



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μελέτης των επιδράσεων του καπνίσματος στο ENaC τραχειακού επιθηλίου προβάτου

Γραμματικόπουλος Αλέξανδρος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ζαρογιάννης Σωτήρης (Επιβλέπων), Λέκτορας Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής
- Χατζόγλου Χρυσή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής

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, Οκτώβριος, 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Development of an experimental model for the investigation of smoking
effects on ENaC on sheep tracheal epithelium

By
Grammatikopoulos Alexandros

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ζαρογιάννης Σωτήρης (Επιβλέπων), Λέκτορας Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής
- Χατζόγλου Χρυσή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής

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

Λάρισα, Οκτώβριος, 2014

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1.1 ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	10
1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ	11
1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ.....	13
1.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ – ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ.....	15
1.5 Ο ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΣ ΔΙΑΥΛΟΣ ΙΟΝΤΩΝ ΝΑΤΡΙΟΥ (ENaC)	17
1.7 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ENaC	21
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
2. ΥΛΙΚΟ	26
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ.....	26
2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ.....	27
3. ΜΕΘΟΔΟΣ	30
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	30
3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΑΞΗ USSING SYSTEM	31
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ WESTERN BLOT.....	35
3.3.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ WESTERN BLOTTING.....	35
3.3.2 Η ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	36
3.3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	37
3.3.4 Η ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	38
3.3.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ α ENaC ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ.....	39
3.3.6 Η ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ FILM ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ Α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ENaC ΚΑΙ ΤΗΣ Β-ΑΚΤΙΝΗΣ.....	41
3.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΦΛΟΙΩΜΕΝΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΤΕΜΑΧΙΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ	42
3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ	43
<i>Πειράματα Αναφοράς.....</i>	<i>43</i>
<i>Πειράματα Αμιλορίδης.....</i>	<i>45</i>

<i>Πειράματα Αμιλορίδης σε ιστοτεμάχια χωρίς/με επώαση με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου.....</i>	46
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ WESTERN BLOT	47
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	50
ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014, υπό την επίβλεψη του κ. Σωτηρίου Ζαρογιάννη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κα. Χατζόγλου Χρυσή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας και τον κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής και ιδιαίτερα τον κ. Ζαρογιάννη Σωτήρη, Λέκτορα Φυσιολογίας του ιδίου τμήματος για την καθοδήγηση, τη στήριξη, τη βοήθεια και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια της εκπόνησης διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μαρία Ιωάννου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την συμβολή της στον ιστολογικό χαρακτηρισμό των δειγμάτων της παρούσας μελέτης. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Βασιλική Πέππα, Ζωή Αρσενοπούλου και Rajesh Jagirdar για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής μου εργασίας καθώς χωρίς την συμβολή τους, η ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήταν αδύνατη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου, την οικογένειά μου, τους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Σοφία, τον αδερφό μου Νίκο, τους παππούδες μου, Αλέξανδρο και Αντιγόνη και τους φίλους μου, Έλενα Γκίκα, Κυριάκη Ευθύμιο, Μπέτα Ραφαέλα, Κωνσταντίνο Χατζηελευθεριάδη και Μαρία Χαραλάμπους, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου αρωγοί, στηρίζοντάς με τόσο ψυχολογικά, ηθικά όσο πρακτικά, με οποιοδήποτε τρόπο και μέσο μπορούσε ο καθένας τους οποιαδήποτε στιγμή προέκυπτε κάποια ανάγκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι το κάπνισμα προκαλεί προοδευτική απώλεια της λειτουργίας του Διαμεμβρανικού Ρυθμιστή της Κυστικής Ίνωσης (CFTR) είτε σε υγιείς καπνιστές είτε σε καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η έκπτωση της λειτουργίας του CFTR σε ασθενείς με κυστική ίνωση έχειδειχθεί ότι επηρεάζει και τη λειτουργία του επιθηλιακού διαύλου νατρίου (ENaC) και έτσι επιβαρύνει περαιτέρω την συμπύκνωση του υγρού επιφανείας των αεραγωγών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της λειτουργικότητας του ENaC σε τραχειακό επιθήλιο προβάτου χωρίς και με επίδραση εκχύλισματος καπνού τσιγάρου (CSE). **Μεθοδολογία:** Τραχεία προβάτου μεταφέρθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS στο εργαστήριο και απομονώθηκε επιθήλιο με αποφλοίωση. Παρασκευάστηκε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου σε διάλυμα Krebs Ringer και αραιώθηκε σε συγκέντρωση 5%. Με τη διάταξη Ussing καταγράφηκε η μεταβολή του ιοντικού ρεύματος (I_{SC}) του ιστού μετά την επώαση του για 30 λεπτά χωρίς/με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. Η αναστολή του ENaC μελετήθηκε με την προσθήκη αμιλορίδης (10^{-5}) στην επιθηλιακή επιφάνεια του ιστοτεμαχίου. Παράλληλα έγινε ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων για την εκτίμηση πιθανών μορφολογικών μεταβολών και τέλος ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της α -υπομονάδας του ENaC. **Αποτελέσματα:** Η δράση του αναστολέα του ENaC σε φυσιολογικό τραχειακό επιθήλιο προβάτου οδηγεί σε μείωση του I_{SC} που διέρχεται τον ιστό [$\Delta I=33\pm 5.92 \mu A/cm^2$; $p<0.001$ σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς χωρίς προσθήκη αμιλορίδης($\Delta I=1.44\pm 0.71 \mu A/cm^2$)]. Μετά από επώαση με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου το I_{SC} επίσης μειώθηκε σημαντικά ($\Delta I=14.80\pm 1.96 \mu A/cm^2$; $p<0.001$). Δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην μορφολογία των ιστοτεμαχίων κατά την ιστολογική εκτίμηση. Τέλος αν και η έκφραση της α - υπομονάδας του ENaC φαίνεται να μειώνεται μετά από επώαση με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου, η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. **Συμπεράσματα:** Στο τραχειακό επιθήλιο προβάτου η αναστολή του ENaC από αμιλορίδη δείχνει ότι υπάρχει ενεργότητα του διαύλου σε φυσιολογικές συνθήκες. Μετά από επώαση με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου η δραστηριότητά του ENaC μειώνεται χωρίς να παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές στα ιστοτεμάχια ή σημαντικές μεταβολές της έκφρασης της α υπομονάδας του ENaC. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να οφείλονται είτε σε αλλαγές στη διαθεσιμότητά του ENaC στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του παρασκευάσματος είτε στην ανασταλτική δράση των συστατικών ή/και των παραπροϊόντων του τσιγάρου στη λειτουργία του ENaC.

Λέξεις Κλειδιά: Επιθήλιο αεραγωγών, Επιθηλιακός Δίαυλος Νατρίου, Ιοντική Διαπερατότητα, Τραχεία, Συσκευή Ussing

ABSTRACT

Aim: Recent evidence demonstrate that smoking induces the progressive loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) function both in healthy smokers and in smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). The dysfunction of CFTR function in cystic fibrosis patients has been shown to affect the function of Epithelial Sodium Channel (ENaC) as well. This results in further deterioration of the normal turnover of the airway surface liquid. The goal of the current study was to investigate the function of EnaC in specimens of sheep tracheal epithelium with and without the incubation with cigarette smoke extract (CSE). **Methodology:** Sheep trachea was transferred in PBS in the laboratory and epithelial specimens were isolated by exfoliation. CSE was produced in Krebs Ringer buffer and was subsequently diluted to 5% in Krebs Ringer. Ussing Chamber experiments were performed and the Short Circuit Current (I_{sc}) recorder in tissues that were incubated either in Krebs Ringer alone or in Krebs-Ringer-CSE 5% for 30 minutes. The inhibition of EnaC was studied by the application of amiloride (10^{-5}) in the mucosal side of the specimens. Histologic examination was also performed in order to assess possible morphological changes in the specimens and finally Western Blotting was performed in order to assess the expression of the alpha subunit of EnaC (α ENaC). **Results:** The effect of EnaC inhibition in normal sheep tracheal epithelium leads to the reduction of the sodium current through the membrane as shown by the I_{sc} measurements [$\Delta I = 33 \pm 5.92 \mu A/cm^2$; $p < 0.001$ as compared to control experiments without amiloride addition ($\Delta I = 1.44 \pm 0.71 \mu A/cm^2$)]. After the incubation with CSE the sodium current significantly reduced as shown by the significant drop of the I_{sc} ($\Delta I = 14.80 \pm 1.96 \mu A/cm^2$; $p < 0.001$). No remarkable changes in morphology were observed as indicated by the histological analysis of the specimens. Finally, the expression of the alpha subunit of ENaC tends to reduce after CSE incubation but this reduction is not statistically significant. **Conclusion:** This study demonstrates that the sheep tracheal epithelium expresses EnaC that is active in normal conditions and inhibitable by amiloride. Incubation with CSE reduces the function of EnaC without affecting the morphology or the α ENaC subunit expression levels. These findings may be due to changes in the availability of ENaC in the plasma membrane or due to the inhibitory effects of CSE constituent or by-products.

Keywords: Airways epithelium, Epithelial Sodium Channel, Ion permeability, Trachea, Ussing System

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία υγιείς νυν καπνιστές, καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) καθώς και πρώην καπνιστές εμφανίζουν συστηματική έκπτωση της λειτουργίας του Διαμεμβρανικού Ρυθμιστή της Κυστικής Ίνωσης (CFTR). Αυτοί οι καπνιστές, ασθενείς ή μη, εμφανίζουν λοιπόν ένα φαινότυπο ήπιας Κυστικής Ίνωσης. Από την άλλη πλευρά η έκπτωση της λειτουργίας του CFTR σε ασθενείς που πασχουν από τη γενετική νόσο Κυστική Ίνωση έχειδειχθεί ότι έχουν μεταβολή και στη λειτουργία του επιθηλιακού διαύλου νατρίου (ENaC) που επιβαρύνει περαιτέρω την συμπίκνωση του υγρού επιφανείας των αεραγωγών.

Το γεγονός ότι το κάπνισμα μπορεί να φέρει τέτοιες μεταβολές σε κατά τα άλλα υγιείς ανθρώπους δείχνει ότι πρέπει να διερευνηθεί σε μεγάλο βάθος και με αξιόπιστα μοντέλα η επίδραση του καπνίσματος και των επιμέρους συστατικών του καπνού στους κύριους ιοντικούς διαύλους που φέρουν τα επιθηλιακά κύτταρα των ανώτερων αεραγωγών. Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που έχουν τον συγκεκριμένο προσανατολισμό πραγματοποιείται σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου ή σε πρωτογενείς καλλιέργειες πειραματοζώων ή ανθρώπου. Εναλλακτικά γίνονται in vivo μελέτες σε μικρά πειραματόζωα που εκτίθενται είτε συνολικά είτε μέσω εισπνοής μόνο σε καπνό τσιγάρου. Το πλεονέκτημα αυτών των μελετών είναι ότι μπορούν να γίνουν σε μεγάλη κλίμακα αλλά υπάρχει ο περιορισμός ότι οι ομοιότητες τους με τον άνθρωπο δεν είναι πάντα οι επιθυμητές.

Λόγω των παραπάνω ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να δημιουργηθεί ένα ex vivo μοντέλο για την μελέτη των επιδράσεων του καπνίσματος στη τραχεία προβάτου. Το πρόβατο είναι ένα πειραματόζωο που εμφανίζει αρκετές ομοιότητας ανατομικά και λειτουργικά με τον άνθρωπο και άρα κλινικά πιο σχετικό από μοντέλα κυττάρων ή μικρών πειραματοζώων. Επομένως η πτυχιακή αυτή εργασία στοχεύει στο να καλύψει ένα κενό που υπάρχει επί του παρόντος στα διαθέσιμα ερευνητικά μέσα για τη μελέτη των επιδράσεων του καπνού στους ιοντικούς διαύλους των αεραγωγών.

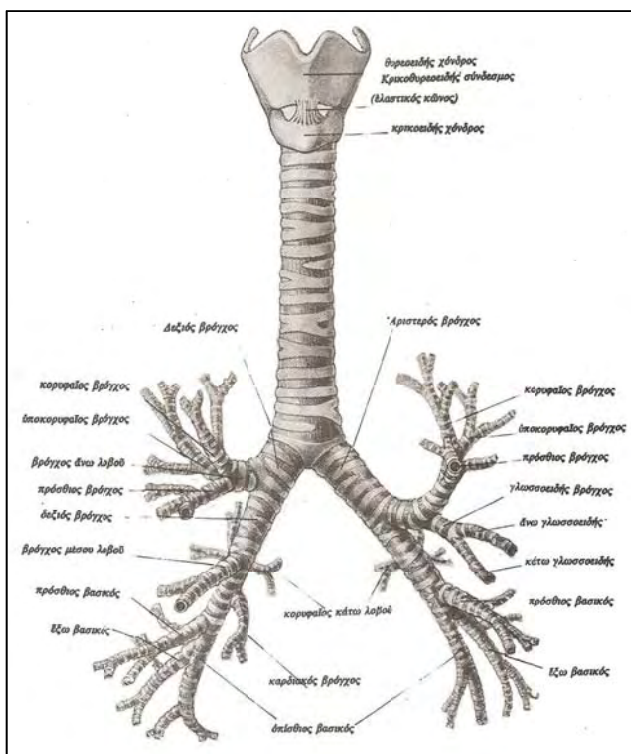
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τους πνεύμονες και ένα σύστημα σωλήνων το οποίο είναι υπεύθυνο για την σύνδεση του εξωτερικού περιβάλλοντος με τις θέσεις ανταλλαγής των αερίων. Η θωρακική κοιλότητα, το διάφραγμα, οι μεσοπλεύριοι μύες, οι ελαστικές και κολλαγόνες ίνες των πνευμόνων αποτελούν τον μηχανισμό αερισμού που είναι υπεύθυνος για την μεταφορά του αέρα διαμέσου των πνευμόνων. Το αναπνευστικό σύστημα διαχωρίζεται σε δύο κύριες μοίρες, την μεταφορική και την αναπνευστική (**Εικόνα 1**).

Η μεταφορική μοίρα αποτελείται από την ρινική κοιλότητα, το ρινοφάρυγγα, το λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους, τα βρογχιόλια και τα τελικά βρογχιόλια. Ουσιαστικά, συνθέτει ένα

σύστημα αγωγών μέσω των οποίων ο αέρας εισέρχεται από το εξωτερικό περιβάλλον στους πνεύμονες και εν συνεχεία απομακρύνεται από αυτούς. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός καθώς υγραίνουν και θερμαίνουν με τη βοήθεια των αιμοφόρων αγγείων τον αέρα που εισέρχεται στον οργανισμό, ενώ παράλληλα απομακρύνουν σωματίδια σκόνης και μικροοργανισμούς που ενδέχεται να εισέλθουν κατά την εισπνοή, με τη βοήθεια του κροσσωτού επιθηλίου του αναπνευστικού βλεννογόνου. Οι ίνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, σε συνδυασμό με συγκεκριμένους χόνδρους, στηρίζουν δομικά τη μεταφορική μοίρα παρέχοντας της παράλληλα ευκαμψία, διασφαλίζοντας έτσι συνεχή παροχή αέρα στον οργανισμό.



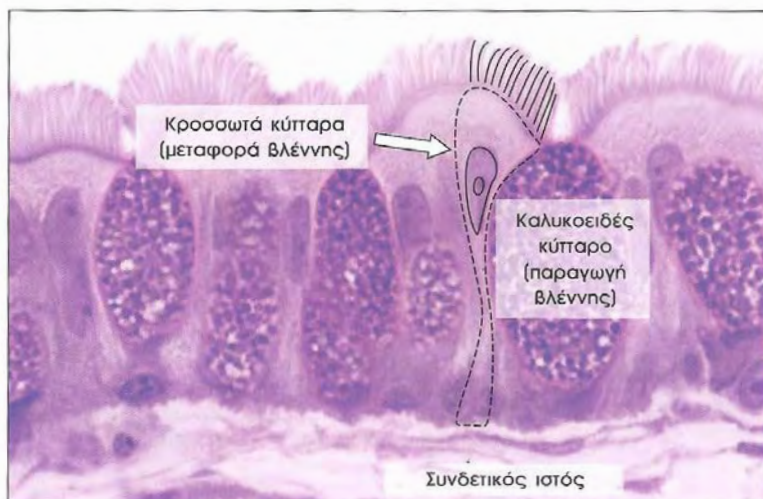
Εικόνα 1. Εντοπισμός του λάρυγγα, της τραχείας, και του βρογχικού δέντρου του αναπνευστικού συστήματος (Ανατύπωση από: Αλεξάνδρου Π. Σάββα, Επιτομή, ανατομική του ανθρώπου και Άτλας, Δ' έκδοση, κεφάλαιο Αναπνευστικού συστήματος, Εκδοτικός οίκος αφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1989).

αερίων. Πιο συγκεκριμένα, οι πνεύμονες απαρτίζονται στο μεγαλύτερό τους μέρος από εξειδικευμένες δομές με μορφή σάκου, οι οποίες ονομάζονται κυψελίδες, και είναι υπεύθυνες για την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του αίματος και του εισπνεόμενου αέρα [1].

1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ

Η τραχεία ανήκει στη μεταφορική μοίρα του αναπνευστικού συστήματος αποτελώντας συνέχεια του λάρυγγα και σημείο σύνδεσης του τελευταίου με τους βρόγχους. Πιο αναλυτικά, εκβάλλει από το κάτω μέρος του κρικοειδούς χόνδρου του λάρυγγα και εκτείνεται προς τα κάτω διαμέσου της θωρακικής κοιλότητας, ώσπου στο ύψος περίπου του 4^{ου} θωρακικού σπονδύλου διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους κλάδους, τους βρόγχους. Πρόκειται για έναν σωλήνα μεγέθους περίπου 10 εκ. Το εμπρόσθιο και τα πλάγια τμήματά του είναι κυρτά και αποτελούνται από 16 μέχρι 20 ημικρίκια χόνδρων. Αντίθετα, το οπίσθιο τμήμα της τραχείας είναι επίπεδο και βλενώδες. Μεταξύ των ημικρικίων παρεμβάλλεται συνδετικός ιστός, οι μεσοκρίκιοι σύνδεσμοι, οι οποίοι ενώνουν τα ημικρίκια μεταξύ τους [2].

Το μεγαλύτερο μέρος της μεταφορικής μοίρα, όπως και η τραχεία που κατατάσσεται σε αυτή, καλύπτονται από ψευδοπολύστιβο κροσσωτό κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο είναι άφθονο σε καλυκοειδή κύτταρα. Ο συγκεκριμένος τύπος επιθηλίου είναι γνωστός ως αναπνευστικό επιθήλιο και απαρτίζεται από 5 διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τα κροσσωτά κυλινδρικά κύτταρα, τα βλενώδη καλυκοειδή κύτταρα, τα κύτταρα με ψηκτροειδή παρυφή, τα βασικά ή αλλιώς βραχεία κύτταρα και τα νευροενδοκρινικά κύτταρα (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Φωτογραφία από μικροσκόπιο που απεικονίζει τα κύρια συστατικά του αναπνευστικού επιθηλίου. Η χρώση πραγματοποιήθηκε με παραρροζανιλίνη-κυανού της τολουιδίνης (Ανατύπωση από: LC Junqueira, J Carneiro, Βασική Ιστολογία II, 5^η Ελληνική έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2004).

