



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Έκθεση της *Drosophila Melanogaster* σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου και επιδράσεις στο σωματικό βάρος, το μεταβολικό ρυθμό και την κινητικότητα της”

Περικλής Μαρνάς

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σωτήριος Ζαρογιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Επιβλέπων
- Χρυσή Χατζόγλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας
- Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Μάρτιος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

MASTER THESIS

**“Exposure of *Drosophila Melanogaster* to cigarette smoke extract and effects
on its body weight, metabolic rate and locomotion ”**

By

Periklis Marnas

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Sotirios Zarogiannis, Associate Professor of Physiology, Supervisor
- Chrissi Hatzoglou, Professor of Medical Physiology
- Dimitrios Bogdanos, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine.

Larissa, March 2023

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου.....	8
1.1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος.....	8
1.1.2 Επιθήλιο των αεραγωγών του αναπνευστικού συστήματος.....	9
1.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).....	10
1.3 Καπνός τσιγάρου.....	13
1.3.1 Επιπτώσεις του καπνού τσιγάρου στην υγεία του ανθρώπου.....	14
1.3.2 Επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στο επιθήλιο των αεραγωγών.....	15
1.3.3 Επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στην μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT)	15
1.4 <i>Drosophila Melanogaster</i> ως πειραματικό μοντέλο.....	16
1.4.1 Κύκλος ζωής της <i>Drosophila Melanogaster</i>	18
1.4.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά αρσενικών και θηλυκών <i>Drosophila</i> <i>Melanogaster</i>	19
1.4.3 Αναπνευστικό σύστημα <i>Drosophila Melanogaster</i>	20

1.4.4 Μορφολογία της τραχείας της <i>Drosophila Melanogaster</i>	21
1.4.5 Χρήση της <i>Drosophila Melanogaster</i> ως πειραματικό μοντέλο μελέτης παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος.....	22
1.5 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	25
2. Υλικό και Μέθοδοι.....	26
2.1 Διατήρηση καλλιέργειας <i>Drosophila Melanogaster</i>	26
2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού.....	26
2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου (CSE).....	27
2.4 Πειραματικός σχεδιασμός.....	29
2.5 Δοκιμασία Αρνητικής Γεώταξης.....	29
2.6 Μεταβολές του μεταβολικού ρυθμού.....	31
2.7 Μέτρηση βάρους.....	34
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	35
3. Αποτελέσματα.....	36
3.1 Αποτελέσματα αρνητικής γεώταξης.....	36
3.2 Αποτελέσματα μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού.....	39
3.3 Αποτελέσματα μέτρησης βάρους.....	41
4. Συζήτηση.....	45
5. Βιβλιογραφία.....	50
6. Βιογραφικό Σημείωμα.....	52

Ευχαριστίες

Στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την χρονική περίοδο 2022-2023, με επιβλέπων τον κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας.

Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ζαρογιάννη καθώς με δέχθηκε ως φοιτητή του ΠΜΣ στην ομάδα του, ενώ ταυτόχρονα αποτέλεσε αρωγό με τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο για την επιστημονική όσο και για την προσωπική μου εξέλιξη σαν άνθρωπος. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Χρυσή Χατζόγλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας που με δέχθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο πυλώνες για την εκπόνηση την πτυχιακής μου εργασίας. Ο πρώτος είναι όλα τα μέλη του εργαστηρίου πρώτον για την εκπαίδευση που μου παρείχαν, δεύτερον γιατί στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου (όπως και εγώ), τόσο στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας όσο και στις υπόλοιπες ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο και τρίτον για το άριστο φιλικό κλίμα συνεργασίας που επικρατεί. Ο δεύτερος αποτελεί η οικογένεια μου που βρίσκεται δίπλα μου σε κάθε επιπλέον βήμα που αποφασίζω να κάνω για την επιστημονική μου εξέλιξη.

Περίληψη

Το κάπνισμα αποτελεί σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία και τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την Χρόνια Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ). Επιπλέον έχει σοβαρές επιπτώσεις στον επιθήλιο των αεραγωγών του αναπνευστικού συστήματος του ανθρώπου, το οποίο αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε εισπνεόμενα παθογόνα. Το αναπνευστικό σύστημα της *Drosophila Melanogaster* αποτελείται μόνο από επιθηλιακά κύτταρα και έχει σημαντικές ομοιότητες με το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, με αποτέλεσμα να αποτελεί εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο για την μελέτη ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος.

Στόχος της πτυχιακής εργασίας ήταν η έκθεση της *Drosophila Melanogaster* σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου (CSE) διαφορετικών συγκεντρώσεων και ο προσδιορισμός της κινητικότητας, του μεταβολικού ρυθμού και του βάρους, με σκοπό τη χρήση της ως οργανισμό μοντέλο για την ΧΑΠ.

Drosophila Melanogaster 2-4 ημερών αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες ή με τροφή που περιείχε CSE σε συγκεντρώσεις 10%, 25%, 50%. Προσδιορίστηκε η κινητικότητα τους με τη δοκιμασία Αρνητικής Γεώταξης, ο μεταβολικός τους ρυθμός με τον υπολογισμό της παραγωγή CO₂, και μετρήθηκε το βάρος τους.

Η κινητικότητα (σε % μυγών που έφτασαν τα 10 cm) μειώθηκε σημαντικά σε θηλυκές μύγες εκτεθειμένες σε 10% CSE και σε αρσενικές σε 25% CSE συγκριτικά με τις συνθήκες Control. Η παραγωγή CO₂ (σε ml/ώρα/μύγα) αυξήθηκε σημαντικά σε αρσενικές μύγες εκτεθειμένες σε 50% CSE, συγκριτικά με τις συνθήκες Control, ενώ στις θηλυκές δεν παρατηρήθηκε διαφορά. Το βάρος (σε mg/μύγα) μειώθηκε σημαντικά στις θηλυκές μύγες σε όλες τις συνθήκες, ενώ στις αρσενικές μόνο στο 50% CSE, συγκριτικά με τα control.

Συμπερασματικά το CSE μειώνει την κινητικότητα της *Drosophila Melanogaster*, αυξάνει το μεταβολικό ρυθμό, και μειώνει το βάρος. Δεδομένης της ομοιότητας των επιδράσεων του καπνού τσιγάρου στον άνθρωπο και στη *Drosophila Melanogaster*, τα ευρήματά μας θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ΧΑΠ.

Abstract

Cigarette smoke is a major threat to public health and the main risk factor of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In addition, it has serious implications on the airway epithelium of the human respiratory system, which is the first line of defense against inhaled pathogens. The respiratory system of *Drosophila Melanogaster* consists only of epithelial cells and has significant similarities to the human respiratory system, thus being an excellent experimental model for studies of respiratory diseases.

The purpose of the thesis was the exposure of *Drosophila Melanogaster* in cigarette smoke extract (CSE) of different concentrations and the determination of locomotor activity, metabolic rate and body weight, for the purpose of using it as a model for COPD.

Drosophila melanogaster 2-4 days old were grown in standard conditions or with food containing CSE with different concentrations 10%, 25%, 50%. The locomotor activity was determined by the negative geotaxis assay, the metabolic rate with the calculation of CO₂ production, and in the end the weight of the flies was measured.

Locomotor activity (% of flies reaching 10 cm) was significant lower in female flies exposed to 10% CSE and in male flies exposed to 25% CSE compared to control. CO₂ production (in µl/hr/fly) was significant higher in male flies exposed to 50% CSE compared to control, while no difference was observed in females. The weight (mg/fly) was significant lower in female flies in all conditions, while only in male flies exposed to 50% CSE, compared to control.

In conclusion, the CSE reduces the locomotion of *Drosophila Melanogaster*, increases the metabolic rate, and reduces weight. The similarities of these effects in smokers and in *Drosophila Melanogaster* in our findings could be used in the study of molecular mechanisms of COPD.

Γενικό Μέρος

1.Εισαγωγή

1.1 Αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου

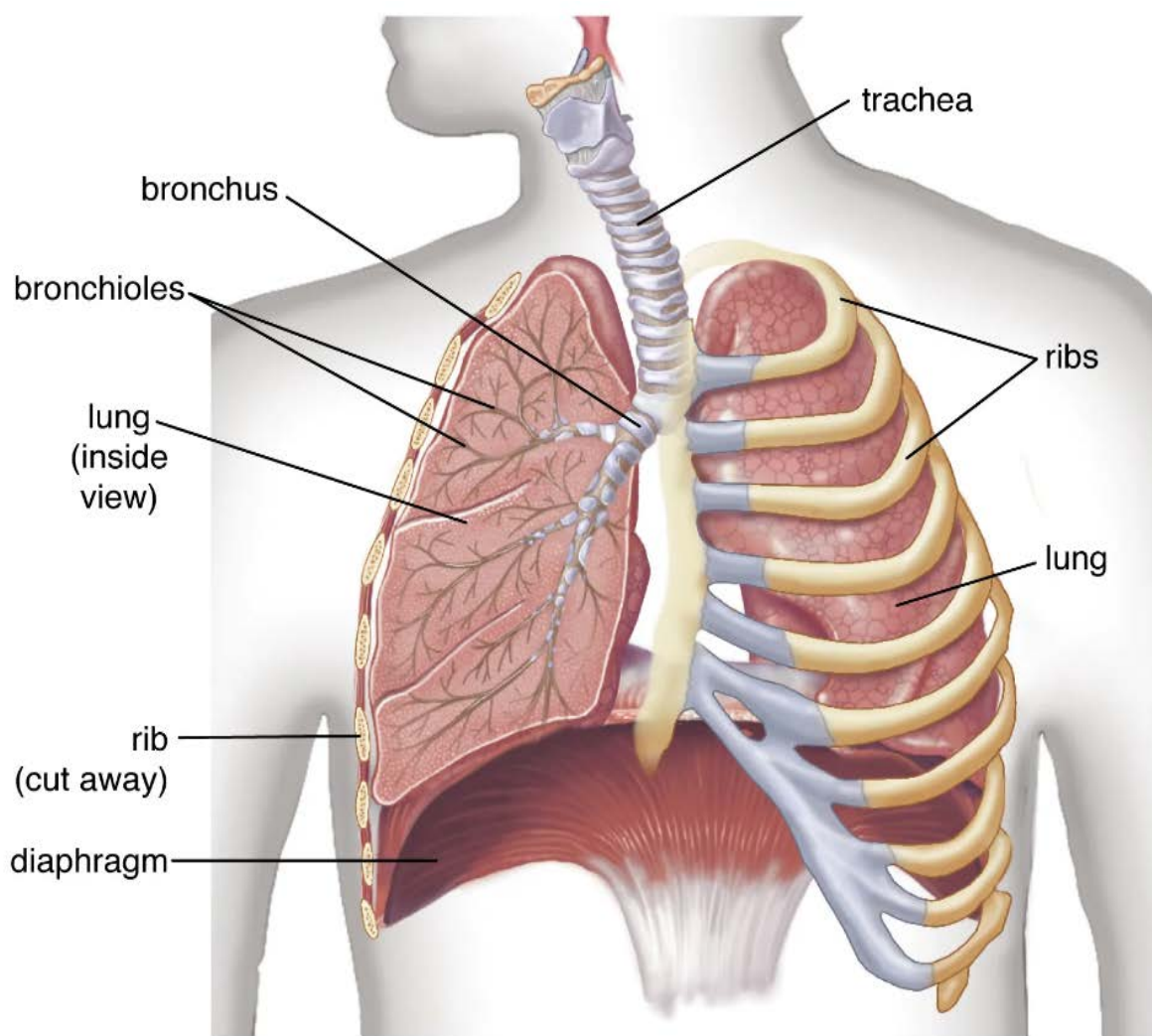
Το αναπνευστικό σύστημα αποτελεί το σύνολο των οργάνων, με το οποίο επιτυγχάνεται η εξωτερική αναπνοή, δηλαδή η ανταλλαγή αερίων O_2 και CO_2 μεταξύ εξωτερικού περιβάλλοντος και των κυττάρων του οργανισμού [1]. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία της αναπνοής περιλαμβάνει:

1. την μετακίνηση αέρα, μέσα και έξω από τους πνεύμονες με βάση τις ανάγκες του οργανισμού για κατανάλωση O_2 και αποβολή CO_2 .
2. Την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του αίματος των πνευμονικών τριχοειδών και των κυψελίδων, μέσω παθητικής διάχυσης.
3. Την μεταφορά O_2 και CO_2 , μέσω του αίματος, μεταξύ ιστών και πνευμόνων
4. Την ανταλλαγή αερίων με παθητική διάχυση, μεταξύ, του αίματος των τριχοειδών στη συστηματική κυκλοφορία και των κυττάρων των διάφορων ιστών.

1.1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου διακρίνεται σε ανώτερο και κατώτερο αναπνευστικό, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**. Το ανώτερο αναπνευστικό περιλαμβάνει την στοματική και ρινική κοιλότητα, μέσω των οποίων εισέρχεται και εξέρχεται ο αέρας κατά την εξωτερική αναπνοή, την τραχεία, η οποία ξεκινά από τον φάρυγγα και μέσω την οποίας συνεχίζεται εισροή του αέρα, και τον λάρυγγα, ο οποίος εντοπίζεται στην είσοδο της τραχείας, από τον οποίο διέρχεται ο αέρας από ένα άνοιγμα των φωνητικών χορδών που ονομάζεται γλωττίδα.

Το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα περιλαμβάνει τους βρόγχους, οι οποίοι αποτελούν δύο κλάδους, στους οποίους διαιρείται η τραχεία, τον δεξιό και αριστερό, οι οποίοι εισέρχονται στον δεξιό και αριστερό πνεύμονα αντίστοιχα. Στο εσωτερικό του πνεύμονα οι βρόγχοι αρχίζουν να διακλαδίζονται σε μικρότερους κλάδους που ονομάζονται βρογχιόλια. Οι τελικές διακλαδώσεις των βρογχιολίων ονομάζονται τελικά βρογχιόλια, στα οποία εντοπίζονται οι κυψελίδες που αποτελούν αεροφόρους σάκους, μέσω των οποίων γίνει η ανταλλαγή O_2 και CO_2 μεταξύ αέρα και αίματος [1].

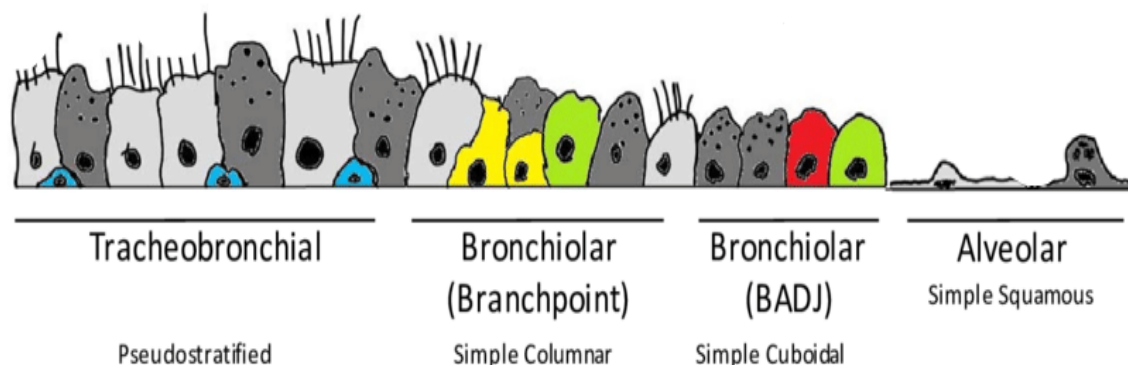


© Encyclopædia Britannica, Inc.

Εικόνα 1. Ανατομία αναπνευστικού συστήματος (Encyclopaedia Britannica).

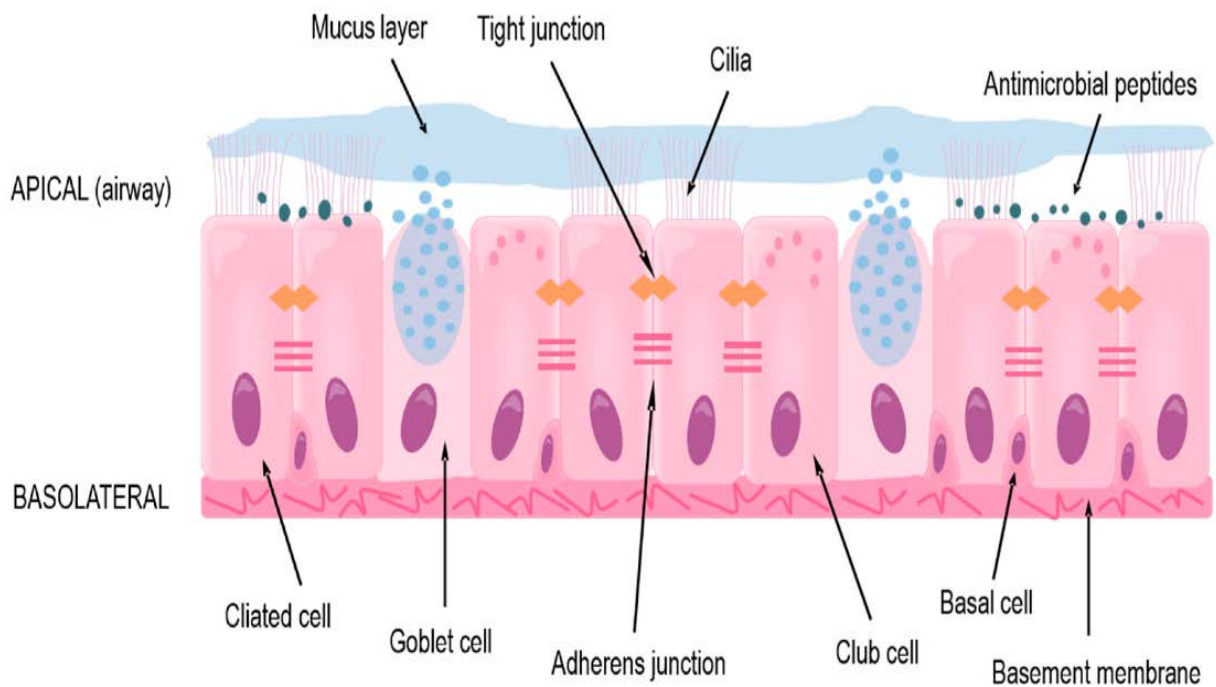
1.1.2 Επιθήλιο των αεραγωγών του αναπνευστικού συστήματος

Οι αεραγωγοί του αναπνευστικού συστήματος είναι επενδυμένοι με ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με το εξωκυττάριο υγρό και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε εισπνεόμενα παθογόνα [2]. Οι μεγάλοι αεραγωγοί, όπως οι βρόγχοι και η τραχεία αποτελούνται από ψευδοπολύστιβο επιθήλιο και διαθέτουν υποβλεννογόνιους αδένες. Οι αρχικές διακλαδώσεις των βρογχιολίων αποτελούνται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο, οι τελικές διακλαδώσεις από μονόστιβο κυβικό επιθήλιο και οι κυψελίδες από μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2**.



