

UNIwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Nauk o Zdrowiu

Monika Wolak

Wpływ histaminy na czynność
miofibroblastów izolowanych z ziarniny ran

Promotor pracy

dr hab. n.med. Jacek Drobnik, prof. UM.

Zakład Patofizjologii

Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej

Łódź, 2023

Spis treści

Wstęp	3
Cel Pracy	9
Materiał i metody	9
Wyniki	13
Publikacja 1.	13
Publikacja 2.	15
Publikacja 3.	17
Podsumowanie i wnioski	19
Wniosek końcowy	20
Literatura	20
Streszczenie w języku polskim	24
Streszczenie w języku angielski	28
Publikacje w oryginałach	32

Wstęp

Na skutek wydłużania się życia, postępu cywilizacyjnego i poprawy jakości życia na świecie systematycznie rośnie odsetek ludzi w wieku poprodukcyjnym. Ten trend jest szczególnie zauważalny w krajach wysoko rozwiniętych – szacuje się, że w Japonii w 2030 r. aż 30% obywateli będzie miało więcej niż 65 lat. Prawie co piąta osoba tj. 19,4% w Unii Europejskiej, czyli blisko 100 mln ludzi, ma 65 lat i więcej. Problem starzenia się społeczeństwa i jego konsekwencje w obrębie zdrowia, w tym chorób przewlekłych oraz wymagających hospitalizacji dotyczą również Polski. Z prognoz demograficznych GUS wynika, że w Polsce w 2050 r. udział osób w wieku powyżej 65 roku życia ukształtuje się na poziomie 32,7%. Statystyki pokazują iż, w 2019 r. częstość występowania cukrzycy w odniesieniu do innych zachorowań wyniosła 9,3% tj. 463 mln osób na całym świecie. Przewiduje się, że do 2030 roku wskaźnik wzrośnie do 10,2% (578 mln osób) i odpowiednio 10,9% (700 mln osób) do 2045 r. [1] U osób starszych często pojawiają się patologiczne zmiany takie jak: owrzodzenia żyłne, owrzodzenia tętnicze, odleżyny i stopa cukrzycowa (niedokrwienna lub neuropatyczno-niedokrwienna).

Analiza w 2018 roku beneficjentów firmy ubezpieczeniowej Medicare wykazała, że 8,2 mln osób korzystało ze świadczeń z powodu niegojących się lub trudno gojących się ran. Szacunkowe koszty leczenia ran ostrych i przewlekłych wahały się od 28,1 do 96,8 miliarda dolarów. [2] Ogólne nakłady na leczenie tego typu patologii to 13–15 bilionów dolarów rocznie. W Unii Europejskiej pochłaniają one 2–4% budżetu w ochronie zdrowia. Sytuacja ekonomiczna polskiej służby zdrowia nie ma się lepiej w tym względzie. [3,4]

Trudno gojące się czy też niegojące rany to duży problem wpływający na jakość oraz życie i zdrowie pacjentów, ale także ogromny problem ekonomiczny,

coraz silniej odczuwalny w starzejącym się społeczeństwie (rany przewlekłe dotyczą 120 na 100 000 osób w wieku od 45 do 65 lat i liczba ta wzrasta do 800 na 100 000 osób w wieku powyżej 75 lat). [5]

Analizując powyższe aspekty zasadnym jest prowadzenie badań nad mechanizmem gojenia ran i lepszym zrozumieniem tego procesu, gdyż dokładne poznanie zjawisk gojenia stworzy podstawy dla nowych metod leczenia, zwłaszcza ran przewlekłych. Podczas gojenia się ran zachodzą złożone reakcje biologicznie aktywnych oraz chemiczne czynnych substancji w środowisku rany, a także liczne zjawiska fizyczne skutkujące m.in. wzrostem wytrzymałości na rozciąganie lub też zmianami sprężystości. Jednak wytrzymałość utworzonej blizny stanowi tylko ok. 70% wytrzymałości skóry sprzed jej uszkodzenia. [6] Głównym celem procesu gojenia ran jest przywrócenie ciągłości uszkodzonego narządu poprzez wytworzenie blizny. Proces ten składa się z następujących faz: hemostazy, zapalenia, migracji i proliferacji komórek, syntezy białek oraz przebudowy blizny. Wspomniane etapy muszą być ściśle ze sobą „skoordynowane”, aby skutecznie naprawić uszkodzoną tkankę. [7]

Hemostaza krwi jest procesem prowadzącym do tworzenia się włókien fibryny zamykających uszkodzone naczynie i zapobiegającym wypływowi krwi z naczyń. Ponadto rusztowanie fibrynowe tworzy pierwotną macierz w ranie zapewniając podłoże do napływu komórek modyfikując tym samym przebieg procesów naprawczych. [8, 9] Po tym okresie rana wchodzi w fazę zapalną, w której do rany napływają neutrofile, makrofagi oraz limfocyty. Kluczem do uniknięcia przedłużającego się stanu zapalnego jest przekształcenie fenotypowe makrofagów z M1 (typ prozapalny) do M2 (typ przeciwzapalny). [10,11]

Fibroblasty, keratynocyty jak również komórki śródbłonka napływają do rany w fazie proliferacji. Fibroblasty a zwłaszcza miofibroblasty mogą syntetyzować duże ilości kolagenu. Jest to białko macierzy pozakomórkowej (ECM) tkanki łącznej, które zapewnia wytrzymałość powstającej bliznie, przyczyniając się tym samym do strukturalnej i fizjologicznej integralności tkanek. [12] Funkcją kolagenu jest ochrona tkanek przed rozciąganiem i uszkodzeniami, można powiedzieć zatem, że działa on jako wewnątrzkomórkowy „klej/spoiwo”. Zidentyfikowano co najmniej 27 typów kolagenu w ludzkim ciele, przy czym typy I-IV są najbardziej rozpowszechnione.