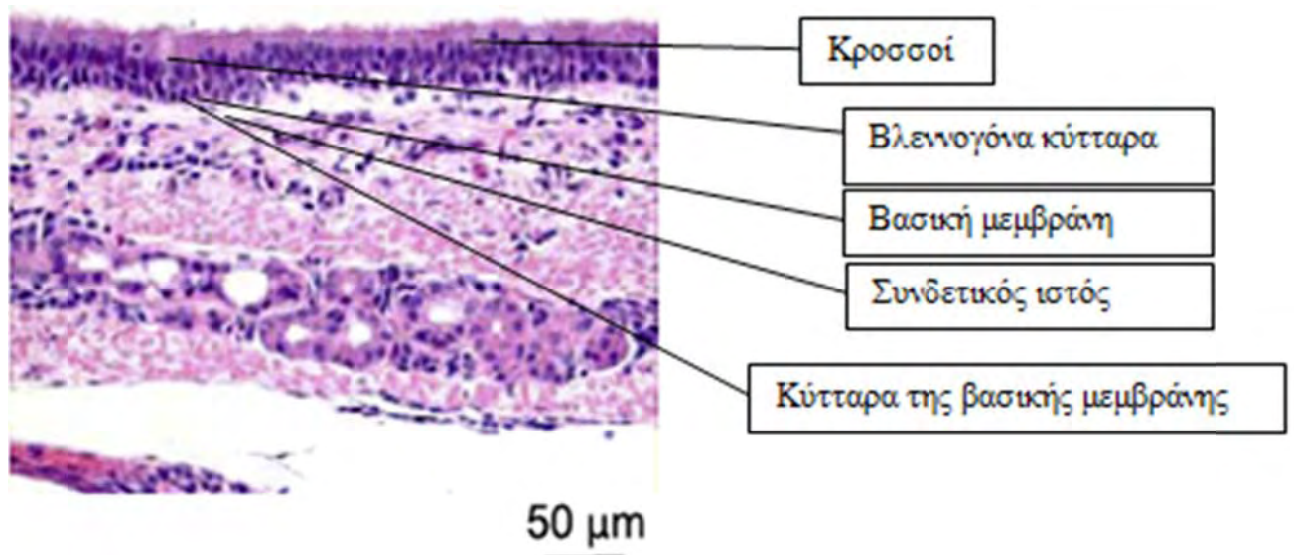
Τα κροσσωτά κυλινδρικά κύτταρα διατρέχουν το μεγαλύτερο μέρος του αναπνευστικού επιθηλίου, φέροντας γύρω στους 300 κροσσούς ανά κύτταρο στην κορυφαία επιφάνειά τους. Τα βλενώδη καλυκοειδή κύτταρα παράγουν από την κορυφαία πλευρά τους ποσότητες βλέννης η οποία επαλείφει το σύνολο της έκτασης των αεραγωγών προσδίδοντας λειτουργικά και προστατευτικά (μηχανικά, θερμικά, χημικά) οφέλη. Η σύσταση της βλέννης χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση μεγάλων ποσοτήτων διαφόρων γλυκοπρωτεϊνών, ενώ η βιολογική της σημασία

έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι αποτελεί το μέσο πρόσδεσης διαφόρων σωματιδίων, είτε σκόνης είτε μικροοργανισμών τα οποία εισέρχονται στους αεραγωγούς κατά την εισπνοή. Τα σωματίδια καθώς παγιδεύονται στη βλέννα κατευθύνονται, εξαιτίας της συντεταγμένης κίνησης των κροσσών του επιθηλίου, προς το φάρυγγα με σκοπό να απομακρυνθούν από τον οργανισμό, είτε με τη μορφή φλεγμάτων, μέσω της στοματικής κοιλότητας, είτε με τη μορφή βλέννης, διαμέσου της ρινικής κοιλότητας (βλεννοκροσσωτή κάθαρση) [3].

Τα κύτταρα με τη ψηκτροειδή παρυφή φέρουν πλήθος μικρολαχνών στην κορυφαία επιφάνειά τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα από το οποίο προήλθε και η ονομασία τους. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εξαιτίας του γεγονότος ότι διαθέτουν προσαγωγές νευρικές ίνες στη βασική τους επιφάνεια θεωρούνται ως αισθητήριοι υποδοχείς του αναπνευστικού επιθηλίου.

Τα βασικά ή βραχεία κύτταρα είναι μικρά κύτταρα σφαιρικού σχήματος που εντοπίζονται στον βασικό υμένα, αλλά δεν εκτείνονται στην επιφάνεια του αυλού. Είναι υπεύθυνα τόσο για την στήριξη, όσο για την επισκευή και την ανανέωση των κυττάρων του επιθηλίου κατόπιν τραυματισμού του.

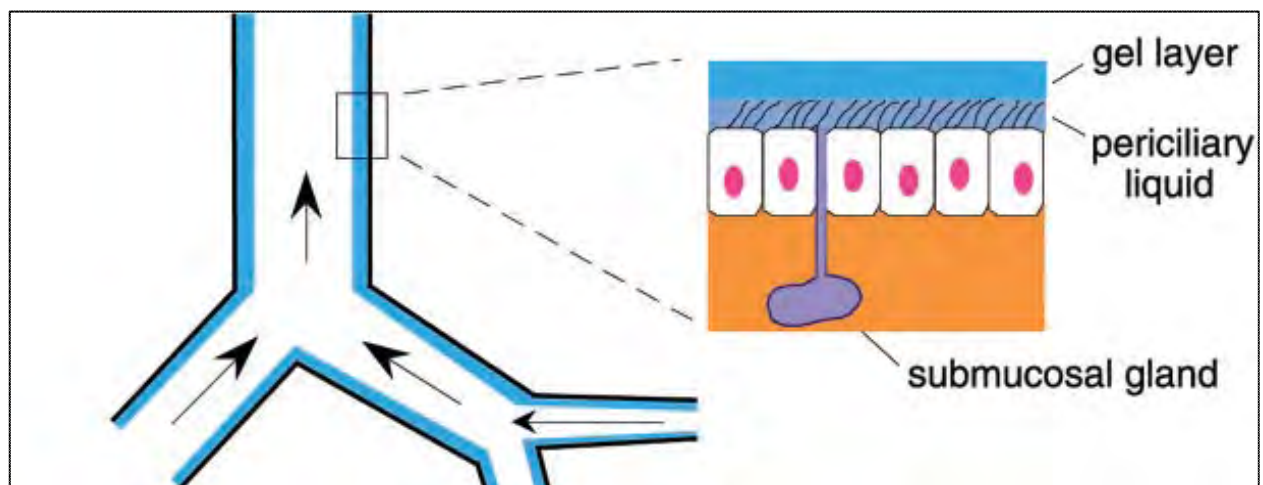
Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα, μοιάζουν με αυτά του βασικού υμένα διαθέτοντας στο εσωτερικό τους πλήθος κοκκίων, διαμέτρου 100-300 nm, κατατάσσοντας τα με αυτόν τον τρόπο στα κύτταρα του διάχυτου νευροενδοκρινικού συστήματος [1]. Όλα τα κύτταρα επικάθονται στη βασική μεμβράνη κάτω από τη οποία στο χόριο βρίσκονται κολλαγόνο, αυλοί αδένων, απολήξεις νεύρων και αγγεία (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Παρατίθεται η απεικόνιση της δομής της τραχείας με τον εντοπισμό των βασικών κυτταρικών δομών (Ανατύπωση από: Song Y, Namkung W, Nielson DW, Lee JW, Finkbeiner WE, Verkman AS (2009) Airway surface liquid depth measured in ex vivo fragments of pig and human trachea: dependence on Na⁺ and Cl⁻ channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297 (6):L1131-40).

1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Ο πνεύμονας πρέπει να προστατεύεται συνεχώς από μικροοργανισμούς και σωματίδια σκόνης που εναποτίθεται στους αεραγωγούς κατά την αναπνοή. Η κάθαρση των αεραγωγών όπως προαναφέρθηκε επιτελείται μέσω της λειτουργίας που ονομάζεται βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Στη βλεννοκροσσωτή κάθαρση που αποτελεί μηχανική απόρριψη των μικροοργανισμών και των διαφόρων σωματιδίων σημαντικό ρόλο παίζουν εκτός από τους κροσσούς του επιθηλίου και το υγρό που επαλείφει τους αεραγωγούς. Αυτός ο μηχανισμός μηχανικής κάθαρσης μέσω της γέλης είναι η πρώτη γραμμή άμυνας των αεραγωγών στα θηλαστικά [5]. Μελέτες που έχουν διενεργηθεί με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχουν καταδείξει ότι το υγρό της επιφάνειας των αεραγωγών αποτελείται από δυο φάσεις: η πρώτη φάση του αποτελείται από το περικροσσωτό υγρό που επικάθεται στο επιθήλιο και έχει χαμηλό ιξώδες παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα κίνησης μέσα σε αυτό των κροσσών αλλά και τη ροή πάνω σε αυτό της δεύτερης φάσης του. Η δεύτερη φάση που έχει υψηλό ιξώδες αποτελείται από τη γέλη πάνω στην οποία επικάθονται οι μικροοργανισμοί και τα σωματίδια σκόνης (**Εικόνα 4**) [6].



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του υγρού που επαλείφει τους μεγάλους και τους μικρούς αεραγωγούς, το περικροσσωτό υγρό και το επίπεδο της βλάννης. Επίσης εικονίζεται η μεταφορά του υγρού από τους αεραγωγούς προς τη ρινική και τη στοματική κοιλότητα (Ανατύπωση από: Verkman AS, Song Y, Thiagarajah JR (2003) Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:2-15).

Οι κροσσοί είναι βυθισμένοι στο περικροσσωτό υγρό του οποίου οι ιδιότητες (π.χ. ιοντική σύσταση, ωσμωτικότητα, pH, ύψος) είναι σημαντικές για την βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Η ιοντική σύσταση του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών έχει ευρέως μελετηθεί αλλά τα αποτελέσματα ποικίλουν ανάλογα με τη μεθοδολογία των μετρήσεων, το είδος του πειρατοζώου ή την προέλευση των κυττάρων της καλλιέργειας. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε

παρασκεύασμα τραχειάς ανθρώπου με τη χρήση δεικτών φθορισμού οι τιμές των συγκεντρώσεων νατρίου και καλίου είναι περίπου 100 και 90 mM αντίστοιχα (αναλογία περίπου 1:1 μεταξύ των δύο). Μελέτες σε πρόβατο που είναι το πειραματόζωο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν υπάρχουν. Οι τιμές της ωσμωτικότητας εξαρτώνται από τη ενυδάτωση του περικροσσωτού υγρού και την φυσιολογική λειτουργία των ιοντικών διαύλων που διατηρούν σταθερή τη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών. Οι κύριοι είναι νατρίου (μέσω του Επιθηλιακού διαύλου νατρίου; Epithelial Sodium Channel - ENaC) και χλωρίου (μέσω του Διαμεμβρανικού ρυθμιστή της κυστικής ίνωσης; Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator - CFTR). Εξαρτώνται επίσης σε μεγάλο βαθμό και από το φορτίο της βλεννώδους φάσης σε σωματίδια και μικροοργανισμούς [7]. Το υγρό της επιφάνειας των αεραγωγών περιέχει επίσης και πληθώρα μορίων όπως π.χ. αντιμικροβιακούς παράγοντες (λυσοζύμη και λακτοφερίνη), κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (π.χ. μακροφάγα, ουδετερόφιλα), κυτταροκίνες, έκτο-νουκλεοτιδάσες, γλυκοπρωτεΐνες [7].

Σε φυσιολογικούς αεραγωγούς το ύψος του περικροσσωτού υγρού φτάνει το ανώτερο ύψος των κροσσών (περίπου 7-10 μm) ενώ το ύψος της βλέννης εμφανίζει μεγάλες αποκλίσεις και μπορεί να είναι από 7 έως 70 μm [7]. Σε μια μόνο μελέτη που έχει διεξαχθεί με χρήση τραχειάς προβάτου το 1990 με μεθοδολογία που είναι πολύ απλούστερη των σημερινών, μετρήθηκε το ύψος του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών σε περίπου 35 μm [6].

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η φυσιολογική παραγωγή και ρύθμιση των χαρακτηριστικών του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών είναι σημαντική για την αποτελεσματική διεκπεραίωση της απομάκρυνσης μικροοργανισμών και σωματιδίων και άρα της αποτελεσματικής άμυνας του οργανισμού. Σε περίπτωση δυσλειτουργίας ενός εκ των μηχανισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να επιβαρυνθεί και να μειωθεί κατά πολύ η αμυντική λειτουργία του οργανισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα δυσλειτουργίας της παραγωγής και ρύθμισης του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών είναι η κυστική ίνωση. Αποτελεί ένα γενετικό συστηματικό νόσημα που οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR που είναι διάυλος χλωρίου [8]. Ενώ προσβάλλονται όλοι οι ιστοί που εκφράζουν τον συγκεκριμένο διάυλο η νόσος κλινικά εκδηλώνεται κυρίως στους πνεύμονες διότι προκαλούνται ανωμαλίες στην παραγωγή και ομοιοστατική αντιρρόπηση της έκκρισης χλωρίου στο υγρό της επιφάνειας των αεραγωγών. Προοδευτικά η λειτουργία των αεραγωγών και του πνεύμονα εκπίπτει και η κάθαρση των μικροοργανισμών δυσχεραίνει οδηγώντας σε συχνότερες λοιμώξεις του αναπνευστικού [9].

1.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΕΣ MEMBRANES – ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ

Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας που επιτρέπει στο κυτταρόπλασμα να διατηρεί σύσταση διαφορετική από εκείνη του εξωκυττάριου χώρου. Σπουδαίο ρόλο στην κατανόηση του σημαντικού ρόλου των βιολογικών μεμβρανών διαδραμάτισε η ανακάλυψη ότι η απορρόφηση υγρού από το έντερο απαιτεί ακέραιο επιθήλιο και ότι η διακίνηση υγρού διαμέσου της μεμβράνης γίνεται χωρίς να υπάρχει κάποια οσμωτική δύναμη [10]. Έκτοτε πλειάδα μελετών σε πολλούς ιστούς μας έδωσαν τη δυνατότητα να μελετήσουμε και να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που καθορίζουν τη διακίνηση ιόντων και ύδατος διαμεμβρανικά. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν είτε μετακίνηση διαμέσου της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας είτε μέσα από πρωτεΐνες που φέρει η πλασματική μεμβράνη. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά. Η διάχυση είναι η τυχαία διακίνηση ουσιών, μόριο με μόριο, μέσα από χώρους που παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων στη μεμβράνη, είτε σε συνδυασμό με πρωτεΐνη φορέα (διευκολυνόμενη διάχυση). Η διάχυση επιτελείται με τη συνήθη κινητική ενέργεια της ύλης. Τα ιόντα διαχέονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα μόρια, καθώς επίσης και τα αιωρούμενα κολλοειδή σωματίδια, με τη διαφορά ότι τα κολλοειδή κινούνται με πολύ μικρότερη ταχύτητα εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους [11]. Η ενεργητική μεταφορά συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή άλλων ουσιών, διαμέσου της μεμβράνης, με τη συμμετοχή μιας πρωτεΐνης φορέα. Επιπλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πρηνές, όπως από χαμηλή συγκέντρωση προς υψηλή συγκέντρωση, διεργασία για την οποία απαιτείται επιπρόσθετη ενέργεια εκτός από την κινητική για την πραγματοποίηση της μετακίνησης [11].

Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολικότητα λόγω της ανισοκατανομής ιοντικών διαύλων στην πλασματική τους μεμβράνη που εξασφαλίζεται από τις στεγανές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Οι στεγανές συνδέσεις χωρίζουν την πλασματική μεμβράνη σε κορυφαία (apical) και βασικοπλευρική (basolateral) και διαμερισματοποιούν το σύνολο των πλασματικών μεμβρανών των κυττάρων που αποτελούν τον επιθηλιακό φραγμό δημιουργώντας έτσι την πολικότητα της μονοστοιβάδας. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταφορικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης που βλέπει προς τη μια πλευρά της στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από εκείνες της μεμβράνης που βλέπει προς την άλλη πλευρά [12]. Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της πολικότητας [11]. Οι στενές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν τη μίξη των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της κορυφαίας, διατηρώντας έτσι την πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν τη δίοδο ύδατος και μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι, υπάρχουν δυο

τύποι οδών μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: (α) διακυτταρικές οδοί, μέσα από τα κύτταρα, και (β) παρακυττάρια οδοί, μεταξύ των κυττάρων [12-13].

Κατά όμοιο τρόπο λειτουργεί και η επιθηλιακή στοιβάδα της τραχείας. Λόγω του σημαντικού ρόλου των ιοντικών διαύλων των επιθηλιακών κυττάρων της στην παραγωγή και ρύθμιση του υγρού της επιφάνειας των αεραγωγών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε επίπεδο ηλεκτροφυσιολογίας. Σε όλες τις ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση ιστοτεμαχίων τραχείας γίνεται χαρακτηρισμός των βιοφυσικών ιδιοτήτων του προς μελέτη ιστού. Οι κύριες και συχνότερα αναφερόμενες βιοφυσικές παράμετροι που εξετάζονται είναι η διαμεμβρανική διαφορά δυναμικού (TPD; transmembrane potential difference), η διαμεμβρανική ηλεκτρική αντίσταση (R_{TM} ; Transmembrane electric resistance) και το ρεύμα βραχυκυκλώματος (I_{sc} ; Short-circuit Current). Η TPD είναι ενδεικτική της διαφοράς δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης, R_{TM} είναι δείκτης κυρίως της παρακυτταρικής μεταφοράς ιόντων, ενώ το I_{sc} είναι η συνισταμένη του συνολικού ρεύματος που διαπερνά μια μεμβράνη. Σε περίπτωση που μελετούμε επιθηλιακού τύπου ιστούς (όπως στην παρούσα μελέτη) οι παραπάνω ονομασίες προσαρμόζονται ανάλογα (π.χ. Διεπιθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση). Οι τιμές των βιοφυσικών ιδιοτήτων των επιθηλιακών παρασκευασμάτων από τραχεία διαφοροποιούνται από ιστό σε ιστό και από οργανισμό σε οργανισμό.