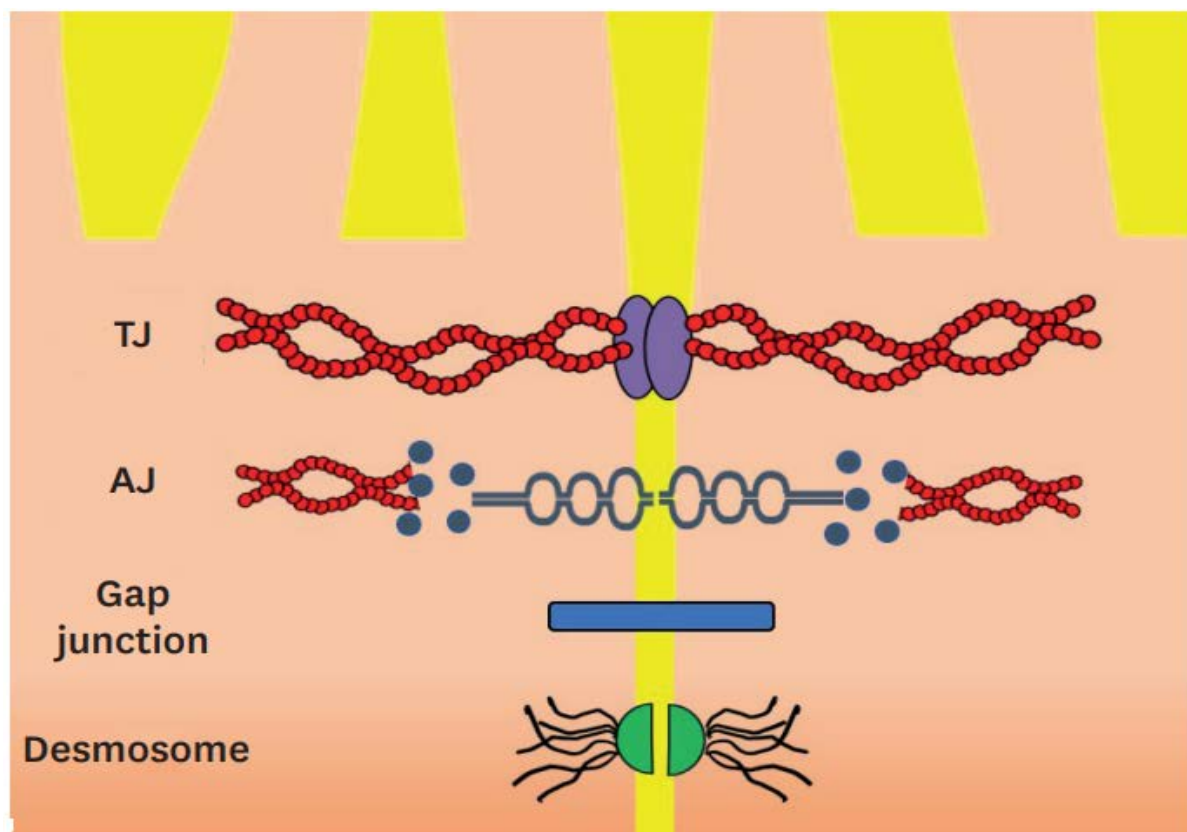
Εικόνα 2. Επιθήλιο των αεραγωγών (Joshua S. et.al., 2009).

Το επιθήλιο της τραχείας αποτελείται κυρίως από goblet, ciliated και basal cells, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3**. Πιο συγκεκριμένα όταν το αναπνευστικό σύστημα προσβάλλεται από εισπνεόμενα παθογόνα πραγματοποιείται η βλεννογόνος κάθαρση, τα goblet cells του υποβλεννογόνιου αδένα παράγουν βλενη, μέσα στην οποία παγιδεύονται τα εισπνεόμενα παθογόνα, και έπειτα απομακρύνονται με τους κροσσούς των ciliated cells και αποβάλλονται [3]. Ο ρόλος των basal cells είναι η ικανότητα διαφοροποίησης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, ανάλογα με τις ανάγκες των αεραγωγών. Εντός των κυψελίδων υπάρχουν τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, που είναι υπεύθυνα για την ανταλλαγή αερίων, και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, προσδίδουν δομική στήριξη στις κυψελίδες και σε περίπτωση βλάβης αποδιαφοροποιούνται και πολλαπλασιάζονται, αποκαθιστώντας τα κατεστραμμένα κυψελιδικά κύτταρα τύπο I.



Εικόνα 3. Κυτταρικοί τύποι του επιθηλίου των αεραγωγών (Jenny C. et.al., 2020).

Βασικό χαρακτηριστικό του επιθηλίου που επενδύει του αεραγωγούς του αναπνευστικού συστήματος αποτελεί η δημιουργία του επιθηλιακού φραγμού, μέσω διακυτταρικών συνδέσεων, με αποτέλεσμα το επιθήλιο να παρουσιάζει επιλεκτική διαπερατότητα [4]. Οι διακυτταρικές συνδέσεις αποτελούνται από τους Adherens Junctions, Gap Junctions, Tight junctions και τα Desmosomes. Οι Adherens Junctions διατηρούν την πολικότητα του επιθηλίου και το διαιρούν σε κορυφαίο και πλαγιοβασικό διαμέρισμα. Οι Gap Junctions επιτρέπουν την διακυτταρική επικοινωνία, ενώ τα Desmosomes συντελούν στην συγκρότηση των κυττάρων. Οι Tight Junctions εντοπίζονται στο κορυφαίο διαμέρισμα και αποτελούνται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών αγκύρωσης, όπως η οκλουδίνη και οι κλαουδίνες, και ρυθμίζουν την διαπερατότητα του επιθηλίου, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4. Διακυτταρικές συνδέσεις του επιθηλίου (Lee PH. et.al., 2021).

1.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

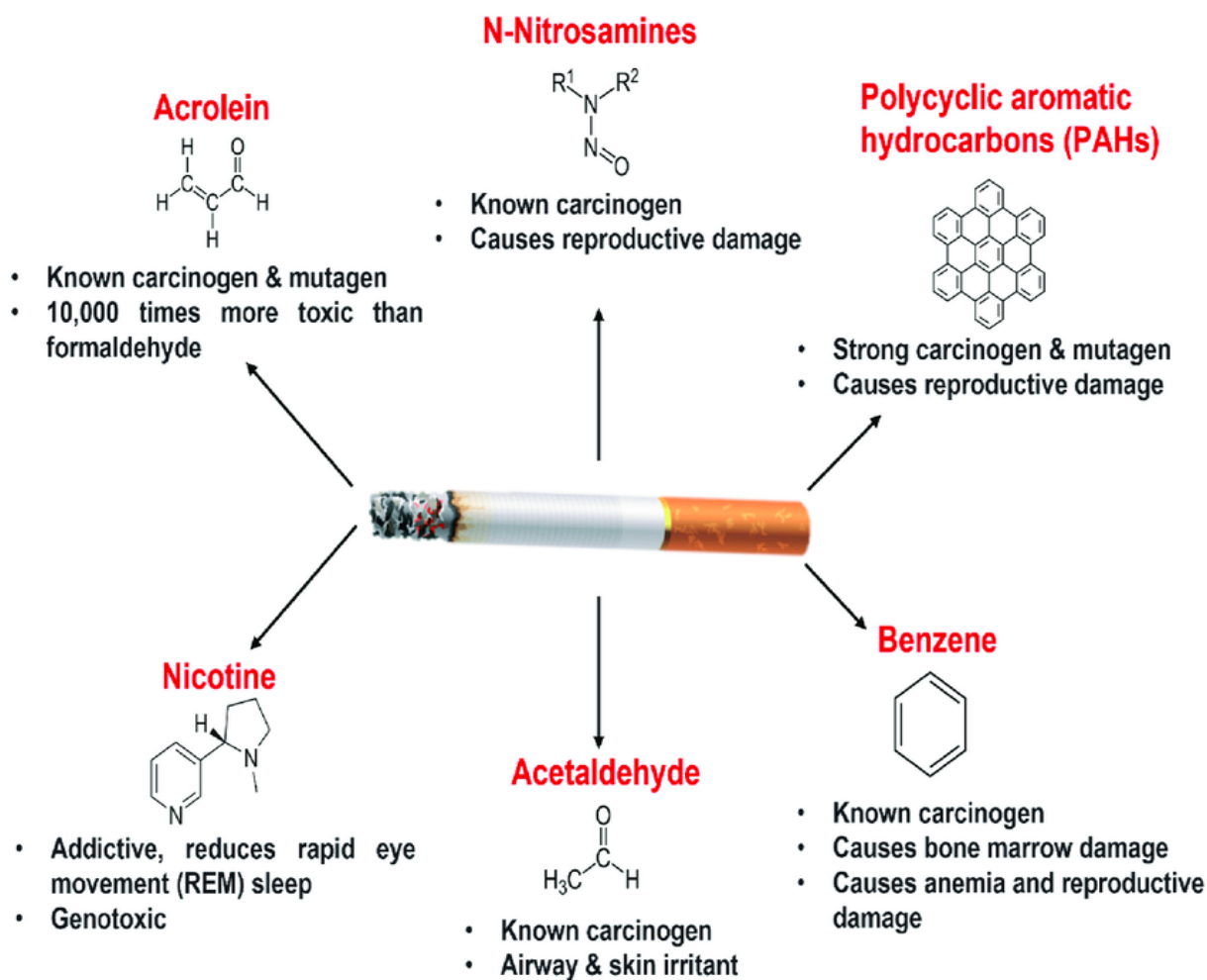
Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από δυσκολία στην αναπνοή, εξαιτίας της απόφραξης της ροής αέρα, λόγω βλαβών των αεραγωγών και των κυψελίδων, καθώς και παροξύνσεις. Βασικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι ότι παρουσιάζει ετερογένεια και συννοσηρότητα. Η ΧΑΠ προκαλείται από την έκθεση σε εισπνεόμενα σωματίδια, όπως ο καπνός του τσιγάρου και οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, σε συνδυασμό με γενετικούς, αναπτυξιακούς και κοινωνικούς παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν σε σταδιακή βλάβη των ιστών των πνευμόνων [5]. Ο κύριος παράγοντας κινδύνου της ΧΑΠ αποτελεί η έκθεση σε καπνό τσιγάρου, με την διακοπή του καπνίσματος να αποτελεί μονόδρομο για την βελτίωση των συμπτωμάτων και την μείωση του κινδύνου.

Ο καπνός του τσιγάρου και ατμοσφαιρικοί ρύποι, όπως τα αιωρούμενα σωματίδια, το όζον και η ρύπανση των οχημάτων οδηγούν σε φλεγμονή, με αποτέλεσμα την καταστροφή των ιστών των πνευμόνων [6]. Βασικός παράγοντας που οδηγεί στην παθολογία της ΧΑΠ αποτελεί το οξειδωτικό στρες, καθώς η αυξημένη παραγωγή ROS οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών, μέσω την αυξημένη παραγωγή μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως ο TNFα και

οι ιντερλευκίνες. Επιπλέον σε ασθενείς με ΧΑΠ έχει παρατηρηθεί ανισορροπία πρωτεασών-αντιπρωτεασών, καθώς αυξημένα επίπεδα πρωτεασών προερχόμενα από φλεγμονώδη κύτταρα έχουν ανιχνευθεί, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται υψηλά επίπεδα πρωτεόλυσης, βλάβη στους ιστούς των πνευμόνων και δημιουργία εμφυσήματος [7].

1.3 Καπνός τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου αποτελεί μία από τις κυριότερες απειλές της δημόσιας υγείας, με τον αριθμό των καπνιστών παγκοσμίως ανέρχεται περίπου στο 20% [8]. Περιέχει πάνω από 4000 χημικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να βρίσκονται σε μορφή αερίων, καθώς και σε μορφή σωματιδίων. Κύριες επιβλαβείς χημικές ενώσεις του καπνού τσιγάρου αποτελούν η νικοτίνη, το CO₂, το CO, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ελεύθερες ρίζες και πτητικές ενώσεις θείου, οι οποίες έχουν σοβαρές επιπτώσεις για τον οργανισμό και ιδιαίτερα για το αναπνευστικό σύστημα, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5**. Αυτές οι ουσίες παρουσιάζουν καρκινογόνο και τοξική δράση, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για πρωτεΐνες, λιπίδια, το DNA και πολλά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια. Για παράδειγμα, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το κάπνισμα έχει ως αποτέλεσμα βλάβη στο DNA, προφλεγμονώδη απελευθέρωση κυτοκίνης και οδηγεί σε κυτταρικός θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών [9]. Τα οξειδωτικά που περιέχονται στον καπνό τσιγάρου προκαλούν βλάβη στους πνεύμονες μέσω της εξάντλησης της γλουταθειόνης και άλλων αντιοξειδωτικών, αδρανοποίηση των αντιπρωτεασών και ενίσχυση της αναπνευστικής έκκρισης. Τα τοξικά σωματίδια προκαλούν επίσης μια προφλεγμονώδη απόκριση μέσω της ενεργοποίησης του μακροφάγων, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση των επιθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα 5. Περιεκτικότητα του καπνού τσιγάρου σε χημικές ενώσεις (Hina A. et.al., 2022).

1.3.1 Επιπτώσεις του καπνού τσιγάρου στην υγεία του ανθρώπου

Με την πάροδο του χρόνου ο καπνός τσιγάρου έχει συσχετιστεί με την παθολογία πολλών ασθενειών, όπως αναπνευστικές παθήσεις, καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη και πολλούς τύπους καρκίνου. Ιδιαίτερα επικίνδυνες χαρακτηρίζονται οι επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στο καρδιαγγειακό σύστημα, καθώς σχετίζονται άμεσα με την αύξηση κινδύνου εμφάνισης κολλικών και κοιλιακών αρρυθμιών, εμφράγματος του μυοκαρδίου και την δημιουργία καρδιακής ανεπάρκειας [10]. Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την γονιμότητα και την σεξουαλική διέγερση, με βασικό πρόβλημα να αποτελεί η έκθεση σε καπνό τσιγάρου μεγάλου ποσοστού γυναικών κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Έρευνες έχουν δείξει ότι κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ο καπνός τσιγάρου έχει σοβαρές επιπτώσεις στα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου, με αυξημένο κίνδυνο οι απόγονοι να εμφανίσουν κατά την παιδική, εφηβική και ενήλικη ηλικία ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος, όπως η ΧΑΠ και το άσθμα [11].

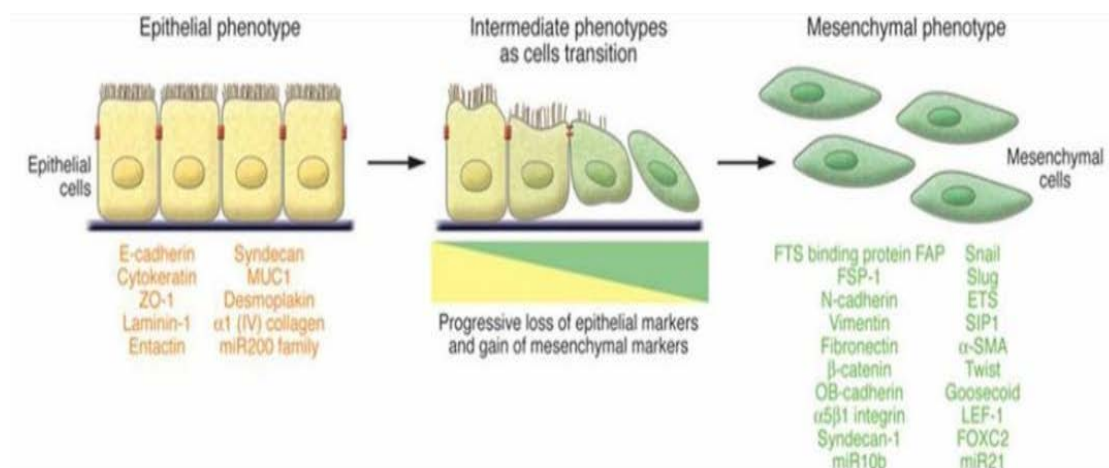
1.3.2 Επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στο επιθήλιο των αεραγωγών

Το επιθήλιο των αεραγωγών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε εισπνεόμενα παθογόνα. Το κάπνισμα θέτει σε κίνδυνο τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού, αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, και παρεμποδίζει την βλεννογόνο κάθαρση [9]. Η έκθεση σε καπνό τσιγάρου οδηγεί σε μεταπλασία των goblet cells και απόπτωση των ciliated cells, μεταβάλλοντας την έκκριση βλέννας που αποτελεί ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με ΧΑΠ. Επιπλέον ο καπνός τσιγάρου οξύνει τις βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις σε ασθενείς με ΧΑΠ, οι οποίες επηρεάζουν τη μεταφορά χλωρίου εντός των επιθηλιακών κυττάρων, ένα χαρακτηριστικό που παρατηρείται σε ασθενείς με κυστική ίνωση.

Η έκθεση σε καπνό τσιγάρου έχει ως αποτέλεσμα την ρήξη των διακυτταρικών συνδέσεων του επιθηλίου των αεραγωγών, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της διαπερατότητας του επιθηλιακού φραγμού και την ανεξέλεγκτη εισβολή εισπνεόμενων παθογόνων. Πιο συγκεκριμένα προκαλείται βλάβη στους Tight junctions, μέσω της επίδρασης ROS, που με έναν καταρράκτη αντιδράσεων οδηγούν σε μειωμένη έκφραση ZO-1 και ουκλουδινών. Επιπρόσθετα η υψηλή περιεκτικότητα ROS του καπνού τσιγάρου δημιουργεί βλάβες στους Adherens Junctions με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιείται η κυτταρική προσκόλληση.