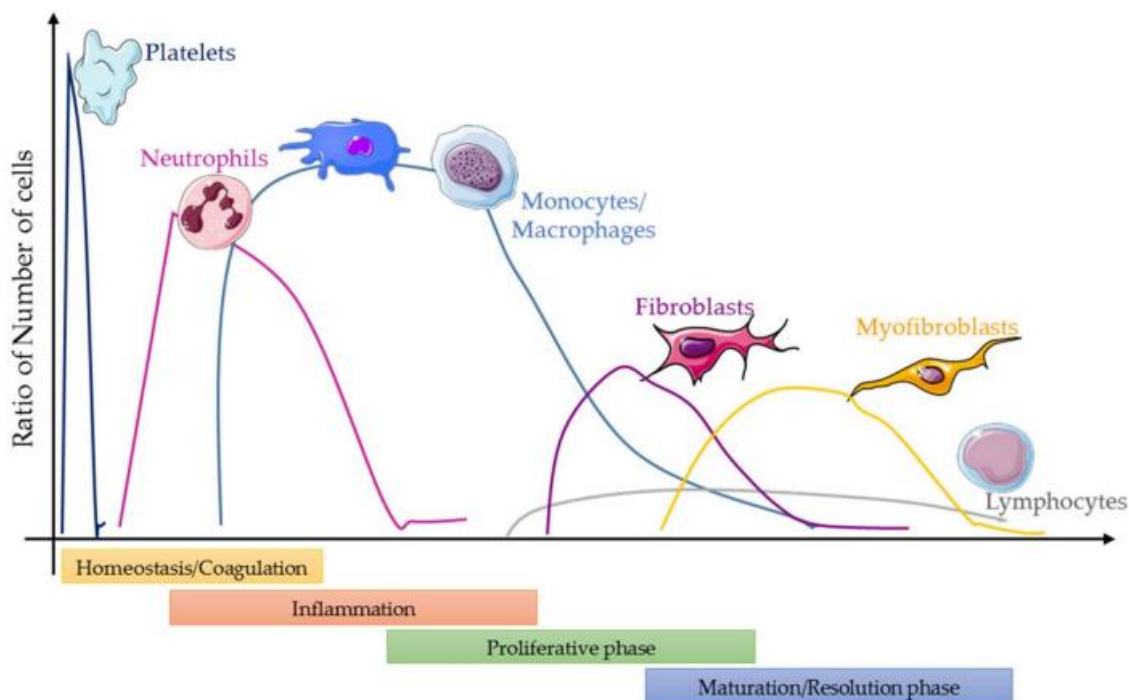
Macierz pozakomórkowa (ECM – extracellular matrix) to substancja wypełniająca przestrzeń między komórkami skóry, w skład której wchodzi wytwarzane przez fibroblasty włókna kolagenowe i elastynowe, glikoproteiny i glikozaminoglikany (przede wszystkim kwas hialuronowy). Dzięki czynnikom wzrostu i receptorom wiążącym ECM na powierzchni komórek adherentnych, ECM modyfikuje proliferację, różnicowanie i migrację komórek. Proces ten odgrywa istotną rolę regulatora funkcji komórek. [13]

Biosynteza kolagenu jest wysoce złożonym procesem rozpoczynającym się od transkrypcji genów kolagenu, po której następuje translacja i translokacja powstającego łańcucha polipeptydowego do szorstkiego ER (rER), postranslacyjna modyfikacja i fałdowanie, transport przez siatkę Golgiego, sekrecja i wreszcie zewnątrzkomórkowe przetwarzanie oraz dojrzewanie białka. Synteza kolagenu jest stymulowana przez uszkodzenie tkanek – fibroblasty migrują do rany, gdzie wytwarza się tkanka bliznowata złożona głównie z kolagenu. W tkankach, ECM podlega ciągłej i dynamicznej, choć zazwyczaj powolnej, przemianie, w której kolagen ulega degradacji i ponownej syntezie. [14]

Degradacja zewnątrzkomórkowego kolagenu jest przypisywana głównie metaloproteinazom macierzy (MMP) i katepsynie K, która ułatwia migrację komórek oraz powoduje uwolnienie czynników wzrostu. W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy modyfikują procesy rozwojowe, embriogenezę, kontrolują angiogenezę i gojenie się ran, a także uczestniczą w procesie tworzenia receptorów komórkowych oraz w wielu procesach immunologicznych. [15], [16]

Miofibroblasty, to komórki powstające w wyniku transformacji fenotypowej fibroblastów, mającej miejsce podczas wczesnych etapów gojenia. Odpowiednie uporządkowane i polimeryzacja kolagenu jest kluczowym etapem fazy przebudowy [17], podczas której zwiększa się wytrzymałość mechaniczna blizny na rozciąganie. Powstawanie blizn skutkuje zamknięciem rany i przywróceniem ciągłości tkanek.

Poniższa grafika przedstawia napływ odpowiednich komórek do rany, w poszczególnych etapach jej gojenia. W pierwszej fazie pojawiają się płytki krwi, a następnie do miejsca rany napływają neutrofile a w kolejnym etapie monocyty, które różnicują się do makrofagów. W fazie migracji i proliferacji komórek, do rany przedostają się fibroblasty przekształcające się do miofibroblastów rozpoczynających intensywną syntezę kolagenu. Inne komórki, takie jak limfocyty (głównie limfocyty T czy też NK) komórki dendrytyczne i komórki tuczne są także niezbędne do prawidłowego gojenia, jednak ich liczba jest stosunkowo niska, dlatego autorzy nie pokazali ich na rycinie.



Rycina 1: Udział poszczególnych komórek w kolejnych etapach gojenia ran.
 Źródło ryciny: [34]

Jak dowodzą badania, podczas procesu włóknienia oraz gojenia zaobserwowano znaczący wzrost komórek tłuszczowych. Zjawisko to wiąże się ze wzrostem poziomu histaminy w tkance. Głównym mediatorem komórek tłuszczowych jest histamina. [18] Ziarnistości mastocytów uwalniają oprócz histaminy również heparynę, tryptazę, chymazę, NGF (nerve growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor- α) oraz mediatory lipidowe syntetyzowane de novo takie jak prostaglandyny, leukotrieny i czynnik aktywujący płytki. [19] Prowadzone badania wskazują, że tryptaza z komórek tłuszczowych jest dodatkowym czynnikiem pobudzającym angiogenezę. [20], mastocyty mogą ulegać degranulacji pod wpływem bodźców zależnych od IgE oraz niezależnych od IgE aktywatorów oraz cytokin. [21]

Transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- β 1), uwalniany jest przez płytki krwi, monocyty/makrofagi, komórki śródbłonna i fibroblasty [22], [23], [24], jest on cytokiną, której działanie i charakterystyka różni się w zależności od narządu i tkanki,

jednak wspólną i stałą funkcją jest regulowanie proliferacji, wzrost, różnicowanie oraz ruch komórek, jak również niezmiernie ważne w aspekcie gojenia ran, działanie profibrogenne. [25] Jak dowodzą badania TGF-beta 1 stosowany miejscowo poprawia gojenie różnych modeli ran, w tym ran ciętych, klutych i owrzodzeń. Roberts i wsp. w swoich badaniach dowiedli, iż TGF-beta 1 odgrywa istotną rolę w regulacji gojenia się ran, gdyż wpływa na odpowiedź zapalną, angiogenezę, tworzenie się ziarniny, ponowne nabłonkowanie i odkładanie się macierzy pozakomórkowej oraz jej przebudowę. Wspomniane efekty, bez wątpienia sprzyjają gojeniu i przyczyniają się do przyspieszenia bliznowacenia. [26] Zaobserwowano również, że pojedyncza ogólnoustrojowa dawka TGF- beta 1 podana przed zranieniem poprawia naprawę tkanek. [27] [28]

Histamina jest substancją naturalnie występującą w organizmie. Jest ona heterocykliczną aminą pochodną imidazolu, syntetyzowaną w wyniku dekarboksylacji histydyny. Histamina jest magazynowana głównie w komórkach tucznych oraz bazofilach, z których ulega uwolnieniu w wyniku procesu degranulacji. [29] Działanie histaminy zależne jest od pobudzenia 4 receptorów histaminowych (H1, H2, H3, i H4), które ulokowane są w różnych tkankach. Pobudzenie receptora H1 wywołuje skurcz mięśni gładkich oraz rozszerzenie naczyń krwionośnych prowadzące do spadku ciśnienia krwi. Receptor H1 jest także odpowiedzialny za zwiększenie wydzielanie śluzu na błonach śluzowych oraz zwiększenie napięcia układu parasympatycznego. Stymulacja receptora H2 zwiększa wydzielanie soku żołądkowego oraz nasila wydzielanie gruczołów surowiczo-śluzowych dróg oddechowych. Pobudzenie receptora H3 wpływa na syntezę histaminy i jej uwalnianie, podczas gdy receptor H4 jest rozlokowany głównie w układzie immunologicznym, gdzie jego ekspresja jest uzależniona od działania interleukin 10 i 13. [30]