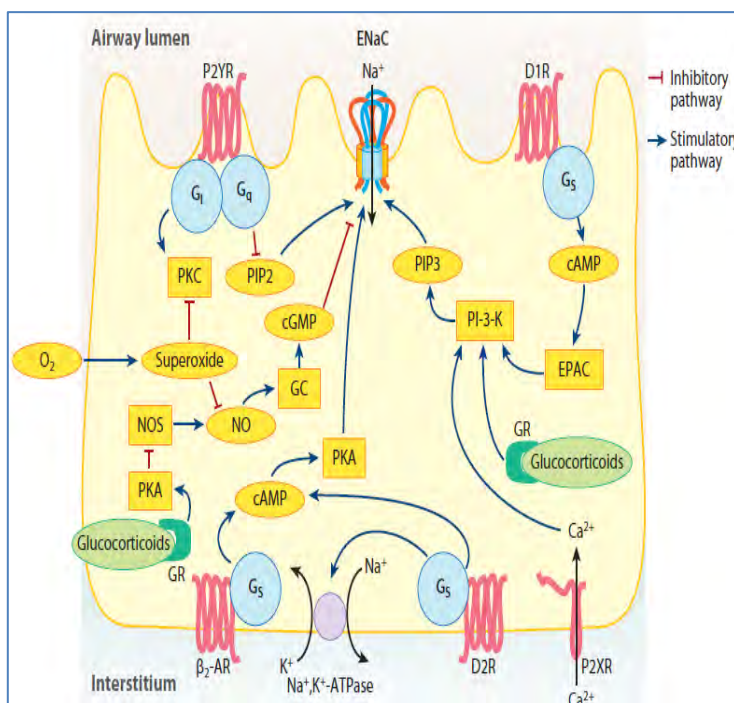
Αρχικά τη δεκαετία του '70 και '80 οι οργανισμοί των οποίων ιστοτεμάχια τραχείας έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας ήταν ο σκύλος, το κουνέλι, η γάτα, τα βοοειδή και το πρόβατο. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του I_{sc} στον σκύλο κυμαίνεται από 50 μέχρι 100 $\mu A/cm^2$, ενώ στη περίπτωση της γάτας σε τιμές μεταξύ 30 και 50 $\mu A/cm^2$. Στη τραχεία του προβάτου βρέθηκε μεταξύ 40 και 90 $\mu A/cm^2$, στα βοοειδή μεταξύ 120 και 170 $\mu A/cm^2$, ενώ στο κουνέλι μεταξύ 60 και 90 $\mu A/cm^2$ [14]. Σε πιο πρόσφατη μελέτη με τη διάταξη Ussing System μετρήθηκε η R_{TM} και το I_{sc} σε δείγματα τραχείας γουρούνι και ανθρώπου από υποψήφιο μόσχευμα που απορρίφθηκε. Οι τιμές τόσο της R_{TM} ($259 \pm 19 \Omega \times cm^2$ και $240 \Omega \times cm^2$ αντίστοιχα) όσο και του I_{sc} (περίπου 60 $\mu A/cm^2$ και 65-70 $\mu A/cm^2$) ήταν συγκρίσιμες. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να αναδείξει την ομοιότητα τόσο στις βιοφυσικές ιδιότητες των δύο παρασκευασμάτων όσο και να δείξει την ομοιότητα στη λειτουργία των ιοντικών διαύλων ENaC και CFTR στα δύο είδη κάτι που απεδείχθη με τη χρήση των ειδικών αναστολέων, αμιλορίδη (για το ENaC) και CFTR₁₇₂ (για το CFTR). Ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να τονισθεί είναι ότι στη συγκεκριμένη μελέτη τα δείγματα τραχείας τόσο του γουρουνιού όσο και του ανθρώπου τοποθετήθηκαν ολόκληρα στο Ussing System, χωρίς την απομόνωση του επιθηλιακού τμήματος της τραχείας [4]. Σε μια άλλη μελέτη απομονώθηκαν τραχείες από χοίρους και υπολογίστηκε τόσο η R_{TM} ($168 \pm 6 \Omega \times cm^2$) όσο και το I_{sc} ($132 \pm 3 \mu A/cm^2$) του επιθηλίου του συγκεκριμένου ιστού. Η διαφορά με την προηγούμενη μελέτη είναι ότι αφού

αφαιρέθηκε η τραχεία απομονώθηκαν τμήματα μόνο του επιθηλίου της και τοποθετήθηκαν στο Ussing System [15].

Τέλος υπάρχει μια μελέτη η οποία χρησιμοποιεί παρασκεύασμα αποφλοιωμένου επιθηλιακού ιστού από τραχεία προβάτου για ηλεκτροφυσιολογική διερεύνηση σε συσκευή Ussing. Στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα της μελέτης αναφέρουν μόνο τιμές I_{sc} περίπου 70-100 $\mu A/cm^2$ σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Σημαντικό όμως είναι να τονισθεί ότι στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσματα τα οποία είχαν προεπωασθεί με ινδομεθακίνη προκειμένου να επαχθεί η έκκριση ανιόντων και επομένως οι μετρήσεις του I_{sc} που αναφέρονται είναι μεγαλύτερες από τις πραγματικές συνθήκες ηρεμίας του ιστού [16].

1.5 Ο ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΣ ΔΙΑΥΛΟΣ ΙΟΝΤΩΝ ΝΑΤΡΙΟΥ (ENaC)

Ο ENaC είναι μία ετεροτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, διαπερατή κυρίως σε ιόντα νατρίου από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου στον εσωτερικό του χώρο, η οποία είναι ιδιόσυστα ενεργή. Το γεγονός ότι πρόκειται για ένα κανάλι ιόντων εξειδικευμένο στην μεταφορά ιόντων νατρίου δεν αποκλείει την πιθανότητα μεταφοράς άλλων ιόντων παράλληλα με την είσοδο αυτών του νατρίου (Na^+), όπως είναι το λίθιο (Li^+), το κάλιο (K^+), το κέσιο (Cs^+) και το ρουβίδιο (Rb^+) με πολύ μικρότερη εξειδίκευση από ότι του βασικού του ιόντος [17].

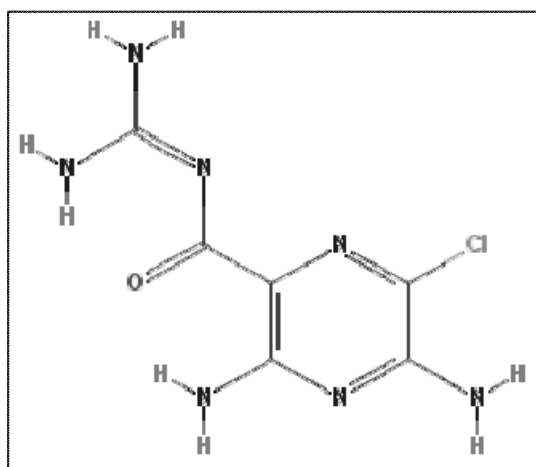


Εικόνα 5. Ο κυτταρικός εντοπισμός του ENaC. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων της τραχείας. Παρατίθενται επίσης οι αλληλεπιδράσεις του διαύλου με πλήθος μορίων όπως είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η κυκλική μονοφωσφορική γουανίνη (cGMP) και διαφόρων μεμβρανικών υποδοχέων. (Ανατύπωση από: Douglas C. Eaton, My N. Helms, Michael Koval, Hui Fang Bao, and Lucky Jain, The Contribution of Epithelial Sodium Channels to Alveolar Function in Health and Disease, Annu. Rev. Physiol. 2009. 71:403–23).

Ο επιθηλιακός διάυλος ιόντων νατρίου εντοπίζεται στην κορυφαία (*apical*) πλευρά της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων αρκετών βασικών οργάνων, όπως είναι αυτό του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του νεφρού (Εικόνα 5). Η ικανότητά μεταφοράς ενός τόσο

σημαντικού για τη λειτουργία του κυττάρου και άφθονου στον εξωκυττάριο χώρο ιόντος, όπως είναι το νάτριο, συγκαταλέγει το συγκεκριμένο επιθηλιακό διάλυο ιόντων μαζί με την αντλία Na^+/K^+ στα κυριότερα μόρια που είναι υπεύθυνα για τη διαεπιθηλιακή μεταφορά ιόντων νατρίου του κυττάρου. Κατέχει συνεπώς έναν από τους κυριότερους ρόλους στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων Na^+ στο αίμα, των υγρών του σώματος και των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων υγρών των επιθηλιακών κυττάρων [18]. Επίσης, μπορεί να εντοπιστεί και στους ιδρωτοποιούς αδένες ελέγχοντας την επαναπρόσληψη ιόντων νατρίου στον οργανισμό αλλά και στα κύτταρα των γευστικών υποδοχέων συμβάλλοντας, συγκεκριμένα, στην αντίληψη της αλμυρής γεύσης. Ακόμη, γίνεται λόγος για τον εντοπισμό του διαλύου σε ολόκληρη την έκταση του κροσσώτου επιθηλίου του αναπνευστικού συστήματος, και συγκεκριμένα στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων που φέρουν τους κροσσούς, καταδεικνύοντας τον ως μόριο ρυθμιστή της ωσμωμοριακότητας και της ωσμωτικότητας του υγρού που περιβάλλει το κροσσώτο αυτό επιθήλιο [19].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε όργανα, όπως είναι το παχύ έντερο και ο νεφρός, η ενεργότητα του ENaC ρυθμίζεται είτε από την **αλδοστερόνη**, η οποία διεγείρει την



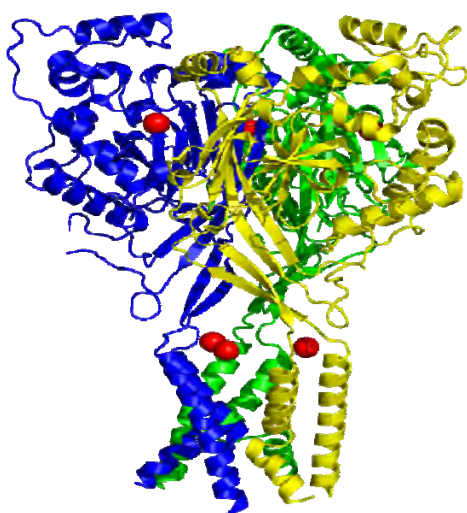
Εικόνα 6. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρατίθεται η δομή της αμιλορίδης, μια ουσία με ικανότητα εξειδικευμένης δέσμευσης στον ENaC και αναστολής της λειτουργίας του, αποτρέποντας συνεπώς την είσοδο ιόντων νατρίου στο κύτταρο (Αναδιατύπωση από: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=16231#itabs-2d>).

επαναρρόφηση του νατρίου στον οργανισμό, είτε από το **αρτηριακό νατριουρητικό πεπτίδιο**, ουσία η οποία δρα ως διουρητικό και οδηγεί στην ταυτόχρονη απομάκρυνση από τον οργανισμό του νατρίου. Ο ENaC αναστέλλεται ακόμη από την **αμιλορίδη**, η οποία είναι διουρητική ουσία, και φαίνεται να παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το συγκεκριμένο διάλυο (**Εικόνα 6**) [18, 20, 21]. Η αμιλορίδη ως κάλιοσυντηρητικό διουρητικό αποτρέπει την απομάκρυνση ιόντων καλίου από τα νεφρικά κύτταρα του άπω εσπειραμένου σωληναρίου διαμέσου της διούρησης. Η χρήση της ως φάρμακο εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 1967 και χρησιμοποιήθηκε για την καταπολέμηση της υπέρτασης και της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας. Η αμιλορίδη όπως και μόρια με ανάλογη δομή, όπως είναι το Benzamil (βενζυλ-αμιλορίδη) χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα σε ασθενείς που νοσούν από κυστική ίνωση εξαιτίας του μεγαλύτερου χρόνου δέσμευσης τους, σε σχέση

με την πρώτη, αλλά παρουσίασαν τα ίδια απογοητευτικά αποτελέσματα [22-25].

1.6 Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ENaC

Ο επιθηλιακός διάυλος ιόντων νατρίου αποτελείται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, την α , την β και την γ , οι οποίες παράγονται από τρία διαφορετικά γονίδια υψηλής συντήρησης, τα SCNN1A, SCNN1B και το SCNN1G, και οι οποίες εκτείνονται συμμετρικά από το κεντρικό άξονα του μορίου, όπου βρίσκεται ο πόρος του διαύλου [26-28]. Οι υπομονάδες α , β και γ της πρωτεΐνης, παρότι παράγονται από διαφορετικά γονίδια φαίνεται να μοιράζονται περίπου στο 32



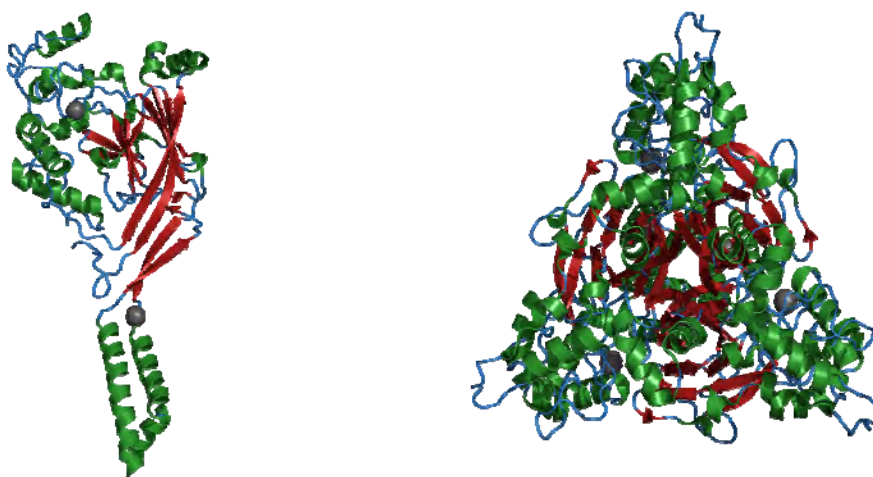
Εικόνα 7. Η απεικόνιση του επιθηλιακού διαύλου ιόντων νατρίου. Με διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται οι τρεις επιμέρους υπομονάδες, α , β και γ , της πρωτεΐνης, ενώ με κόκκινο χρώμα εντοπίζονται τα ιόντα νατρίου. Η εικόνα αυτή αποτελεί μία πρόβλεψη της πραγματικής απεικόνισης του μορίου της πρωτεΐνης τρισδιάστατα στο χώρο καθώς μονάχα η α υπομονάδα του μορίου ASIC (από κοτόπουλο εδώ) είναι αυτή που έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως και αποδόθηκε βάση μοντέλων βιοπληροφορικής. Βασισμένοι λοιπόν στο γεγονός ότι ο η πρωτεΐνη που μελετάμε, ο ENaC, ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον ASICs καταφύγαμε σε αυτή την υποθετική αναπαράσταση με την βοήθεια του προγράμματος «*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*».

με 37% κοινή αλληλουχία. Συγκεκριμένα, η α υπομονάδα εκτείνεται σε μήκος 17kb και αποτελείται από 13 ιντρόνια [29]. Στον άνθρωπο το γονίδιο της α υπομονάδα του ENaC εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12p13.31, ενώ οι υπομονάδες β και γ στο 16p12-p13 [30-32].

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μεγέθους 510-920 αμινοξέων όπου καθεμία από τις υπομονάδες του διαύλου αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές με τη μορφή α -έλικας και έναν εξωκυττάριο βρόγχο. Συνεπώς, το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων του διαύλου εντοπίζονται εσωτερικά του κυττάρου [33]. Στο καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων της πρωτεΐνης εντοπίζεται μοτίβο επαναλήψεων αμινοξέων προλίνης και τυροσίνης (PY motif), το οποίο αλληλεπιδρά με τη λιγάση της ουβικιτίνης, Nedd4, ως προς τη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων του ασβεστίου. Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο μοτίβο αυτό και οδηγούν σε κέρδος λειτουργίας προκαλούν το σύνδρομο Liddle's, μια αυτοσωμική επικρατή μορφή υπέρτασης, η οποία οδηγεί στην εκτεταμένη απορρόφηση

ιόντων νατρίου από τους νεφρούς [34]. Μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του ENaC, και εντοπίζονται σε οποιαδήποτε από τις τρεις υπομονάδες, προκαλούν τον ψευδοαλδοστερισμό τύπου-1, μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από απώλεια άλατος και υπόταση [35].

Στο σύνολο τους, οι τρεις αυτές υπομονάδες καθίστανται απαραίτητες για την ορθή συναρμολόγηση του πρωτεϊνικού μορίου, την μεταφορά, την ενσωμάτωσή του στη μεμβράνη του κυττάρου και τη σωστή λειτουργία του [36]. Το 1994 υποστηρίχθηκε η άποψη πως μόνον η έκφραση της α υπομονάδας του διαύλου είναι ικανή ώστε να διεξαχθεί η μεταφορά των ιόντων νατρίου διαμέσου της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, και πως οι β και γ υπομονάδες απλώς ενισχύουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης αυτής, χωρίς οι ίδιες να υποστηρίζουν από μόνες τους την διαεπιθηλιακή ιοντική μεταφορά, καθιστώντας έτσι την α υπομονάδα την κύρια λειτουργική υπομονάδα της πρωτεΐνης [37].



Εικόνα 8. Αριστερά παρατίθεται η απεικόνιση της α υπομονάδας του ASIC απομονωμένη από κοτόπουλο ενώ δεξιά η τρισδιάστατη απεικόνιση του ASIC με την βοήθεια του προγράμματος «*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*». Η πρωτεΐνη ASIC ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον ENaC, επειδή όμως η δομή του τελευταίου παραμένει μέχρι στιγμής άγνωστη, καθώς η συνολική πρωτεΐνη, όπως επίσης και οι επιμέρους υπομονάδες της δεν έχουν κρυσταλλωθεί, αποδίδουμε τη δομή του βασιζόμενη σε αυτήν του ASIC.

Παρόλα αυτά, η τελική διαμόρφωση του ENaC δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμη. Είναι όμως πολύ πιθανόν να είναι παραπλήσια με αυτή ενός ιοντικού διαύλου που ενεργοποιείται από εξωκυττάρια πρωτόνια (*ASIC1: acid-sensing ion channel 1*). Μια μία πιθανή αποικόνηση του ENaC φαίνεται στην **Εικόνα 7**, λόγω του ότι ο ASIC1 κατατάσσεται στην ίδια οικογένεια με τον ENaC [38]. Η αποικόνηση του ASIC1 φαίνεται στην **Εικόνα 8**. Εκτός από τις υπομονάδες α , β και γ που αναφερθήκαν προηγουμένως, μια ακόμη υπομονάδα, η δ , αναφέρεται στην βιβλιογραφία, της οποίας η αλληλουχία μοιάζει αρκετά με αυτή της α υπομονάδας, προσδίδοντάς της παράλληλα την δυνατότητα πολυμερισμού με την β και γ υπομονάδα ως προς τον σχηματισμό λειτουργικής πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη ισομορφή του ιοντικού διαύλου

εμφανίζεται σε διαφορετικά όργανα από ότι η ισομορφή που αποτελείται από τις α, β και γ υπομονάδες, όπως είναι οι ωοθήκες, το πάγκρεας και οι όρχεις.