1.3.3 Επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στην μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT)

Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου έχει συνδεθεί με την αναδιαμόρφωση των ιστών, το οποίο παρατηρείται σε ασθενείς με ΧΑΠ, μέσω μιας διαδικασίας που μετάβασης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT). Το EMT είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητα και την προσκόλληση τους, πραγματοποιείται ρήξη των διακυτταρικών συνδέσεων, απώλεια επιθηλιακών δεικτών, αύξηση μεσεγχυματικών δεικτών και αποκτούν μεταναστευτικές και επεμβατικές ιδιότητες για να γίνουν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6**. Το EMT έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζεται στην επούλωση τραυμάτων, στην ίνωση οργάνων, στην έναρξη της μετάστασης στον καρκίνο, καθώς και στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα, μέσω μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται και στη ΧΑΠ, όπως WNT/β-κατενίνη, Hedgehog (Hh) και TGF-β που αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αναδιαμόρφωσης των ιστών στη ΧΑΠ [3].



Εικόνα 6. EMT: Μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Sukhwinder S. Et.al., 2013).

1.4 *Drosophila Melanogaster* ως πειραματικό μοντέλο

Η *Drosophila Melanogaster* ή αλλιώς μύγα των φρούτων αποτελεί ένα έντομο της τάξης των δίπτερων και η ταξινόμησή της παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**.

Βασίλειο	Φύλο	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Υπογένος	Είδος
Ζώα	Αρθρόποδα	Έντομα	Δίπτερα	Drosophilidae	Drosophila	Sophophora	Drosophila Melanogaster

Πίνακας 1. Ταξινόμηση *Drosophila Melanogaster*.

Η *Drosophila Melanogaster* (**Εικόνα 7**) αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα πειραματικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής, αναπτυξιακής βιολογίας, φυσιολογίας και ιδιαίτερα σε μελέτες του νευρικού συστήματος του ανθρώπου. Η χρήση της ως οργανισμός μοντέλο παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της είναι ότι διαθέτει σύντομο κύκλο ζωής, χαμηλό κόστος και εύκολη συντήρηση της καλλιέργειας με αποτέλεσμα να μπορούν να πραγματοποιούνται πειράματα, ακόμα και στους απογόνους, σε σύντομο χρονικό διάστημα [12]. Επιπρόσθετα έχει μικρό μέγεθος, καθιστώντας εύκολο τον πειραματικό χειρισμό, ενώ η υψηλή γονιμότητα και η γρήγορη αναπαραγωγή έχει ως αποτέλεσμα την ευρεία χρήση της σε γενετικές μελέτες. Το γενετικό της υλικό, το οποίο αποτελείται από περίπου 14.000 γονίδια, οργανώνεται σε 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων, εκ των οποίων το ένα είναι φυλετικό (X, Y) και τα υπόλοιπα αυτοσωμικά (2, 3, 4). Ο κύριος λόγος που την καθιστά

εξαιρετικό μοντέλο είναι ότι διαθέτει ομόλογα γονίδια για το περίπου 65% των ανθρώπινων γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες.

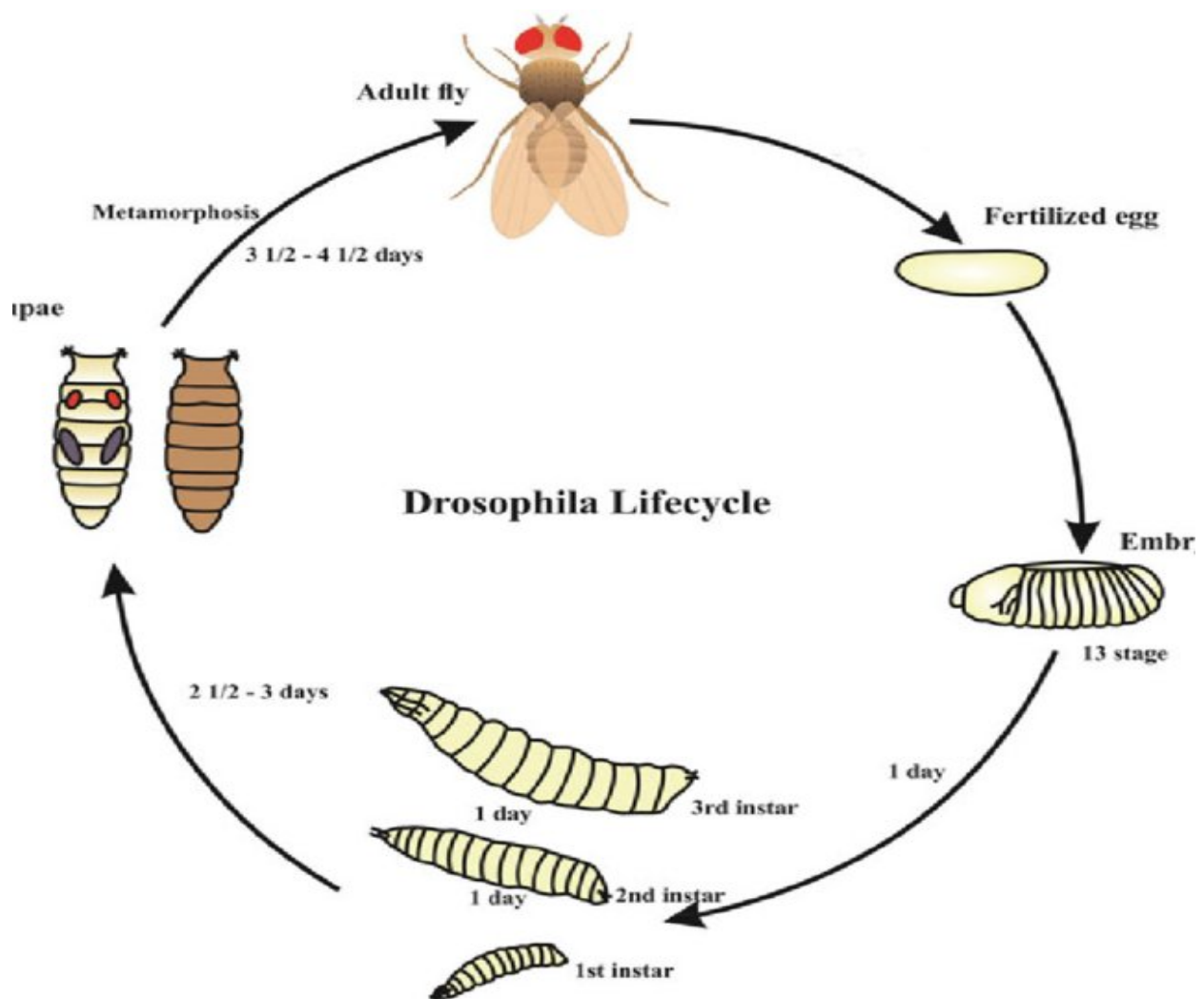


Εικόνα 7. Drosophila Melanogaster (Meredith E. et.al., 2017).

1.4.1 Κύκλος ζωής της *Drosophila Melanogaster*

Ο κύκλος ζωής της *Drosophila Melanogaster* είναι πολύ σύντομος και διαρκεί περίπου 8-14 ημέρες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Συνήθως ως εργαστηριακό μοντέλο αναπτύσσεται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C) και υγρασίας (50-60%) μέσα σε φιαλίδια που περιέχουν στο κάτω μέρος τους το φαγητό, με τον κύκλο ζωής να διαρκεί περίπου 10 ημέρες [13]. Μέχρι να γίνει ενήλικο έντομο η *Drosophila Melanogaster* περνάει από 4 αναπτυξιακά στάδια, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8**. Αρχικά με την διασταύρωση δύο ενήλικων μυγών προκύπτει το αυγό, το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο κάτω στην τροφή και εκεί

πραγματοποιείται το στάδιο της εμβρυογένεσης. Μέσα στις πρώτες κιόλας 24 ώρες το έμβρυο μεταμορφώνεται σε προνύμφη, η οποία παραμένει μέσα στην τροφή και αρχίζει να τρέφεται. Το στάδιο της προνύμφης διακρίνεται σε 3 φάσεις ανάπτυξης, οι οποίες είναι οι 1st instar larva, 2nd instar larva και 3rd instar larva. Με το πέρας τριών με τεσσάρων ημερών η προνύμφη φτάνει στη φάση ανάπτυξης 3rd instar larva, κατά την οποία απομακρύνεται από την τροφή και πηγαίνει στα τοιχώματα του φιαλιδίου, με σκοπό την μεταμόρφωση σε νύμφη. Σε χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών η ανάπτυξη πραγματοποιείται μέσα σε ένα κουκούλι από χιτίνη και στο τέλος προκύπτει ένα ενήλικο έντομο. Στα ενήλικα έντομα μετά από 8-12 ώρες μπορεί να πραγματοποιηθεί σεξουαλική αναπαραγωγή με αποτέλεσμα να ξεκινά ξανά ένας νέος κύκλος ζωής.



Εικόνα 8. Κύκλος ζωής *Drosophila Melanogaster* (Bedanta K. et.al., 2019).

1.4.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά αρσενικών και θηλυκών *Drosophila Melanogaster*

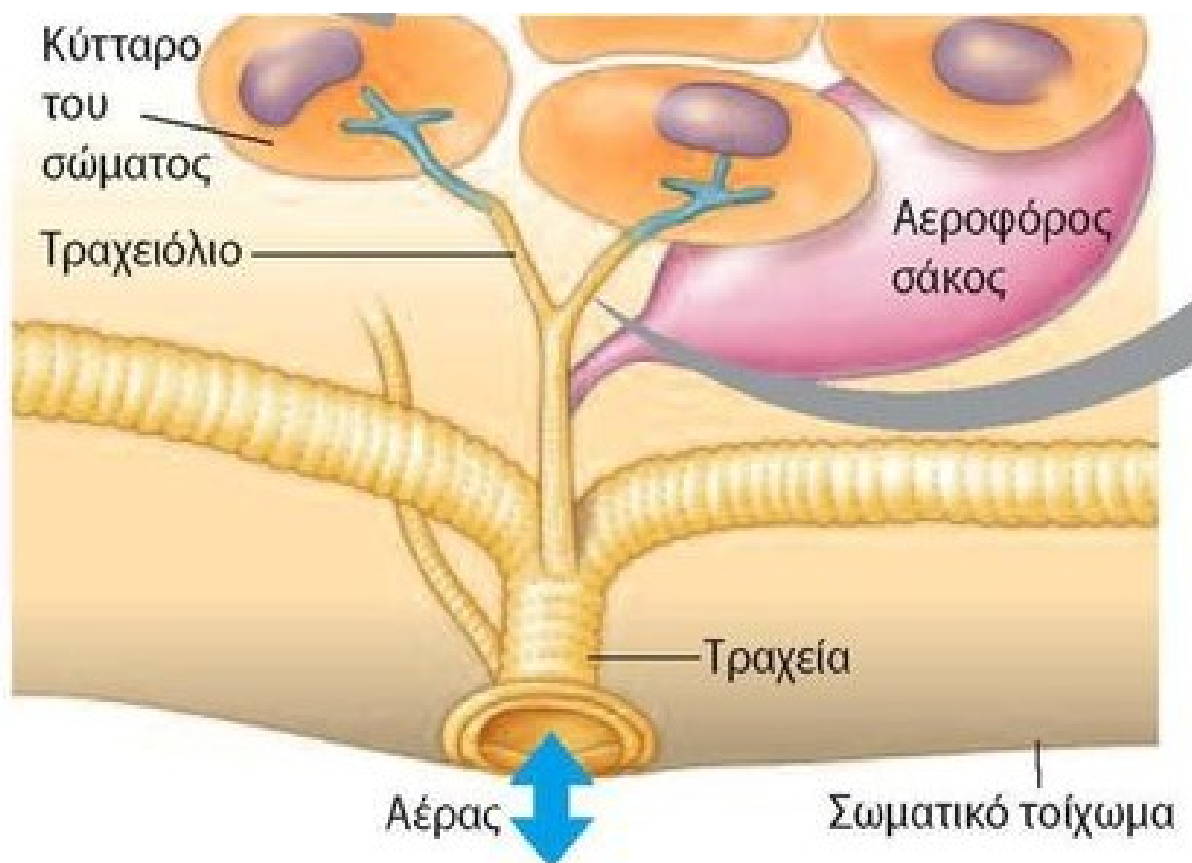
Κατά της διεξαγωγή των πειραμάτων θα πρέπει να μπορεί να πραγματοποιηθεί διάκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών *Drosophila Melanogaster*. Το κάθε φύλο διαθέτει τα δικά του μοναδικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν εύκολα κατά τον πειραματικό χειρισμό [14]. Βασική διαφορά συναντάται αρχικά στο μέγεθος των δύο φύλων, με τις θηλυκές μύγες να είναι αρκετά μεγαλύτερες από τις αρσενικές και με μεγαλύτερο σωματικό βάρος, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 9**. Το δεύτερο ευδιάκριτο χαρακτηριστικό αποτελεί η κοιλιά της κάθε μύγας. Πιο συγκεκριμένα τα αρσενικά διαθέτουν μαύρη κηλίδα στο κάτω μέρος της κοιλιάς τους, ενώ τα θηλυκά διαθέτουν μαύρες ρίγες. Τέλος τα αρσενικά διαθέτουν ένα μοναδικό ανατομικό χαρακτηριστικό στο πρώτο ζεύγος των ποδιών που ονομάζεται φυλετικό χτένι, το οποίο για να διακριθεί εύκολα απαιτείται η χρήση ηλεκτρονικού στερεοσκοπίου.



Εικόνα 9. *Drosophila Melanogaster*, στα αριστερά απεικονίζεται αρσενική και στα δεξιά θηλυκή μύγα (<https://arrogantscientist.wordpress.com/sexing-drosophila/>).

1.4.3 Αναπνευστικό σύστημα *Drosophila Melanogaster*

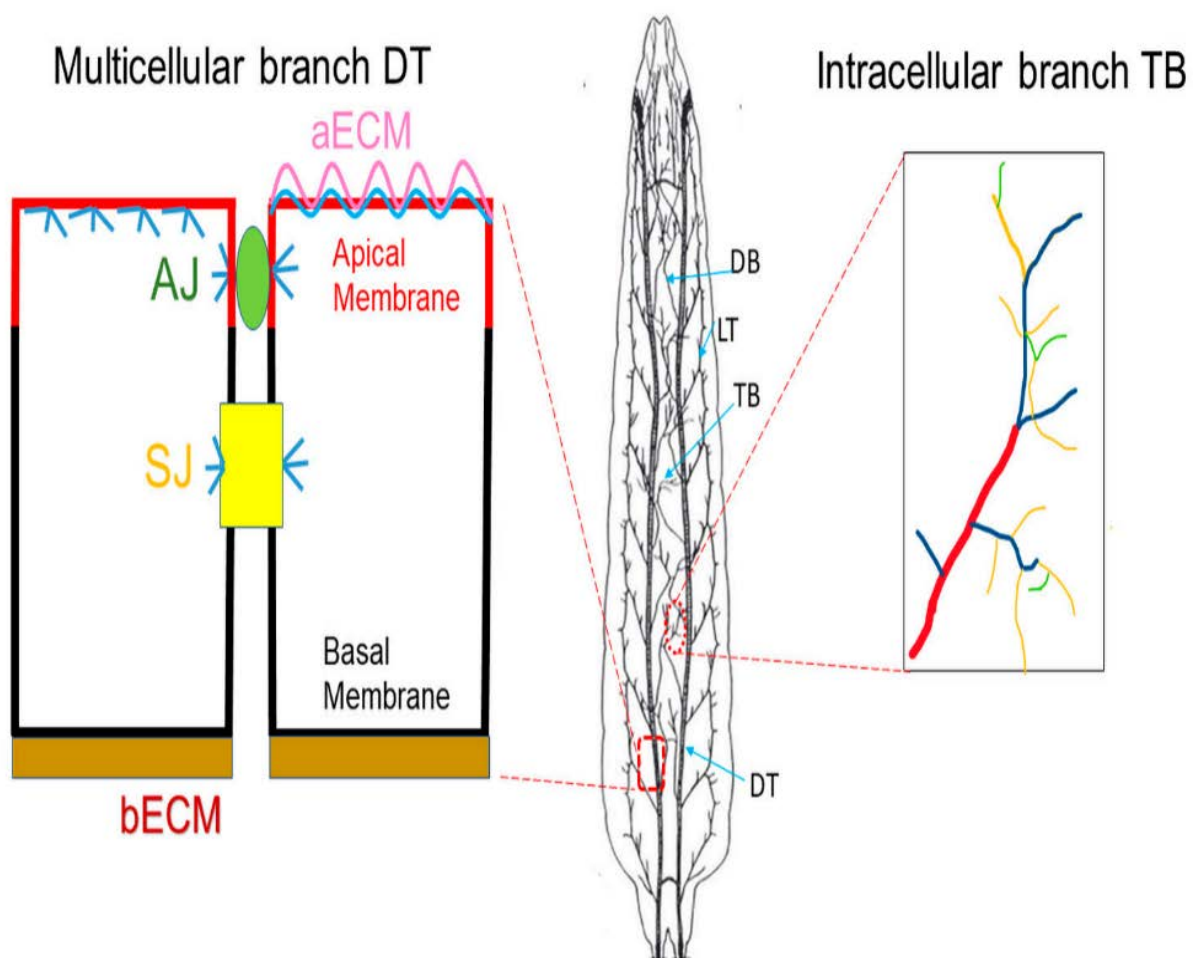
Το αναπνευστικό σύστημα της *Drosophila Melanogaster* αποτελείται κυρίως από την τραχεία, η οποία στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως ανάλογο των πνευμόνων του ανθρώπου. Αρχικά ο αέρας εισέρχεται στο σώμα των εντόμων από μικρούς πόρους που υπάρχουν κατά μήκος και πλάτος του σώματος, οι οποίοι ονομάζονται στίγματα. Από τα στίγματα ο αέρας εισέρχεται μέσα στην τραχεία, που αποτελεί τον κύριο αεραγωγό του αναπνευστικού συστήματος των εντόμων (**Εικόνα 10**). Η τραχεία μέσα στο σώμα διακλαδίζεται και εκτείνεται σε όλο το σώμα, με τις μικρότερες διακλαδώσεις να ονομάζονται τραχειόλια. Οι τελικές διακλαδώσεις της τραχείας έρχονται σε επαφή σχεδόν με κάθε κύτταρο του σώματος, όπου γίνεται και η ανταλλαγή αερίων με παθητική διάχυση, μέσω του υγρού επιθηλίου που επενδύει τα άκρα των τελικών διακλαδώσεων.