Cel Pracy

Wcześniejsze badania przeprowadzone głównie in vivo pokazały regulacyjny wpływ histaminy na procesy gojenia i kolagenogenezy. Niskie dawki histaminy pobudzały odkładanie kolagenu w ranie natomiast wysokie działały hamująco na kolagenogenezę. Dąbrowski [31] wysunął hipotezę, że mechanizm działania histaminy na procesy gojenia może być zależny od wpływu tej aminy na przepływ krwi w ranie. Autor ten przypuszczał, że przepływ krwi w ziarninie rany ulega zwiększeniu pod wpływem histaminy. Zjawisko to wiąże się z lepszym dotlenieniem i odżywieniem rany i przyspieszeniem procesu jej gojenia. Wyjaśniając mechanizm działania histaminy należy też uwzględnić bezpośredni wpływ tej aminy na fibroblasty, za pośrednictwem receptorów histaminowych, w efekcie którego może zmieniać się czynność komórki np.: synteza macierzy pozakomórkowej, proliferacja, migracja komórek.

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy histamina może wywierać regulacyjny wpływ na proces gojenia ran. Zamierzałam zbadać zmiany aktywności metabolicznej komórek wyizolowanych z ziarniny ran, gromadzenia białka kolagenowego w hodowli oraz sekrecji transformującego czynnika wzrostu beta1 (TGFbeta1) pod wpływem histaminy. Ponadto zaplanowałam wyodrębnienie receptora histaminowego, który pośredniczy w regulacji czynności badanych komórek.

Materiał i metody

Badania prowadzone były na szczurach szczepu Wistar, których waga średnio wynosiła 280 g. Zwierzęta poddawane były zabiegowi wszczepienia siatek polipropylenowych podskórną w okolicy lędźwiowej. W czasie hodowli jak i w okresie

po operacji zwierzęta były pojone czystą wodą oraz karmione standardową paszą. Po 28 dniach pobierano ziarninę przerastającą siatkę polipropylenową, poddano ją trawieniu kolagenazą (1h), następnie próbkę płukano i zakładano hodowlę komórkową na płytkach hodowlanych z pożywką wzbogaconą o 10% surowicy bydlęcej, fungizon i gentamycynę. Komórki hodowano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, ~ 90 % wilgotności). Po uzyskaniu 70% konfluencji hodowle były przemyte HBSS w temp. pokojowej oraz poddane działaniu trypsyny (0,05%) w celu oddzielenia komórek od podłoża (1 ml trypsyny na płytkę, czas inkubacji przez 5 min), następnie płytkę przemyto medium hodowlanym z 10% zawartością surowicy celem inaktywacji trypsyny. Pobrany materiał wirowano (5min, 1000 obr/min). Osad zawierający fibroblasty był zawieszany w medium hodowlanym i przenoszony na nowe podłoże. W ten sam sposób wykonywane były kolejne pasáže komórek przeznaczonych do hodowli. Do badań wykorzystane zostały hodowle komórek pochodzące z pasażu drugiego.

Proliferację komórek określano poprzez wykonanie testu BrdU zgodnie z zaleceniami producenta. Bromodeoksyurydyna jest syntetycznym analogiem nukleozydu tymidyny inkorporowanym do DNA w fazie S podziału komórek żywych tkanek. Przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw BrdU możliwa jest detekcja wbudowanych cząsteczek. Reakcja enzymu z chromogennym substratem pozwala na kolorymetryczną analizę próbek.

Aktywność metaboliczna komórek badano przy pomocy testu MTT, czyli przy wykorzystaniu zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, który jest ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji.

Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona była spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 570 nm. Stężenie barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalne do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, czyli liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji.

Kolagen oznaczano metodą Woessnera na podstawie określenia ilości hydroksyproliny w próbce. Test ELISA (metoda immunoenzymatyczna) posłużył do oznaczenia TGF β 1 w medium hodowlanym oraz receptora H1 w homogenacie komórek.

Ekspresja genów dla kolagenu typu I i III (*COL1A1* i *COL3A1*) określana była przy pomocy RT PCR, czyli łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Przeprowadzony eksperyment składał się z trzech etapów: izolacji RNA, transkrypcji i amplifikacji. Do izolacji RNA z komórek zastosowano zestaw Total RNA Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), następnie przeprowadzono proces transkrypcji wykorzystując PrimeScript RT-PCR Kit (Takara, Kusatsu, Shiga, Japonia). Izolowane mRNA zostaje następnie przepisane na cDNA. Metodę RT PCR charakteryzuje wysoka czułość oraz powtarzalność. *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego), *Hprt1* (Fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa) i *RPL13A* (białko rybosomalne L13A) zastosowano jako geny referencyjne.

Cytometrię przepływową zastosowano do identyfikacji izolowanych komórek, gdyż metoda ta pozwala określić ekspresję poszczególnych białek. Komórki po procesie płukania zostały poddane utrwalaniu, a następnie barwieniu przy pomocy przeciwciał połączonych z fluorochromami. Oprócz próbki badanej

zastosowano kontrolę izotypową, która umożliwiła ocenę tła oraz określono autofluorescencję badanych komórek. Należy wspomnieć, iż pomijając tło pochodzące z samego analizatora, sygnały mogą wynikać także z autofluorescencji czy niespecyficznego wiązaniem się przeciwciał. [32] [33]

W cytometrze przepływowym zawieszona odpowiednio zabarwionych komórek wtłaczana jest w otoczkę płynu osłaniającego (dzięki czemu komórki nie skleją się) poprzez dyszę, w formie cienkiego, laminarnie płynącego strumienia zawierającego rząd pojedynczych komórek (tzw. ogniskowanie hydrodynamiczne, w którym płyn osłaniający płynie szybciej, niż centralny strumień z komórkami), a następnie przepływa przed optoelektronicznymi układami rejestrującymi (fotokomórkami lub fotopowielaczami), w których to pojedyncze komórki zostają oświetlane przez cienkie wiązki monochromatycznego, spolaryzowanego światła lasera. W metodzie tej, przy przechodzeniu pojedynczych komórek przez komorę pomiarową, wykorzystywane jest kilka zjawisk tj.: rozpraszania, załamania, odbicia i absorpcji światła, dzięki którym zauważane są chwilowe zmiany sygnału elektrycznego z rejestrujących elementów optoelektronicznych. Zmiany te są zależne od: barwy, struktury i intensywności zabarwienia analizowanych komórek. Ponadto rejestruje się czas zmiany tych sygnałów i amplitudę zmian sygnału polaryzacji w stosunku do pierwotnej polaryzacji światła lasera. W celu zweryfikowania fenotypu wyizolowanych z ran komórek, zbadano ekspresję alfa-aktyny, desminy i wimentyny. Wyniki porównywano z kontrolą izotypową oraz odnoszono do badanej autofluorescencji komórek. Do wszystkich pomiarów stosowano cytometr CytoFLEX (Beckman Coulter).

Wyniki

Publikacja 1.

Wolak M, Bojanowska E, Staszewska T, Ciosek J, Juszcak M, Drobnik J.
The role of histamine in the regulation of the viability, proliferation and Transforming Growth Factor β 1 secretion of rat wound fibroblasts.
Pharmacological Reports Volume 69, Issue 2, April 2017, Pages 314-321.