1.7 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΕΝαC

Το κάπνισμα αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης ανιάτων ασθενειών και πρόωρου θανάτου, αντιπροσωπεύοντας περίπου 100.000 θανάτους στο Ηνωμένο Βασίλειο [39] και 480.000 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (1/5 του συνολικού της πληθυσμού) ετησίως [40]. Οι αρνητικές επιπτώσεις του καπνίσματος είναι καθολικές στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς πλήττονται όλα τα συστήματα ενώ, μειώνει δραματικά το προσδόκιμο και την ποιότητα ζωής. Ανάμεσα στις ασθένειες στον οποίων την παθογένεια συμμετέχει σε μεγάλο ή μικρό βαθμό είναι η χρόνια αποφρακτική νόσος (COPD), ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, εγκεφαλικά επεισόδια και διάφορες μορφές καρκίνου, όπως είναι του πνεύμονα, της τραχείας, των βρόγχων, του οισοφάγου και άλλοι [40]. Στον **Πίνακα 1** παρατίθενται τα ποσοστά των θανάτων που οφείλονται στο κάπνισμα μόνο κατά το έτος 2010-2011 στην περιοχή του Ηνωμένου Βασιλείου.

Οι θάνατοι που προκαλούνται από το κάπνισμα, πρωτογενούς και δευτερογενούς, υπολογίζονται στα 6 εκ. παγκοσμίως [41], ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί στα 7εκ. μέχρι το τέλος του 2020 και να ξεπεράσει τα 8εκ. το 2030 [42, 43]. Για κάθε έναν θάνατο που προκαλείται από το κάπνισμα, περίπου 20 άτομα υποφέρουν από κάποια σχετιζόμενη με το κάπνισμα ασθένεια [40, 44]. Μόνο στην Αγγλία κατά το έτος 2010-2011, υπολογίζονται πως πραγματοποιήθηκαν περίπου 460.000 εισαγωγές σε νοσοκομεία, ατόμων ηλικίας 35 χρόνων και πάνω, που οφείλονταν αποκλειστικά στο κάπνισμα, ποσοστό το οποίο αντιπροσωπεύει το 5% του συνόλου των εισαγωγών των ατόμων της ίδιας ηλικίας [45]. Εκτιμάται ακόμη πως το κόστος περίθαλψης και κάλυψης της φαρμακευτικής αγωγής των ασθενών αυτών κυμαίνεται από £2.7 έως £5.2 δις ετησίως [46,47].

Πίνακας 1. Παρουσιάζονται τα εκτιμώμενα ποσοστά θανάτων που αποδίδονται στο κάπνισμα, σε Αγγλικό πληθυσμό ηλικίας >35, κατά το έτος 2011(Ανατύπωση από: Statistics on smoking: England, 2012, The NHS Information Centre for Health and Social Care, 20120.

	Συνολικός αριθμός θανάτων	Θάνατοι οφειλόμενοι στο κάπνισμα	
		Σύνολο	Ποσοστό (%) των θανάτων
Είδη καρκίνου			
Πνεύμονας, Τραχεία, Βρόγχοι	28.143	22.900	81,4%
Οισοφάγος	6.191	4.100	66,2%
Ουροδόχος κύστη	4.211	1.700	40,4%
Πάγκρεας	6.948	1.700	24,5%
Περιοχές του ανώτερου αναπνευστικού	1.867	1.200	64,3%

Το κάπνισμα έχει επιπτώσεις που εντοπίζονται ακόμα και σε επίπεδο ιοντικών διαύλων στις κυτταρικές μεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, ο ENaC είναι ένα από τα μόρια τα οποία πλήττεται από τον καπνό του τσιγάρου. Ο ENaC εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και άγει ιόντων νατρίου στο εσωτερικό των κυττάρων. Εξαιτίας του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει στην επιθηλιακή φυσιολογία έχει μελετηθεί σε διάφορα σημεία του τραχειοβρογχικού δένδρου που αποτελούν σημεία που πλήττονται από τις επιδράσεις του καπνού του τσιγάρου. Το κάπνισμα τραυματίζει συνεχώς το επιθήλιο του αναπνευστικού συστήματος προκαλώντας φλεγμονή και οδηγώντας στην παραγωγή μορίων φλεγμονής, όπως είναι οι ιντερλευκίνες (IL-1β), οι κυτοκίνες (TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α) και οι αυξητικοί παράγοντες (TGF-β, Transforming Growth factor-b), αλλά και ελευθέρων ριζών. Σε πειράματα που έγιναν σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυψελιδικών κυττάρων ποντικών και τα οποία εκτέθηκαν σε εκχύλισμα καπνού τσιγάρου παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή του mRNA και της έκφρασης της κύριας υπομονάδας του διαύλου ENaC ενώ μετρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις των παραπάνω κυτταροκινών [49-52].

1.8 ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ ΣΕ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σε αρκετές μελέτες πραγματοποιούνται μετρήσεις των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του ιστού κατά την έκθεσή του σε εκχύλισμα καπνού (CSE: cigarette smoke extract). Με τον τρόπο αυτό, μελετούνται οι επιδράσεις του καπνίσματος και καταγράφονται οι μεταβολές που επιφέρει στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων, σε πρωτεϊνικό και μεταγραφικό επίπεδο, τα οποία εμπλέκονται στην διατήρηση της ομοιόστασης της στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων ιστού.

Κατά κύριο λόγο, μελετάται η συμβολή των δύο κυριότερων ιοντικών διαύλων (ENaC και CFTR) που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη του επιθηλίου των αεραγωγών και ρυθμίζουν την σύσταση του υγρού που επαλείφει τους αεραγωγούς. Επομένως έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλία επιθηλιακών κυττάρων όπως, κυψελιδικά κύτταρα βρογχιολίων, ή κύτταρα τραχείας τα οποία είτε είναι αποτέλεσμα πρωτογενούς καλλιέργειας από πειραματόζωα ή ανθρώπους είτε κυτταρικές σειρές καλοήθους ή κακοήθους. Στη συνέχεια, εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων καπνού, για διάφορες χρονικές περιόδους, προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του ENaC και του CFTR.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφυσιολογική μελέτη και μελέτη ανοσοαποτύπωσης της έκφρασης της α υπομονάδας του ENaC σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από αρσενικά ποντίκια Sprague Dawley. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε εκχύλισμα καπνού που παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ερευνητικά τσιγάρα τύπου 1R5F. Το εκχύλισμα ενός τσιγάρου (100%) συλλέχθηκε σε 10ml αλατούχου διαλύματος, χρησιμοποιώντας ειδική σύριγγα κενού και κατάλληλη συσκευή καπνίσματος. Τέλος, υπολογίστηκε η απορρόφησή του στα 320nm. Η έκθεση των κυττάρων στο CSE οδήγησε στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες φαίνεται να οδήγησαν σε αύξηση του ρεύματος νατρίου που είναι ευαίσθητο σε αμιλορίδη, που αποδίδεται στον ιοντικό διάυλο ENaC. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των διαύλων του ENaC στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί, πως παρατηρήθηκε αύξηση της πιθανότητας ανοιχτής κατάστασης των διαύλων ENaC, γεγονός που ενισχύει το αρχικό εύρημα. Η συγκεκριμένη επίδραση του CSE επιβεβαιώθηκε με την προεπάση των κυττάρων με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα TEMPO, πριν την έκθεση σε CSE, καθώς διαπιστώθηκε επαναφορά του Isc στα αρχικά επίπεδα. Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση (Western Blotting) οδήγησε στην ισχυροποίηση των παραπάνω ευρημάτων, καθώς η έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων σε CSE, συγκέντρωσης 1%, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της α υπομονάδας της πρωτεΐνης του ENaC [52].

Σε μια άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τόσο ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα HAE, τα οποία απομονώθηκαν από μια 44χρονη γυναίκα, όσο και ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα BEAS-2B, τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες σε διαλύματα συμπυκνώματος καπνού διαφόρων συγκεντρώσεων (CSC: Cigarette smoke condensate). Η μόνη διαφορά που εντοπίζεται μεταξύ του CSE και του CSC είναι στον τρόπο παρασκευής τους. Το CSC, σε αντίθεση με το CSE, παρασκευάστηκε από ερευνητικά τσιγάρα τύπου 1R3F με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής καπνίσματος. Στη συνέχεια, τα σωματίδια του καπνού συλλέχτηκαν σε ένα ειδικό φίλτρο και διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα DMSO. Τα επίπεδα των μεταγράφων, όπως και της έκφρασης της α -υπομονάδας του ENaC, τόσο στα HAE που

επωάστηκαν με CSC, όσο και στα BEAS-2B, ήταν μικρότερα σε σχέση με τα control. Από ότι φαίνεται μέχρι στιγμής, η χαμηλή συγκέντρωση των εκχυλισμάτων καπνού αυξάνει την ενεργότητα και την έκφραση του ENaC, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αντίθετα, η έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαίνεται να έχει το ακριβώς αντίστροφο αποτέλεσμα, οδηγώντας σε μείωση των παραπάνω [53].

Αναφορικά με μελέτες που εστιάζουν στη λειτουργία του και έκφραση του CFTR μετά από έκθεση επιθηλιακών κυττάρων αεραγωγών σε εκχύλισμα καπνού αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς των αεραγωγών Calu-3. Το εκχύλισμα καπνού παρασκευάστηκε εισάγοντας 30ml καπνού ανά λεπτό σε μία σύριγγα που περιείχε 10ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε για συνολικά 5 λεπτά και το CSE που παραλήφθηκε ορίστηκε ως εκχύλισμα συγκέντρωσης 100%. Έπειτα, τα κύτταρα εκτίθονταν στο CSE κάθε 2 ώρες, για 10 λεπτά, για συνολικά 4 ώρες. Μετά το πέρας 6 ωρών από την πρώτη έκθεση των κυττάρων στο CSE, απομονώθηκε το συνολικό τους RNA και υποβλήθηκαν σε Northern blot ανάλυση, ενώ μετά το πέρας των 24 ωρών από την πρώτη έκθεσή τους ακολούθησε πρωτεϊνική απομόνωση, με σκοπό τον προσδιορισμό της έκφρασης του CFTR. Η έκθεση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς σε εκχύλισμα καπνού οδήγησε σε μείωση του γονιδιακού και πρωτεϊνικού επιπέδου του CFTR. Παρατηρήθηκε ακόμη, αύξηση στην έκφραση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) και της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης του γλουταμικού και της κυστεΐνης (GCLC). Αξίζει να σημειωθεί, πως η συγκεκριμένη λιγάση αποτελεί το πρώτο ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της κυτταρικής GSH, ενισχύοντας όλο και περισσότερο προηγούμενα ευρήματα που υποστηρίζουν ότι το εκχύλισμα καπνού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών προκαλώντας έτσι, μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης διαφόρων κυτταρικών παραγόντων [54].

Τα ευρήματα της παραπάνω εργασίας ενισχυθήκαν αργότερα σε μια μελέτη, η οποία κατέδειξε τον εντοπισμό σχεδόν διπλάσιας συγκέντρωσης επιπέδων ιόντων Cl^- στον ιδρώτα υγιών καπνιστών, σε σχέση με τους υγιείς μη καπνιστές. Η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα HBE που απομονώθηκαν από υγιής δότες. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα HBE κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε πλάσμα υγιών καπνιστών και στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στη διάταξη Ussing System, εντός διαλύματος Ringer, για τον προσδιορισμό του συνολικού ρεύματος I_{scCl} . Οι καπνιστές από τους οποίους είχε ληφθεί και το πλάσμα εμφάνιζαν μη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR. Η απόκριση των κυττάρων που εκτέθηκαν σε πλάσμα καπνιστών σε φορσκολίνη (ενεργοποιητής του CFTR) ήταν μικρότερη σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε αυτό. Η ακρολεΐνη είναι ένας από αυτούς τους παράγοντες που εντοπίστηκαν, με φασματοσκοπία μάζας, στον καπνό του τσιγάρου, η οποία προκαλεί μείωση της λειτουργίας του CFTR, όχι μόνο στους

αγωγούς του αναπνευστικού συστήματος, αλλά καθολικά, σε ολόκληρο τον οργανισμό, εξαιτίας της μεταφοράς της μέσω των τελευταίων σε αυτό. Πιο συγκεκριμένα, η ακρολεΐνη προσδένεται στο πόρο του διαύλου CFTR αναστέλλοντας την λειτουργία του και προσδίδοντας φαινότυπο κυστικής ίνωσης στους καπνιστές. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω θεωρία, κύτταρα HBE εκτέθηκαν για 7 μέρες σε διαφορετικές συγκέντρωσης ακρολεΐνης και στη συνέχεια, υποβλήθηκαν τόσο σε ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες, όσο και σε αναλύσεις western blot. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μειωμένη ενεργότητα και έκφραση του διαύλου CFTR [55].

Σε προηγούμενη μελέτη από την ίδια ομάδα είχε βρεθεί ότι η προεπόαση των κυττάρων με το CSE οδηγεί σε δόσοεξαρτώμενη μείωση του ρεύματος που εξαρτάται από το c-AMP. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας, τα ίδια κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν για την western blot ανάλυση του CFTR. Στα κύτταρα τα οποία προεπώαστηκαν με CSE, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA του CFTR ήταν μειωμένα σε σχέση με αυτά των μη εκτεθειμένων κυττάρων [56].

1.9 Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το πρόβατο είναι ένα πειραματόζωο που παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες στο αναπνευστικό σύστημα με τον άνθρωπο. Είναι πειραματόζωο που σε συγκριτικές ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες υπεζωκότα έχει δείξει μορφολογικές και λειτουργικές ομοιότητες με τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, δεν έχει χρησιμοποιηθεί ποτέ σε μελέτες διερεύνησης επιδράσεων του καπνίσματος σε επίπεδο λειτουργίας ιοντικών διαύλων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός μοντέλου διερεύνησης των επιδράσεων του εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου σε ιοντικούς διαύλους, όπως ο ENaC, του επιθηλίου της τραχείας προβάτου. Στο σχεδιασμό αρχικά επιλέχθηκαν σαν στόχοι η ανάπτυξη μιας τεχνικής παρασκευής εκχυλίσματος καπνού και μιας τεχνικής απομόνωσης της τραχείας και παρασκευής του επιθηλιακού τμήματός της. Έπειτα, τέθηκε σαν στόχος ο χαρακτηρισμός των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του παρασκευάσματος και η μελέτη της ανταπόκρισης του σε αναστολή του ENaC, πριν και μετά την επώαση του με 5% εκχύλισμα καπνού. Τέλος, για να διαπιστωθεί αν προκύπτει μορφολογική μεταβολή ή μεταβολή σε επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης σχεδιάστηκε ο ιστολογικός χαρακτηρισμός του παρασκευάσματος και η εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ENaC με χρήση Western Blotting.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τραχείες που απομονώθηκαν από ενήλικα πρόβατα αμέσως μετά την σφαγή τους στο τοπικό σφαγείο (Σφαγεία Λάρισας Α.Ε., Γυρτώνη Λάρισας). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τραχείες από 76 πρόβατα κατά την περίοδο Δεκέμβριος 2013-Ιούλιος 2014. Η λήψη των δειγμάτων γινόταν πάντα από ζώα που προορίζονταν για κατανάλωση όπως προέκυπτε από τον αρμόδιο έλεγχο κατά την ώρα της σφαγής. Η λήψη της τραχείας πραγματοποιούνται άμεσα μετά την αφαίρεσή της από το πρόβατο (χρόνος αφαίρεσης έως και αποθήκευσης στο πειραματικό διάλυμα αποθήκευσης σχεδόν μηδενικός).

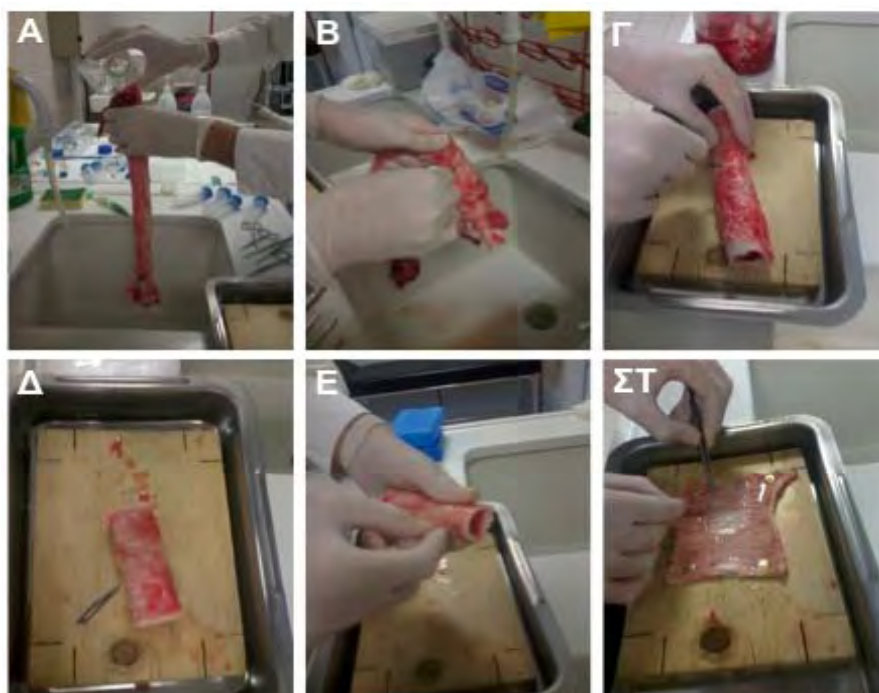
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

Η τραχεία μεταφέρθηκε στο εργαστήριο μέσα σε διάλυμα PBS (**διάλυμα μεταφοράς**), του οποίου η σύσταση αναγράφεται στον **Πίνακα 2**, σε φορητό ψυγείο που περιείχε πάγο. Με την άφιξη των ιστών στο εργαστήριο ακολουθούσε άμεσα η πλύση του ιστού με διάλυμα PBS και εξωτερικός καθαρισμός της τραχείας από παρακείμενους ιστούς. Η διαδικασία της πλύσης της τραχείας επαναλαμβανόταν τρεις φορές, με 200 mL PBS κάθε φορά να εισάγονται στον αυλό της τραχείας. Στη συνέχεια, με τη χρήση νυστεριού απομακρύνονται τα υπολλείματα του λάρυγγα, βρόγχων ή λιπώδους ιστού που ενδεχομένως απέμειναν στην τραχεία. Μετά τον εξωτερικό καθαρισμό της τραχείας η τραχεία τεμαχίζεται σε 2-3 κομμάτια (ανάλογα με το μέγεθός της) για καλύτερο χειρισμό. Έπειτα σε κάθε ένα τμήμα τραχείας γίνεται τομή στο πρόσθιο τμήμα της, κάθετα προς τα ημικρίκια. Η τραχεία πλέον σαν επίπεδος ιστός σταθεροποιείται (με τέσσερις πινέζες στα τέσσερα άκρα του) σε μια ξύλινη επιφάνεια κοπής και εν συνεχεία ξεκινάει η διαδικασία απομόνωσης (αποφλοιώσης) των τμημάτων της επιθηλιακής μεμβράνης που θα χρησιμοποιηθεί στην πειραματική διαδικασία. Η αποφλοιώση του επιθηλίου γινόταν πάντα από τη οπίσθια πλευρά της τραχείας που ήταν ελεύθερη από ημικρίκια. Μεταξύ των διαδικασιών της αποφλοιώσης των επιθηλιακών τμημάτων της τραχείας τα ιστοτεμάχια τοποθετούνταν άμεσα σε φρέσκο διάλυμα PBS σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της απομόνωσης του συνόλου των ιστοτεμαχίων. Τα αποφλοιωμένα ιστοτεμάχια είχαν διαστάσεις περίπου 5x5εκ. Η διαδικασία της απομόνωσης φαίνεται στην **Εικόνα 9**.

