

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΘΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ
ΛΕΙΟΥ ΜΥΟΣ

της

Ευφροσύνης Θ. Μπόμπου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Καρατζαφέρη Χριστίνα

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική
εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου του
Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Άσκηση και Υγεία» του Τμήματος
Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2015

© 2015
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Άσκηση & Υγεία »
ALL RIGHTS RESERVED

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καρατζαφέρη Χριστίνα

*Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Άσκησης
Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

Χατζευθυμίου Αποστολία

*Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας
Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

Σακκάς Γεώργιος

*Λέκτορας Άσκησης σε Κλινικούς Πληθυσμούς
Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

*Στους γονείς μου Θεόδωρο και Πηνελόπη,
στην αδερφή μου Πένυ,
και στους άντρες της ζωής μου Δημήτρη και Ευάγγελο,*

*ως ελάχιστο δείγμα της αγάπης μου για την στήριξη, την υπομονή και την κατανόηση
που επιδεικνύουν.*

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια συνεργασίας του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μηχανικής του Μυός του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με το εργαστήριο Μελέτης, Σύζευξης, Διέγερσης-Συστολής Λείων Μυϊκών Ινών της Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Με την ολοκλήρωση της συγγραφικής διαδικασίας της μελέτης, συνειδητοποίησα τη συνδρομή και υποστήριξη αρκετών ατόμων στους οποίους εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου, αδράζοντας την ευκαιρία να τους ευχαριστήσω ολόψυχα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διατριβής μου, κα Καρατζαφέρη Χριστίνα, Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Άσκησης του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία με την επιμονή, υπομονή, τις γνώσεις της και την εμπειρία της συνετέλεσε τα μέγιστα στο να αισθανθώ προνομιούχα, ως μέλος του περιβάλλοντός της. Με απόλυτη ελευθερία στις κινήσεις μου και τις επιλογές μου, την αμέριστη εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου, αλλά και με την διάφανη καθοδήγησή της, κατόρθωσα να επιτύχω τον πιο σημαντικό έως τώρα ακαδημαϊκό στόχο μου.

Στην συνέχεια και με την ίδια θέρμη θα ήθελα να αναφερθώ και να ευχαριστήσω την κα Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αν.Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η γνωριμία μου με την οποία αποτέλεσε σημείο σταθμό για την επίτευξη αυτού του μεγάλου στόχου. Ο άψογος επαγγελματισμός της, η έμπειρη ερευνητική καθοδήγησή της, η ηθική στήριξη και ο πολύτιμος χρόνος που μου προσέφερε απλόχερα καθ' όλη την διάρκεια των δύο αυτών χρόνων αποτέλεσαν την ιδανικότερη χείρα βοήθειας, ώστε να δύναμαι σήμερα να φτάσω στο σημείο που βρίσκομαι.

Οριστική υπήρξε η συμβολή του κου Σακκά Γεώργιου, Λέκτορα Άσκησης σε Κλινικούς Πληθυσμούς, στην επιλογή και οριοθέτηση του θέματος της μελέτης μου, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής καθώς επίσης και για την ευκαιρία περιπλάνησης στον κόσμο της πειραματικής φυσιολογίας .

Ανεκτίμητη η επιστημονική βοήθεια, της κας Μαλαβάκη Χριστίνας μεταδιδακτορικής ερευνήτριας, της οποίας η συνεχής και υπομονετική καθοδήγηση, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της διατριβής μου όσο και σε όλη την διάρκεια της εκπόνησής της, συνέβαλλαν τα μέγιστα για το τελικό αποτέλεσμα αυτής.