Celem pierwszej części badań było sprawdzenie czy histamina stosowana w stężeniach 10^{-4} – 10^{-8} M może modyfikować aktywność metaboliczną fibroblastów z ziarniny rany, proliferację komórek oraz sekrecję TGF β 1. Rezultaty badań wykazały statystycznie istotny wzrost aktywności metabolicznej komórek pod wpływem histaminy stosowanej w zakresie 10^{-6} – 10^{-8} M, natomiast przy stężeniu 10^{-4} M wzrost aktywności komórek nie był istotny statystycznie (Fig.1; publikacja 1). W kolejny etapie przystąpiłam do sprawdzenia, czy obserwowany efekt histaminy jest zależny od receptorów histaminowych. W tym celu zbadalam czy zastosowanie ketotifenu (10^{-7} M) może znieść badany efekt histaminy stosowanej w stężeniu 10^{-8} M. W eksperymencie tym potwierdziłam stymulujący wpływ histaminy na aktywność metaboliczną komórek oraz udowodniłam, że działanie to jest zniesione przez ketotifen – antagonistę receptora H1 (ketotifen + histamina). Stosowanie samego ketotifenu nie wywoływało statystycznie istotnego efektu. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenie wskazuje, że histamina zwiększa aktywność metaboliczną komórek poprzez aktywację receptora H1 (Fig.2; publikacja 1). Celem dodatkowego potwierdzenia powyższego wniosku zbadalam wpływ 2-pyridylethylamine dihydrochloride (10^{-4} – 10^{-8} M) – agonisty receptora H1 na aktywność metaboliczną komórek z ziarniny ran. Stosowany agonista H1 podwyższał, podobnie jak histamina aktywność metaboliczną komórek. Efekt ten był istotny statystycznie dla stężeń

w przedziale 10^{-6} – 10^{-8} M. Wyniki te potwierdzają udział receptora H1 w regulacji aktywności metabolicznej komórek ran poprzez histaminę (Fig.3; publikacja 1). Następne eksperymenty wykazały, że histamina stosowana w stężeniu 10^{-4} M podwyższa wydzielanie TGFbeta1 przez fibroblasty ran. Ponadto, wzrost wydzielania TGF beta1 stwierdzono po zastosowaniu agonisty H1 (10^{-4} M), (Fig.4; publikacja 1). Kolejne prace pozwoliły zaobserwować zahamowanie wydzielania TGFbeta1 przez ketotifen - inhibitor receptora H1 (ketotifen + histamina), natomiast sam ketotifen nie wpływał na poziom badanego czynnika wzrostu w hodowli (Fig.5; publikacja 1). W dalszej części prac potwierdziłam ekspresję receptora H1 na komórkach z ziarniny ran oraz wyższą gęstość receptorów H1 w tych komórkach w porównaniu do fibroblastów pobranych z nieuszkodzonej skóry (Fig.6; publikacja 1).

Kolejne doświadczenia nie wykazały wpływu histaminy na liczbę komórek w hodowli (Tabela 1; publikacja 1) lub ich proliferację (Tabela 2; publikacja 1). Ponadto badana amina nie zmieniała aktywności metabolicznej komórek pobranych z nieuszkodzonej skóry (Tabela 3; publikacja 1). Stosowanie ranitydyny (inhibitora receptora H2), ciproxifanu (inhibitora receptora H3) oraz JNJ7777120 (inhibitora receptora H4) nie wpływało w sposób istotny statystycznie na efekt działania histaminy tj. na aktywność metaboliczną komórek pobranych z ziarniny ran. Ranitydyna nieznacznie hamowała wzrost aktywności metabolicznej indukowanej przez histaminę (efekt nieistotny statystycznie), zatem, aby całkowicie wykluczyć udział receptora H2 podaliśmy do komórek amthamine dihydrobromide (agonistę receptora H2). Substancja ta okazała się nieefektywna we wszystkich zastosowanych stężeniach (10^{-4} – 10^{-8} M). Wyniki te sugerują, że żaden z receptorów H2, H3, H4 nie uczestniczy w regulacji metabolizmu komórek pobranych z ziarniny ran.

Wniosek: Histamina pobudza aktywność metaboliczną komórek pobranych z ziarniny ran. Działanie to jest zależne od pobudzenia receptora H1. Wykluczono jednocześnie udział innych receptorów histaminowych w regulacji aktywności metabolicznej fibroblastów. Ponadto potwierdzono obecność receptora H1 w komórkach pobranych z ziarniny ran. Histamina nie wpływa na aktywność metaboliczną fibroblastów izolowanych z nieuszkodzonej skóry. Efekt ten koreluje z niską gęstością receptorów H1 na tych komórkach. Większe stężenia histaminy zwiększają uwalnianie TGFbeta1 z fibroblastów ziarniny ran. Działanie to jest zależne od pobudzenia H1 receptora.

Publikacja 2.

Wolak M, Bojanowska E, Staszewska T, Piera L, Szymański J, Drobnik J. Histamine augments collagen content via H1 receptor stimulation in cultures of myofibroblasts taken from wound granulation tissue. Molecular and Cellular Biochemistry, 2021 Feb;476(2):1083-1092. doi: 10.1007/s11010-020-03974-6.

Celem kolejnego etapu doświadczeń, w oparciu o uzyskane wyniki opisane w publikacji 1, było określenie czy histamina działająca bezpośrednio na miofibroblasty pochodzące z ziarniny rany może wpływać na włóknienie.

Wyizolowane z ziarniny ran komórki charakteryzują się ekspresją alfa aktyny (alpha smooth muscle actin), desminy i wimentyny (Fig. 1a, publikacja 2). Antygeny te są typowe dla miofibroblastów. W ramach eksperymentów przy zastosowaniu histaminy w stężeniach 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-4} M i 10^{-4} M zaobserwowałam zwiększoną zawartość kolagenu w porównaniu z kontrolą (Fig. 2a, publikacja 2). Ponadto nie stwierdziłam wpływu histaminy stosowanej

w stężeniu 10^{-4} M na ekspresję genów łańcuchów alfa 1 kolagenu typu I lub III w hodowli miofibroblastów (Fig. 2b i c, publikacja 2). Wyniki te wskazują na postranskrypcyjny mechanizm regulacji włóknienia. Potwierdziłam również ekspresję alfa aktyny (alpha smooth muscle actin), desminy i wimentyny w komórkach wyizolowanych z nieuszkodzonej skóry szczurów eksperymentalnych (Fig. 3a, publikacja 2), były to komórki adherentne do powierzchni hodowlanej szalek Petriego, charakteryzujące się różnym kształtem (podłużnym, wrzecionowatym, gwiaździstym). Dane te pozwalają na stwierdzenie, że wyizolowano miofibroblasty. W hodowlach miofibroblastów otrzymanych z nieuszkodzonej skóry stwierdzono większą zawartość kolagenu (Fig. 3b, publikacja 2) pod wpływem histaminy. (Fig. 3a, publikacja 2). Istotnie większą zawartość kolagenu odnotowałam w hodowlach traktowanych histaminą w stężeniu 10^{-4} M i 10^{-6} M, a dla stężenia 10^{-5} M widoczny efekt był nieistotny statystycznie.