Πίνακας 2. Τα συστατικά και τρόπος παρασκευής διαλύματος PBS, τελικού όγκου 1L και συγκέντρωσης.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,8 mM
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,133 g	1 mM
MgCl ₂ •6H ₂ O	0,10 g	0.5 mM

*Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων διαλυτοποιούνται σε 800ml ddH₂O. Ύστερα μετριέται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται με την προσθήκη HCl στο 7,4 και συμπληρώνεται ποσότητα ddH₂O έως τον τελικό όγκο του 1L. Η ωσμωτικότητα του υπολογίζεται σε όλες τις πειραματικές διεργασίες και είναι ίση περίπου με 300mOsm. (Ανατύπωση από: Cold Spring Harbor Protocols. Ημερομηνία πρόσβασης 15/9/2014, από <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>).

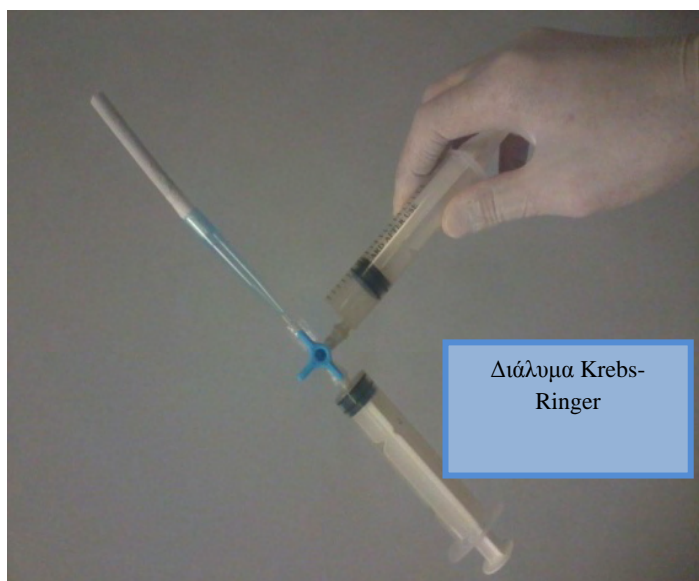


Εικόνα 9. Διαδικασία απομόνωσης τμημάτων επιθηλίου τραχείας. Από το Α έως ΣΤ απεικονίζονται τα στάδια παρασκευής των πειραματικών τεμαχίων. Η πλύση του ιστού (Α), ο καθαρισμός της εξωτερικής επιφάνειας της τραχείας (Β), ο διαχωρισμός της σε δύο ίσα τμήματα (Γ-Δ), η εγκάρσια τομή στο πρόσθιο τμήμα (Ε) και η αποφλοίωση του επιθηλίου της τραχείας (ΣΤ).

2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ

Στη μελέτη που περιγράφεται μερικά από τα αποφλοιωμένα επιθηλιακά ιστοτεμάχια τραχείας έπρεπε να επωαστούν με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου (CSE: Cigarette Smoke Extract). Η διαδικασία εκχύλισης του καπνού τσιγάρου πραγματοποιήθηκε με μια συσκευή που συναρμολογήθηκε με δύο σύριγγες των 25 mL, ένα διακλαδωτή τύπου «ταφ» και ένα πλαστικό

ρύγχος πιπέτας του 1 mL. Στην **Εικόνα 10** φαίνεται η συσκευή με ένα τσιγάρο στερεωμένο στο πλαστικό ρύγχος.



Εικόνα 10. Συσκευή παρασκευής εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου. Το σύστημα αποτελείται από 2 σύριγγες των 25 mL, ένα διακλαδωτή τύπου «ταφ», και ένα πλαστικό ρύγχος για πιπέτα του 1 mL. Στην διευρυμένη είσοδο του ρύγχους εισάγεται το τσιγάρο. Η εκχύλιση του τσιγάρου γίνεται σε 5 mL διαλύματος Krebs-Ringer.

Για την παρασκευή του εκχυλίσματος του καπνού χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα τσιγάρα (Νικοτίνη: 0.8mg, Πίσσα: 10 mg). Η συσκευή της εκχύλισης αποτελούταν από ένα διακλαδωτή μορφής «ταφ», δύο σύριγγες των 25ml και ένα πλαστικό ρύγχος (tip) πιπέτας των 1000μl. Αρχικά, η μια σύριγγα προσαρμόζεται στο ένα άκρο του διακλαδωτή τυλίγοντας πρώτα την άκρη του στομίου της με parafilm. Μετά την τοποθέτησή της στο παραπάνω εξάρτημα, τυλίγεται ακόμη μία φορά με parafilm, ώστε με τον τρόπο αυτό να περιοριστούν στο μέγιστο οι απώλειες του καπνού κατά την διάρκεια της εκχύλισής του από το τσιγάρο. Έπειτα, προσαρμόζεται και η δεύτερη σύριγγα στον διακλαδωτή, στο κάθετο άκρο σε σχέση με την πρώτη σύριγγα. Η δεύτερη σύριγγα περιέχει 5ml διαλύματος Krebs-Ringer του οποίου η σύσταση αναφέρεται στον **Πίνακα 3**. Στο τρίτο άκρο του διακλαδωτή (το εκ διαμέτρου αντίθετο από την πρώτη σύριγγα) τοποθετείται το ρύγχος το οποίο στεγανοποιείται με parafilm όπως στη περίπτωση της πρώτης σύριγγας. Στη διευρυμένη άκρη του τοποθετείται το τσιγάρο το οποίο ο χειριστής ανάβει και αρχίζει να «καπνίζει» τραβώντας το έμβολο της πρώτης σύριγγας προς τα πίσω ώστε ο καπνός να εισέλθει στην σύριγγα και να γεμίσει όλο τον όγκο της. Έπειτα η στρόφιγγα του διακλαδωτή γυρίζει με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει σε επικοινωνία τη σύριγγα που περιέχει τον καπνό και εκείνη που περιέχει το διάλυμα Krebs-Ringer. Σε αυτό το στάδιο υπάρχει επικοινωνία μόνο των δύο συρίγγων. Πιέζοντας το έμβολο της σύριγγας που περιέχει τον καπνό, αυτός περνάει στη δεύτερη σύριγγα μέσα από το διάλυμα Krebs-Ringer. Έπειτα ο καπνός απορρίπτεται από την δεύτερη σύριγγα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με σταθερό ρυθμό μέχρι να «καπνιστεί» όλο το τσιγάρο (διάρκεια περίπου 6 λεπτά). Αυτό το διάλυμα θεωρείται 100% εκχύλισμα καπνού τσιγάρου (σε διάλυμα Krebs-Ringer) και μεταφέρεται σε

αποθηκευτικό σωλήνα τύπου falcon (των 15 mL). Μέρος από το διάλυμα θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αραίωση σε διάλυμα Krebs-Ringer προκειμένου να παρασκευαστούν διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγιναν πειράματα που διερευνούσαν επιδράσεις εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου 5% (0.5 mL διαλύματος 100% σε 9.5 mL διαλύματος Krebs-Ringer) (CSE 5%), αναμιγνύοντας 0,5ml διαλύματος σε 9,5ml διαλύματος Krebs-Ringer. Το διάλυμα που προκύπτει ορίζεται ως ατομικό διάλυμα προεπάσης των μεμβρανών του τραχειακού επιθηλίου του προβάτου.

Πίνακας 3. Σύσταση του διαλύματος Krebs-Ringer, τελικού όγκου 1L.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (gr)	Τελική συγκέντρωση
NaCl	6,866 g	117,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,158 g	1,15 mM
NaHCO ₃	2,099 g	24,99 mM
KCl	0,421 g	5,65 mM
MgSO ₄	0,239 g	1,18 mM
CaCl ₂	0,370 g	2,52 mM
Glucose	1,000 g	5,55 mM

*Το pH του διαλύματος μετριέται και προσαρμόζεται με την προσθήκη HCl στο 7,4 ενώ η οσμωτικότητα του υπολογίζεται σε όλες τις πειραματικές διεργασίες και ισούται περίπου με 300mOsm.

Απο τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι ο χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου πραγματοποιείται με φωτομέτρηση στα 260 nm. Η επιλογή του συγκεκριμένου μήκος κύματος γίνεται για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση της νικοτίνης στο εκχύλισμα δεδομένου ότι ο δακτύλιος πυριμιδίνης που διαθέτει το μόριο της νικοτίνης απορροφά στα 260nm. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα της εκχύλισης. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία ο χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος του καπνού (CSE 100%) πραγματοποιήθηκε με τρεις παραμέτρους: τη μέτρηση του pH (με πεχαμέτρου), τη μέτρηση της οσμωτικότητας (με οσμώμετρο στους 37°C), και τη φωτομέτρηση στα 260nm. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κάθε φορά που παράγεται νέο εκχύλισμα καπνού τσιγάρου.

Πίνακας 4. Τυπικές τιμών του pH, της ωσμωτικότητας σε θερμοκρασία 37 °C και της απορρόφησης στα 260nm των διαλυμάτων Krebs-Ringer και του εκχυλίσματος καπνού (CSE).

Αντιδραστήριο	pH	Ωσμωτικότητα	Θερμοκρασία (°C)	Απορρόφηση (260nm)
Krebs-Ringer	7.344	297	36.8	0.128
CSE (100%) σε διάλυμα Krebs-Ringer	8.245	299	36.7	2.097

3. ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Οι συνθήκες που ελέγχθηκαν με τις τεχνικές που αναλύονται παρακάτω ήταν οι εξής τέσσερις:

A) Τμήματα αποφλοιωμένου επιθηλίου τραχείας που μόλις απομονώθηκαν, επώαστηκαν για 30 λεπτά σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs-Ringer. Κάποια από αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφυσιολογική μελέτη, κάποια για ιστολογική εξέταση καθώς και κάποια ανάλυση της περιεκτικότητας σε ENaC με Western Blotting.

B) Τμήματα αποφλοιωμένου επιθηλίου τραχείας που μόλις απομονώθηκαν, επώαστηκαν για 30 λεπτά σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs-Ringer με 5% CSE. Κάποια από αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφυσιολογική μελέτη, κάποια για ιστολογική εξέταση καθώς και για ανάλυση της περιεκτικότητας σε ENaC με Western Blotting.

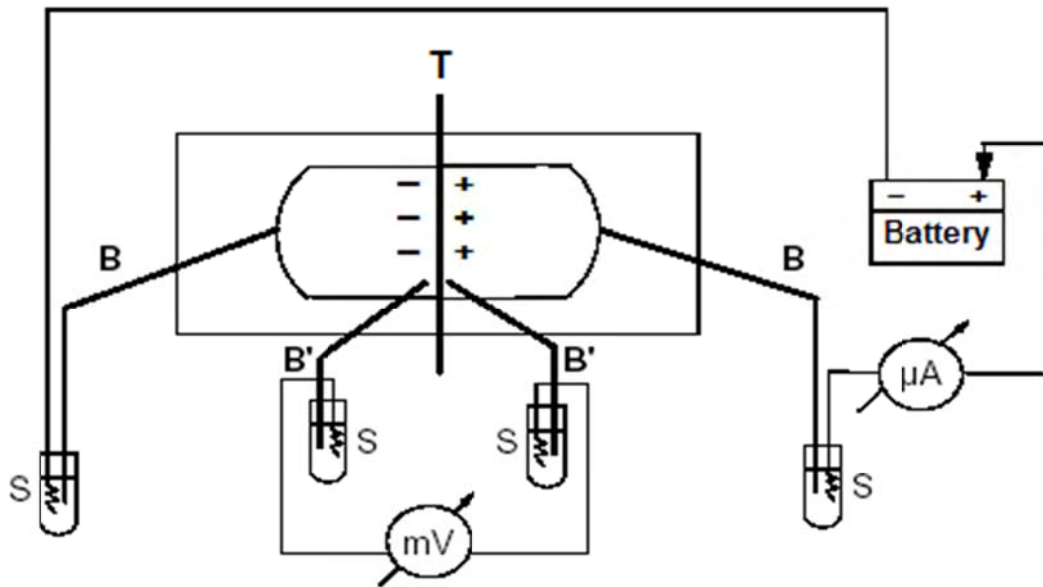
Γ) Τμήματα αποφλοιωμένου επιθηλίου τραχείας που μόλις απομονώθηκαν, επώαστηκαν για 30 λεπτά σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs-Ringer, έπειτα τοποθετήθηκαν για άλλες 2 περίπου ώρες στο Ussing System και στα οποία χορηγήθηκε αμιλορίδη (διάρκεια καταγραφής 30 λεπτά). Κάποια από τα ιστοτεμάχια πριν την προσθήκη αμιλορίδης ελήφθησαν για ιστολογική εξέταση καθώς και ανάλυση της περιεκτικότητας σε ENaC με Western Blotting.

Δ) Τμήματα αποφλοιωμένου επιθηλίου τραχείας που μόλις απομονώθηκαν, επώαστηκαν για 30 λεπτά σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs-Ringer με 5% CSE, έπειτα τοποθετήθηκαν για άλλες 2 περίπου ώρες στο Ussing System και στα οποία χορηγήθηκε αμιλορίδη (διάρκεια καταγραφής 30 λεπτά). Κάποια από τα ιστοτεμάχια πριν την προσθήκη αμιλορίδης ελήφθησαν για ιστολογική εξέταση καθώς και ανάλυση της περιεκτικότητας σε ENaC με Western Blotting.

E) Σε κάποιες περιπτώσεις έγινε μόνο ιστολογική εξέταση του ιστού με την άφιξή του στο εργαστήριο (ακέραια ημικρίκια τραχείας) και σε αποφλοιωμένα ιστοτεμάχια αμέσως μετά την απομόνωσή τους.

3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΑΞΗ USSING SYSTEM

Η διάταξη Ussing System αποτελεί μια κλασσική μέθοδο μελέτης διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών.³²⁻³⁴ Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου διαφαίνεται στην **Εικόνα 11** [57]. Ο ιστός (**T**) τοποθετείται σαν επίπεδο στρώμα σε μια αντλία και εκατέρωθεν αυτού υπάρχει ίση ποσότητα διαλύματος Krebs-Ringer. Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού μετράται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (**B'**, **B'**) που το καθένα απέχει 3mm από την επιφάνεια του ιστού. Το δυναμικό καταγράφεται σε ένα βολτόμετρο (mV). Με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) και ενός διαιρέτη τάσης, ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B**, **B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm έκαστο από την επιφάνεια του ιστού. Το Ussing System στην βασική του μορφή αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη. Τον θάλαμο και το ηλεκτρικό κύκλωμα που προσαρμόζεται επάνω του. Η ποικιλία των εφαρμογών της διάταξης οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στη μεγάλη ποικιλία των μετατροπών που έχουν υποστεί τα δύο αυτά μέρη προκειμένου να προσαρμόζεται κατά περίπτωση στις ανάγκες των πειραμάτων. Στη διάταξη Ussing System είναι δυνατή πέραν της μέτρησης της διαφοράς δυναμικού, της έντασης του ρεύματος και της αντίστασης του ιστού-δείγματος, και η μέτρηση παραμέτρων όπως η χωρητικότητα και η εμπέδιση του συστήματος. Σήμερα οι διάφοροι θάλαμοι του Ussing System, κατηγοριοποιούνται στους κυκλοφορούντες θαλάμους (Circulating Chambers) και στους συνεχώς διηθούμενους θαλάμους (Continuously Perfused Chambers). Αυτοί οι βασικοί τύποι θαλάμων έχουν αρκετές διαφορές στη δομή και τη λειτουργία τους. Ο κυκλοφορούντες θάλαμοι, είναι αυτοί που έχουν επικρατήσει σαν πρότυπο στα περισσότερα εργαστήρια λόγω της απλότητας στην κατασκευή, λειτουργία, χρήση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι συνεχώς διηθούμενοι θάλαμοι ωστόσο προσφέρουν αρκετές εναλλακτικές λειτουργίες και μετρήσεις μη διαθέσιμες στα μοντέλα των κυκλοφορούντων θαλάμων.



Εικόνα 11. Διάγραμμα της συσκευής Ussing System. **B:** Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (**S**) για την χορήγηση ρεύματος. **B':** Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (**S**) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. **mV:** μιλιβολτόμετρο. **μA:** μικροαμπερόμετρο. **Battery:** Μπαταρία. **T:** Ιστός.

Οι επιθηλιακές μεμβράνες εμφανίζουν δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά: την πολικότητα και την ιστική συνοχή. Με τον όρο πολικότητα αναφερόμαστε στη διαφορά δυναμικού που δημιουργείται λόγω της ασύμμετρης κατανομής των πρωτεϊνών μεταξύ της κορυφαίας (apical) και βασικοπλευρικής (basolateral) επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης του επιθηλίου. Με τον όρο ιστική συνοχή αναφερόμαστε στην ακεραιότητα και στην αντίσταση του ιστού, τόσο σε ηλεκτρικές, όσο και μηχανικές καταπονήσεις. Αυτή η ιδιότητα προκύπτει από το σχηματισμό πρωτεϊνικών συνδέσεων (Στενές Συνδέσεις). Οι σύνδεσμοι αυτοί διαχωρίζουν τις δύο επιθηλιακές επιφάνειες (κορυφαία και βασικοπλευρική) και η πυκνότητα τους καθορίζει την συνοχή του ιστού ως μετρήσιμο μέγεθος. Η συνοχή ενός ιστού μπορεί να προσδιορισθεί με τη βοήθεια του μετρήσιμου μεγέθους της ηλεκτρικής αντίστασής του [58]. Συγκεκριμένα η αντίσταση ενός υλικού δίνεται από την εξίσωση: $R = \rho \cdot (l/A)$.