Συνολικά τα μέλη του muscle group του εργαστηρίου, μου μετέφεραν ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, αλληλεγγύης, οικογενειακής ατμόσφαιρας και τους ευχαριστώ προπαντός για την φιλία που αναπτύχθηκε.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ στον κο Αηδονίδη Ισαάκ, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Φυσιολογίας και την κα Σταματίου Ροδόπη μεταδιδακτορική ερευνήτρια - Βιολόγο, που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση του χειρουργικού μέρους των πειραμάτων κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης μου, αλλά και για τις οξυδερκείς και γόνιμες παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριό τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον κο Μακαντάση Ιωάννη, Ηλεκτρονικό Μηχανικό για την άμεση επίλυση τεχνικών προβλημάτων κατά τη διάρκεια του πειραματικού πρωτοκόλλου και την άψογη συντήρηση της πειραματικής διάταξης. Υπήρξαν ουκ ολίγες φορές που χωρίς την καθοδήγησή του, η έναρξη ενός πειράματος ήταν αδύνατη.

Να μην παραλείψω να ευχαριστήσω την κα Κουτσιανίτη Μαρία, Γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος 'Άσκηση κ Υγεία', η οποία με υπομονή επέλυε οποιοδήποτε γραφειοκρατικό πρόβλημα προέκυπτε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ολοκληρώνοντας, δεν θα μπορούσα να παραβλέψω φυσικά την ίδια μου την οικογένεια, η οποία στεκόταν πάντα δίπλα μου, διακριτικά, σε όλη την διάρκεια κι αυτής της προσπάθειάς. Είναι οι άνθρωποι που με την αγάπη τους, την υπομονή τους και την διαρκή υποστήριξή τους, κάνουν τις δύσκολες στιγμές να μοιάζουν ευκολότερες.

*Μπόμπου Θ. Ευφροσύνη
Τρίκαλα 2015*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αναγωγικών μηχανισμών. Οι αεραγωγοί είναι εκτεθειμένοι στο περιβάλλον και σε διάφορα εξωτερικά και εσωτερικά βιοχημικά ερεθίσματα. Οξειδωτικό στρες στους αεραγωγούς μπορεί να προκύψει από πολλές πηγές, συμπεριλαμβανομένων πιθανών περιβαλλοντικών προοξειδωτικών παραγόντων, μεταβολικών παραγόντων, διήθησης από φλεγμονώδη κύτταρα, αλλά και λόγω μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες στους αεραγωγούς συσχετίζεται με την βαρύτητα της πνευμονικής νόσου αλλά και με επιγενετικές μεταβολές. Η πιθανή επίδραση οξειδωτικών παραγόντων στη συσταλτικότητα των λείων μυών των αεραγωγών, είναι ιδιαίτερης σημασίας αλλά δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην συστολή του λείου μυός τραχείας. Ως οξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο προέρχεται και από περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως συστατικά του καπνού του τσιγάρου. Συγκεκριμένα, μέσω δυναμομετρίας, μελετήθηκε η επίδρασή του H_2O_2 στην λειτουργία του λείου μυός τραχείας New Zealand κόνικλου ($N=13$), και συγκεκριμένα στον βασικό τόνο του ιστού (συνθήκες ηρεμίας) και στην μέγιστη ισομετρική σύσπαση (προκαλούμενη από έκθεση σε 80 mM KCl). Επίσης μελετήθηκε ο ρόλος του επιθηλίου και η επίδραση του pH στη δράση του H_2O_2 . Η μελέτη έλαβε έγκριση της Εσωτερικής Επιτροπής Δεοντολογίας της ΣΕΦΑΑ και χρησιμοποιήθηκαν κόνικλοι ελέγχου προερχόμενοι από άλλες μελέτες (επίσης εγκεκριμένες) για την συλλογή του ιστού, ώστε να μην γίνεται ανώφελη ευθανασία. Έγιναν πειράματα συστολών σε παρασκευάσματα τραχείας (περί τα 4 ημικρίκια ανά ζώο) και μελετήθηκε η επίδραση του H_2O_2 (0.3-

