980-1988. [[PubMed](#)]
53. Das S, Schapira M, Tomic-Canic M, Goyanka R, Cardozo T, Samuels HH, 2007. **Farnesyl pyrophosphate is a novel transcriptional activator for a subset of nuclear hormone receptors.** *Mol Endocrinol* 21, 2672-2686. [[PubMed](#)]
54. Pastar I, Stojadinovic O, Sawaya AP, Stone RC, Lindley LE, Ojeh N, Vukelic S, Samuels HH, Tomic-Canic M, 2016. **Skin Metabolite, Farnesyl Pyrophosphate, Regulates Epidermal Response to Inflammation, Oxidative Stress and Migration.** *J Cell Physiol.* [[PubMed](#)]

55. Wang AS, Armstrong EJ, Armstrong AW, 2013. **Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period.** *Am J Surg* 206, 410-417. [[PubMed](#)]
56. Anstead GM, 1998. **Steroids, retinoids, and wound healing.** *Adv Wound Care* 11, 277-285. [[PubMed](#)]
57. Wicke C, Halliday B, Allen D, Roche NS, Scheuenstuhl H, Spencer MM, Roberts AB, Hunt TK, 2000. **Effects of steroids and retinoids on wound healing.** *Arch Surg* 135, 1265-1270. [[PubMed](#)]
58. Howes EL, Plotz CM, Blunt JW, Ragan C, 1950. **Retardation of wound healing by cortisone.** *Surgery* 28, 177-181. [[PubMed](#)]
59. Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, Mahoney MG, Brennan D, Krzyzanowska A, Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M, 2008. **Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers.** *J Cell Mol Med* 12, 2675-2690. [[PubMed](#)]
60. Lee B, Vouthounis C, Stojadinovic O, Brem H, Im M, Tomic-Canic M, 2005. **From an enhanceosome to a repressosome: molecular antagonism between glucocorticoids and EGF leads to inhibition of wound healing.** *J Mol Biol* 345, 1083-1097. [[PubMed](#)]
61. Davidson VL, Sittman DB: **Biochemistry**, 3 edn: Harwal Publishing; 1994.
62. Takei K, Denda S, Kumamoto J, Denda M, 2013. **Low environmental humidity induces synthesis and release of cortisol in an epidermal organotypic culture system.** *Exp Dermatol* 22, 662-664. [[PubMed](#)]

63. Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R, 2005. **Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol.** *FASEB J* 19, 1332-1334. [[PubMed](#)]
64. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P *et al*, 1995. **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell* 83, 835-839. [[PubMed](#)]
65. Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ, 2002. **Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo.** *J Biol Chem* 277, 26573-26580. [[PubMed](#)]
66. Ismaili N, Garabedian MJ, 2004. **Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation.** *Ann N Y Acad Sci* 1024, 86-101. [[PubMed](#)]
67. Barnes PJ, 2006. **Corticosteroid effects on cell signalling.** *Eur Respir J* 27, 413-426. [[PubMed](#)]
68. Radoja N, Komine M, Jho SH, Blumenberg M, Tomic-Canic M, 2000. **Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers.** *Mol Cell Biol* 20, 4328-4339. [[PubMed](#)]
69. Newton R, Holden NS, 2007. **Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?** *Mol Pharmacol* 72, 799-809. [[PubMed](#)]

70. Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P, 2011. **Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor.** *Cell* 145, 224-241. [[PubMed](#)]
71. Oakley RH, Cidlowski JA, 2013. **The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.** *J Allergy Clin Immunol* 132, 1033-1044. [[PubMed](#)]
72. Stojadinovic O, Sawaya A, Pastar I, Tomic-Canic M, 2013. **Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes.** *PLoS One* 8, e63453. [[PubMed](#)]
73. Samarasinghe RA, Witchell SF, DeFranco DB, 2012. **Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling.** *Cell Cycle* 11, 2819-2827. [[PubMed](#)]
74. Feingold KR, Wiley MH, Moser AH, Lau DT, Lear SR, Siperstein MD, 1982. **De novo sterologenesi in intact primates.** *J Lab Clin Med* 100, 405-410. [[PubMed](#)]
75. Haines BE, Wiest O, Stauffacher CV, 2013. **The increasingly complex mechanism of HMG-CoA reductase.** *Acc Chem Res* 46, 2416-2426. [[PubMed](#)]
76. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K, 2000. **The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals.** *Nat Med* 6, 1004-1010. [[PubMed](#)]

77. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ, 1998. **Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras.** *J Bone Miner Res* 13, 581-589. [[PubMed](#)]
78. Weivoda MM, Hohl RJ, 2011. **Effects of farnesyl pyrophosphate accumulation on calvarial osteoblast differentiation.** *Endocrinology* 152, 3113-3122. [[PubMed](#)]
79. Sebti SM, 2005. **Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy.** *Cancer Cell* 7, 297-300. [[PubMed](#)]
80. Palaniswamy C, Selvaraj DR, Selvaraj T, Sukhija R, 2010. **Mechanisms underlying pleiotropic effects of statins.** *Am J Ther* 17, 75-78. [[PubMed](#)]
81. Murthy S, Tong H, Hohl RJ, 2005. **Regulation of fatty acid synthesis by farnesyl pyrophosphate.** *J Biol Chem* 280, 41793-41804. [[PubMed](#)]
82. Stancu C, Sima A, 2001. **Statins: mechanism of action and effects.** *J Cell Mol Med* 5, 378-387. [[PubMed](#)]
83. Schiefelbein D, Goren I, Fisslthaler B, Schmidt H, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S, 2008. **Biphasic regulation of HMG-CoA reductase expression and activity during wound healing and its functional role in the control of keratinocyte angiogenic and proliferative responses.** *J Biol Chem* 283, 15479-15490. [[PubMed](#)]

84. Liao JK, Laufs U, 2005. **Pleiotropic effects of statins.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 89-118. [[PubMed](#)]
85. Gazerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, Santoro A, Laezza C, Bifulco M, 2012. **Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer.** *Pharmacol Rev* 64, 102-146. [[PubMed](#)]
86. Toker S, Gulcan E, Cayc MK, Olgun EG, Erbilien E, Ozay Y, 2009. **Topical atorvastatin in the treatment of diabetic wounds.** *Am J Med Sci* 338, 201-204. [[PubMed](#)]
87. Bitto A, Minutoli L, Altavilla D, Polito F, Fiumara T, Marini H, Galeano M, Calo M, Lo Cascio P, Bonaiuto M *et al*, 2008. **Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes.** *Pharmacol Res* 57, 159-169. [[PubMed](#)]
88. Rego AC, Araujo Filho I, Damasceno BP, Egito ES, Silveira IA, Brandao-Neto J, Medeiros AC, 2007. **Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats.** *Acta Cir Bras* 22 Suppl 1, 57-63. [[PubMed](#)]
89. Trezzi M, Blackstone EH, Sun Z, Li L, Sabik JF, 3rd, Lytle BW, Gordon SM, Koch CG, 2013. **Statin therapy is associated with fewer infections after cardiac operations.** *Ann Thorac Surg* 95, 892-900. [[PubMed](#)]
90. Kratz G, 1998. **Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture.** *Microsc Res Tech* 42, 345-350. [[PubMed](#)]

91. Li D, Turi TG, Schuck A, Freedberg IM, Khitrov G, Blumenberg M, 2001. **Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination.** *FASEB J* 15, 2533-2535. [[PubMed](#)]
92. Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M, Freedberg IM, Bernerd F, Blumenberg M, 1993. **Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6786-6790. [[PubMed](#)]
93. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS *et al*, 1999. **The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.** *Science* 283, 83-87. [[PubMed](#)]
94. Tong H, Holstein SA, Hohl RJ, 2005. **Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells.** *Anal Biochem* 336, 51-59. [[PubMed](#)]
95. Jho SH, Vouthounis C, Lee B, Stojadinovic O, Im MJ, Brem H, Merchant A, Chau K, Tomic-Canic M, 2005. **The book of opposites: the role of the nuclear receptor co-regulators in the suppression of epidermal genes by retinoic acid and thyroid hormone receptors.** *J Invest Dermatol* 124, 1034-1043. [[PubMed](#)]
96. Jho SH, Radoja N, Im MJ, Tomic-Canic M, 2001. **Negative Response Elements in Keratin Genes Mediate Transcriptional Repression and the Cross-talk among Nuclear Receptors.** *J Biol Chem* 276, 45914-45920. [[PubMed](#)]