Εικόνα 10. Αναπνευστικό σύστημα *Drosophila Melanogaster* (Εντομολογία Τζανακάκης, University Studio Press)

1.4.4 Μορφολογία της τραχείας της *Drosophila Melanogaster*

Η τραχεία της *Drosophila Melanogaster* αποτελεί ένα διακλαδισμένο δίκτυο επιθηλιακών αεραγωγών με μονοστιβάδα από σφιχτά προσκολλημένα πολωμένα κύτταρα που περιβάλλουν έναν κεντρικό αυλό. Καθώς οι προνύμφη αναπτύσσεται ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR) καθοδηγεί τη μετανάστευση τραχεικών κυττάρων σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις, με σκοπό την ανάπτυξη νέων διακλαδώσεων [6]. Σχηματίζονται τεσσάρων ειδών διακλαδώσεις. Ο τύπος I αποτελεί διακλάδωση που σχηματίζεται από πολλαπλά κύτταρα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με ενδοκυτταρικές συνδέσεις, τέτοιου τύπου διακλάδωση αποτελεί η κύρια διακλάδωση της τραχείας ο ραχιαίος κορμός (DT) (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Τραχειακό σύστημα *Drosophila Melanogaster* (Scholl A. et.al., 2021).

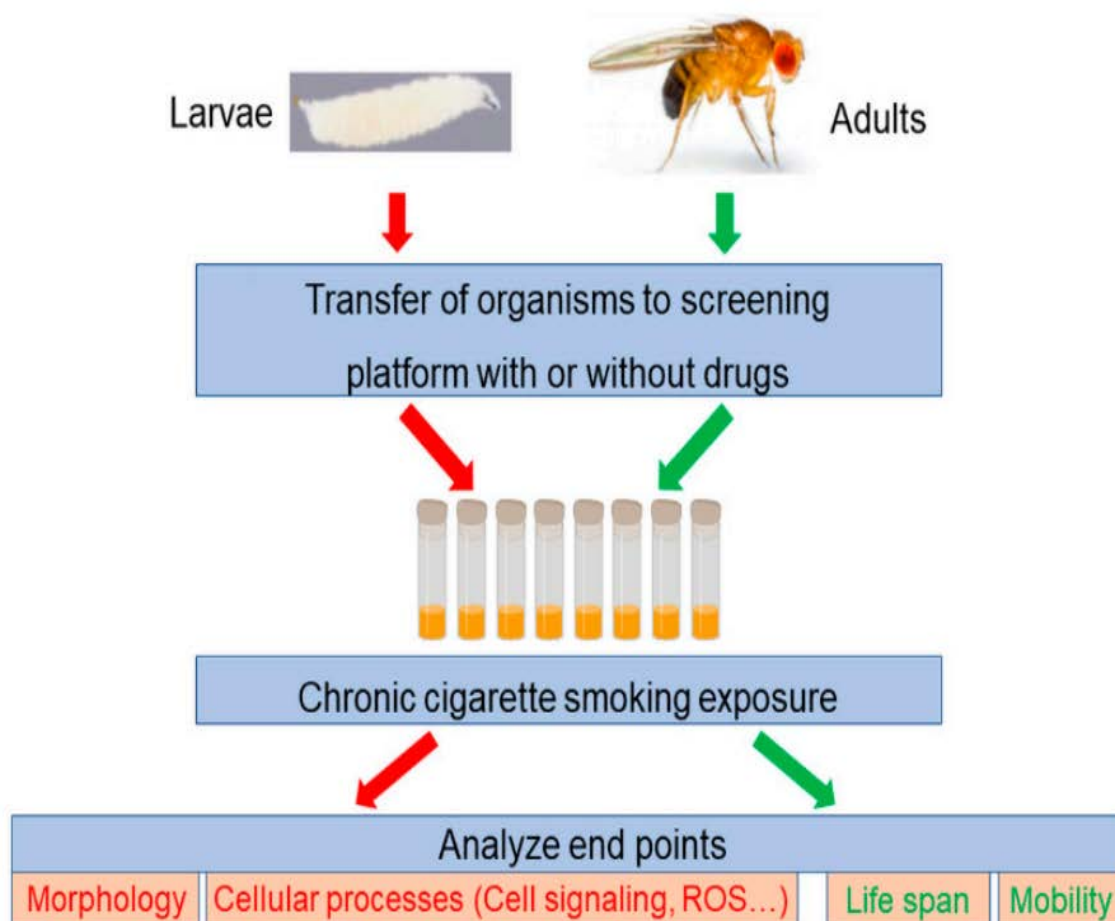
Έπειτα σχηματίζονται οι διακλαδώσεις τύπου II, οι οποίες αποτελούνται από μια γραμμική διάταξη μεμονωμένων κυττάρων, όπως η πλευρική διακλάδωση (LT) και η ραχιαία διακλάδωση (DB). Οι διακλαδώσεις τύπου III σχηματίζονται από σύντηξη κυττάρων, με τις κορυφαίες επιφάνειές τους να εκτείνονται στο εσωτερικό τοίχωμα του δακτυλίου, και οι διακλαδώσεις τύπου IV είναι υψηλά διακλαδισμένες ενδοκυτταρικές προεκτάσεις που σχηματίζονται κοντά στα

απομακρυσμένα κύτταρα και αποτελούν τις τελικές διακλαδώσεις, που παρατηρούνται στο στάδιο της προνύμφης. Στο ραχιαίο κορμό τα γειτονικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με Adherens Junctions (AJs), καθώς και με Septate Junctions (SJs) που αποτελούν τους ανάλογους Tight Junctions του ανθρώπου. Οι SJs ελέγχουν την διαπερατότητα του επιθηλίου, ενώ οι AJs συντελούν στην κυτταρική προσκόλληση, μέσω της ακτίνης του κυτταροσκελετού.

1.4.5 Χρήση της *Drosophila Melanogaster* ως πειραματικό μοντέλο μελέτης παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος.

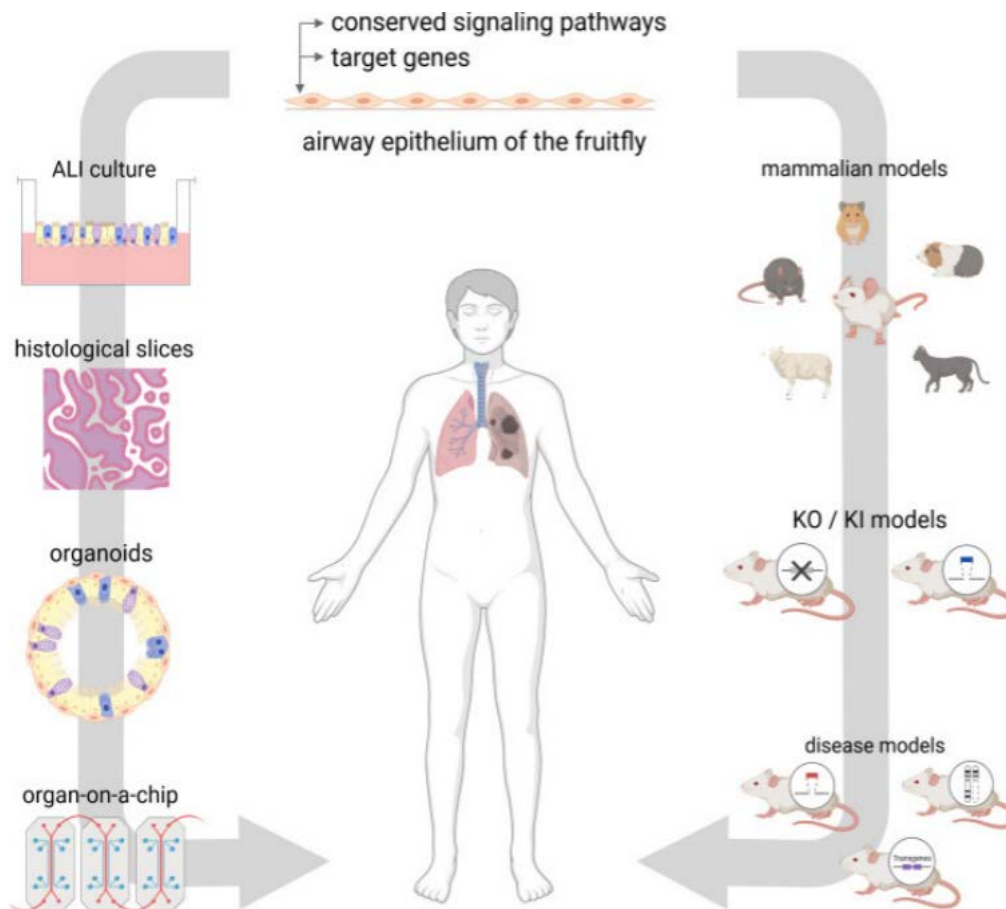
Το αναπνευστικό σύστημα της *Drosophila Melanogaster* αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο παθήσεων του αναπνευστικού, καθώς παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην λειτουργία. Το βασικό πλεονέκτημα που προσφέρει είναι ότι το τραχειακό της σύστημα αποτελείται αποκλειστικά από επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να μπορούν να μελετηθούν πρώιμες δομικές βλάβες των αεραγωγών, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή κατά την εισβολή των παθογόνων στο επιθήλιο των αεραγωγών [15]. Δεδομένου ότι πάνω του 65 % των γονιδίων που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες υπάρχουν ως ομόλογα γονίδια στη *Drosophila Melanogaster*, οι μελέτες σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών που εμπλέκονται σε φαινότυπους παθήσεων του πνεύμονα, όπως είναι η ΧΑΠ, μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα πειραματικό μοντέλο με χαμηλό κόστος και ευκολότερο πειραματικό χειρισμό.

Οι επιθυμητοί φαινότυποι μπορούν εύκολα να επιτευχθούν εκθέτοντας τα έντομα σε καπνό τσιγάρου, καθώς αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για παθήσεις του αναπνευστικού, όπως η ΧΑΠ. Η έκθεση μπορεί να επιτευχθεί απευθείας, μέσω της εισπνοής, μπορεί να παρασκευαστεί εκχύλισμα καπνού τσιγάρου το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται στην τροφή, ενώ μπορεί να μελετηθούν μεμονωμένα ουσίες του τσιγάρου, όπως η νικοτίνη, με την χορήγηση στην τροφή [16]. Επομένως μπορούν μετά να πραγματοποιηθούν μελέτες μορφολογικών χαρακτηριστικών, μοριακών μηχανισμών, έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών σε έντομα που έχουν εκτεθεί σε καπνό σε σύγκριση με έντομα που δεν έχουν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου, ενώ εύκολα μπορούν να χορηγηθούν φάρμακα μέσω της τροφής (*Εικόνα 12*).



Εικόνα 12. Μελέτη επιδράσεων του καπνού τσιγάρου στη *Drosophila Melanogaster* (Scholl A. et.al., 2021).

Η κατανόηση των αναπτυξιακών οδών και των ανοσολογικών διεργασιών που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων. Τέτοιου είδους μελέτες καθίστανται πολύπλοκες και δύσκολες με τη χρήση πειραματικών μοντέλων θηλαστικών, όπως για παράδειγμα τα ποντίκια που χρησιμοποιούνται ευρέως. Επιπλέον για ηθικούς λόγους, είναι εξαιρετικά δύσκολο να μελετηθούν οι επιπτώσεις του καπνού τσιγάρου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, ενώ η μεγάλη διάρκεια ζωής των ανθρώπων δεν επιτρέπουν την μελέτη των επιπτώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου, η *Drosophila Melanogaster*, λόγω του σύντομου κύκλου ζωής, επιτρέπει την μελέτη πρώιμων σταδίων της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων. Στοχεύοντας σε συγκεκριμένα γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια του επιθηλίου των αεραγωγών, μπορούν οι μελέτες στη συνέχεια να συνεχιστούν σε πειραματικά μοντέλα θηλαστικών, καθώς και σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων, ακόμη και σε πιο πολύπλοκες καλλιέργειες όπως τα οργανοειδή που αντιπροσωπεύουν καλύτερα τη φυσιολογία του πνεύμονα (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Χρήση της *Drosophila Melanogaster* ως πειραματικό μοντέλο, σε συνδυασμό με την χρήση μοντέλων θηλαστικών και καλλιιεργειών ανθρώπινων κυττάρων (Ehrhardt B. et.al., 2022).

1.5 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η έκθεση της *Drosophila Melanogaster* σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου και η μελέτη των επιδράσεων του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα, τον μεταβολικό ρυθμό και το σωματικό βάρος. Η κινητικότητα προσδιορίστηκε με την δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, ο μεταβολικός ρυθμός με τον προσδιορισμό του παραγόμενου CO₂ και στο τέλος μετρήθηκε το βάρος. Η εκτίμηση της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στην *Drosophila Melanogaster*, σε επίπεδο φυσιολογίας και μεταβολισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου μελέτης των μοριακών μηχανισμών της ΧΑΠ.

Ειδικό Μέρος

2. Υλικό και Μέθοδοι

2.1 Διατήρηση καλλιέργειας *Drosophila Melanogaster*

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *D. Melanogaster* Zurich, απομονωμένο στη Ζυρίχη της Ελβετίας. Η καλλιέργεια διατηρήθηκε σε κλίβανο, ο οποίος παρείχε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (25 °C) και υγρασίας (50-60%). Για την ομαλότερη ανάπτυξη και διατήρηση του στελέχους ο κλίβανος διέθετε πρόγραμμα σταθερού ημερήσιου κύκλου (12 ώρες ημέρα και 12 ώρες νύχτα).

Αρχικά περίπου 30-40 μύγες τοποθετούνταν μέσα σε φιαλίδια, τα οποία στο κάτω μέρος περιείχαν το θρεπτικό υλικό και στο πάνω μέρος ήταν καλυμμένα με βαμβάκι. Κάθε 10 μέρες γινότανε αλλαγή των μυγών σε νέα φιαλίδια με φρέσκο θρεπτικό υλικό. Με αυτό τον τρόπο πάντα οι ενήλικες μύγες βρισκόντουσαν σε περιβάλλον με φρέσκο θρεπτικό υλικό, ενώ ο αριθμός της καλλιέργειας αυξανότανε εκθετικά, καθώς επιτυγχάνονταν πάντα η ανάπτυξη νέων ενήλικων μυγών στα παλαιότερα φιαλίδια που περιείχαν έμβρυα, νύμφες και προνύμφες. Τέλος με σκοπό την διατήρηση της υγείας της καλλιέργειας τα φιαλίδια αποσύρονταν με το πέρας ενός μήνα, ενώ γινότανε συχνός έλεγχος, με τη χρήση στερεοσκοπίου OLYMPUS, για μύκητες και παράσιτα.

2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Ως τροφή (media) για τις μύγες χρησιμοποιήθηκε ένα τυπικό θρεπτικό μέσο, βασισμένο στην μαγιά, το καλαμποκάλευρο και το άγαρ, περιεκτικότητας 7,5 % w/v σουκρόζη και νιπαγίνη συγκέντρωσης 0,2 % για αντιμυκητιασική δράση. Πιο συγκεκριμένα για την παρασκευή της τροφής στα 100 ml νερό χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα συστατικά: 7,5 gr ζάχαρη, 5,5 gr καλαμποκάλευρο, 3,33 gr ξηρή μαγιά, 1 gr άγαρ και 0,2 gr νιπαγίνη διαλυμένη σε 5 ml αιθανόλης 70 %. Η προμήθεια της νιπαγίνης έγινε από την Sigma (cat: h3647-100G), της 100% αιθανόλης από την VWR CHEMICALS (cat: 20821.330), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά πάρθηκαν από τοπικά καταστήματα της περιοχής.

Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού αναφέρονται παρακάτω:

1. Αρχικά τοποθετούνται 100 ml νερό σε ένα ποτήρι ζέσεως και θερμαίνεται, μέχρι να φτάσει στο σημείο βρασμού, σε θερμαινόμενη πλάκα.
2. Αφού φτάσει σε σημείο βρασμού η θερμοκρασία ελαττώνεται και αρχίζει η ανάδευση.

3. Έπειτα τοποθετείται η ζάχαρη στο νερό που εξακολουθεί να αναδεύεται, μέχρι να διαλυθεί πλήρως.
4. Στη συνέχεια ακολουθεί το καλαμποκάλευρο, η ξηρή μαγιά και το άγαρ αντίστοιχα.
5. Το μείγμα συνεχίζει να θερμαίνεται, μέχρι να διαλυθούν πλήρως όλα τα συστατικά.
6. Όταν τα συστατικά διαλυθούν πλήρως, το ποτήρι ζέσεως απομακρύνεται από την θερμαινόμενη πλάκα και αναδεύεται μέχρι να μειωθεί σημαντικά η θερμοκρασία του.
7. Ακολουθεί η προσθήκη της διαλυμένης νιπαγίνης, το μείγμα αναδεύεται και τοποθετείται στα φιαλίδια.
8. Τα φιαλίδια αποθηκεύονται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να σταθεροποιηθεί το θεραπευτικό μέσο, ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η τοποθέτηση ενήλικών μυγών.

2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου (CSE)

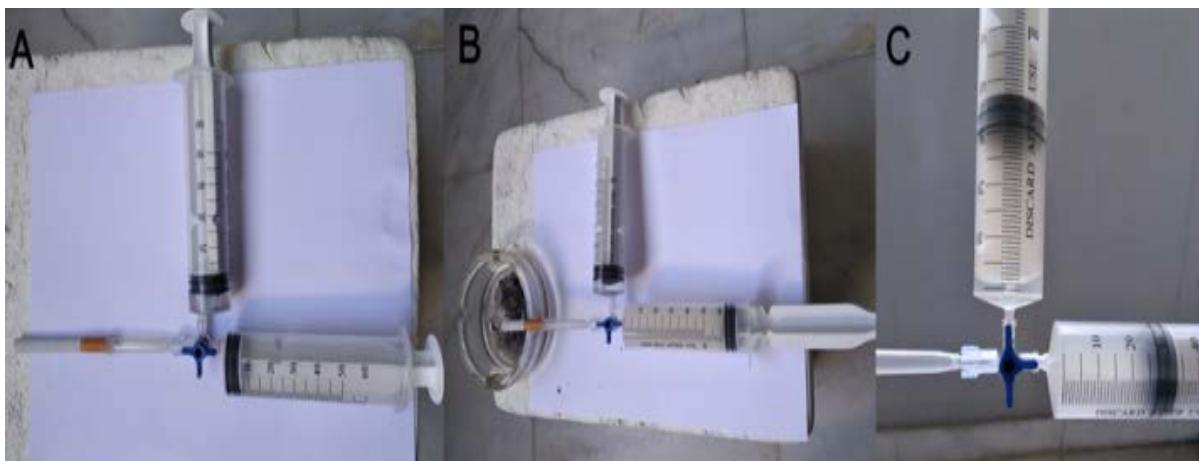
Για την παρασκευή του εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου χρησιμοποιήθηκαν τσιγάρα του εμπορίου, χαρακτηρισμένα ως προς την περιεκτικότητα τους σε πίσσα, νικοτίνη και μονοξείδιο του άνθρακα, όπως αναφέρεται και στον **Πίνακα 2** [18].