10mM) σε ιστό με άθικτο επιθήλιο και σε ιστό που το επιθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά. Τα ημικρίκια τοποθετήθηκαν σε λουτρό διαπότισης, όγκου 10ml, με συνεχή ροή διαλύματος Krebs, pH 7.4 ή 7.2, όπως και μετά από προεπώαση του ιστού με τον αναγωγικό παράγοντα dithiothreitol (DTT, 10mM) ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος με την ενδοαυλική πλευρά προς τα άνω. Η παροχή του διαλύματος και η απομάκρυνσή του έγινε με περισταλτική αντλία με ταχύτητα διάχυσης 5ml/min. Το ένα άκρο του ιστού στερεώθηκε σταθερά στο λουτρό διαπότισης και το άλλο στο ελεύθερο άκρο ενός μηχανομετατροπέα (Grass FT03C). Η θερμοκρασία σε κάθε λουτρό διαπότισης διατηρούνταν σταθερή στους 37°C με τη βοήθεια κυκλοφορητή θερμού ύδατος. Οι μεταβολές της τάσης του ιστού καταγράφηκαν σε καταγραφικό με συνεχή ένδειξη σήματος σε οθόνη παλμογράφου, όπως και σε καταγραφικό μηχάνημα τεσσάρων διαύλων (Grass 7400 Physiological Recorder). Οι μετρήσεις εκφράστηκαν σε γραμμάρια τάσης ανά εμβαδό της εγκάρσιας διατομής του ιστού σε mm^2 (g/mm^2) και παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος (Mean) \pm τυπικό σφάλμα (SEM). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπως και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5. Χρησιμοποιήθηκε μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression) για τον υπολογισμό της μέγιστης τάσης (B_{max}) μετά από αυξανόμενη έκθεση σε H_2O_2 και για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης H_2O_2 που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης (EC_{50}). Η σύγκριση των τιμών που αφορούν τον ίδιο ιστό έγινε με paired t-test. Για τη σύγκριση τιμών που αφορούν διαφορετικούς ιστούς έγινε σύγκριση των τιμών με unpaired t-test. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των τιμών η σύγκριση έγινε με μη παραμετρική ανάλυση Mann-Whitney U test. Ως επίπεδο

στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε, για κάθε είδος στατιστικής ανάλυσης, η τιμή $P < 0.05$.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το H_2O_2 , σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.5, 1 και 10mM, προκαλεί δόσοεξαρτώμενη σύσπαση του λείου μυ τραχείας κονίκλου σε συνθήκες ηρεμίας. Η μηχανική αφαίρεση του επιθήλιου δεν επηρέασε σημαντικά την ανταποκρισιμότητα του ιστού. Επίσης, η μέγιστη σύσπαση που προκλήθηκε από το H_2O_2 σε ιστό με επιθήλιο και σε ιστό χωρίς, ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την σύσπαση που προκαλεί στον ιστό το KCl (80mM). Η έκθεση του ιστού σε διαδοχικές συγκεντρώσεις H_2O_2 δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο KCl σε παρασκευάσματα με άθικτο επιθήλιο, ενώ αντίθετα την ελαττώνει σε παρασκευάσματα χωρίς επιθήλιο. Η μεταβολή του pH από 7.4 σε 7.2 φαίνεται να ελαττώνει την ανταποκρισιμότητα του ιστού με άθικτο επιθήλιο στο H_2O_2 , παρόλο που είναι στατιστικά μη σημαντική η διαφορά. Τέλος, η προεπώαση ιστού με τον αναγωγικό παράγοντα DTT (10 mM), για 15min, αναστέλλει την συσπαστική δράση του H_2O_2 σε ιστό με άθικτο επιθήλιο και ελαττώνει τη δράση του H_2O_2 σε ιστό χωρίς επιθήλιο αποδεικνύοντας ότι οι παρατηρήσεις μας οφείλονταν στην καθ'αυτή επίδραση του H_2O_2 και όχι στον χειρισμό του δείγματος