Podjęto również próbę identyfikacji receptora histaminowego odpowiedzialnego za regulację gromadzenia kolagenu w hodowlach (Fig. 4 a, b, c, publikacja 2). Eksperymenty przeprowadzono na komórkach wyizolowanych z tkanki ziarninowej modelu rany (siatka polipropylenowa wprowadzana podskórną szczurom) a otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze ustalenia dotyczące wpływu histaminy w stężeniu 10^{-4} M na wzrost poziomu kolagenu w hodowlach (Fig. 4 a i b, publikacja 2). Inhibitor receptora histaminowego H1 tj. ketotifen (10^{-3} M) hamował wzrost poziomu kolagenu pod wpływem histaminy (Fig. 1a, publikacja 2), natomiast podawanie ketotifenu (10^{-3} M) bez histaminy nie wpływało na zawartość białka kolagenowego. Inhibitor receptora histaminowego H2 ranitydyna (10^{-3} M) nie hamowała wzrostu poziomu kolagenu pod wpływem histaminy. Stosowanie ranitydyny (10^{-3} M) bez histaminy nie modyfikowało poziomu białka

kolagenowego w hodowli (Fig. 4b, publikacja 2). Agonista receptora H1, dichlorowodorek 2-pirydyloetyloaminy, zastosowany w dawkach w zakresie od 10^{-5} M do 10^{-4} M, zwiększył zawartość kolagenu w hodowlach (Fig. 4c, publikacja 2), pozostałe stężenia nie były efektywne.

W ramach prac badawczych sprawdzono także, czy zastosowane podczas eksperymentów substancje mogą wpływać na ekspresję alfa aktyny, desminy i wimentyny w wyizolowanych z ziarniny ran komórkach. Ekspresja badanych antygenów była zmniejszana przez ketotifen lub ranitydynę (Fig. 1c i d, publikacja 2). Obserwacja ta wymaga dodatkowych badań w celu jej szerszego wyjaśnienia. W pozostałych doświadczeniach nie stwierdzono zmian ekspresji badanych antygenów (Fig. 1a, b, e, f, publikacja 2).

Wnioski: Histamina wywiera bezpośredni wpływ na hodowle myofibroblastów pobranych z ziarniny rany, powodując podwyższenie zawartości kolagenu w hodowli komórkowej poprzez stymulację receptora histaminowego H1. Przedstawiony mechanizm może mieć potencjał terapeutyczny. Histamina podwyższa również gromadzenie kolagenu w hodowlach pochodzących z nieuszkodzonej skóry.

Publikacja 3.

Wolak M, Bojanowska E, Krzymińska A, Drobnik J. The effect of histamine on healing and fibrosis. Wpływ histaminy na procesy gojenia i włóknienia. Problems in Contemporary Medicine part I, UMedical Reports, 2021, 17(1):69-85.

Celem publikacji nr 3 było przytoczenie dowodów udokumentowanych w literaturze oraz naszych badaniach, opisujących wpływ histaminy na procesy gojenia ran oraz włóknienie narządów. W niniejszej pracy przedstawiono mechanizm procesu

gojenia ran, który składa się z kilku nakładających się na siebie faz: hemostazy, zapalenia, migracji i proliferacji komórek, biosyntezy białek i przebudowy rany. Ponadto w kolejnym rozdziale opisano rolę komórek tłuszcznych w procesach reparacyjnych. Liczne doniesienia pokazują znaczące nagromadzenie komórek tłuszcznych w ranie w różnych fazach gojenia, natomiast deficyt tych komórek wiąże się z hamowaniem tegoż procesu. Podobny wpływ na procesy reparacyjne wywiera farmakologiczna stabilizacja mastocytów. Zaobserwowano jednocześnie korelację między liczbą mastocytów w ranie, a liczbą miofibroblastów oraz dynamiką gromadzenia białka kolagenowego.

Adekwatny odczyn zapalny w ranie wpływa na szybkość gojenia oraz określa jakość blizny. Histamina jest mediatorem zapalenia, który w istotny sposób wywiera regulacyjny wpływ na procesy gojenia i bliznowacenia. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach eksperymentalnych udowodniono, że histamina przyspiesza gojenie ran skórnych, zwiększa kolagenogenezę i podwyższa poziom glikozoaminoglikanów. Działanie histaminy w procesach gojenia wiąże się z regulacją przepływu krwi przez ranę lub bezpośrednim działaniem histaminy na komórki ziarniny ran poprzez pobudzenie receptorów błonowych głównie H1. W doświadczeniach przeprowadzonych na miofibroblastach pobranych z ran powierzchniowych udowodniono, że histamina zwiększa aktywność metaboliczną komórek, podwyższa poziom kolagenu oraz zwiększa poziom transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). Przeprowadzone badania własne oraz przegląd literatury dokumentują istotny regulacyjny wpływ histaminy na procesy gojenia ran i włóknienia narządów. We wczesnych i późnych etapach reparacji stwierdzono wzrost liczby i zwiększoną degranulację komórek tłuszcznych. Zjawisku temu towarzyszył wzrost poziomu histaminy. Udokumentowano wpływ histaminy na wzrost syntezy kolagenu,

glikozaaminoglikanów, angiogenezę oraz proliferację i migrację fibroblastów jednak mechanizm działania histaminy nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Wiadomo jednak, że amina ta wywiera regulacyjny wpływ na procesy gojenia, proliferację oraz migrację komórek przez receptory błonowe. Najlepiej udokumentowany jest wpływ pobudzenia receptorów H1. Wiadomo również, że histamina może zwiększać wydzielanie czynników wzrostu takich jak TGF- β 1 i bFGF. Wydzielanie TGF- β 1 jest również zależne od pobudzenia receptora H1, należy również pamiętać o stabilizowaniu przez histaminę struktury kolagenu lub kompleksów kolagen–glikozaaminoglikany w środowisku kwaśnym.

Identyfikacja receptorów histaminowych lub szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału w procesach gojenia i włóknienia typowych dla różnych narządów pozwoli na celowaną interwencję farmakologiczną.

Podsumowanie i wnioski

1. Histamina pobudza aktywność metaboliczną komórek izolowanych z ziarniny ran. Działanie to jest zależne od pobudzenia receptora H1.
2. Potwierdzono obecność receptora H1 w komórkach izolowanych z ziarniny ran.
3. Histamina zwiększa wydzielanie TGF β 1 z komórek pobranych z ziarniny ran za pośrednictwem receptora H1.
4. Badana amina nie zmienia aktywności metabolicznej komórek pobranych z nieuszkodzonej skóry.

5. Histamina zwiększa gromadzenie kolagenu w hodowli miofibroblastów pobranych z ziarniny ran poprzez pobudzenie receptora H1. Podobny wpływ histaminy na gromadzenie kolagenu stwierdzono w komórkach pobranych z nieuszkodzonej skóry.
6. Istnieją liczne dowody opisane w literaturze, dotyczące regulacyjnego wpływu histaminy na procesy gojenia i włóknienia narządów. Obecna praca eksperymentalna wypełnia lukę w piśmiennictwie wyjaśniając mechanizm działania histaminy na miofibroblasty ziarniny ran.

Wniosek końcowy

Histamina korzystnie wpływa na procesy gojenia (akumulację kolagenu, aktywność metaboliczną komórek, wydzielanie TGFbeta1) poprzez pobudzenie receptora H1 w komórkach pochodzących z ziarniny ran.