97. Garcia-Villalba P, Jimenez-Lara AM, Castillo AI, Aranda A, 1997. **Histone acetylation influences thyroid hormone and retinoic acid-mediated gene expression.** *DNA Cell Biol* 16, 421-431. [[PubMed](#)]
98. Kauppi B, Jakob C, Farnegardh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, Calles K, Engstrom O, Harlan J, Muchmore S *et al*, 2003. **The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism.** *J Biol Chem* 278, 22748-22754. [[PubMed](#)]
99. Veleiro AS, Alvarez LD, Eduardo SL, Burton G, 2010. **Structure of the glucocorticoid receptor, a flexible protein that can adapt to different ligands.** *ChemMedChem* 5, 649-659. [[PubMed](#)]
100. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishan A, Vasnawala H, 2015. **Pleiotropic effects of statins.** *Indian J Endocrinol Metab* 19, 554-562. [[PubMed](#)]
101. Maurer-Stroh S, Washietl S, Eisenhaber F, 2003. **Protein prenyltransferases.** *Genome Biol* 4, 212. [[PubMed](#)]
102. London N, Lamphear CL, Hougland JL, Fierke CA, Schueler-Furman O, 2011. **Identification of a novel class of farnesylation targets by structure-based modeling of binding specificity.** *PLoS Comput Biol* 7, e1002170. [[PubMed](#)]
103. Porter KE, Turner NA, 2011. **Statins and myocardial remodelling: cell and molecular pathways.** *Expert Rev Mol Med* 13, e22. [[PubMed](#)]

104. Swenne CA, 2013. **Beyond lipid lowering: pleiotropic effects of statins in heart failure.** *Neth Heart J* 21, 406-407. [[PubMed](#)]
105. Bonsu KO, Kadirvelu A, Reidpath DD, 2013. **Statins in heart failure: do we need another trial?** *Vasc Health Risk Manag* 9, 303-319. [[PubMed](#)]
106. Mihos CG, Artola RT, Santana O, 2012. **The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in rheumatologic disorders: a comprehensive review.** *Rheumatol Int* 32, 287-294. [[PubMed](#)]
107. Lopez-Pedrera C, Ruiz-Limon P, Valverde-Esteba A, Barbarroja N, Rodriguez-Ariza A, 2012. **To cardiovascular disease and beyond: new therapeutic perspectives of statins in autoimmune diseases and cancer.** *Curr Drug Targets* 13, 829-841. [[PubMed](#)]
108. Costantine MM, Cleary K, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H, Human Development Obstetric--Fetal Pharmacology Research Units N, 2013. **Pravastatin for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women.** *Obstet Gynecol* 121, 349-353. [[PubMed](#)]
109. Henneman L, van Cruchten AG, Kulik W, Waterham HR, 2011. **Inhibition of the isoprenoid biosynthesis pathway; detection of intermediates by UPLC-MS/MS.** *Biochim Biophys Acta* 1811, 227-233. [[PubMed](#)]
110. Bauer DC, 2003. **HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review.** *Osteoporos Int* 14, 273-282. [[PubMed](#)]

111. Serin-Kilicoglu S, Erdemli E, 2007. **New addition to the statin's effect.** *J Trauma* 63, 187-191. [[PubMed](#)]
112. Shao H, Tan Y, Eton D, Yang Z, Uberti MG, Li S, Schulick A, Yu H, 2008. **Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels.** *Stem Cells* 26, 1376-1384. [[PubMed](#)]
113. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D, Chopp M, 2008. **Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury.** *J Neurotrauma* 25, 130-139. [[PubMed](#)]
114. Harris IR, Hoppner H, Siefken W, Farrell AM, Wittern KP, 2000. **Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 114, 83-87. [[PubMed](#)]
1997. **Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis.** *J Invest Dermatol* 109, 783-787. [[PubMed](#)]
116. Jackson SM, Wood LC, Lauer S, Taylor JM, Cooper AD, Elias PM, Feingold KR, 1992. **Effect of cutaneous permeability barrier disruption on HMG-CoA reductase, LDL receptor, and apolipoprotein E mRNA levels in the epidermis of hairless mice.** *J Lipid Res* 33, 1307-1314. [[PubMed](#)]
117. Keller RK, 1996. **Squalene synthase inhibition alters metabolism of nonsterols in rat liver.** *Biochim Biophys Acta* 1303, 169-179. [[PubMed](#)]