Τσιγάρα	Πίσσα mg/cig	Νικοτίνη mg/cig	Μονοξείδιο του Άνθρακα mg/cig
MARLBORO RED FTKS 20S BOX	10	0,8	10

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα τσιγάρου σε πίσσα, νικοτίνη και μονοξείδιο του άνθρακα.

Το εκχύλισμα καπνού τσιγάρου παρασκευάστηκε με μία αυτοσχέδια συσκευή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14**. Πιο συγκεκριμένα η συσκευή αποτελείται από μια θήκη για τσιγάρο και δύο σύριγγες συνδεδεμένες με μία αντλία τριών οδών. Η κάθετη σύριγγα περιέχει ισοτονικό διάλυμα PBS και η οριζόντια είναι άδεια. Αρχικά μέσω της αντλίας είναι ανοιχτή η οδός μεταξύ του τσιγάρου και της άδειας σύριγγας. Καθώς ανάβεται το τσιγάρο πραγματοποιείται εισροή του καπνού στην άδεια σύριγγα. Στη συνέχεια ανοίγει η οδός μεταξύ των δύο συρίγγων

και ο καπνός εισέρχεται στη σύριγγα που περιέχει το PBS. Ο περιττός καπνός αφαιρείται από την σύριγγα που περιέχει το PBS και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να τελειώσει το τσιγάρο.



Εικόνα 14. Συσκευή παρασκευής εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου (CSE).

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιούνται τέσσερις πειραματικές συνθήκες, οι οποίες είναι media+10% PBS (Control), 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Για την παρασκευή της συνθήκης 10% CSE χρησιμοποιείται 1 τσιγάρο στα 5 ml PBS, το οποίο αναμειγνύεται στη συνέχεια με 45 ml media. Η συνθήκη 25% CSE δημιουργείται χρησιμοποιώντας 2 τσιγάρα στα 10 ml PBS και ακολουθεί ανάμειξη με 30 ml media. Τέλος για την παρασκευή της συνθήκης 50% CSE χρησιμοποιούνται 2 τσιγάρα στα 10 ml PBS και ακολουθεί ανάμειξη με 10 ml media.

2.4 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται 90 αρσενικές και 90 θηλυκές *D.melanogaster*, οι οποίες αναπτύσσονται στις συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE. Πιο συγκεκριμένα στα φιαλίδια από κάθε συνθήκη τοποθετούνται 10 θηλυκές και 5 αρσενικές *D.melanogaster* με σκοπό την αναπαραγωγή. Μετά το πέρας των τριών ημερών οι μύγες απορρίπτονται από τα φιαλίδια, τα οποία περιέχουν πλέον έμβρυα από τα οποία θα προκύψουν νέες ενήλικες μύγες που χρησιμοποιούνται στην πειραματική διαδικασία. Στην συνέχεια μετά από 9 μέρες παρασκευάζονται ξανά νέα φιαλίδια με τις αντίστοιχες συνθήκες, στα οποία τοποθετούνται οι ενήλικες μύγες διαχωρισμένες σε αρσενικές και θηλυκές. Τέλος σε ηλικία 2-4 ημερών η ανάπτυξη τους έχει ολοκληρωθεί πλήρως και είναι έτοιμες για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα.

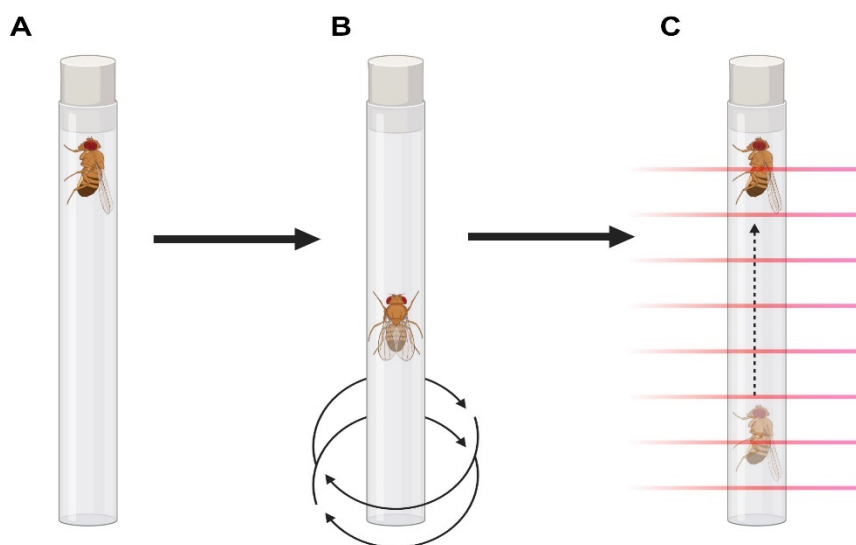
Αρχικά, τόσο οι αρσενικές όσο και οι θηλυκές *D.melanogaster*, χωρίζονται σε ομάδες των 6 και πραγματοποιείται μελέτη της κινητικότητας με την δοκιμασία της αρνητικής γεώταξης. Στην

συνέχεια οι ίδιες *D.melanogaster* χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστούν οι μεταβολές στον μεταβολικό τους ρυθμό. Τέλος θανατώνονται και πραγματοποιείται μέτρηση του βάρους τους.

2.5 Δοκιμασία Αρνητικής Γεώταξης

Η αρνητική γεώταξη αποτελεί μια έμφυτη συμπεριφορά που παρατηρείται σε ιπτάμενα έντομα, όπως η *D.melanogaster*. Πιο συγκεκριμένα όταν ένα γεγονός οδηγεί σε απότομη αλλαγή της ροής της κίνησης τους, παρουσιάζουν μια αντίδραση προσανατολισμού, με αποτέλεσμα να κινούνται σε αντίθετη κατεύθυνση της βαρύτητας [19]. Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν τα ιπτάμενα έντομα έχει οδηγήσει τους ερευνητές να βασίζονται στην αρνητική γεώταξη, ώστε να μελετούν μεταβολές της κινητικότητας της *D.melanogaster*. Συνήθως κατά την συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιούνται μύγες που βρίσκονται μέσα σε ένα δοχείο και με την πραγματοποίηση ενός ελαφρύ χτυπήματος, ώστε να βρεθούν στον πάτο του δοχείου, επιτυγχάνεται διατάραξη της κίνησής τους, με αποτέλεσμα να αρχίζουν να κινούνται προς τα πάνω. Επομένως βιντεοσκοπώντας την κίνηση των μυγών μπορεί να συγκριθεί η κινητικότητα σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες με έναν εύκολο, γρήγορο, φθηνό και αποτελεσματικό τρόπο.

Βασική προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας αποτελεί ο ορισμός μιας συγκεκριμένης κάθετης απόστασης σε cm, την οποία θα πρέπει να διανύσουν οι *D.melanogaster*, καθώς και ένα συγκεκριμένο χρονικό όριο στο οποίο θα πρέπει να έχουν διανύσει την συγκεκριμένη απόσταση [20]. Η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται στην **Εικόνα 15**.



Εικόνα 15. Δοκιμασία αρνητικής γεώταξης (Thiago C.Moulin et al., 2021).

Για την δοκιμασία αρνητικής γεώταξης συλλέχθηκαν αρσενικές και θηλυκές μύγες, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE αντίστοιχα. Ακολούθησε ο διαχωρισμός τους σε ομάδες των 6 μυγών και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

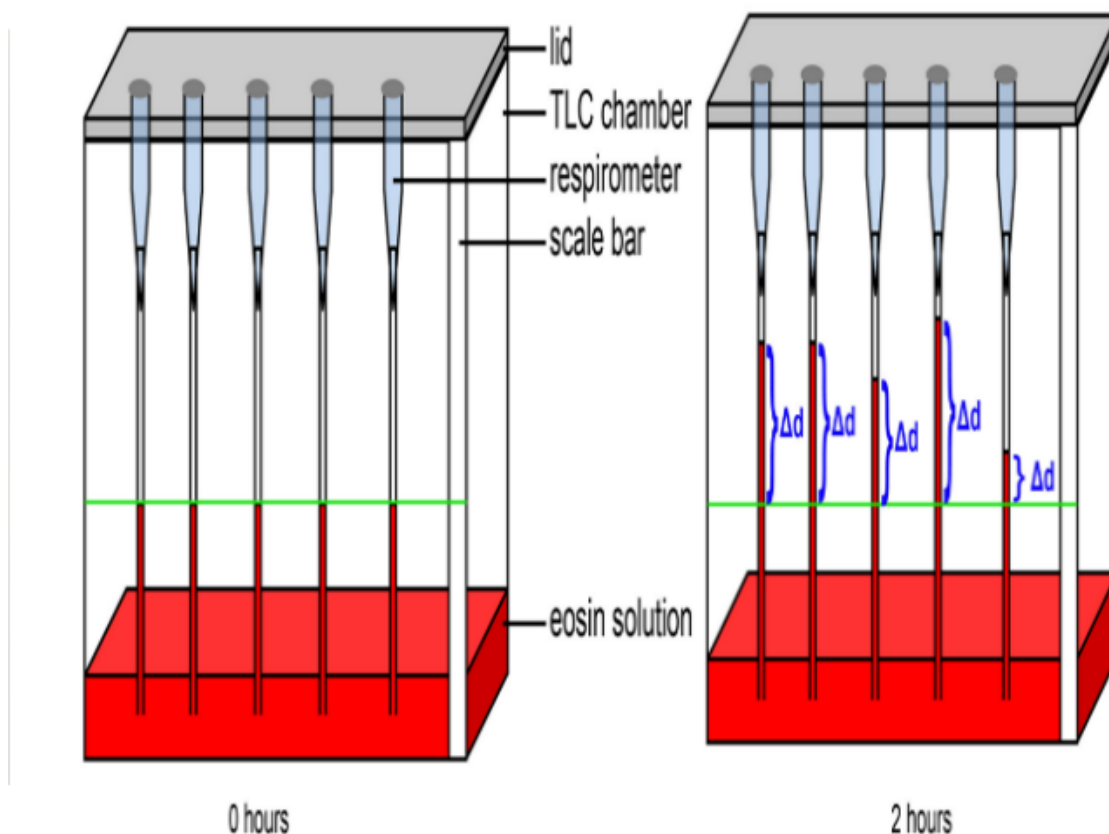
- 6.1 Αναισθητοποίηση των *D.melanogaster* σε πάγο για 30 λεπτά.
- 6.2 Τοποθέτηση σε κυλινδρικά φιαλίδια, το ύψος των οποίων είναι βαθμονομημένο στα 10 cm.
- 6.3 Επώαση 15 λεπτών, έτσι ώστε να ξυπνήσουν και να σταθεροποιηθεί το σύστημα κίνησης τους.
- 6.4 Ελαφρύ χτύπημα, ώστε να βρεθούν στον πάτο των φιαλιδίων.
- 6.5 Βιντεοσκόπηση για 10 δευτερόλεπτα.
- 6.6 Υπολογισμός του % ποσοστού των *D.melanogaster* που κατάφεραν να αναρριχηθούν στα 10 cm σε 10 δευτερόλεπτα.

2.6 Μεταβολές του μεταβολικού ρυθμού

Στην *D.melanogaster* η κατανάλωση O_2 σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή CO_2 , με αποτέλεσμα να αντικατοπτρίζει το επίπεδο του μεταβολισμού. Το O_2 που χρησιμοποιείται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση μετατρέπεται σε CO_2 , το οποίο αποβάλλεται ως αναπνευστικό απόβλητο [21]. Επομένως ο υπολογισμός παραγωγής CO_2 έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μελέτες που σχετίζονται με την γήρανση και τον μεταβολισμό. Η μεθοδολογία για προσδιορισμό μεταβολών του μεταβολισμού της *D.melanogaster* είναι βασισμένη στην σύγκριση της παραγωγής CO_2 .

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ένα αυτοσχέδιο αναπνευστόμετρο, το οποίο αποτελεί μια γυάλινη μικροπιπέτα που περιέχει μύγες και Soda lime pellets, καθώς και ένας θάλαμος αεροστεγώς κλειστός, ο οποίος περιέχει νερό με χρωστική και ειδικές θέσεις για την τοποθέτηση των αναπνευστόμετρων, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 16**. Το Soda lime, το οποίο αποτελείται από $Ca(OH)_2$ και $NaOH$, έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το παραγόμενο CO_2 . Η προμήθεια του Soda lime έγινε από την Sigma (cat: 72073-1KG). Επιπρόσθετα χρησιμοποιείται και μια μικροπιπέτα χωρίς μύγες μέσα ως αρνητικό control. Καθώς τοποθετούνται οι μικροπιπέτες μέσα στον θάλαμο ασκείται πίεση στην επιφάνεια του νερού τόσο από την μικροπιπέτα όσο και από τα αέρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η στάθμη του νερού στην μικροπιπέτα να σταθεροποιείται σε ένα συγκεκριμένο σημείο. Κατά την χρονική διάρκεια 2 ωρών οι μύγες συνεχίζουν να καταναλώνουν O_2 , όμως το Soda lime απορροφά το παραγόμενο CO_2 , με αποτέλεσμα η πίεση που

ασκείται στην επιφάνεια του νερού να μειώνεται και να παρατηρείται αύξηση στην στάθμη του νερού.



Εικόνα 16. Αυτοσχέδιο αναπνευστόμετρο (S.Yatsenko et al., 2014).

Φωτογραφίζοντας το σύστημα στην αρχική του μορφή, καθώς και μετά από 2 ώρες μπορεί να υπολογιστεί η διαφορά που προκύπτει στην στάθμη του νερού. Με βάση την στάθμη του νερού μπορεί να υπολογιστεί και το παραγόμενο CO_2 ($\mu\text{l/hr/fly}$) της κάθε μικροπιπέτας. Ο υπολογιστική μέθοδος πραγματοποιείται σύμφωνα με την εξίσωση που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 17**. Το αυτοσχέδιο αναπνευστόμετρο που κατασκευάστηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις ανάγκες της παρούσας πτυχιακής φαίνεται στην **Εικόνα 18**.

$$CO_2 = \frac{[(\Delta d - \Delta c)(\pi x R^2)] \times 1000}{n x h}$$

R= ακτίνα μικροπιπέτας σε cm.

Δd = διαφορά στάθμης νερού μικροπιπέτας που περιέχει D.melanogaster.

Δc = διαφορά στάθμης νερού μικροπιπέτας χωρίς D.melanogaster (control).

n= αριθμός D.melanogaster κάθε μικροπιπέτας.

h= ώρες.

Εικόνα 17. Εξίσωση υπολογισμού παραγόμενου CO_2 ($\mu l/hr/fly$).



Εικόνα 18. Αυτοσχέδιο αναπνευστόμετρο κατασκευασμένο στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

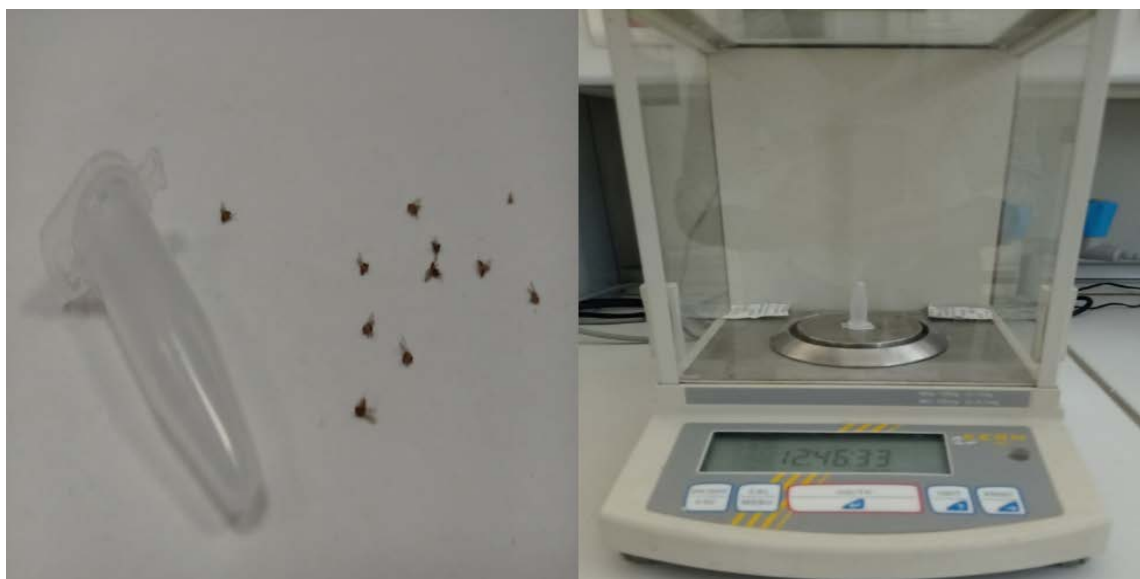
Με βάση την δοκιμασία που αναλύθηκε παραπάνω, οι *D.melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν στην δοκιμασία αρνητικής γεώταξης συλλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν για να μελετηθεί ο μεταβολικός τους ρυθμός. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι:

1. Στον αεροστεγώς κλειστό θάλαμο τοποθετούνται 1200 ml νερό και 2 ml χρωστικής, έτσι ώστε η στάθμη του νερού μέσα στην μικροπιπέτα να είναι εμφανής.
2. Έπειτα τοποθετούνται *D.melanogaster* σε φιαλίδια μέσα σε πάγο για 30 λεπτά έτσι ώστε να αναισθητοποιηθούν.
3. Κάθε γυάλινη μικροπιπέτα περιέχει ένα κομμάτι σφουγγάρι, μετά δύο pellets Soda lime και από πάνω με ένα ακόμα κομμάτι σφουγγάρι, έτσι ώστε να μην έρχεται το Soda lime σε επαφή με τις μύγες.
4. Στη συνέχεια τοποθετούνται 6 *D.melanogaster* και οι μικροπιπέτες σφραγίζονται με παραφίλμ.
5. Μια μικροπιπέτα πρέπει να περιέχει μόνο Soda lime, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικό control.
6. Οι μικροπιπέτες παραμένουν για 15 λεπτά εκτός του θαλάμου έτσι ώστε να ξυπνήσουν οι μύγες.
7. Οι μικροπιπέτες τοποθετούνται μέσα στο θάλαμο και παραμένουν για 15 λεπτά, έτσι ώστε το σύστημα να σταθεροποιηθεί.
8. Στη συνέχεια με μια φωτογραφική μηχανή λαμβάνονται φωτογραφίες, έτσι ώστε να είναι εμφανής η στάθμη του νερού σε κάθε μικροπιπέτα. Μετά από 2 ώρες λαμβάνονται φωτογραφίες ξανά.
9. Πραγματοποιείται ανάλυση των εικόνων με το λογισμικό ImageJ, έτσι ώστε να υπολογιστεί η διαφορά στη στάθμη του νερού της κάθε μικροπιπέτας, και στη συνέχεια υπολογίζεται το παραγόμενο CO₂ (μl/hr/fly), σύμφωνα με την εξίσωση που αναγράφεται στην **Εικόνα 17**.