Με **R** συμβολίζεται η ωμική αντίσταση του υλικού, με **ρ** η ειδική αντίσταση του υλικού που οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, με **l** το πάχος του υλικού κατά τη φορά του ρεύματος και με **A** το εμβαδόν της περιοχής που μετράται. Επομένως σε ίδιο υλικό με σταθερό πάχος και εμβαδόν **l** και **A**, η αντίσταση εξαρτάται αποκλειστικά από τη μοριακή του δομή. Προκειμένου να μετρηθεί η συνολική αντίσταση της μεμβράνης με τη χρήση του συστήματος

του Ussing, είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος σε αυτή. Καθώς δημιουργείται το ηλεκτρικό πεδίο, οι ηλεκτρολύτες και τα διάφορα ιοντικά στοιχεία των μεμβρανικών κυττάρων συμμετέχουν στην παραγωγή του ρεύματος που διατρέχει τη μεμβράνη καθώς και στην εμφάνιση της αντίστασης στη ροή του ρεύματος κατά τη φορά που καθορίζει το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Σύνδεση Δυναμικού (Voltage Clamp). Το μειονέκτημα της σύνδεσης δυναμικού, είναι η μετακίνηση ηλεκτρολυτών διαλυμένων στο κυτταρόπλασμα κατά τη φορά της εφαρμοζόμενης διαφοράς τάσης. Το φαινόμενο αυτό της ιοντικής μετανάστευσης μπορεί να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα καθώς δεν ανταποκρίνεται στην φυσιολογική κατάσταση που επικρατεί στο κύτταρο, υπό κανονικές συνθήκες. Επίσης, η ένταση του ρεύματος που διαπερνά τη μεμβράνη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής συνοχής ή απλά την βλάβη στις πρωτεΐνες που είναι πιο ευαίσθητες στις μεταβολές της κυτταρικής ιοντικής ισορροπίας, με αποτέλεσμα οι μετρήσεις που προκύπτουν να μην αντιστοιχούν σε αυτές ενός ζωντανού επιθηλιακού κυττάρου *in vivo* [59]. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, χρησιμοποιείται η μέτρηση με Σύνδεση Ρεύματος (Current Clamp). Στην περίπτωση αυτή τον ιστό διαπερνούν παλμοί συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος μικρής διάρκειας και καθορισμένης έντασης και έτσι αποφεύγεται το φαινόμενο της ιοντικής ενδοκυττάριας μετανάστευσης. Επίσης, σημαντική είναι και η διαφορά στον τρόπο μέτρησης. Με τη σύνδεση τάσης, η μέτρηση γίνεται με τη βοήθεια ενός βολτομέτρου μεγάλης εμπέδισης που μετρά τις αλλαγές στην εφαρμοζόμενη τάση. Αντίθετα στη σύνδεση ρεύματος η γεννήτρια ηλεκτρικών παλμών είναι συνδεδεμένη με αμπερόμετρο που μεταφράζει την μεταβαλλόμενη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος σε διαφορά δυναμικού. Τέλος η μέτρηση τύπου Ανοικτού Κυκλώματος (Open Circuit mode) οδηγεί στη μικρότερη δυνατή καταπόνηση του ιστού και πρακτικά προκειται για πολύ ήπιο Current Clamp ανά λεπτό και άρα οδηγεί στον προσδιορισμό της διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) του ιστού ανά λεπτό με την εφαρμογή του νόμου του Ohm.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Ανοικτού Κυκλώματος και της Σύνδεσης Δυναμικού με την τροποποίηση ότι η τάση που εφαρμόστηκε στη μεμβράνη ήταν ίση με μηδέν. Στην περίπτωση αυτή που ονομάζεται Ρεύμα Βραχυκυκλώματος (Short Circuit Current; I_{sc}), η μετρώμενη ένταση ρεύματος είναι η συνισταμένη της έντασης όλων των ιοντικών ρευμάτων που οφείλονται σε λειτουργία των αντίστοιχων ιοντικών διαύλων που είναι ενεργοί στο παρασκεύασμα. Μη τη χρήση αναστολέων συγκεκριμένων ιοντικών διαύλων μπορεί με ακρίβεια να μετρηθεί η συμμετοχή τους στο συνολικό ρεύμα.

Το αποφλοιωμένο τραχειακό επιθήλιο τοποθετήθηκε ως επίπεδο στρώμα μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) οι οποίοι περιείχαν υγρό διάλυμα Krebs-Ringer). Κατά την τοποθέτηση του ιστού

ελήφθη μέριμνα για την ελάχιστη καταπόνηση του ιστού κατά τη διαδικασία. Κάθε ημιθάλαμος περιείχε 4 ml υγρού διαλύματος Krebs (εξασφαλίζοντας την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης), ενώ συνεχώς διοχετευόταν στο κάθε ημιθάλαμο αέριο σύστασης 95% O₂ - 5% CO₂. Η επιφάνεια του εκτεθειμένου στο υγρό ιστού, ήταν 1 cm². Λόγω του ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, οι μετρήσεις της διαμεμβρανικής αντίστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C.

Η PD και η R_{TM} δια μέσου των επιθηλιακών μεμβρανών εκφραζόμενης σε mV και Ω•cm² αντίστοιχα μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl το καθένα εκ των οποίων ήταν τοποθετημένο σε απόσταση 3 mm εκατέρωθεν της μεμβράνης, σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος. Σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος διοχετεύεται ένας παλμός ρεύματος έντασης 50 μΑ και διάρκειας 200 ms κατά μήκος των ηλεκτροδίων με αποτέλεσμα η διάταξη να υπολογίζει αυτόματα τη διαφορά δυναμικού κατά μήκος του ιστού χρησιμοποιώντας τον νόμο του Ohm. Η αντίσταση του διαλύματος Krebs-Ringer's-Bicarbonate είχε μετρηθεί κατά την περίοδο της βαθμονόμησης του οργάνου και είχε αυτόματα αφαιρεθεί από το λογισμικό συλλογής και καταγραφής δεδομένων. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, γινόταν νέα μέτρηση της R_{TM} κάθε ένα λεπτό. Πραγματοποιούνταν παράλληλα 6 πειράματα κάθε φορά σε αντίστοιχους θαλάμους και η καταγραφή γινόταν μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά την τοποθέτηση του ιστού ακολουθούσε στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, μια περίοδος ηρεμίας plateau του ιστού διάρκειας 10-30 λεπτών για την εξισορρόπηση της PD και μετά η καταγραφή άλλαζε σε Σύνδεση Δυναμικού ίσου με 0 mV, και άρα η μέτρηση ήταν ίση με το I_{sc}. Ο ιστός αφέθηκε σε κάθε πείραμα σε περίοδο εξισορρόπησης για επιπλέον 2 ώρες υπό I_{sc} και ο λειτουργικός έλεγχος της λειτουργίας του ENaC πραγματοποιήθηκε με χορήγηση αμιλορίδης στην κορυφαία επιφάνεια (αυλός της τραχείας) του ιστού και μέτρηση της πτώσης του συνολικού ρεύματος. Η πτώση αυτή αντιστοιχούσε στο ρεύμα που αποδίδεται στη λειτουργία του ENaC. Η συγκέντρωση αμιλορίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10 μM, συγκέντρωση που από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι ειδικά μπλοκάρει τη λειτουργία του ENaC.

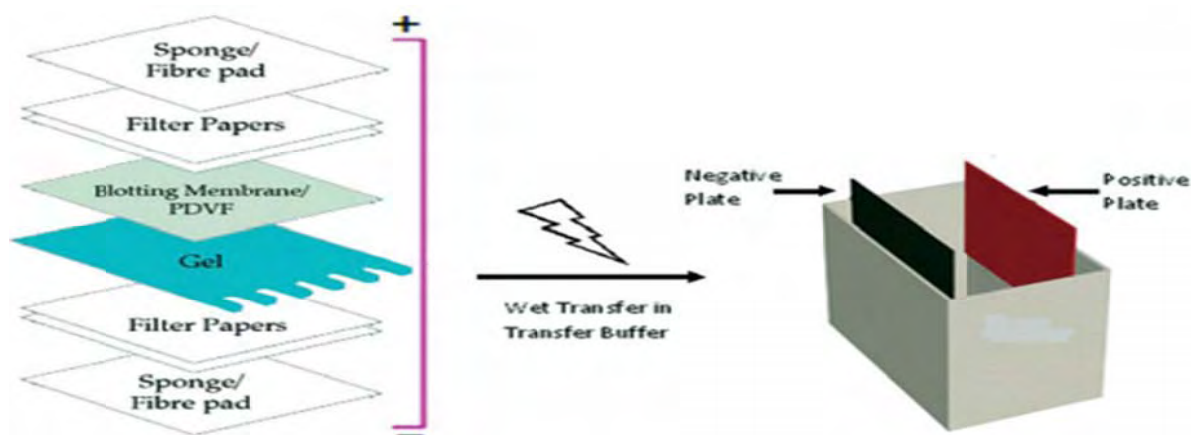
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GraphPad 5.0 για Microsoft Windows. Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων κανονικοποιήθηκαν και σαν μέσοι όροι του απόλυτης τιμής μεταβολής του ρεύματος I_{sc} και σαν μέσοι όροι της απόλυτης τιμής μεταβολής της R_{TM} από τις τιμές πρό της προσθήκης αμιλορίδης ± τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) (Standard Error of the Mean), του δηλωμένου αριθμού διαφορετικών πειραμάτων σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μέσων όρων 2 πειραματικών ομάδων έγινε με paired *t*-test. Τιμές που ανταποκρίθηκαν σε *p*<0,05 έγιναν

αποδεκτές ως στατιστικά σημαντικές. Το στατιστικό πακέτο GraphPrism 5.0 χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των διαγραμμάτων.

3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ WESTERN BLOT

3.3.1 Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΟΥ WESTERN BLOTTING

Η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών ή αλλιώς Western Blotting, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών συγκεκριμένου μοριακού βάρους. Περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση των βιολογικών δειγμάτων σε gel ακρυλαμιδίου (είτε αποδιατακτικού είτε μη-αποδιατακτικού) για τον διαχωρισμό του συνόλου των πρωτεϊνών είτε λόγω διαφορετικού μεγέθους είτε λόγω διαφορετικής τριτοταγούς διαμόρφωσης σε συγκεκριμένες συνθήκες ηλεκτροφόρησης (χρονική διάρκεια και Volts). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel τοποθετείται με κατάλληλο τρόπο κάτω από μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εντός ειδικής διάταξης η οποία απεικονίζεται στην **Εικόνα 12** [60] και τοποθετούνται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο gel να μεταφερθούν στην μεμβράνη [60]. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σήμανση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση δύο αντισωμάτων. Το πρωτογενές που ανιχνεύει την πρωτεΐνη και το δευτερογενές που φέρει συνδεδεμένο στο άκρο του ειδικό ένζυμο, αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρωτογενές αντίσωμα δίνοντας το σήμα της ανίχνευσης. Η χρήση του δεύτερου αντισώματος προκαλεί μεγαλύτερη εξειδίκευση στη διαδικασία της ανίχνευσης. Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων πραγματοποιείται η εμφάνιση της σημασμένης πρωτεΐνης, η οποία μπορεί να γίνει βασισμένη σε μεθόδους ραδιενέργειας, χημειοφωταύγειας, φθορισμού ή χρωματομετρίας.



Εικόνα 12. Η ειδική διάταξη για την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel ηλεκτροφόρησης στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διάταξη αυτή παρομοιάζεται συχνά ως «σάντουιτς» καθώς στο κέντρο της τοποθετείται το gel της ηλεκτροφόρησης, από πάνω του η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, εξωτερικά και των δύο από ένα απορροφητικό χαρτί τύπου Wittmann, τα οποία περιβάλλονται συνολικά από δύο σφουγγάρια, όλα κομμένα στις διαστάσεις του gel, ενώ η διαδικασία της μεταφοράς πραγματοποιείται εντός TBS-T Transfer Buffer (**Πίνακας 8**) διασφαλίζοντας την απαιτούμενη υγρασία που πρέπει να έχει η μεμβράνη και το gel για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά. Κατά την παρούσα διεργασία είναι πιθανή η δημιουργία φυσαλίδων οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να εξασφαλιστεί η ομαλότητα και η σωστή διεξαγωγή της διαδικασίας της μεταφοράς. Η διάταξη αυτή τοποθετείται εντός μιας ειδικής θήκης και εισάγεται σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης με τέτοια φορά ώστε το gel να βρίσκεται προς τον αρνητικό πόλο της ηλεκτροφόρησης και η μεμβράνη προς το θετικό.

3.3.2 Η ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση Western blot πραγματοποιείται σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται στην ενότητα **2.1**, με κάποια περαιτέρω βήματα. Τα τεμάχια του αποφλοιωμένου επιθηλίου της τραχείας του προβάτου τοποθετούνται στην επιφάνεια ενός τριβλίου βακτηριακής καλλιέργειας 100mm που βρίσκεται σε πάγο, με την κορυφαία πλευρά της μεμβράνης τους προς τα επάνω. Ποσότητα 900μl διαλύματος RIPA, (σύσταση και τρόπος παρασκευής παρατίθεται στον **Πίνακα 5**), τοποθετείται στην κορυφαία επιφάνεια του παρασκευάσματος και επωάζεται για 5-10 λεπτά. Ύστερα γίνεται επαναλαμβανόμενα απόξυση της επιφάνειας των μεμβρανών, με τη βοήθεια ενός cell scraper, ώστε να αφαιρεθούν τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται σε eppendorf χωρητικότητας 1,5ml. Το κυτταρόλυμα με τη βοήθεια μιας σύριγγας ινσουλίνης αναδεύεται πολλές φορές ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 15.000 rpm στους 4 °C. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα αποθηκεύεται (περιέχει τις πρωτεΐνες του κυττάρου), ενώ στη βάση του eppendorf με μορφή ιζήματος συγκεντρώνονται κατεστραμμένες

κυτταρικές δομές και υπολείμματα της επεξεργασίας που απορρίπτονται. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε νέο erppendorf των 1,5ml. Τα τελικά επεξεργασμένα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο έως ότου εξαφανιστεί ο αφρός (που λόγω της ανάδευσης έχει προκληθεί) και εν συνεχεία ακολουθεί ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται με την μέθοδο Micro BCA.

Πίνακας 5. Στο συγκεκριμένο πίνακα παρατίθεται η συνταγή παρασκευής του διαλύματος RIPA συγκέντρωσης 1X και τελικού όγκου 100ml.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα αντιδραστηρίου (Vτελικό=25ml)
TritonX100	2,5 ml
20% SDS	1,25 ml
1M TrisHCL pH 7.4	12,5 ml
5M NaCl	7,5 ml
Sodium Deoxycholate	1,25 g
0.5M EDTA	0,5 ml
ddH ₂ O	0,75 ml

*Μόλις ολοκληρωθεί η Παρασκευή του διαλύματος προστίθεται 1 ταμπλέτα αναστολέα πρωτεασών (*Complete tables, Mini Easy pack, Roche*) και 50μl DTT (διθειοθρεϊτόλη) συγκέντρωσης 1M κάθε 10ml διαλύματος και αποθηκεύεται για 4 με 5 μέρες στους 4 °C.

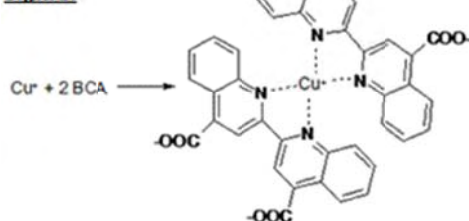
3.3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων γίνεται με τη δοκιμασία Micro BCA. Η Micro BCA (*Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific™, Number 23235*) είναι μια χρωματομετρική τεχνική για την ανίχνευσή και ποσοτικοποίηση του συνόλου των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ένα δείγμα. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του δισινchoninικού οξέος (bicinchoninic acid: BCA) ως μέσο για την ανίχνευση του Cu⁺¹ όταν ανάγεται με τη μεσολάβηση των πεπτιδικών δεσμών μιας πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον με τρόπο που εξαρτάται από την αύξηση της θερμοκρασίας [61]. Μετά το πέρας της αντίδρασης παράγεται προϊόν ιώδους χρώματος το οποίο σχηματίζεται από την ένωση δύο μορίων του BCA και ενός κατιόντος χαλκού (Cu⁺¹). Το υδατοδιαλυτό αυτό σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 562 nm, η οποία είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Η μακρομοριακή

Βήμα 1:



Βήμα 2:



Εικόνα 13. Η αρχή της μεθόδου Micro BCA. **Βήμα 1:** Σε ένα δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης προστίθενται Cu²⁺ τα οποία σε αλκαλικό περιβάλλον και σε θερμοκρασία 37 °C ανάγονται σε Cu⁺¹. **Βήμα 2:** Στο ίδιο δείγμα προστίθενται μόρια BCA τα οποία ενώνονται με τον Cu⁺¹ σε αναλογία 2:1 και το σύμπλοκο BCA-Cu⁺¹ που δημιουργείται παράγει ένα προϊόν μωβ χρώματος (*Ανατύπωση από: CHEM 240 Laboratory, Lab 2: Colorimetric Determination of Protein Concentration. Ημερομηνία πρόσβασης 15/9/2014 από <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM240/experiments.cfm?expt=02>*).

δομή της πρωτεΐνης, ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών και η παρουσία των τεσσάρων αμινοξέων (κυστεΐνης, κυστίνης, τρυπτοφάνης και τυροσίνης) έχουν αναφερθεί επίσης ότι ευθύνονται για τον σχηματισμό του χρώματος με το BCA [62]. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα συνολικά στην τεχνική της Micro BCA παρατίθενται στην **Εικόνα 13**.

3.3.4 Η ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αφού υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που βρίσκεται σε κάθε δείγμα, εισάγεται η κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε δείγμα σε ένα καινούργιο σωληνάκι eppendorf μαζί με RIPA buffer και χρωστική (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Παρατίθεται ο τρόπος παρασκευής διαλύματος χρωστικής (**Laemmlī – loading buffer**) των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμιδίου western blot.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα για τελικό όγκο διαλύματος 0.1L
Tris-HCl	0,985g
SDS	1g
Glycerol (100%)	8ml
β-Mercaptoethanol(14,7M)	1,5ml
Bromophenol blue	5mg

Ύστερα αναμιγνύονται καλά στο vortex και τοποθετούνται στους 95 °C για 10 λεπτά. Η θέρμανση σε συνδυασμό με την β-μερκαπτοαιθανόλη διασπών του δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινοξέων στις πρωτεΐνες και τις αποδιατάσσουν επιτρέποντάς αυτές να ηλεκτροφορηθούν στο gel βάση μεγέθους και όχι βάση διαμόρφωσης. Το gel ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση ήταν διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης (4-12%) (Sigma-Aldrich). Για την ηλεκτροφόρηση του απαιτείται 1X MOPS running buffer (**Πίνακας 7**).

Πίνακας 7. Παρατίθενται οι ποσότητες αντιδραστηρίων για την κατασκευή MOPS running buffer συγκέντρωσης 1X και τελικού όγκου 1L.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα για παρασκευή διαλύματος 1L
MOPS	20,92g
Tris Base	12,12 g
SDS	1g
EDTA	0,3 g

Το RIPA buffer και το MOPS περιέχουν SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), το οποίο προσδένεται στις πρωτεΐνες, προσδίδοντάς τους το αρνητικό του φορτίο. Έτσι, κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες αναμένεται να κινηθούν προς το θετικό πόλο της συσκευής ο οποίος και βρίσκεται στη βάση της.