118. Fitzmaurice GJ, McWilliams B, Nolke L, Redmond JM, McGuinness JG, O'Donnell ME, 2014. **Do statins have a role in the promotion of postoperative wound healing in cardiac surgical patients?** *Ann Thorac Surg* 98, 756-764. [[PubMed](#)]

119. Farsaei S, Khalili H, Farboud ES, 2012. **Potential role of statins on wound healing: review of the literature.** *Int Wound J* 9, 238-247. [[PubMed](#)]

Spisak skraćenica

TBS	fiziološki rastvor puferovan TRIS-om (<i>engl.</i> Tris Buffered Saline)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A CoA
BSA	albumin iz kravljeg seruma (<i>engl.</i> Bovine Serum Albumin)
DEX	deksametazon
DMEM	Dulbekova modifikacija Igl medijuma (<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium)
GRE	element glukokortikoidnog odgovora
KRE	element keratinskog odgovora
EGF	epidermalni faktor rasta (<i>engl.</i> Epidermal Growth Factor)
CHiP	esej imunoprecipitacije hromatina
TNF	factor nekroze tumora alfa (<i>engl.</i> Tumor Necrosis Factor)
IGF-1	faktor rasta sličan insulinu 1 (<i>engl.</i> Insulin like Growth Factor)
FT	farnezil transferaza
FPP	farnezil-pirofosfat
GAS	gama aktivirane sekvence
GGPP	geranilgeranil-pirofosfat
GH	glukokortikoidni hormoni
GR-P	glukokortikoidni receptor fosforilisan na serinu 211 (<i>engl.</i> Phospho serine 211 GR)
CAT	hloramfenikol acetiltransferaza
HEK	humani epidermalni keratinociti (<i>engl.</i> Human Epidermal Keratinocyte)
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
IPP	izopentenil-pirofosfat
JAK1	janus kinaza 1
K	keratin
cDNK	komplementarna DNK
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerizacije (<i>engl.</i> quantitative Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR	lančana reakcija polimerizacije kojoj prethodi reverzna transkripcija (<i>engl.</i> Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
MEV	mevastatin
MCP-1	monocitni hemoatraktani protein 1 (<i>engl.</i> Monocyte Chemotactic Protein)
PBS	rastvor fosfatnog pufera (<i>engl.</i> Phosphate Buffer Saline)
VGEF	vaskularni endotelijalni faktor rasta (<i>engl.</i> Vascular Endothelial Growth Factor)

Biografija

Dr Saša Vukelić je 1994 godine upisao je 1994., a završio 2002. godine Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 9,46. Obavezni staž obavio je 2003-2004. godine na Vojno medicinskoj akademiji u Beogradu. Postdoktorsko usavršavanje iz bazične nauke obavio je 2005-2009. godine na Weill Cornell College of Medicine u Njujorku, SAD. Specijalizaciju iz interne medicine završio je u bolnici Lenox Hill u Njujorku, SAD 2012. godine, kada je i položio specijalistički ispit. Magistarsku tezu iz imunologije je odbranio 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Trenutno je na završnoj godini subspecijalističkih studija iz kardiologije na Emory University u Atlanti, SAD. Autor i koautor je 11 radova i 20 publikovanih abstrakata u časopisima sa SCI liste. Više puta je prezentovao usmeno i posterom na internacionalnim konferencijama.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisan Saša Vukelić

Izjavljujem

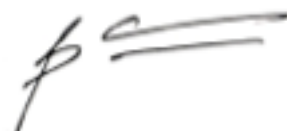
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Statini pospešuju zarastanje rana blokirajući aktivaciju glukokortikoidnog receptora farnezil pirofosfatom, međuproizvodom u sintezi holesterola“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 10. 04. 2016. godine

Potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Saša Vukelić

Naslov rada: „Statini pospešuju zarastanje rana blokirajući aktivaciju glukokortikoidnog receptora farnezil pirofosfatom, međuproizvodom u sintezi holesterola”

Mentor: **Doc. dr Svetlana Popadić**

Komentor: **Prof. dr Marjana Tomić-Canić**

Potpisani Saša Vukelić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 10. 04. 2016. godine

Potpis doktoranta



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Statini pospešuju zarastanje rana blokirajući aktivaciju glukokortikoidnog receptora farnezil pirofosfatom, međuproizvodom u sintezi holesterola“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 10. 04. 2016. godine

Potpis doktoranta