2.7 Μέτρηση βάρους

Έχοντας πραγματοποιηθεί, τόσο η δοκιμασία αρνητικής γεώταξης όσο και η δοκιμασία μεταβολής του μεταβολικού ρυθμού, ακολούθησε θανάτωση των *D. Melanogaster* και μέτρηση του βάρους τους. Πιο συγκεκριμένα αρσενικές και θηλυκές *D. Melanogaster* διαχωρίστηκαν σε ομάδες των 6, έπειτα τοποθετήθηκαν σε 6 σε κάθε tube και στην συνέχεια μετρήθηκε το βάρος τους σε ζυγό ακριβείας, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**. Με τον ζυγό ακριβείας υπολογίστηκε το βάρος

6 μυγών ανά ομάδα σε mg και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος βάρους κάθε μύγας σε mg/fly.



Εικόνα 19. Μέτρηση βάρους D.melanogaster σε ζυγό ακριβείας.

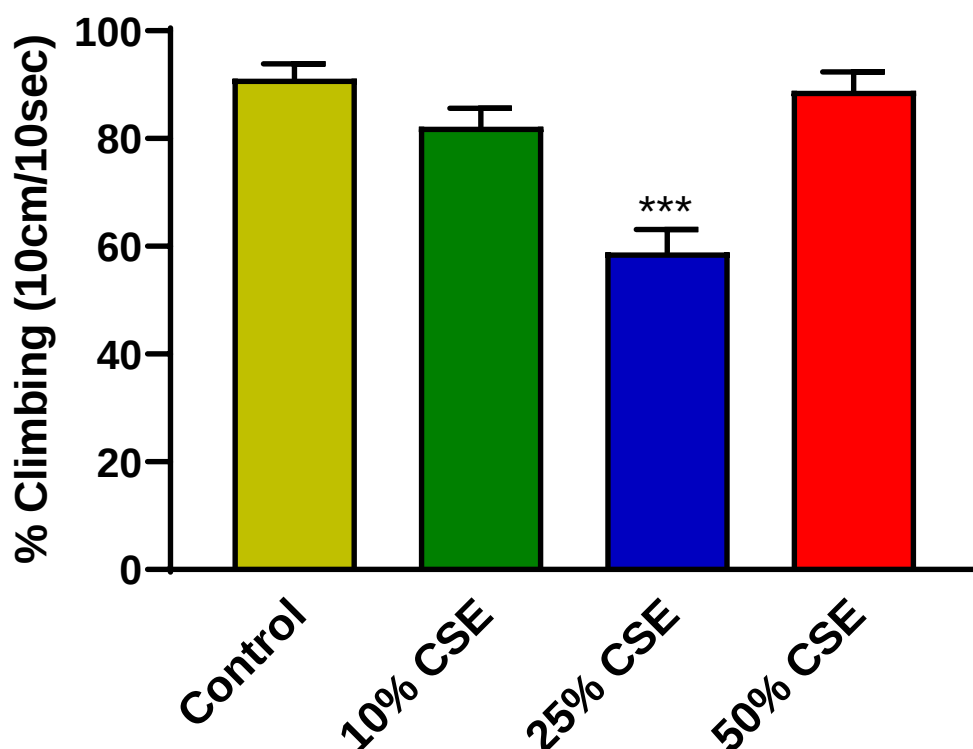
2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, την δοκιμασία μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού και της μέτρησης βάρους πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism v.8.00. Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα κάθε πειράματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο κανονικότητας, χρησιμοποιώντας το τεστ D'Agostino & Pearson και στη συνέχεια με βάση τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν παραμετρικά τεστ One way ANOVA ή μη παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis test. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσου όρου (mean $\pm$ SEM) και θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν το p value ήταν $< 0,01$.

3. Αποτελέσματα

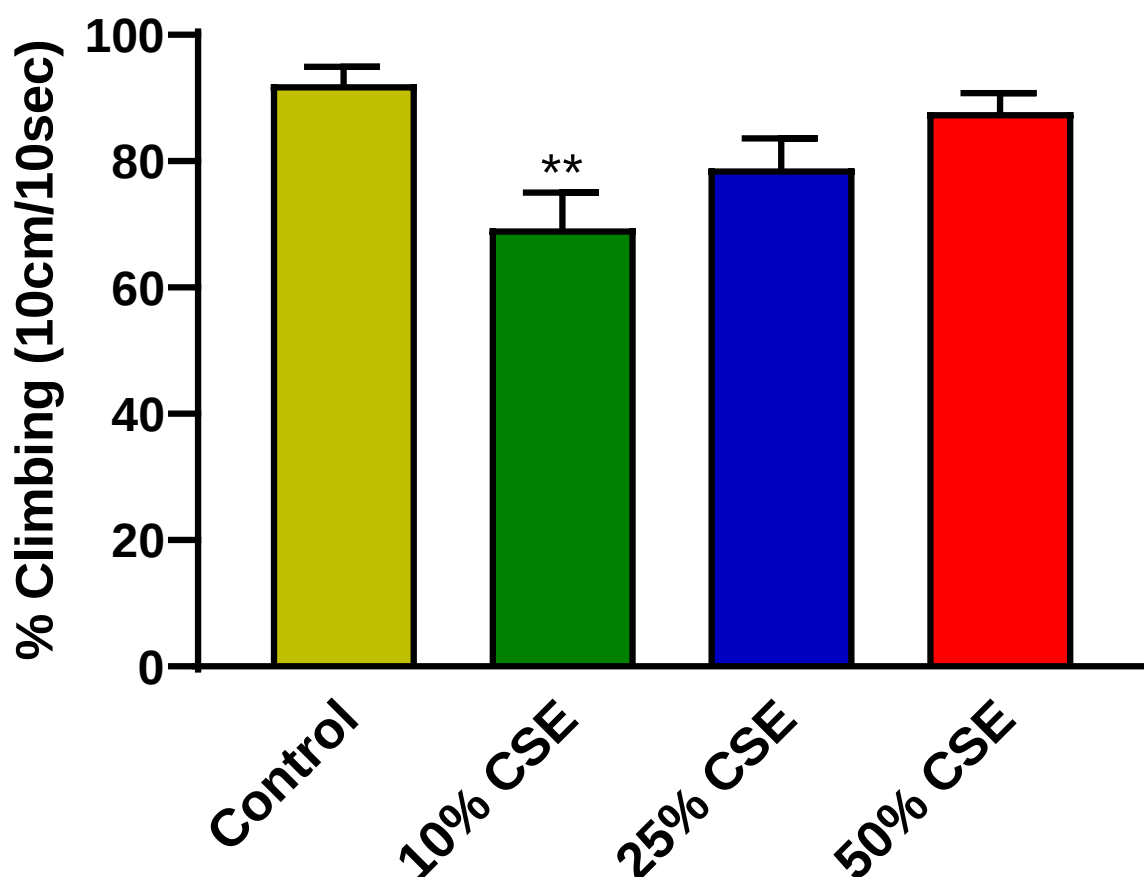
3.1 Αποτελέσματα αρνητικής γεώταξης

Από την μελέτη της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα των αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 1**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο % ποσοστό των μυγών που αναρριχήθηκαν στα 10 cm σε 10 sec των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($82,19 \pm 3,44$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($91,12 \pm 2,74$). Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο το % ποσοστό των μυγών που αναρριχήθηκαν στα 10 cm σε 10 sec των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($58,86 \pm 4,25$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($88,87 \pm 3,52$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



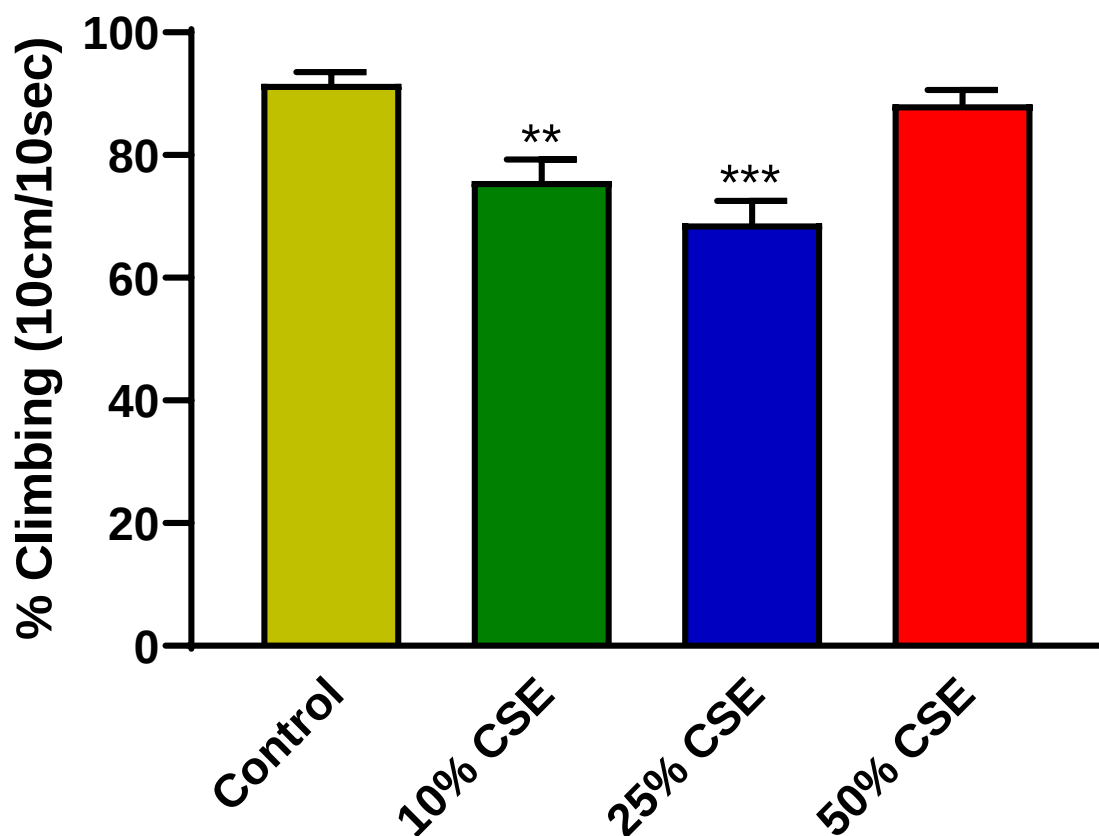
Διάγραμμα 1. Αρνητική γεώταξη. % ποσοστό αναρρίχησης των αρσενικών *Drosophila Melanogaster* στα 10 cm σε 10 sec, n= 15 τιμές % ποσοστού αναρρίχησης, N= 90 *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM. *** p< 0,001.

Από την μελέτη της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα των θηλυκών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 2**. Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο το % ποσοστό των μυγών που αναρρίχθηκαν στα 10 cm σε 10 sec των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($69,34 \pm 5,71$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($92,21 \pm 2,75$). Στην πειραματική συνθήκη 25% CSE ($78,87 \pm 4,73$) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($87,75 \pm 3,03$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 2. Αρνητική γεώταξη. % ποσοστό αναρρίχησης των θηλυκών *Drosophila Melanogaster* στα 10 cm σε 10 sec, $n = 15$ τιμές % ποσοστού αναρρίχησης, $N = 90$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $mean \pm SEM$. ** $p < 0,01$.

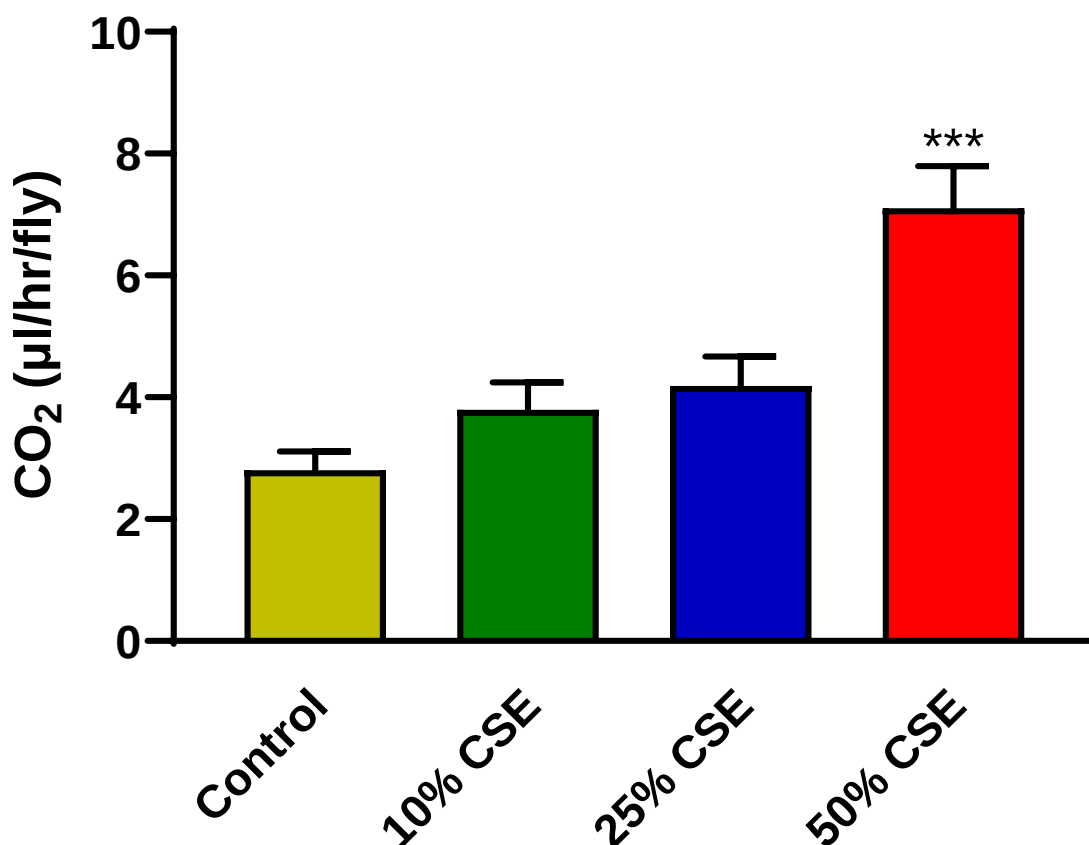
Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από της μελέτης επίδρασης του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών, *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3**. Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο το % ποσοστό των μυγών που αναρριχήθηκαν στα 10 cm σε 10 sec των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($75,76 \pm 3,48$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($91,66 \pm 1,91$). Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην πειραματική συνθήκη 25% CSE ($68,87 \pm 3,63$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Τέλος δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($88,31 \pm 2,28$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 3. Αρνητική γεώταξη. % ποσοστό αναρρίχησης των θηλυκών και αρσενικών *Drosophila Melanogaster* στα 10 cm σε 10 sec, n= 30 τιμές % ποσοστού αναρρίχησης, N= 180 *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

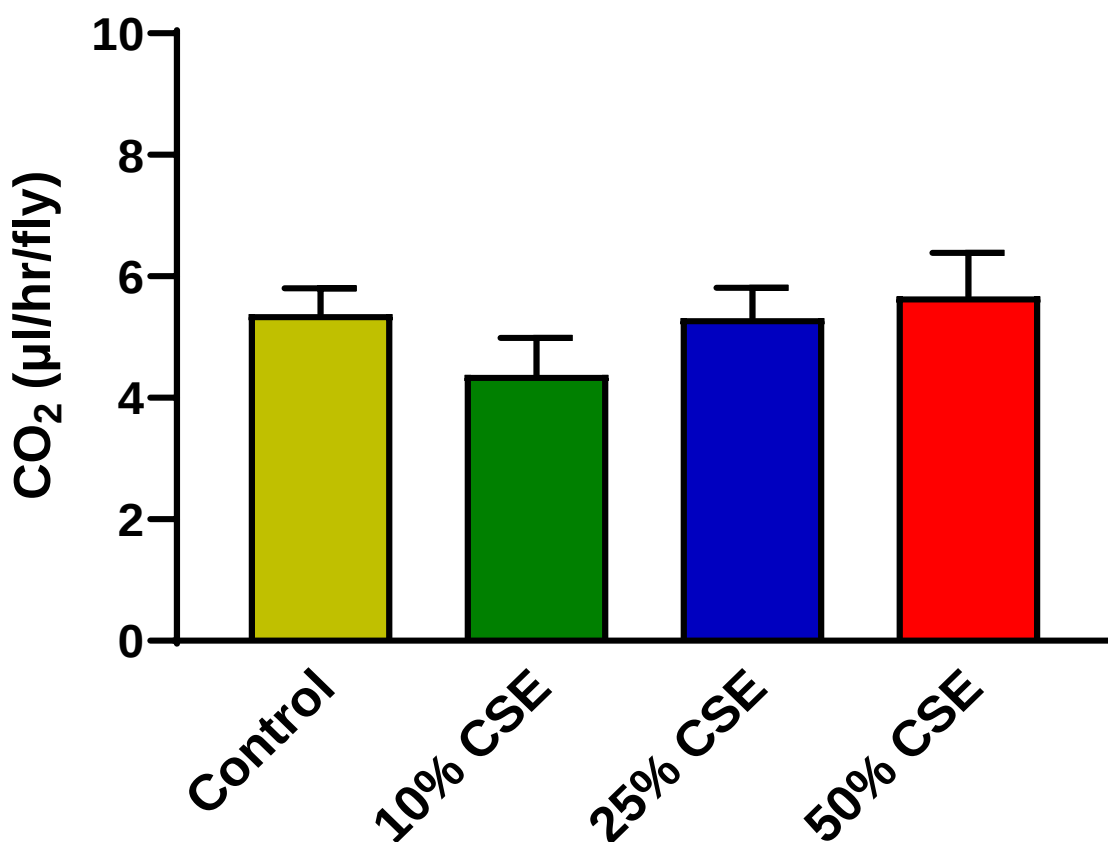
3.2 Αποτελέσματα μεταβολών του μεταβολικού ρυθμού

Από την μελέτη της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στον μεταβολικό ρυθμό των αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 4**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($3,79 \pm 0,44$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($2,80 \pm 0,31$). Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO₂ των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($4,19 \pm 0,48$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Ωστόσο το παραγόμενο CO₂ βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($7,1 \pm 0,68$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 4. Μεταβολικός ρυθμός. Παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, n=15 τιμές παραγόμενου CO₂, N=90 *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$.