Σε κάθε gel ηλεκτροφόρησης, εκτός από τα δείγματα φορτώνεται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (**marker**), ώστε μετά το πέρας του western blot και εφόσον είναι γνωστό το μοριακό βάρος της προς μελέτη πρωτεΐνης, να είναι δυνατή η επαλήθευση του αποτελέσματος.

Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε διαδρομή του gel ηλεκτροφόρησης φορτώνονται 15μl από κάθε δείγμα. Σε μία από αυτές, φορτώνονται αποκλειστικά 8μl από το marker. Η ηλεκτροφόρηση ρυθμίζεται στα 80Volts για 20 λεπτά και ύστερα στα 120Volts, για περίπου μία με μιάμιση ώρα, έως ότου απομακρυνθεί από το gel η χρωστική.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel εισάγεται στην διάταξη της **Εικόνας 12**, η οποία λούεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T για 2 περίπου ώρες στα 120mA ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το gel ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη απομακρύνεται από τη διάταξη, και με ένα μολύβι αφήνεται ένα ειδικό σημάδι ώστε να εντοπίζεται η φορά με την οποία εισήχθησαν τα δείγματα στις διαδρομές του gel. Για να αποφευχθεί η δέσμευση των αντισωμάτων σε οποιαδήποτε σημεία πάνω στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτελείται το «μπλοκάρισμα» (membrane blocking) των ελεύθερων θέσεων μέσω της διαδικασίας κατά την οποία εμβαπτίζεται η μεμβράνη σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος συγκέντρωσης 5%, το οποίο παρασκευάζεται με την διαλυτοποίηση 5g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος σε 100ml TBS-T buffer (**Πίνακας 8**), μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Έτσι, η μεμβράνη τοποθετείται προσεκτικά σε ειδικό πλαστικό δοχείο και καλύπτεται με 10ml του παραπάνω διαλύματος και αφήνεται να ανακινείται για 1 ώρα στους 4 °C.

Πίνακας 8. Παρασκευή διαλύματος stock 10X TBS-T το οποίο χρησιμεύει ως transfer buffer. Για την ηλεκτροφόρηση της μεταφοράς των πρωτεϊνών απαιτείται αραιώση καθώς χρειάζεται διάλυμα συγκέντρωσης 1X.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα για παρασκευή 1L διαλύματος
Glycine powder	288 g
Tris base	60,4 g
ddH ₂ O	1,8 L
Methanol	200 ml

3.3.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ αENaC ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Η διαδικασία ανίχνευσης της υπομονάδας α του ENaC στα δείγματα που μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Την επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, και στη συνέχεια την ανίχνευση του πρωτογενούς αντισώματος από το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο στην άκρη της βαριάς του

αλυσίδα με μια υπεροξειδάση, το **HRP** (Horseradish Peroxidase). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία του blocking της μεμβράνης απομακρύνεται το διάλυμα γάλακτος από το δοχείο όπου βρίσκεται η μεμβράνη και εισάγεται σε αυτό νέο διάλυμα όγκου 10ml το οποίο περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα εντός διαλύματος αποβουτυρωμένου γάλακτος συγκέντρωσης 5%, σε αναλογία 1:500 (αντίσωμα : διάλυμα γάλακτος). Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη είναι το **a-ENaC goat polyclonal IgG** (Santa Cruz Biotechnology). Η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 12-15 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS-T (**Πίνακας 9**) για δέκα λεπτά η καθεμία υπό συνεχή ανάδευση.

Πίνακας 9. Παρασκευή διαλύματος TBS-T για το ξέπλυμα και το «probing» της μεμβράνης

Αντιδραστήριο	Ποσότητα για παρασκευή 1L διαλύματος
Tris	2,42 g
NaCl	8,76 g
Tween 20	1 ml
ddH₂O	800 ml

*Προσαρμογή του pH στο 7.5 με την προσθήκη HCl και προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 1L

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (**donkey anti-goat IgG-HRP**), το οποίο παρασκευάστηκε με την προσθήκη 10μl του τελευταίου σε 10ml διαλύματος αποβουτυρωμένου γάλακτος συγκέντρωσης 5%, σε αναλογία δηλαδή συγκέντρωσης 1:1000 (αντίσωμα:διάλυμα γάλακτος) και αφήνεται 2 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να προσδεθεί στο πρωτογενές αντίσωμα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το παραπάνω διάλυμα και ακολουθούν πέντε διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS-T (5 λεπτά έκαστη).

Με τον ίδιο τρόπο ανιχνεύθηκε και η β-ακτίνη στα ίδια δείγματα αφού η μεμβράνη επώασθη αρχικά με διάλυμα που διασπά τους δεσμούς μεταξύ του αντιγόνου ενδιαφέροντος στη μεμβράνη και του πρωτογενούς αντισώματος. Η διαδικασία λέγεται membrane stripping και διεξάγεται με εμβαπτίση της μεμβράνης ανάποδα για 20 λεπτά, υπό ανάδευση. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται (stripping buffer) παρατίθεται στον **Πίνακα 10**. Έπειτα η μεμβράνη υπόκειται στη ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε για την ανίχνευση του aENaC. Για την ανίχνευση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα λαγού β-ακτίνης (αναλογία 1:500) και σαν δευτερογενές χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP (και τα δύο από την Santa Cruz Biotechnology).

Πίνακας 10. Αναγράφονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την παρασκευή του stripping buffer.

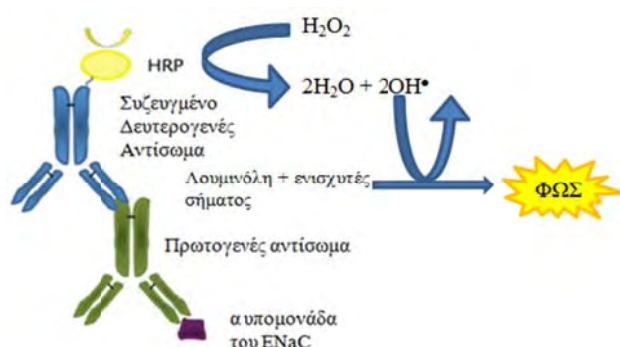
Αντιδραστήριο	Ποσότητα αντιδραστηρίου (Vτελικό=95 ml)
Γλυκίνη	1,5 g
SDS	0,1 g
Tween20	1 ml
Water	Μέχρι τα 95 ml

*Το pH του διαλύματος προσαρμόζεται στο 2,2 με την προσθήκη HCl.

3.3.6 Η ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ FILM ΑΚΤΙΝΩΝ-X ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ Α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ENaC ΚΑΙ ΤΗΣ Β-ΑΚΤΙΝΗΣ

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία σήμανσης των πεπτιδίων-στόχων με πρωτογενές και δευτερογενές αντισώματος, παρασκευάζεται το διάλυμα εμφάνισης του σήματος (αναλογία 1:1 των Peroxidase solution-detection reagent 1 & Luminol enhancer solution-detection reagent 2, Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo ScientificTM). Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει στην άκρη της βαριάς του αλυσίδας προσδεσμένη μια υπεροξειδάση. Όταν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προστεθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μετατρέπεται σε μόρια νερού (H_2O) και ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet) οι οποίες προσβάλλουν ειδικά υποστρώματα, όπως είναι η λουμινόλη (υπόστρωμα χημειοφωταύγειας) η οποία οξειδώνεται και απελευθερώνει φως (**Εικόνα 14**) [63,64]. Στην αντίδραση αυτή προστίθενται και ενισχυτές (enhancer) του σήματος που παράγεται. Το φως που εκπέμπεται από την αντίδραση αυτή «μαυρίζει» το film, και έτσι είναι δυνατός ο εντοπισμός του ένζυμο πάνω στη μεμβράνη, και κατά συνέπεια του συμπλόκου των αντισωμάτων όπου είναι προσδεσμένο οδηγώντας στον εντοπισμό της α υπομονάδας του ENaC.

Στην επιφάνεια της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης προσθέσαμε 500μl από το διάλυμα



Εικόνα 14. Η διαδικασία ανίχνευσης της α υπομονάδας του ENaC με τη προσθήκη κατάλληλων υποστρωμάτων για το ένζυμο που βρίσκεται προσδεσμένο στο δευτερογενές αντίσωμα και τη συμβολή film ακτίνων-X (Ανατύπωση από: Veitch, 2004, Akkara *et al.*, 1991).

εμφάνισης που αναφέρθηκε προηγουμένως και τοποθετείται πάνω σε αυτή το film ακτίνων-X για περίπου 2 λεπτά. Έπειτα, το film εμβαπτίζεται σε νέο διάλυμα (developer) για 1 λεπτό και στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό για να εμβαπτιστεί εκ νέου σε άλλο διάλυμα (fixer) για επίσης 1 λεπτό και να ξεπλυθεί πάλι με νερό. Τα δύο διαλύματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως συμβάλλουν στη μονιμοποίηση του σήματος πάνω στο film. Η διαδικασία της εμφάνισης του film πραγματοποιείται σε σκοτεινό δωμάτιο. Στη

συνέχεια το φιλμ σαρώνεται ηλεκτρονικά και γίνεται με το πρόγραμμα ImageJ πυκνομετρική ανάλυση των φωτογραφιών για την εύρεση των αναλογιών του πεπτιδίου στόχου σε σχέση με το πεπτίδιο αναφοράς και ακολουθεί ανάλυση των αποτελεσμάτων.

3.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΦΛΟΙΩΜΕΝΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΤΕΜΑΧΙΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ

Οι ιστοί από τους οποίους απομονώθηκαν οι μεμβράνες μεταφέρθηκαν την ημέρα σφαγής του ζώου στο εργαστήριο σε δοχείο που περιείχε διάλυμα PBS και βρισκόταν σε πάγο. Με την άφιξη των τεμαχίων τραχείας στο εργαστήριο ξεκίνησε η διαδικασία απομόνωσης των παρασκευασμάτων. Από το οπίσθιο τμήμα τεμαχίων τραχείας τριών ενήλικων προβάτων απομονώθηκε παρασκεύασμα επιθηλίου προβάτου με αποφλοίωση. Τα ιστοτεμάχια παρασκευάστηκαν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εμφανές το άνω και κάτω τμήμα του το οποίο και έφερε τμήμα χορίου ή/και μυϊκού ιστού. Η απομόνωση έγινε με τρόπο όμοιο με εκείνο της απομόνωσης για πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας. Οι πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν ιστολογικά αναφέρονται στο κεφάλαιο 3.1 (Πειραματικός Σχεδιασμός).

Με το πέρας των επώσεων τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% σε σωλήνες Falcon 15 mL. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο έως την ημέρα παράδοσής τους στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού Τμήματος του Π.Θ. Εκεί διενεργήθηκε η συνήθης επεξεργασία για την εμπέδωση τους σε κύβους παραφίνης. Τομές 3 μm διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροτόμο Leica TP1020. Μετά από την απο- παραφινολοποίηση σε xylene, διενεργήθηκε επανυδάτωση των τομών σε διαλύματα αιθανόλης με διαρκώς μειούμενη συγκέντρωση και ακολούθησε χρώση με αιματοξυλίνη-ιωσίνη (Hematoxylin & Eosin). Οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των κεχρωσμένων τομών και τη λήψη των φωτογραφιών (μεγέθυνση x4).

3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

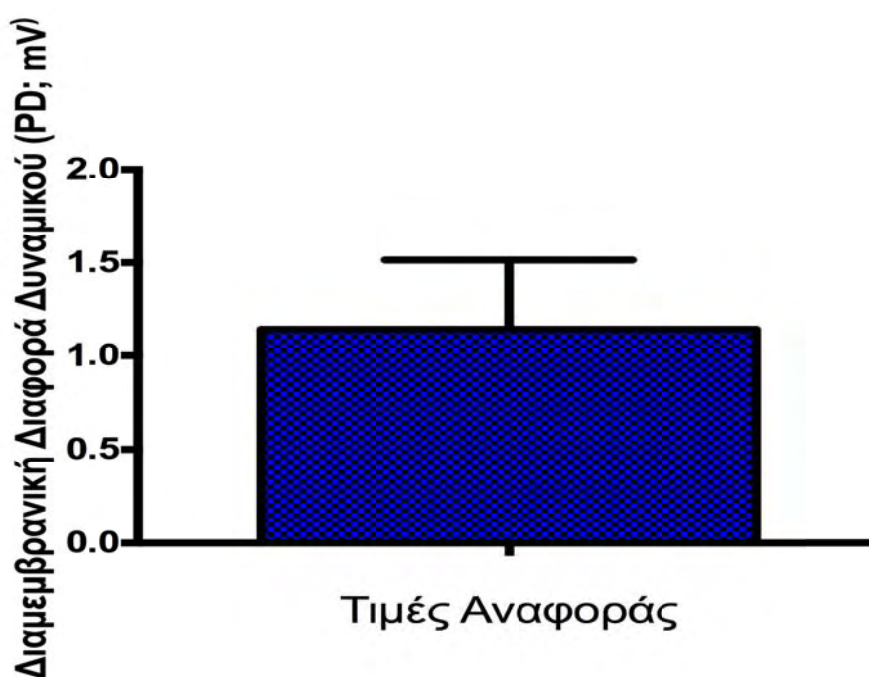
Η στατιστική ανάλυση παραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο Graph Pad Prism v5.0. Οι έλεγχοι κανονικότητας των δεδομένων έγιναν με το Kolmogorov-Smirnov normality test. Εκτίμηση στατιστικής σημαντικότητας μονοπαραγοντικών αναλύσεων έγιναν με το One-Sample t-test και το Wilcoxon Signed Rank test για παραμετρικά και μη παραμετρικά δεδομένα αντίστοιχα. Συγκρίσεις μεταξύ δύο παραμέτρων με το Student's t-test και το Mann-Whitney test για παραμετρικά και μη παραμετρικά δεδομένα αντίστοιχα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

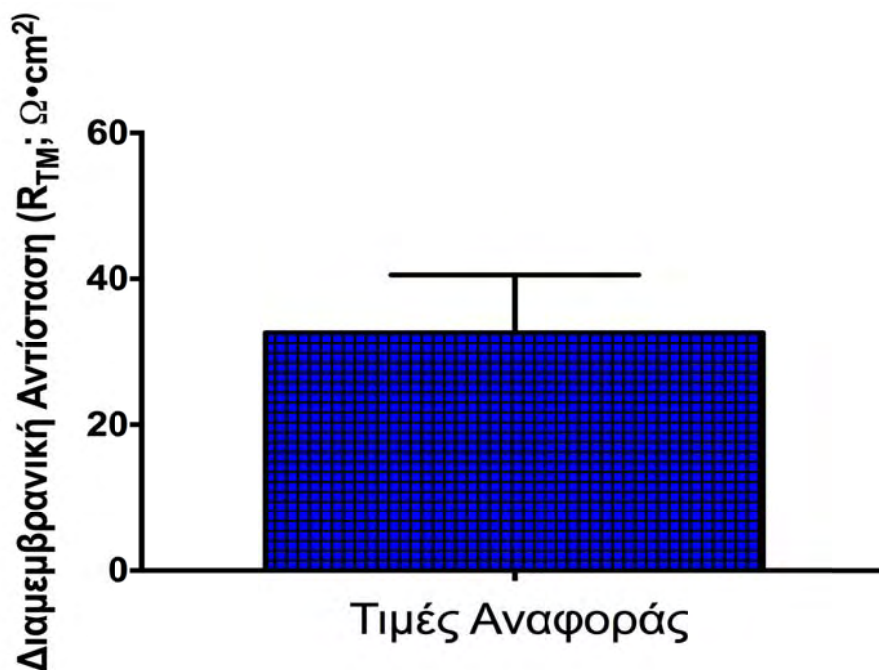
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πειράματα Αναφοράς

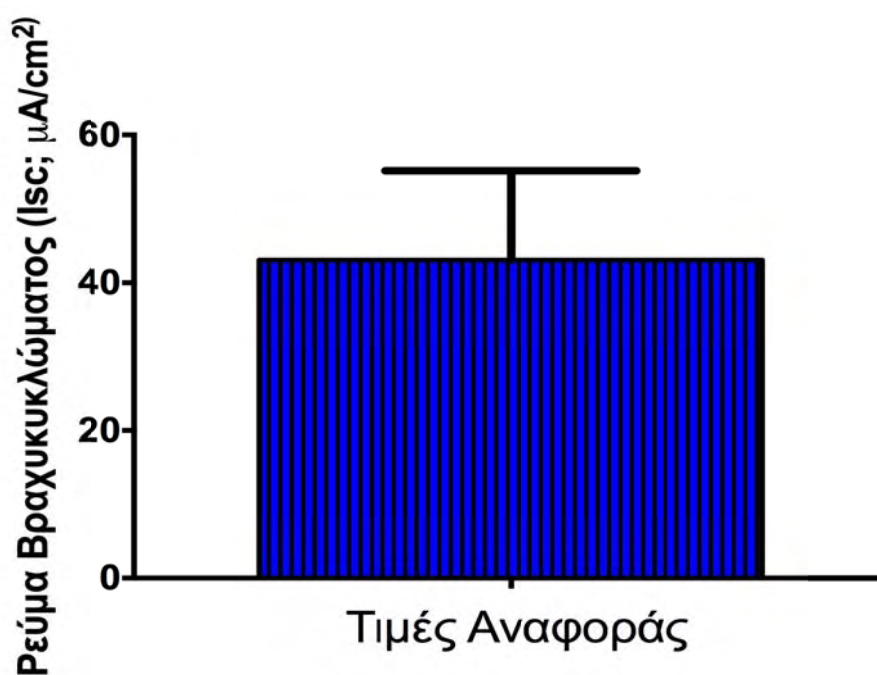
Διενεργήθηκαν πειράματα αναφοράς για την εύρεση της μέσης διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού (PD), διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) και ρεύματος βραχυκυκλώματος (I_{sc}) σε 9 ιστούς μάρτυρες. Η μέση τιμή ($\pm T.S.$) διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού του παρασκευάσματος επιθηλίου τραχείας ανέρχεται στα 1.14 ± 0.37 mV με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 0.28-2.00 mV (**Διάγραμμα 1**). Η μέση τιμή ($\pm T.S.$) διαμεμβρανικής αντίστασης του παρασκευάσματος επιθηλίου τραχείας ανέρχεται στα $32.63 \pm 7.92 \Omega \cdot \text{cm}^2$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 14.38-50.88 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (**Διάγραμμα 2**). Η μέση τιμή ($\pm T.S.$) ρεύματος βραχυκυκλώματος του παρασκευάσματος επιθηλίου τραχείας ανέρχεται στα $43.05 \pm 12.14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 15.05-71.06 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ (**Διάγραμμα 3**).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα των μετρηθέντων διαμεμβρανικών διαφορών δυναμικού των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων. Μέσος όρος 1.14 ± 0.37 mV με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 0.28-2.00 mV (n=9).