Συμπερασματικά, το H_2O_2 ασκεί στο λείο μυ της τραχείας κονίκλου δόσοεξαρτώμενη επιθηλιο-ανεξάρτητη σύσπαση μέσω οξειδωτικού stress. Η δράση είναι δηλαδή άμεση και δεν επιτυγχάνεται μέσω απελευθέρωσης μεσολαβητών από το επιθήλιο της τραχείας. Η μεταβολή του pH σε πιο όξινο φαίνεται να ελαττώνει την συσπαστική δράση του H_2O_2 στον λείο μυ στατιστικά μη σημαντικά. Η παρουσία του επιθήλιου φαίνεται να δρα προστατευτικά στην ικανότητα του μυός να επαναλάβει μέγιστη ισομετρική σύσπαση, μετά βραχύβιας έκθεσης στον οξειδωτικό

παράγοντα. Επίσης, προστατευτικά φαίνεται να δρα και ο αντιοξειδωτικός παράγοντας. Τα αποτελέσματά μας, υποδεικνύουν έναν μη αμελητέο ρόλο της έκθεσης σε οξειδωτικό στρες στην λειτουργία του λείου μυός της τραχείας και δικαιολογούν περεταίρω έρευνα για τον σχεδιασμό παρεμβάσεων για την βελτίωση /προστασία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αναπνευστικού συστήματος.

ABSTRACT

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between oxidants and reducing mechanisms. The airways are exposed to internal but also to various external biochemical stimuli. In the airways oxidative stress may thus be the result of many processes, implicating potential environmental pro-oxidants factors, metabolic factors, infiltration by inflammatory cells, but can also be due to decreased levels of antioxidant defense mechanisms. According to the literature, oxidative stress in the airways correlates with the severity of pulmonary diseases and epigenetic changes. The possible effects of oxidizing agents on contractility of the airway smooth muscle is of particular importance for healthy breathing but has not been adequately studied.

This study examined the effect of oxidative stress in smooth muscle trachea. As an oxidizing agent we used hydrogen peroxide (H_2O_2), which, among other sources, is also derived from environmental contaminants such as components of cigarette smoke. Specifically, using an in vitro muscle dynamometry system, we evaluated the effect of H_2O_2 in the responsiveness of smooth muscle trachea of New Zealand rabbits ($N=13$), namely on the basal tone (resting conditions) and the maximum isometric contraction (caused by exposure to 80 mM KCl). Also the role of the epithelium was studied (using tissues with intact epithelium and tissues where the epithelium was mechanically removed), as well as the effect of pH on the activity of H_2O_2 . The study received approval of the Internal Ethics Committee of the School and we used control animals from other studies (also approved) for the collection of tissue so as not to employ unnecessary euthanasia. After equilibration for an hour tissues were exposed to 80 mM KCl to record maximum isometric tension. Tissues were then washed with Krebs, re-equilibrated and the effect of H_2O_2 (0.3-10mM) was studied. Following exposure to H_2O_2 the tissues were washed with Krebs and re-equilibrated

before a second exposure to 80 mM KCl, to examine the recovery of maximum tension.

Semirings were placed in the experimental chambers, volume 10ml, in Krebs solution, pH 7.4 or 7.2. In some instances the tissue was pre-incubated with the reducing agent dithiothreitol (DTT, 10mM). The regeneration of the solution was done by the use of a peristaltic pump set at a rate of 5ml / min. One end of the tissue was fixed firmly and the other to the free end of a force transducer (Grass FT03C). The temperature in each bath was maintained constant at 37°C using a warm water circulator. Changes in tissue tension were displayed continuously on an oscilloscope and recorded in a four-channel recorder (Grass 7400 Physiological Recorder). The measurements were expressed in grams of tension per cross-sectional area of tissue in mm² (g / mm²) and presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of the results was done using GraphPad Prism 5. Nonlinear regression was used to calculate the maximum tension after increasing exposure to H₂O₂ (Bmax) and the concentration of H₂O₂ which causes 50% of maximal response was also calculated (EC50). Data comparisons on the same tissue were done with the use of the paired t-test. To compare values for different tissues unpaired t-test was used. In case that the criteria for a normal distribution were not met (following Kolmogorov-Smirnov analysis) comparisons were made with non-parametric tests. Statistical significance was set at P < 0.05.