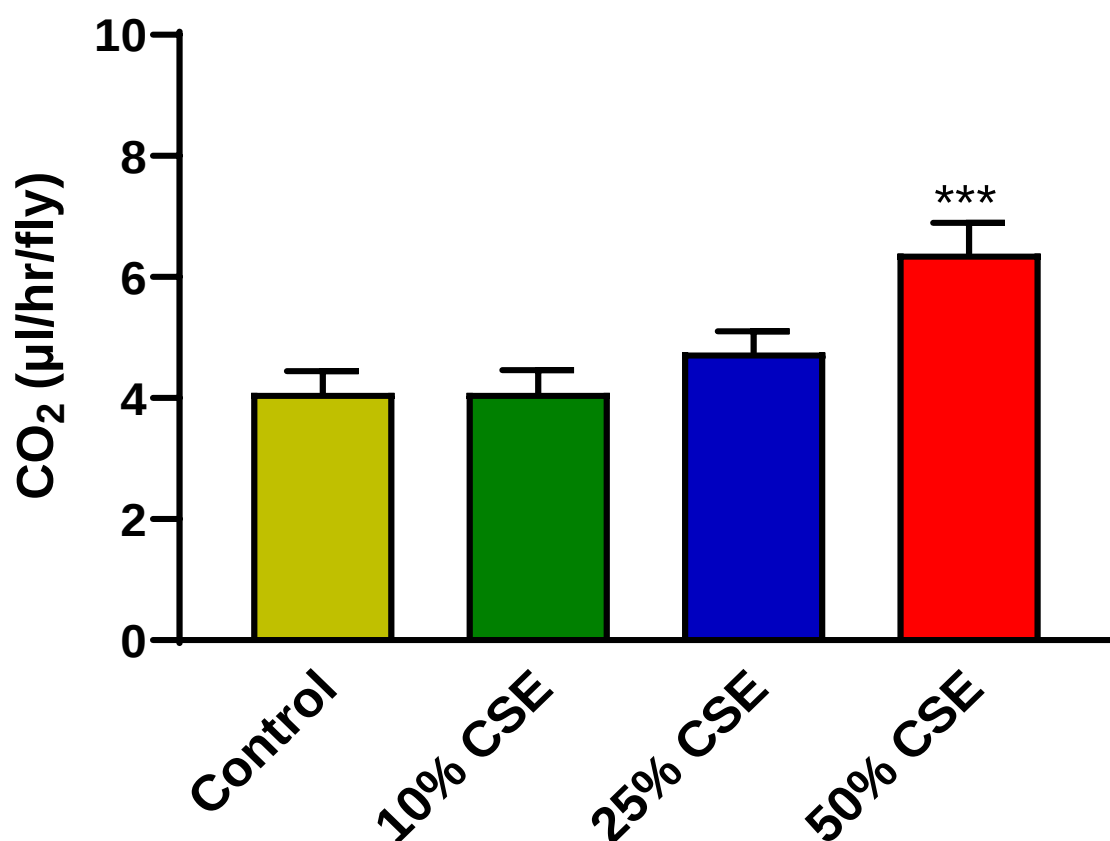
Από την μελέτη της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στον μεταβολικό ρυθμό των θηλυκών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 5**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO₂ στην πειραματική συνθήκη 10% CSE ($4,37 \pm 0,60$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($5,37 \pm 0,43$). Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις πειραματικές συνθήκες 25% CSE ($5,31 \pm 0,49$) και 50% CSE ($5,67 \pm 0,71$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 5. Μεταβολικός ρυθμός. Παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) θηλυκών *Drosophila Melanogaster*, $n=15$ τιμές παραγόμενου CO₂, $N=90$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως *mean* ± *SEM*.

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από της μελέτης επίδρασης του καπνού τσιγάρου στον μεταβολικό ρυθμό, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών, *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE,

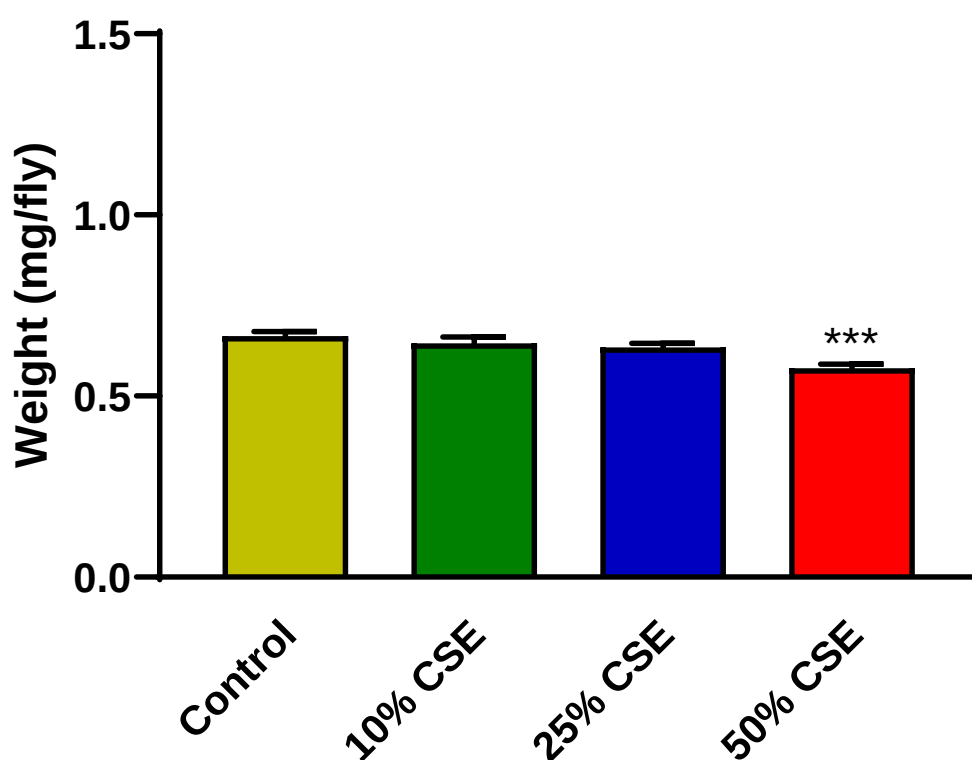
προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 6**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($4,08 \pm 0,37$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($4,09 \pm 0,35$). Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO₂ των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($4,75 \pm 0,35$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Ωστόσο το παραγόμενο CO₂ βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($6,38 \pm 0,50$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 6. Μεταβολικός ρυθμός. Παραγωγή CO₂ (μl/hr/fly) αρσενικών και θηλυκών *Drosophila Melanogaster*, n=30 τιμές παραγόμενου CO₂, N=180 *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean ± SEM. *** $p < 0,001$.

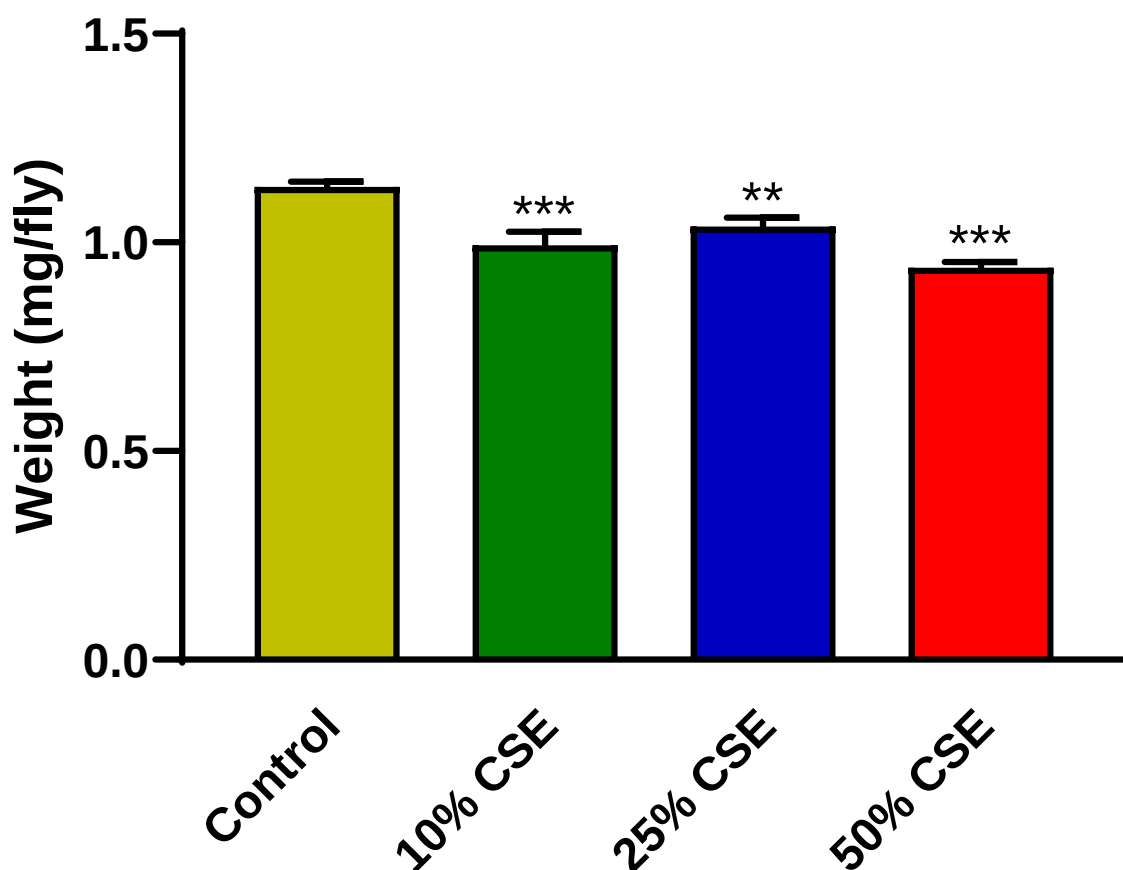
3.3 Αποτελέσματα μέτρησης βάρους

Από την μελέτη της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στο βάρος των αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 7**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος (mg/fly) των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($0,64 \pm 0,01$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($0,66 \pm 0,01$). Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($0,63 \pm 0,01$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Ωστόσο το βάρος βρέθηκε σημαντικά μειωμένο στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($0,57 \pm 0,01$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 7. Μέτρηση βάρους. Βάρος (mg/fly) αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, $n=15$ τιμές βάρους, $N=90$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$. *** $p<0,001$.

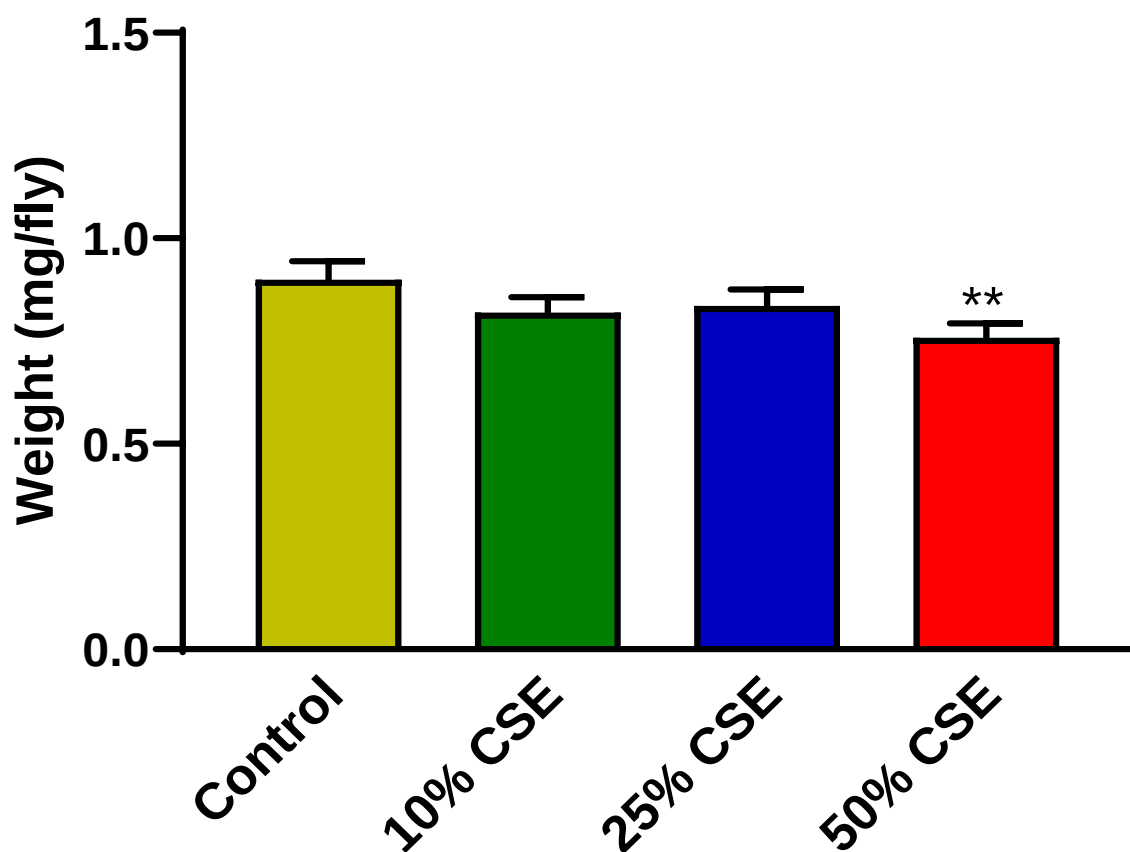
Από την μελέτης της επίδρασης της επίδρασης του καπνού τσιγάρου στο βάρος των θηλυκών *Drosophila Melanogaster*, οι οποίες αναπτύχθηκαν στις πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 8**. Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο βάρος των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($0,99 \pm 0,03$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($1,13 \pm 0,01$). Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο βάρος των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($1,03 \pm 0,02$), καθώς στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($0,94 \pm 0,01$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 8. Μέτρηση βάρους. Βάρος (mg/fly) θηλυκών *D.melanogaster*, $n=15$ τιμές βάρους, $N=90$ *D.melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $mean \pm SEM$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από της μελέτης επίδρασης του καπνού τσιγάρου στο βάρος, τόσο των αρσενικών όσο και τον θηλυκών, *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν στις

πειραματικές συνθήκες Control, 10% CSE, 25% CSE και 50% CSE, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 9**. Αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος (mg/fly) των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 10% CSE ($0,81 \pm 0,03$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control ($0,89 \pm 0,04$). Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος των *Drosophila Melanogaster* που αναπτύχθηκαν σε 25% CSE ($0,83 \pm 0,03$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control. Ωστόσο το βάρος βρέθηκε σημαντικά μειωμένο στην πειραματική συνθήκη 50% CSE ($0,75 \pm 0,03$), σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control.



Διάγραμμα 9. Μέτρηση βάρους. Βάρος (mg/fly) θηλυκών και αρσενικών *Drosophila Melanogaster*, $n=30$ τιμές βάρους, $N=180$ *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $mean \pm SEM$. ** $p < 0,01$.

4. Συζήτηση

Η ΧΑΠ αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, με τη χρόνια έκθεση σε καπνό τσιγάρου να αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου και σχετίζεται άμεσα με την παθολογία της νόσου. Τα τελευταία χρόνια η *Drosophila Melanogaster* χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο ως πειραματικό μοντέλο μελέτης ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, καθώς το αναπνευστικό της σύστημα παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτό του ανθρώπου. Στην συγκεκριμένη μελέτη *Drosophila Melanogaster* εκτέθηκαν σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου διαφορετικών συγκεντρώσεων, 10%, 25% και 50%, και μελετήθηκε η κινητικότητα, ο μεταβολικός ρυθμός και το σωματικό τους βάρος.

Πιο συγκεκριμένα η κινητικότητα τους μελετήθηκε με τη δοκιμασία αρνητικής γεώταξης, παρατηρώντας το % ποσοστό αναρρίχησης των μυγών στα 10 cm σε χρονικό διάστημα 10 sec. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της κινητικότητας των αρσενικών μυγών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 25% CSE και των θηλυκών μυγών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 10% CSE, σε σύγκριση με τις συνθήκες Control. Επιπλέον και στα δύο φύλα παρατηρήθηκε μια τάση της κινητικότητας στην πειραματική συνθήκη 50% CSE να πλησιάζει αυτή της πειραματικής συνθήκης Control.

Σε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί αρσενικές και θηλυκές *Drosophila Melanogaster* εκτέθηκαν άμεσα σε καπνό τσιγάρου, μέσω της εισπνοής, για χρονικό διάστημα 7 και 14 ημερών [22]. Έπειτα με την χρήση ενός λογισμικού παρακολούθησης δραστηριότητας, παρατηρήθηκε η κινητικότητα τους για 2 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη κινητικότητα, τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών μυγών που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου, με την μείωση να είναι μεγαλύτερη σε αυτές που εκτέθηκαν για 14 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τονίζοντας πως οι επιδράσεις του καπνού τσιγάρου είναι εμφανείς στην δραστηριότητα των μυγών, ακόμα και με την πρόσληψη των συστατικών του μέσω της τροφής.