Literatura

1. Li D, Wu N. Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 187 (2022) 109882.
2. Sen C. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates, *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019 Feb 1; 8(2): 39–48., 10.1089/wound.2019.0946.
3. Gottrup F, Apelqvist J, Price P. EWMA Patient Outcome Group. Wyniki kontrolowanych i porównawczych badań nad ranami niegojącymi się; zalecenia służące podniesieniu jakości danych w opiece i leczeniu ran. *Leczenie Ran* 2010; 7: 13-44.

4. Gospodarek E. Zakażenia ran przewlekłych. W: Leczenie ran przewlekłych. Szewczyk MT, Jawień A (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012; 12-22.
5. Natarajan S, Williamson D, Stiltz A, et al: Advances in wound care and healing technology. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 269 –275.
6. Stadelmann W, Digenis A, Tobin G. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.* 1998;176(2A Suppl):26S–38S.
7. Wilkinson H, Hardman M. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.*10: 200223.<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200223>.
8. Pool J. Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol* 1977; 43: 776 – 780.
9. Lawrence W. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998; 25: 321 – 340.
10. Guo S, Dipietro L. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;89 (219–229).
11. Bannon P, Wood S, Restivo T, Campbell L, Hardman M, Mace K. Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice. *Dis Model Mech* 2013;6 (1434–1447).
12. Gajbhiye S, Wairkar S. Collagen fabricated delivery systems for wound healing: A new roadmap, *Biomaterials Advances* Volume 142, November 2022, 213152, <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213152>.
13. Arseni L, Lombardi A, Orioli D. From structure to phenotype: impact of collagen alterations on human health. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:1407. doi: 10.3390/ijms19051407.
14. Bradley K, McConnell-Breul S, Crystal R. Collagen in the human lung. Quantitation of rates of synthesis and partial characterization of composition. *J Clin Investig.* (1975) 55:543–50. doi: 10.1172/JCI107961.
15. Bogaczewicz J, Sysa-Jędrzejowska A, Woźnicka A. Rola Metaloproteinaz macierzy w pierwotnych układowych zapaleniach naczyń. *Pol. Merk. Lek.* 2008, 24, 140–146.

16. Collins H, Morris T, Watson S. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br. J. Cancer* 2001, 84, 1664–1670.
17. Broughton G, Janis J, Attinger C. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>.
18. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *Faseb J.* 2006, 20, 2366–2368. doi:10.1096/fj.06-5837fje.
19. Tonnesen M, Feng X, Clark R. Angiogenesis in Wound Healing, *Angiogenesis In Wound Healing*. Volume 5, 2000, Issue 1, P40-46. DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x>.
20. Blair R, Meng H, Marchese M. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2691-2700.
21. Brzezińska-Błaszczyk E, Czuwaj M, Kuna P. Histamine release from mast cells of various species induced by histamine releasing factor from human lymphocytes. *Agents Actions.*, 1987;21(1-2):26-31.
22. Atkins F, Clark R. Mast cells and fibrosis. *Arch Dermatol*; 1987;123:191–193.
23. Sporn M, Roberts A, Wakefield N, et al.: Some recent advances in the chemistry and biology of TGF-beta. *J. Cell. Biol.* 1987; 105:1039-1045.
24. Gazerly H, Elbardisey D, Eltokhy H, Teaama D. Effect of Transforming Growth Factor Beta 1 on Wound Healing in Induced Diabetic Rats., *International Journal of Health Sciences*, 2013, Vol. 7, No. 2.
25. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013;64(5):384-396, DOI: 10.5603/EP.2013.0022.
26. Roberts A, Sporn M, Assoian R, et al. Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulating of collagen formation in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1986; 83:4167-4171.
27. O’Kane S, Ferguson M. Transforming growth factor betas and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:63—78.

28. Chin D, Boyle G, Parsons P, Coman W. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)? *The British Association of Plastic Surgeons* (2004) 57, 215–221, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2003.12.012>.
29. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine Release from Mast Cells and Basophils. *Handb Exp Pharmacol.*, 2017;241:121-139. doi: 10.1007/164_2017_18.
30. Zawisza E, Bardadin J. Receptory H1, H2, H3, H4 i leki antyhistaminowe, *Borgis - Postępy Nauk Medycznych* 11/2007, s. 453-455.
31. Dąbrowski R. Histamine in the process of development of connective tissue. *Acta Physiol Pol.*, 1981;22:141-63.
32. Hulspas R, O’Gorman M, Wood B, et al. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009, 76: 355-64.
33. Baran J. Nowa Epoka Cytometrii Przepływowej- Przewodnik Po Współczesnych Cytometrach I Ich Zastosowanie. *Postępy Biologii Komórki*, Tom 35, 2008 Supplement Nr 24 (3-15).
34. Guillamat-Prats R, The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration, *Scarring and Regeneration. Cells* 2021, 10, 1729. <https://doi.org/10.3390/cells10071729>

Streszczenie w języku polskim

Wpływ histaminy na czynność miofibroblastów izolowanych z ziarniny ran.

Trudno gojące się rany to duży problem wpływający na jakość życia i zdrowie pacjentów, ale także ogromny problem ekonomiczny, coraz silniej odczuwalny w starzejącym się społeczeństwie (rany przewlekłe dotyczą 120 na 100 000 osób w wieku od 45 do 65 lat i liczba ta wzrasta do 800 na 100 000 u osób w wieku powyżej 75 lat).

Głównym celem procesu gojenia ran jest przywrócenie ciągłości uszkodzonego narządu poprzez wytworzenie blizny. Proces ten składa się z następujących faz: hemostazy, zapalenia, migracji i proliferacji komórek, syntezy białek oraz przebudowy blizny. Wspomniane etapy muszą być ściśle ze sobą „skoordynowane”, aby skutecznie naprawić uszkodzoną tkankę. Adekwatny proces zapalny w istotny sposób odpowiada za regulację gojenia. Hamowanie reparacji stwierdza się w stanach potencjalizacji lub zmniejszenia stanu zapalnego w ranie.

Wcześniejsze badania przeprowadzone in vivo pokazały regulacyjny wpływ histaminy na procesy gojenia i kolagenogenezy. Większość danych wykazała pobudzający wpływ histaminy na procesy gojenia oraz wzrost zawartości kolagenu w ziarninie ran. Mechanizm działania histaminy nie został wyjaśniony, sformułowano natomiast dwie hipotezy. Pierwsza z nich zakładała, że amina ta rozszerza naczynia krwionośne w ranie, zwiększając jej ukrwienie i w ten sposób przyspiesza gojenie. Druga hipoteza podkreślała możliwość pobudzania kolagenogenezy poprzez bezpośrednie działanie histaminy na komórki syntetyzujące kolagen (fibroblasty lub miofibroblasty).

Celem moich badań było podjęcie próby wyjaśnienia mechanizmu działania histaminy w procesie gojenia. Sprawdziłam czy badana amina działając bezpośrednio na komórki wyizolowane z ziarniny ran może modyfikować aktywność metaboliczną komórek, gromadzenie białka kolagenowego w hodowli oraz sekrecję transformującego czynnika wzrostu beta1 (TGFbeta1). Ponadto podjęłam próbę określenia typu receptora histaminowego, który pośredniczy w regulacji czynności badanych komórek.