The results showed that exposure to H₂O₂, in increasing concentrations (0.3, 0.5, 1 and 10mM), caused a dose-dependent contraction in rabbit tracheal smooth muscle. The mechanical removal of the epithelium did not affect the tissue response. Furthermore, the maximum tension induced by H₂O₂ in intact and in epithelium denuded tissue was statistically significantly lower than the maximum tension induced

by exposure to KCl. The tissue exposure in increasing H₂O₂ concentrations did not alter the recovery of KCl induced maximum isometric tension when the epithelium was present, while tension recovery was significantly reduced in epithelium denuded tissues. The pH shift from 7.4 to 7.2 reduced the tissues response to H₂O₂ when the epithelium was intact, without statistical significance. Finally, tissue pre-incubation with the reducing factor DTT (10 mM), for 15min, reduced the effect of H₂O₂ on contractility in epithelium denuded rings. In conclusion H₂O₂ caused a dose-dependent epithelium-independent contraction in rabbit tracheal smooth muscle through oxidative stress. This effect was direct and was not induced through mediators release from tracheal epithelium. The transition to a more acidic pH seemed to reduce the effect of H₂O₂ on smooth muscle contractility without any statistical significance.

All in all the results support the need for further research in order to design interventions to maintain an optimal redox status in order to safeguard respiratory health.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**σελ**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	11
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	16
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	17
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	19
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	 20
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	 25
2.1 Αναπνευστικό σύστημα.....	26
2.1.1 Αεραγωγοί.....	26
2.1.2 Σύσπαση λείων μυών αεραγωγών.....	26
2.2 Οξειδωτικό στρες.....	32
2.2.1 Οξειδωτικό στρες-μορφές.....	32
2.2.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου: σύνθεση-αποικοδόμηση.....	34
2.2.3 Προστασία από το οξειδωτικό στρες.....	36
2.3 Ρόλος του οξειδωτικού στρες στο αναπνευστικό σύστημα.....	37
2.3.1 Επίδραση οξειδωτικού στρες στους αεραγωγούς.....	39
2.3.2 Παθοφυσιολογία, ασθένειες.....	40
2.3.2.1 Άσθμα.....	41
2.3.2.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).....	44
2.3.2.3 Άλλες παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού.....	45
2.3.3 Άλλες παθήσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.....	46
2.4 Μηχανισμός δράσης σε παθήσεις του αναπνευστικού.....	47
2.5 Πιθανές κλινικές εφαρμογές-θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	48
2.6 Άσκηση.....	54
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	 55
3.1 Υλικό και Μέθοδοι.....	56
3.1.1 Έγκριση Δεοντολογίας.....	56
3.1.2 Πειραματόζωα.....	56
3.1.3 Αναισθησία-Ευθανασία.....	56
3.1.4 Δειγματοληψία.....	57
3.1.5 Μηχανική Αξιολόγηση.....	59
3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο.....	61
Α. Προκαταρκτικά πειράματα.....	61
Β. Τελικά πειράματα.....	62

3.3 Παρουσίαση αποτελεσμάτων-Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων.....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
4.1 Οξεία επίδραση οξειδωτικού stress.....	67
4.1.1 Επίδραση H_2O_2 σε λείο μυ τραχείας κονίκλου σε pH 7,4.....	67
4.1.1.1 Επίδραση H_2O_2 στον βασικό τόνο λείου μυός τραχείας κονίκλου, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.....	67
4.1.2 Επίδραση H_2O_2 στον βασικό τόνο λείου μυός τραχείας κονίκλου, παρουσία επιθηλίου ή απουσία επιθηλίου, σε pH 7,2.....	69
4.1.3 Επίδραση DTT σε συνδυασμό με H_2O_2 σε λείες μυϊκές ίνες, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.....	72
4.1.4 Επίδραση της έκθεσης σε H_2O_2 στην σύσπαση με KCl.....	74
4.1.4.1 Επίδραση σε λείες μυϊκές ίνες που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.....	74
4.2. Βραχυπρόθεσμη επίδραση οξειδωτικού stress.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
Αδυναμίες της μελέτης-μελλοντικές μελέτες.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	99