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα των μετρηθέντων διαμεμβρανικών αντιστάσεων των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων. Μέσος όρος $32.63 \pm 7.92 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 14.38-50.88 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=9).

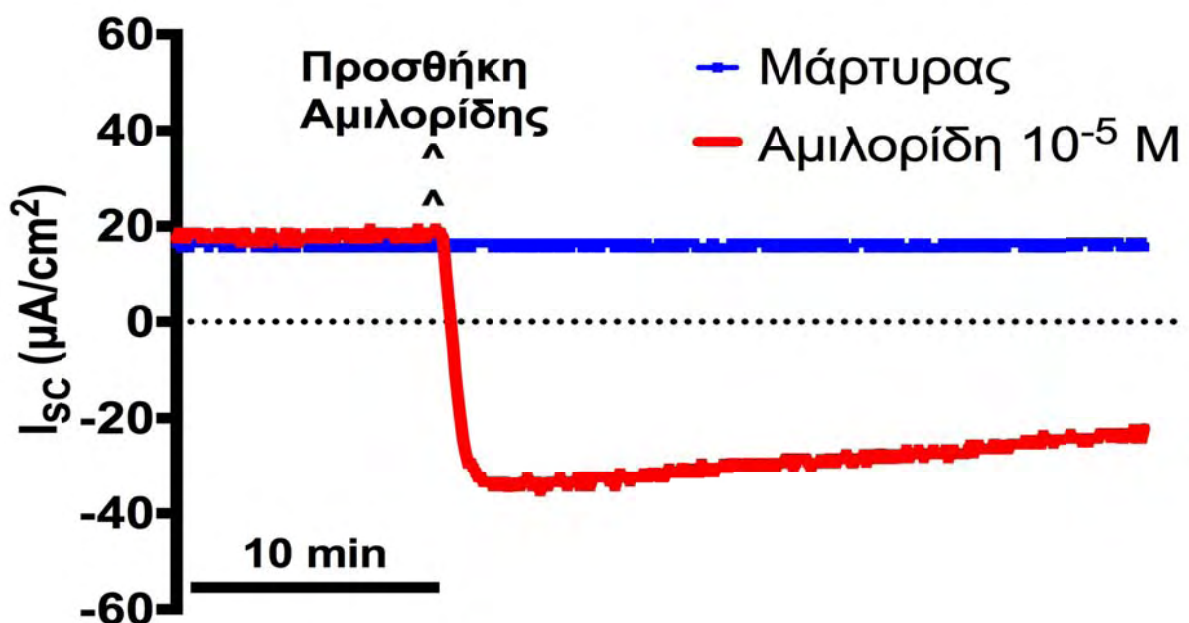


Διάγραμμα 3. Διάγραμμα των μετρηθέντων ρευμάτων βραχυκυκλώματος των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων. Μέσος όρος $43.05 \pm 12.14 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 15.05-71.06 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ (n=9).

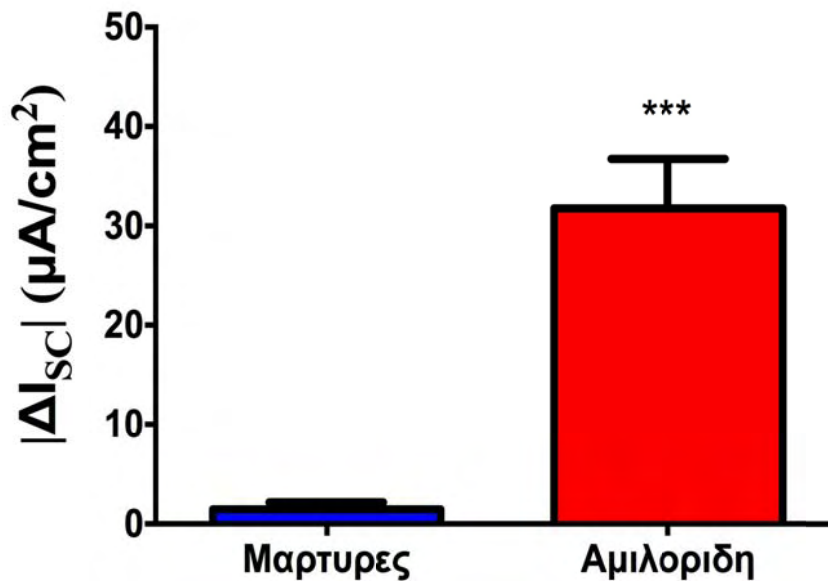
Και στις τρεις περιπτώσεις διενεργήθηκε one-sample t-test για την διαμεμβρανική αντίσταση ($p=0.003$) και το ρεύμα βραχυκυκλώματος ($p=0.008$) (δεδομένης της κανονικής κατανομής των τιμών των δύο παραμέτρων όπως προέκυψε απο Kolmogorov-Smirnov normality test) και Wilcoxon Signed Ranked Test ($p=0.004$) (δεδομένης της μή-κανονικής κατανομής των τιμών της διαφοράς δυναμικού όπως προέκυψε απο Kolmogorov-Smirnov normality test). Επομένως τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά του παρασκευάσματος αποφλοιωμένου επιθηλίου τραχείας προβάτου έδειξαν ότι είναι μετρήσιμα και στατιστικά σημαντικά διαφορετικά από το μηδέν.

Πειράματα Αμιλορίδης

Εν συνεχεία εκτιμήθηκε η ηλεκτροφυσιολογική ανταπόκριση του αποφλοιωμένο επιθήλιο της τραχείας προβάτου στον αναστολέα του ENaC, την αμιλορίδη. Στο **Διάγραμμα 4** φαίνεται η σύγκριση ενός τυπικού πειράματος σε μάρτυρα (πείραμα αναφοράς) και ενός τυπικού πειράματος αναστολής του ENaC. Κάτι τέτοιο είναι σημαντικό για να διαπιστωθεί εάν το φάρμακο είναι αποτελεσματικό στον συγκεκριμένο ιστό. Στο **Διάγραμμα 5** γίνεται σύγκριση των απόλυτων μέσων τιμών των πειραμάτων αναφοράς και των των πειραμάτων με αναστολή του ENaC.



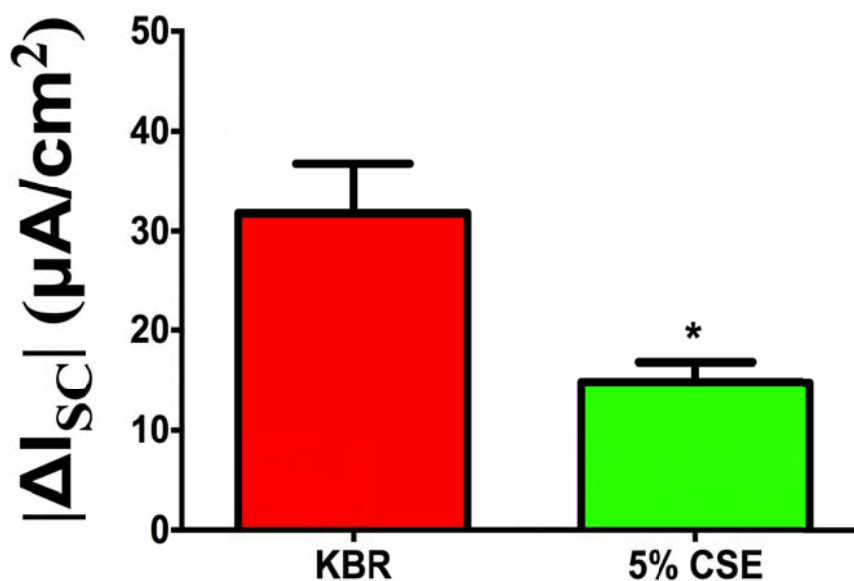
Διάγραμμα 4. Διάγραμμα των μετρηθέντων ρευμάτων βραχυκυκλώματος των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων. Με μπλέ είναι το πείραμα αναφοράς και με κόκκινο το πείραμα αναστολής του ENaC. Η αναστολή με προσθήκη αμιλορίδης 10^{-5} M γίνεται περίπου 2 ώρες αφού ο ιστός έχει σταθεροποιηθεί απο άποψη ρεύματος βραχυκυκλώματος στο Ussing System.



Διάγραμμα 5. Διάγραμμα της μεταβολής των απόλυτων τιμών ρευμάτων βραχυκυκλώματος των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων χωρίς χορήγηση [μπλέ (n=9); $1.44 \pm 0.71 \mu A \cdot cm^{-2}$] και με [κόκκινο (n=12); $31.75 \pm 4.96 \mu A \cdot cm^{-2}$] χορήγηση αμιλορίδης $10^{-5} M$. Η σύγκριση έγινε με Mann-Whitney test ($p < 0.001$).

Πειράματα Αμιλορίδης σε ιστοτεμάχια χωρίς/με επώαση με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου

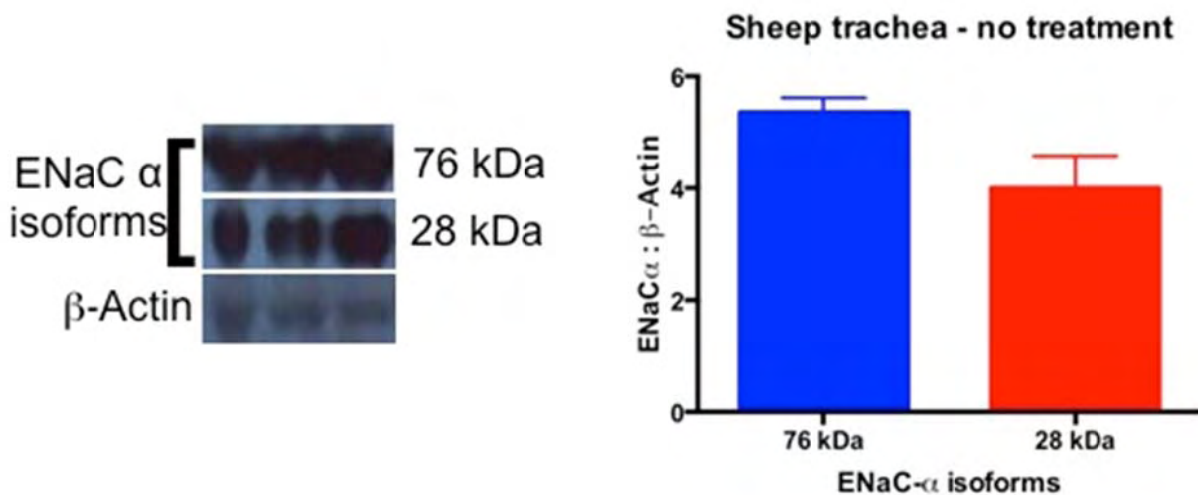
Στο τελευταίο μέρος της ηλεκτροφυσιολογικής μελέτης εκτιμήθηκε η μεταβολή του ρεύματος βραχυκυκλώματος κατ' απόλυτη τιμή σε ιστοτεμάχια που χορηγήθηκε αμιλορίδη αλλά κάποια είχαν επωαστεί μόνο με **Krebs-Ringer** και κάποια με **Krebs-Ringer** και 5% **CSE**. Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 6** υπάρχει σημαντικά μειωμένη ποσότητα ρεύματος που διέρχεται από τον ENaC, όπως προκύπτει από τη μειωμένη αναστολή του, στους ιστούς που έχουν επωασθεί με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. Η σύγκριση με τη χρήση του Student's t-test έδειξε οριακά στατιστικά σημαντική μείωση ($p = 0.049$).



Διάγραμμα 6. Διάγραμμα της μεταβολής των απόλυτων τιμών ρευμάτων βραχυκυκλώματος των αποφλοιωμένων επιθηλιακών ιστών μαρτύρων στα οποία χορηγήθηκε αμιλορίδη $10^{-5}M$. Η μια κατηγορία ιστοτεμαχίων είχε επωασθεί με διάλυμα Krebs Ringer [κόκκινο ($n=9$); $31.75 \pm 4.96 \mu A \cdot cm^{-2}$] ενώ η άλλη είχε επωασθεί με Krebs Ringer και 5% εκχύλισμα καπνού τσιγάρου [πράσινο ($n=5$); $14.80 \pm 1.96 \mu A \cdot cm^{-2}$]. Η σύγκριση έγινε με Student's t-test ($p=0.049$).

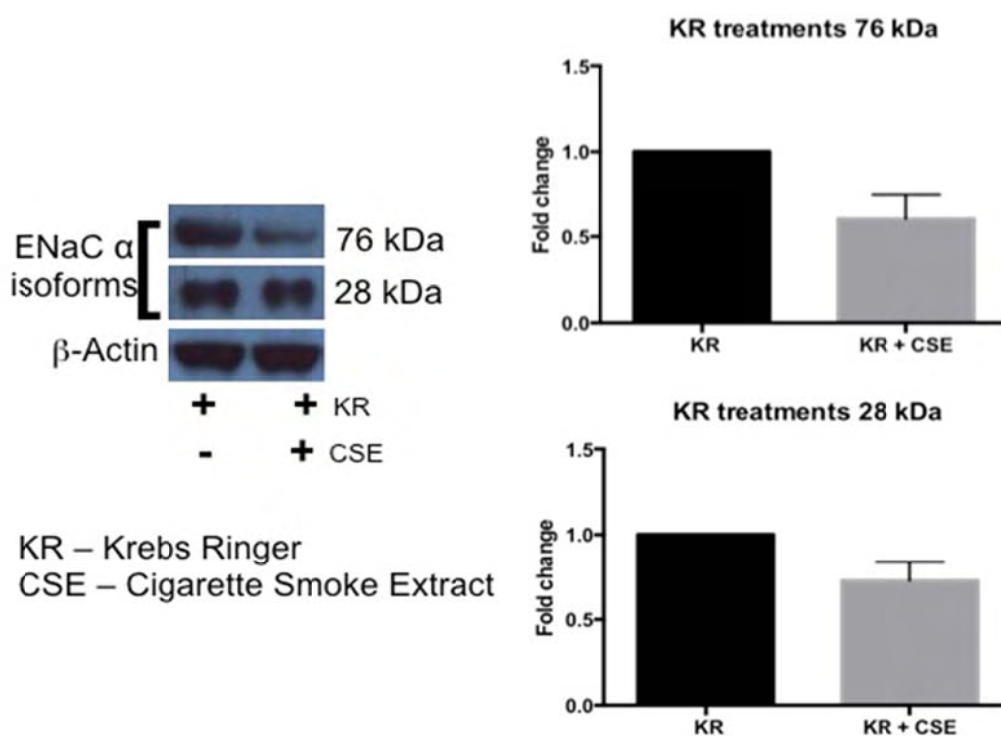
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ WESTERN BLOT

Στα πειράματα με Western Blotting το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε συνδέθηκε με δύο ισομορφές του πεπτιδίου του α -EnaC, μια με μέγεθος 28 kDa και μία με μέγεθος 76 kDa, που αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου. Μετρήθηκαν με το ImageJ οι οπτικές πυκνότητες των ισομορφών του α ENaC και της β -ακτίνης και υπολογίστηκε ο λόγος τους. Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό υλικό απο αποφλοιωμένο επιθήλιο τραχείας χωρίς να υποστεί κάποιο περαιτέρω χειρισμό. Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 7** η έκφραση και των δύο ισομορφών είναι περίπου 4-5 μεγαλύτερη από εκείνη της β -ακτίνης. Μεταξύ της έκφρασης της μεγάλης ισομορφής του α ENaC (76 kDa) και της μικρής ισομορφής του α ENaC (28 kDa) δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.2$).

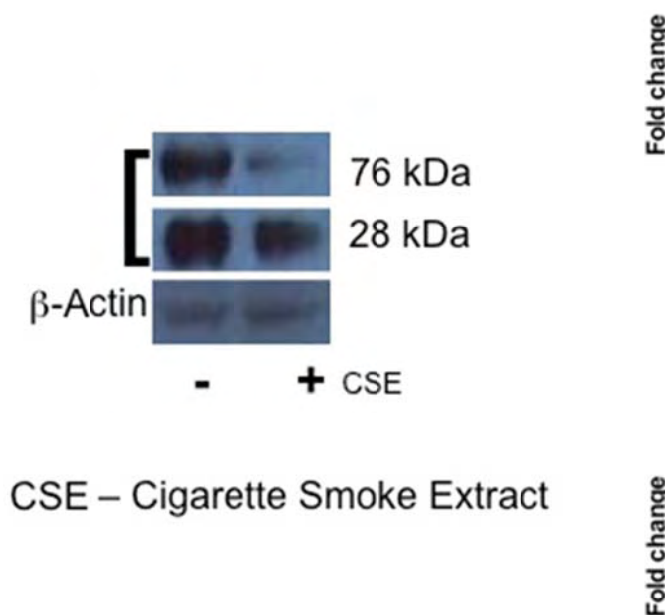


Διάγραμμα 7. Απεικόνιση της έκφρασης των 2 ισομορφών του αENaC και της β-ακτίνης σε κυτταρικό υλικό αποφλοιωμένου επιθηλίου που δεν έχει υποστεί περαιτέρω χειρισμό (αριστερά). Στο διάγραμμα φαίνεται η σύγκριση του λόγου της έκφρασης της κάθε μια ισομορφής προς την β-ακτίνη (δεξιά). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των δύο ισομορφών όπως προκύπτει από τη σύγκριση με Mann Whitney test ($p=0.2$).

Στο πείραμα που αναλύθηκαν διαφορές στην έκφραση δειγμάτων που εκτέθηκαν ή όχι για 30 λεπτά σε Krebs Ringer+5% CSE δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**Διάγραμμα 8**). Το ίδιο ισχύει και για τους ιστούς που εξετάστηκαν μετά την τοποθέτησή τους στη διάταξη Ussing System για 2 ώρες και 40 λεπτά (**Διάγραμμα 9**). Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 8** δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική αλλαγή της έκφρασης της μεγάλης ή της μικρής κανονικοποιημένη προς την έκφραση των δειγμάτων που έχουν επωαστεί μόνο με Krebs Ringer.



Διάγραμμα 8. Απεικόνιση της έκφρασης των 2 ισχυταρικό υλικό αποφλοιωμένου επιθηλίου που δεν εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. Στο επάνω και κάτω έκφρασης της μεγάλης και μικρής αντίστοιχα κ επώαστηκαν με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου, κ δειγμάτων που έχουν επωαστεί μόνο με Krebs F διαφορά όπως προκύπτει από το Wilcoxon Signed R



Διάγραμμα 9. Απεικόνιση της έκφρασης των 2 ισχυταρικό υλικό αποφλοιωμένου επιθηλίου που δεν εκχύλισμα καπνού τσιγάρου. Στο επάνω και κάτω έκφρασης της μεγάλης και μικρής αντίστοιχα κ επώαστηκαν με εκχύλισμα καπνού τσιγάρου, κ δειγμάτων που έχουν επωαστεί μόνο με Krebs F διαφορά όπως προκύπτει από το Wilcoxon Signed R