Metody. Model rany, siatki polipropylenowej wszczepionej podskórnice w okolicy łądzwiowej szczura szczepu Wistar, posłużył do wytworzenia ziarniny ran. Po 28 dniach od wszczepienia implantu, przerośniętą ziarniną siatkę polipropylenową usuwałam z organizmu zwierzęcia. Otrzymana ziarnina posłużyła do izolacji komórek i założenia hodowli. Celem identyfikacji komórek badano ekspresję alfa-aktywnych komórek mięśniowych gładkich, wimentyny i desminy przy pomocy cytometrii przepływowej. TGF beta1 oznaczany był metodą immunoenzymatyczną, natomiast do pomiaru proliferacji komórek wykorzystywałam test BrdU. Aktywność metaboliczną komórek badałam przy pomocy testu MTT. Kolagen oznaczałam metodą Woessnera. Ekspresja genów dla kolagenu typu I i III (*COL1A1* i *COL3A1*) określana była przy pomocy RT PCR, czyli łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

Wyniki badań wykazały statystycznie istotny wzrost aktywności metabolicznej komórek pod wpływem histaminy stosowanej w zakresie 10^{-6} – 10^{-8} M. Następnie udowodniłam, że działanie histaminy jest zniesione przez ketotifen – antagonistę receptora H1. Zbadałam również wpływ 2-pyridylethylamine dihydrochloride (10^{-4} – 10^{-8} M) – agonisty receptora H1 na aktywność metaboliczną komórek z ziarniny ran. Stosowany agonista H1 podwyższał, podobnie jak histamina, aktywność metaboliczną komórek. Wyniki te potwierdzają udział receptora H1 w regulacji aktywności metabolicznej komórek ran przez histaminę. Następne eksperymenty wykazały, że histamina stosowana w stężeniu 10^{-4} M podwyższa wydzielanie TGFbeta1 przez komórki z ziarniny ran. Po zastosowaniu agonisty H1 (10^{-4} M) stwierdzono również wzrost wydzielania TGF beta1. Kolejne prace pozwoliły zaobserwować zahamowanie wydzielania TGF beta1 przez ketotifen - inhibitor receptora H1. Kolejny eksperyment potwierdził ekspresję receptora H1 na komórkach z ziarniny ran oraz wykazał wyższą gęstość receptorów H1 w tych komórkach w porównaniu do fibroblastów pobranych z nieuszkodzonej skóry.

Nie wykazano wpływu histaminy na liczbę komórek w hodowli lub ich proliferację. Ponadto badana amina nie zmieniała aktywności metabolicznej komórek pobranych z nieuszkodzonej skóry. Stosowanie ranitydyny (inhibitora receptora H2), ciproxifanu (inhibitora receptora H3) oraz JNJ7777120 (inhibitora receptora H4) nie wpływało w sposób istotny statystycznie na modyfikowaną przez histaminę aktywność metaboliczną komórek pobranych z ziarniny ran. Ponieważ, ranitydyna nieznacznie hamowała wzrost aktywności metabolicznej indukowanej przez histaminę

(efekt nieistotny statystycznie), aby całkowicie wykluczyć udział receptora H2 podaliśmy do komórek amthamine dihydrobromide (agonistę receptora H2). Substancja ta okazała się nieefektywna we wszystkich zastosowanych stężeniach (10^{-4} – 10^{-8} M). Wyniki te sugerują, że żaden z receptorów H2, H3, H4 nie uczestniczy w regulacji metabolizmu komórek pobranych z ziarniny ran.

Wyzolowane z ziarniny ran komórki charakteryzują się ekspresją alfa aktyny komórek mięśniowych gładkich, desminy i wimentyny. Antygeny te są typowe dla miofibroblastów. W ramach eksperymentów zaobserwowałam zwiększoną zawartość kolagenu w hodowlach traktowanych histaminą. Ponadto nie stwierdziłam wpływu histaminy na ekspresję genów łańcuchów alfa 1 kolagenu typu I lub III w hodowli miofibroblastów. Potwierdziłam również ekspresję alfa aktyny komórek mięśniowych gładkich, desminy i wimentyny w komórkach wyizolowanych z nieuszkodzonej skóry szczurów oraz zaobserwowałam większą zawartość kolagenu pod wpływem histaminy.

Podjęłam również próbę identyfikacji receptora histaminowego odpowiedzialnego za regulację gromadzenia kolagenu w hodowlach. Wyniki potwierdziły wcześniejsze ustalenia dotyczące wpływu histaminy w stężeniu 10^{-4} M na wzrost poziomu kolagenu. Inhibitor receptora histaminowego H1, ketotifen, hamował wzrost poziomu kolagenu pod wpływem histaminy. Natomiast inhibitor receptora histaminowego H2 ranitydyna (10^{-3} M) nie hamowała wzrostu poziomu kolagenu pod wpływem histaminy. Agonista receptora H1, dichlorowodorek 2-pirydyloetyloaminy, zastosowany w dawkach w zakresie od 10^{-5} M do 10^{-4} M, zwiększył zawartość kolagenu w hodowlach.

Ponadto, sprawdziłam czy zastosowane podczas eksperymentów substancje (agoniści i antagoniści receptorów histaminowych) mogą wpływać na ekspresję alfa aktyny, desminy i wimentyny w wyizolowanych z ziarniny ran komórkach. Ekspresja badanych antygenów była zmniejszana przez ketotifen lub ranitydynę. Obserwacja ta wymaga odrębnych badań w celu jej wyjaśnienia. W pozostałych eksperymentach nie stwierdzono zmian ekspresji badanych antygenów.

Podsumowanie i Wnioski. Histamina zwiększa aktywność metaboliczną komórek pobranych z ziarniny ran. Działanie to jest zależne od pobudzenia receptora H1. Wykluczono jednocześnie udział innych receptorów histaminowych w regulacji

aktywności metabolicznej komórki. Ponadto potwierdzono obecność receptora H1 w komórkach pobranych z ziarniny ran. Histamina nie wpływa na aktywność metaboliczną fibroblastów izolowanych z nieuszkodzonej skóry. Efekt ten koreluje z niską gęstością receptorów H1 na tych komórkach. Wysokie stężenia histaminy pobudzają uwalnianie TGFbeta1 z fibroblastów ziarniny ran. Działanie to jest zależne od pobudzenia receptor H1.

Histamina wywiera bezpośredni wpływ na hodowle miofibroblastów pobranych z ziarniny rany, powodując podwyższenie zawartości kolagenu w hodowli komórkowej poprzez stymulację receptora histaminowego H1. Przedstawiony mechanizm może mieć potencjał terapeutyczny.

Histamina podwyższa również gromadzenie kolagenu w hodowlach pochodzących z nieuszkodzonej skóry.

Histamina korzystnie wpływa na procesy gojenia (akumulację kolagenu, aktywność metaboliczną komórek, wydzielanie TGFbeta1) poprzez pobudzenie receptora H1 w komórkach pochodzących z ziarniny ran.

Streszczenie w języku angielski

Influence of histamine on the activity of myofibroblasts isolated from wound granulation tissue.

Chronic, non-healing wounds are an important problem affecting the quality of life and health of patients, but this is also a huge economic problem, which is increasingly experienced in an aging society (chronic wounds affect 120 per 100,000 people aged from 45 to 65, and this number increases to 800 per 100,000 in people aged over 75).