Ο καπνός του τσιγάρου αποτελείται από πολλές χημικές ενώσεις με αποτέλεσμα να έχουν διεξαχθεί έρευνες με την χορήγηση μεμονωμένων χημικών ενώσεων στην *Drosophila Melanogaster* και την μελέτη της κινητικότητάς της. Το Benzo[a]pyrene (B[a]P) ανήκει στην οικογένεια των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και αποτελεί βασικό συστατικό του τσιγάρου. Χαρακτηρίζεται για την τοξική του δράση και τις επιπτώσεις του στην ανάπτυξη και στον νευρικό σύστημα των οργανισμών. Σε μελέτη που *Drosophila Melanogaster* εκτέθηκαν μέσω της τροφής στον συγκεκριμένο αρωματικό υδρογονάνθρακα παρατηρήθηκε επίσης

μειωμένη κινητικότητα, με την δοκιμασία της αρνητικής γεώταξης [23]. Λαμβάνοντας υπόψη τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, καθώς και ότι στο πειραματικό μοντέλο της παρούσας μελέτης εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου η πατρική γενιά και οι απόγονοι, οι επιπτώσεις που έχει ο καπνός τσιγάρου στην ανάπτυξη και στο νευρικό σύστημα θα μπορούσε να ευθύνεται για την μειωμένη κινητικότητα που παρατηρήθηκε.

Η νικοτίνη αποτελεί την κύρια χημική ένωση του καπνού τσιγάρου και ευθύνεται για την εξάρτηση που προκαλεί, καθώς σχετίζεται έντονα με διαταραχές του νευρικού συστήματος μέσω της επίδρασης της στους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης [24]. Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα έκθεσης της *Drosophila Melanogaster* σε νικοτίνη, μέσω της τροφής, και παρατηρήθηκε η κινητική τους δραστηριότητα για 24 ώρες [25]. Σε σύγκριση με τις μύγες που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες παρατηρήθηκε αρχικά μειωμένη κινητικότητα, ενώ με το πέρας των ωρών άρχισαν να παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά μας υποδεικνύουν ότι οι επίδραση που μπορεί να έχει ο καπνός τσιγάρου στην κινητικότητα μπορεί να είναι δοσοεξαρτώμενη, καθώς στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μειωμένη κινητικότητα μόνο στις χαμηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου. Ωστόσο η αρνητική γεώταξη αποτελεί μια συμπεριφορά των μυγών και μπορεί ο καπνός τσιγάρου να επιδρά στην συγκεκριμένη συμπεριφορά, επηρεάζοντας τον προσανατολισμό τους, και αυτός να είναι ο λόγος που παρατηρήθηκε μειωμένο το ποσοστό αναρρίχησης των μυγών.

Η κατανάλωση O_2 και η παραγωγή CO_2 στη *Drosophila Melanogaster* σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα του μεταβολισμού. Για την μελέτη του μεταβολικού ρυθμού συγκρίθηκε το παραγόμενο CO_2 των μυγών στις πειραματικές συνθήκες Control, 10%, 25% και 50% CSE. Στις θηλυκές μύγες δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην παραγωγή CO_2 , ενώ στις αρσενικές παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή CO_2 στην πειραματική συνθήκη 50% CSE, υποδεικνύοντας ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις καπνού τσιγάρου οδηγούν σε ραγδαία αύξηση του μεταβολικού ρυθμού.

Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε μύγες που έχουν αναπτυχθεί σε φυσιολογικές συνθήκες και σε μύγες που έχουν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου μέσω της εισπνοής, έχει προσδιοριστεί το παραγόμενο CO_2 [22]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή CO_2 ήταν μεγαλύτερη σε θηλυκές μύγες που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου σε σύγκριση με αυτές που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις θηλυκές μύγες, επομένως οι επιδράσεις του καπνού τσιγάρου μπορούν να παρουσιάζουν διαφορά ανάμεσα σε θηλυκούς και αρσενικούς οργανισμούς. Επίσης σε πειράματα μελέτης του μεταβολικού ρυθμού έχει

παρατηρηθεί ότι θηλυκές μύγες που δεν είναι παρθένες παρουσιάζουν υψηλή μεταβλητότητα στα αποτελέσματα παραγωγής CO₂, καθιστώντας βασικό κριτήριο την σεξουαλική αναπαραγωγή σε μεταβολές του μεταβολικού ρυθμού [21].

Drosophila Melanogaster έχουν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου στο αναπτυξιακό στάδιο 2nd instar larva και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσίαζαν μειωμένες τελικές διακλαδώσεις της τραχείας, όπως παρατηρείται μικρότερη η επιφάνεια των κυψελίδων σε ασθενείς με ΧΑΠ. [26]. Οι τελικές διακλαδώσεις εκτείνονται κατά μήκος και πλάτος όλου του σώματος της μύγας, με σκοπό της ανταλλαγή αερίων μέσω παθητικής διάχυσης με όλα τα κύτταρα του σώματος. Μικρότερες τελικές διακλαδώσεις έχουν ως αποτέλεσμα να μην μπορούν να καλυφθούν οι ανάγκες όλων των κυττάρων και κατ' επέκταση των ιστών και οργάνων των μυγών για O₂. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη κατανάλωση O₂ και την μεγαλύτερη παραγωγή CO₂, αυξάνοντας τα επίπεδα του μεταβολικού ρυθμού.

Επιπλέον σε ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και συγκεκριμένα των πνευμόνων, όπως και η ΧΑΠ, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα CO₂ στους ιστούς των πνευμόνων και την κυκλοφορία του αίματος των ασθενών, ένα παθολογικό αίτιο που ονομάζεται υπερκαπνία [27]. Δεδομένου των πολλών ομοιοτήτων που παρουσιάζουν οι δύο οργανισμοί στο αναπνευστικό τους σύστημα, κάτι ανάλογο θα μπορούσε να συμβαίνει και στην *Drosophila Melanogaster*, ωστόσο δεν υπάρχουν μελέτες προς το παρόν που να αποδεικνύουν τη συγκεκριμένη υπόθεση.

Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει ο καπνός τσιγάρου αποτελεί το σωματικό βάρος. Για τον λόγο αυτό με το πέρας των πειραμάτων που αναλύθηκαν παραπάνω μετρήθηκε το σωματικό βάρος των *Drosophila Melanogaster*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το βάρος των θηλυκών μυγών μειώθηκε σημαντικά στις πειραματικές συνθήκες 10%, 25% και 50% CSE, σε σύγκριση με την πειραματική συνθήκη Control, ενώ το βάρος των αρσενικών μυγών παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο στην υψηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου 50% CSE. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν την αρνητική επίδραση του καπνού τσιγάρου στο σωματικό βάρος.

Σε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί σε *Drosophila Melanogaster* που έχουν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου, μέσω της εισπνοής έχουν παρατηρηθεί χαμηλά επίπεδα σωματικού λίπους, το οποίο συμφωνεί απόλυτα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης [22]. Με σκοπό την παρασκευή της τροφής μαζί με το εκχύλισμα του καπνού τσιγάρου, το τελικό θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύχθηκαν οι μύγες είχε υποστεί αραίωση, με αποτέλεσμα να είναι φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα περιείχε όλες τις βλαβερές και τοξικές ουσίες που περιέχει ο καπνός

τσιγάρου. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι μύγες που αναπτύσσονται από τα πρώτα κιόλας αναπτυξιακά τους στάδια με έλλειψη θρεπτικών συστατικών μεταμορφώνονται σε ενήλικες μύγες μικρότερου μεγέθους, και κατ' επέκταση μικρότερου σωματικού βάρους [28].

Παρόμοια ευρήματα έχουν βρεθεί σε πειράματα που η πατρική γενιά και οι απόγονοι *Drosophila Melanogaster* έχουν εκτεθεί σε νικοτίνη, μέσω της τροφής και έχει μελετηθεί βιωσιμότητα, το μέγεθος και το βάρος τους. Οι μύγες που εκτέθηκαν σε νικοτίνη είχαν μικρότερο μέγεθος ως έμβρυα, προνύμφες, νύμφες και ενήλικα έντομα. Πιθανόν η νικοτίνη να επηρεάζει τα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων, καθώς και την πρόσληψη τροφής, και να αποτελεί την κύρια χημική ένωση που να οδηγεί στο χαμηλό σωματικό βάρος που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Το κάπνισμα από εγκύους, καθώς και το κάπνισμα των μητέρων πριν την εγκυμοσύνη έχει παρατηρηθεί ότι αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για γεννήσεις μωρών με χαμηλό σωματικό βάρος. Σε έρευνα που διεξήχθη σε 454 εγκύους παρατηρήθηκε μικρότερο μέγεθος του εμβρύου, καθώς και χαμηλότερο σωματικό βάρος στα παιδιά τα οποία είχαν γεννηθεί [29]. Παρότι ο άνθρωπος και η *Drosophila Melanogaster* αποτελούν δύο διαφορετικούς οργανισμούς, παρατηρούνται παρόμοιες επιδράσεις του καπνού τσιγάρου στο μέγεθος και το σωματικό βάρος. Τα αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι το μειωμένο σωματικό βάρος που παρατηρήθηκε στις μύγες στην συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να οφείλεται στην αρνητική επίδραση που έχει ο καπνός τσιγάρου στα αναπτυξιακά στάδια των *Drosophila Melanogaster*.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η *Drosophila Melanogaster* ως πειραματικό μοντέλο μελέτης των επιδράσεων του καπνού τσιγάρου στην κινητικότητα, τον μεταβολικό ρυθμό και το σωματικό βάρος. Βρέθηκε ότι ο καπνός τσιγάρου μείωσε την κινητικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αρσενικές και θηλυκές μύγες, αύξησε τον μεταβολικό ρυθμό σε υψηλές συγκεντρώσεις στις αρσενικές και μείωσε το βάρος σε υψηλές συγκεντρώσεις στις αρσενικές, και σε όλες τις συγκεντρώσεις στις θηλυκές. Τα ευρήματα συμφωνούν με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μύγες που έχουν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου μέσω της εισπνοής, τονίζοντας την αξιοπιστία του πειραματικού μοντέλου έκθεσης σε καπνό τσιγάρου μέσω της τροφής, ενώ επιπλέον παρατηρούνται κοινά χαρακτηριστικά με τις επιπτώσεις που προκαλεί ο καπνός τσιγάρου στον άνθρωπο. Η ύπαρξη κοινών χαρακτηριστικών στο αναπνευστικό σύστημα των δύο οργανισμών σε επίπεδο φυσιολογίας, σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για την μελέτη μοριακών μηχανισμών της ΧΑΠ.

5. Βιβλιογραφία

1. Lauralee Sherwood. Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου, 8η Έκδοση, 1^{ος} Τόμος, Αλεξανδρούπολη, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2016: 580-581.
2. Webster MJ, Tarran R. Slippery When Wet: Airway Surface Liquid Homeostasis and Mucus Hydration. *Curr Top Membr.* 2018;81:293-335.
3. Aghapour M, Raei P, Moghaddam SJ, Hiemstra PS, Heijink IH. Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018 Feb;58(2):157-169.
4. Lee PH, Park S, Lee YG, Choi SM, An MH, Jang AS. The Impact of Environmental Pollutants on Barrier Dysfunction in Respiratory Disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021 Nov;13(6):850-862.
5. Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, Putcha N. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2022 Jun 11;399(10342):2227-2242.
6. Scholl A, Ndoja I, Jiang L. *Drosophila* Trachea as a Novel Model of COPD. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 25;22(23):12730.
7. Tudor RM, Yoshida T, Fijalkowka I, Biswal S, Petrache I. Role of lung maintenance program in the heterogeneity of lung destruction in emphysema. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Nov;3(8):673-9.
8. Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, Schmidt TC, Saeedi R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Sci Total Environ.* 2022 Mar 20;813:152667.
9. Agraval H, Chu HW. Lung Organoids in Smoking Research: Current Advances and Future Promises. *Biomolecules.* 2022 Oct 12;12(10):1463.
10. Santalla M, Pagola L, Gómez I, Balcazar D, Valverde CA, Ferrero P. Smoking flies: testing the effect of tobacco cigarettes on heart function of *Drosophila melanogaster*. *Biol Open.* 2021 Feb 15;10(2):bio055004.
11. Hammer B, Wagner C, Divac Rankov A, Reuter S, Bartel S, Hylkema MN, Krüger A, Svanes C, Krauss-Etschmann S. In utero exposure to cigarette smoke and effects across generations: A conference of animals on asthma. *Clin Exp Allergy.* 2018 Nov;48(11):1378-1390.
12. Tiwari AK, Pragya P, Ravi Ram K, Chowdhuri DK. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology.* 2011 Jul 15;76(2):197-216.

13. Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM, Roberts DM. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*. 2015 Nov;201(3):815-42.
14. Ong C, Yung LY, Cai Y, Bay BH, Baeg GH. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*. 2015 May;9(3):396-403.
15. Wangler MF, Yamamoto S, Chao HT, Posey JE, Westerfield M, Postlethwait J; Members of the Undiagnosed Diseases Network (UDN); Hieter P, Boycott KM, Campeau PM, Bellen HJ. Model Organisms Facilitate Rare Disease Diagnosis and Therapeutic Research. *Genetics*. 2017 Sep;207(1):9-27.
16. Sirocko KT, Angstmann H, Papenmeier S, Wagner C, Spohn M, Indenbirken D, Ehrhardt B, Kovacevic D, Hammer B, Svanes C, Rabe KF, Roeder T, Uliczka K, Krauss-Etschmann S. Early-life exposure to tobacco smoke alters airway signaling pathways and later mortality in *D. melanogaster*. *Environ Pollut*. 2022 Sep 15;309:119696.
17. Ehrhardt B, El-Merhie N, Kovacevic D, Schramm J, Bossen J, Roeder T, Krauss-Etschmann S. Airway remodeling: The *Drosophila* model permits a purely epithelial perspective. *Front Allergy*. 2022 Sep 15;3:876673.
18. Markus Braun, Friedemann Koger, Doris Klingelhöfer, Ruth Müller, David A. Groneberg . Particulate Matter Emissions of Four Different Cigarette Types of One Popular Brand: Influence of Tobacco Strength and Additives. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Jan 17;16(2):263.
19. Iliadi KG, Boulianne GL. Age-related behavioral changes in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jun;1197:9-18.
20. Zhong L, Yang Z, Tang H, Xu Y, Liu X, Shen J. Differential analysis of negative geotaxis climbing trajectories in *Drosophila* under different conditions. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2022 Oct;111(2):e21922.
21. Yatsenko AS, Marrone AK, Kucherenko MM, Shcherbata HR. Measurement of metabolic rate in *Drosophila* using respirometry. *J Vis Exp*. 2014 Jun 24;(88):e51681.
22. Prange R, Thiedmann M, Bhandari A, Mishra N, Sinha A, Häsler R, Rosenstiel P, Uliczka K, Wagner C, Yildirim AÖ, Fink C, Roeder T. A *Drosophila* model of cigarette smoke induced COPD identifies Nrf2 signaling as an expedient target for intervention. *Aging (Albany NY)*. 2018 Aug 27;10(8):2122-2135.
23. Johnson TO, Abolaji AO, Omale S, Longdet IY, Kutshik RJ, Oyetayo BO, Adegboyega AE, Sagay A. Benzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced locomotor and reproductive senescence and altered

- biochemical parameters of oxidative damage in Canton-S *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Rep*. 2021 Mar 10;8:571-580.
24. Dome P, Lazary J, Kalapos MP, Rihmer Z. Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Mar;34(3):295-342.
 25. Ren J, Sun J, Zhang Y, Liu T, Ren Q, Li Y, Guo A. Down-regulation of Decapping Protein 2 mediates chronic nicotine exposure-induced locomotor hyperactivity in *Drosophila*. *PLoS One*. 2012;7(12):e52521.
 26. Shigemura M, Sznajder JI. Elevated CO₂ modulates airway contractility. *Interface Focus*. 2021 Apr 6;11(2):20200021.
 27. Koyama T, Texada MJ, Halberg KA, Rewitz K. Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Nov;77(22):4523-4551.
 28. El-Merhie N, Krüger A, Uliczka K, Papenmeier S, Roeder T, Rabe KF, Wagner C, Angstmann H, Krauss-Etschmann S. Sex dependent effect of maternal e-nicotine on F1 *Drosophila* development and airways. *Sci Rep*. 2021 Feb 24;11(1):4441.
 29. Abraham M, Alramadhan S, Iniguez C, Duijts L, Jaddoe VW, Den Dekker HT, Crozier S, Godfrey KM, Hindmarsh P, Vik T, Jacobsen GW, Hanke W, Sobala W, Devereux G, Turner S. A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Feb 23;12(2):e0170946.

6. Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΗΜΟ: Περικλής Μαρνάς

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 19/05/1995

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αθηναίων Αττικής

ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ: Τρίκαλα

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: 28ης Οκτωβρίου 16α, Λάρισα, 41223

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6973835582

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΤΑΧΥΔΡΟΜΙΟΥ: pmarnas@uth.gr

ΓΝΩΣΗ Η/Υ: Καλή

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Πολύ καλή (Personal Test of English General Level 3 Edexcel)

Εκπαίδευση

Πτυχίο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (2014 –

Βαθμός: 6,34/10 (Καλώς).

Πτυχιακή Εργασία: “Προσδιορισμός αντι-μεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, από φύλλα και καρπούς, *Castanea Sativa* (Ευρωπαϊκή καστανιά) έναντι μεταλλαξιγένεσης επαγόμενης από οξειδωτικό στρες σε βακτήρια Salmonella Typhimurium TA102”.

Επιβλέπων: Δημήτριος Στάγκος (Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

Πρακτική Άσκηση: Κέντρο Εργαστηριακών Αναλύσεων Αιμοδιάγνωση , Κύπρου 45 , 41221 Λάρισα.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Jagirdar RM, Pitaraki E, Kotsiou OS, Rouka E, Sinis SI, Varsamas C, **Marnas P**, Stergiopoulou E, Giannou A, Hatzoglou C, Gourgoulialis KI, Zarogiannis SG. Effects of pharmacological primary cilium disturbance in the context of in vitro 2D and 3D malignant pleura mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Mar 6;654:128-135.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. **Περικλής Μαρνάς**, Λυδία Γιαννακού, Στέφανος-Αθανάσιος Γιαννόπουλος, Ερασμία Ρούκα, Ελεάννα Πιταράκη, Rajesh Jagirdar, Χρυσή Χατζόγλου, Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Σωτήριος Ζαρογιάννης. Μελέτη μεταβολών κινητικότητας, μεταβολισμού και βάρους της *Drosophila melanogaster* μετά από έκθεση σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. 31^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2023.