The main goal of the wound healing process is to restore the continuity of the damaged organ by creating a scar. This process consists of the following phases: hemostasis, inflammation, cell migration and proliferation, protein synthesis and scar remodeling. These steps must be closely "coordinated" with each other in order to effectively repair damaged tissue. An adequate inflammatory process plays an important role in regulating healing. Both exaggerated or decreased inflammation impairs wound healing.

Earlier studies conducted in vivo showed the regulatory effect of histamine on the healing and collagenogenesis processes. Most of the data showed a stimulatory effect of histamine on the healing processes and this amine increased in the collagen content within a wound granulation tissue. The mechanism of histamine action has not been elucidated. Two hypotheses were formulated: The first assumed that this amine dilates blood vessels in the wound, increasing its blood supply and thus accelerating healing. The second hypothesis emphasized the possibility of collagenogenesis stimulation through the direct action of histamine on cells synthesizing collagen (fibroblasts or myofibroblasts).

The aim of the present research, was to explain the mechanism of histamine action on healing process. I checked whether the tested amine, acting directly on cells isolated from wound granulation tissue, could modify the metabolic activity of cells, an accumulation of collagen in culture and secretion of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1). In addition, I made an attempt to determine the type of histamine receptor that mediates in the regulation of the activity of the examined cells.

Methods. A wound model, a polypropylene mesh implanted subcutaneously in the lumbar region of a Wistar rat, was used to create wound granulation tissue. After 28 days from implant insertion, the polypropylene mesh overgrown with granulation tissue was removed from the animal's body. The obtained granulation tissue was used to isolate cells and establish a culture. In order to identify the cells, the expression of smooth muscle alpha-actin, vimentin and desmin was studied by flow cytometry. TGF beta1 was determined by the immunoenzymatic method, while the BrdU test was used to measure cell proliferation. I tested the metabolic activity of the cells using the MTT test. Collagen was determined using the Woesner method. Gene expression for collagen type I and III (*COL1A1 and COL3A1*) was determined using RT PCR, i.e. real-time polymerase chain reaction.

The results of the research showed a statistically significant increase in the metabolic activity of cells under the influence of histamine used in the range of 10^{-6} - 10^{-8} M. Then I proved that the effect of histamine is abolished by ketotifen - an H1 receptor antagonist. I also examined the effect of 2-pyridylethylamine dihydrochloride (10^{-4} - 10^{-8} M) - an H1 receptor agonist on the metabolic activity of wound granulation tissue cells. The H1 agonist increased, similarly to histamine, the metabolic activity of cells. These results confirm the involvement of the H1 receptor in the regulation of the metabolic activity of the cells by histamine. Subsequent experiments showed that 10^{-4} M histamine increased the secretion of TGF-beta1 by the examined cells. An increase in TGF beta1 secretion was also found after application of the H1 agonist (10^{-4} M). Next experiments allowed to observe the inhibition of TGFbeta1 secretion by ketotifen - an H1 receptor inhibitor. Moreover, expression of the H1 receptor on cells from wound granulation tissue was confirmed. Higher density of H1 receptors in these cells compared to fibroblasts taken from intact skin was showed.

Histamine has not been shown to affect the number of cells in culture or their proliferation. Moreover, the tested amine didn't change the metabolic activity of cells taken from intact skin. The use of ranitidine (H2 receptor inhibitor), ciproxifan (H3 receptor inhibitor) and JNJ7777120 (H4 receptor inhibitor) had no statistically significant effect on the histamine-modified metabolic activity of cells collected from wound granulation tissue. Since ranitidine slightly inhibited the increase in metabolic activity induced by histamine (the effect was not statistically significant), in order to

completely exclude the involvement of the H2 receptor, we administered amthamine dihydrobromide (an H2 receptor agonist) to the cells. This substance turned out to be ineffective in all concentrations used (10^{-4} - 10^{-8} M). These results suggest that none of the H2, H3, and H4 receptors participate in the regulation of metabolism of cells taken from the wound granulation tissue.

Cells isolated from wound granulation tissue were proved to express alpha smooth muscle actin, desmin and vimentin. These antigens are typical for myofibroblasts. Furthermore, increased collagen content in cultures treated with histamine was observed. In addition, I found no effect of histamine on the expression of alpha 1 chain genes of type I or III collagen in cultured myofibroblasts. I also confirmed the expression of smooth muscle cell alpha actin, desmin and vimentin in cells isolated from intact skin of rats and in myofibroblast cultures a higher collagen content was found after histamine treatment.

I also attempted to identify the histamine receptor responsible for the regulation of collagen accumulation in cultures. The results confirmed previous findings showing that 10^{-4} M histamine increases in collagen levels. The histamine H1 receptor inhibitor, ketotifen, inhibited the increase in collagen levels under the influence of histamine. On the other hand, the histamine H2 receptor inhibitor ranitidine (10^{-3} M) did not inhibit the increase in collagen levels under the influence of histamine. The H1 receptor agonist, 2-pyridylethylamine dihydrochloride, applied at doses ranging from 10^{-5} M to 10^{-4} M, increased the collagen content within the cultures.

Moreover, I checked whether the substances used during the experiments (agonists and antagonists of histamine receptors) can affect the expression of alpha actin, desmin and vimentin in cells isolated from wound granulation tissue. Antigen expression was downregulated by ketotifen or ranitidine. The observation requires further research to explain it. In subsequent experiments, no changes of the antigens expression were observed.

Summary and Conclusions. Histamine stimulates the metabolic activity of cells taken from wound granulation tissue. This effect is dependent on the stimulation of the H1 receptor. At the same time, the participation of other histamine receptors in the regulation of the metabolic activity of the cell was excluded. Moreover, the presence of the H1 receptor was confirmed in cells taken from wound granulation tissue.

Histamine does not affect the metabolic activity of fibroblasts isolated from intact skin. This effect correlates with the low density of H1 receptors on these cells. High histamine concentrations stimulate the release of TGFbeta1 from wound granulation fibroblasts. This action is dependent on the stimulation of the H1 receptor.

Histamine has a direct effect on myofibroblasts taken from the wound granulation tissue, causing an increase in the collagen content in the cell culture by stimulating the histamine H1 receptor. The presented mechanism may have therapeutic potential.

Histamine also increases collagen accumulation in cultures derived from intact skin.

Histamine has a beneficial effect on healing processes (collagen accumulation, metabolic activity of cells, secretion of TGFbeta1) by stimulating the H1 receptor in cells derived from wound granulation tissue.

Publikacje w oryginałach

1. Wolak M, Bojanowska E, Staszewska T, Ciosek J, Juszcak M, Drobnik J. The role of histamine in the regulation of the viability, proliferation and Transforming Growth Factor β 1 secretion of rat wound fibroblasts. *Pharmacological Reports* Volume 69, Issue 2, April 2017, Pages 314-321. IF= 2,787 MEiN= 25
2. Wolak M, Bojanowska E, Staszewska T, Piera L, Szymański J, Drobnik J. Histamine augments collagen content via H1 receptor stimulation in cultures of myofibroblasts taken from wound granulation tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021 Feb;476(2):1083-1092. doi: 10.1007/s11010-020-03974-6. IF= 3,842 MEiN= 70
3. Wolak M, Bojanowska E, Krzymińska A, Drobnik J. The effect of histamine on healing and fibrosis. Wpływ histaminy na procesy gojenia i włóknienia. *Problems in Contemporary Medicine part I, UMedical Reports*, 2021, 17(1):69-85. MEiN= 20

Suma IF= 6,629

Suma MEiN= 115