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

1. **Σχεδιάγραμμα 1.** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο (A) ή χωρίς επιθήλιο (B) σε pH 7.4
2. **Σχεδιάγραμμα 2.** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο σε pH 7.4.
3. **Σχεδιάγραμμα 3.** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο σε pH=7.2.
4. **Σχεδιάγραμμα 4:** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο σε pH 7.2 και pH 7.4.
5. **Σχεδιάγραμμα 5:** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο σε pH 7.4, σε ιστό με άθικτο επιθήλιο χωρίς ή με προεπώαση με DTT (10mM).
6. **Σχεδιάγραμμα 6:** Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου χωρίς επιθήλιο σε pH 7.4
7. **Σχεδιάγραμμα 7:** Η επίδραση του KCl (80 mM) σε λείο μυ τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο πριν την έκθεση σε H_2O_2 και η εκτιμώμενη B_{\max} στο H_2O_2 .
8. **Σχεδιάγραμμα 8:** Η επίδραση του KCl σε λείο μυ τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο πριν και μετά την έκθεση σε διαδοχικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0.3-10mM).

ΕΙΚΟΝΕΣ

1. **Εικόνα 1.** Επίδραση της φλεγμονής στη διάμετρο των αεραγωγών. Gosens et al 2009
2. **Εικόνα 2.** Μυϊκή συστολή. Cummings et al 2000
3. **Εικόνα 3.** Δράσεις των ROS. Kirkham et al 2006
4. **Εικόνα 4.** Πηγές οξειδωτικού στρες. Kirkham et al 2006
5. **Εικόνα 5.** Μεταβολισμός του H_2O_2 . Halliwell et al 1989
6. **Εικόνα 6.** Ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Garrido et al 2004
7. **Εικόνα 7.** Πηγές οξειδωτικών μορίων. Προσαρμοσμένη από Rahman et al 2006
8. **Εικόνα 8.** Μεταβολισμός του O_2 στους πνεύμονες. Nadeem et al 2008
9. **Εικόνα 9.** Μεταβολισμός του O_2 στους πνεύμονες παρουσία φλεγμονής. Nadeem et al 2008
10. **Εικόνα 10.** Οξειδωτικό στρες και ασθένειες. Galli et al 2005
11. **Εικόνα 11.** Απενεργοποίηση οξειδωτικού στρες. Rahman et al 2006
12. **Εικόνα 12.** Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Macnee et al 2001
13. **Εικόνα 13.** Δομή και Μοριακός τύπος ($C_{11}H_{17}N_2NaO_2S$) Νατριούχου Θειοπεντόνης (Pentothal Sodium). Σχετική Μοριακή Μάζα: 264.32 g/mol
14. **Εικόνα 14.** Παρασκεύασμα ημικρικών λείου μυ τραχείας κονίκλου.
15. **Εικόνα 15.** Α. πειραματική διάταξη μελέτης συσταλτικότητας λείου μυ τραχείας κονίκλου, Β. λουτρά διαπότισης, Γ. μηχανομετατροπείς Grass FT03C force displacement transducer, Δ. θερμαντήρας νερού, Ε. καταγραφικό 4^{ov} καναλιών Grass 7400 Physiological Recorder

16. **Εικόνα 16.** Ιστοτεμάχια τραχείας που επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ή παρουσία H_2O_2 (300 μM , 1, 10mM και 30mM).
17. **Εικόνα 17.** Μέτρηση του pH του διαλύματος διαπότισης (Krebs) με πεχάμετρο Bante 930.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ROS: Reactive Oxygen Species. Δραστικές μορφές οξυγόνου

ΧΑΠ: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

DTT: Dithiothreitol

NO: Nitric oxide

NANC: non adrenergic non cholinergic

VDCC: Voltage dependent calcium channels

nNOS: neuronal nitric oxide synthetase

iNOS: induced nitric oxide synthetase

cNOS: central nitric oxide synthetase

eNOS: epithelial nitric oxide synthetase

GC: guanyl cyclase

AP-1: apolipoprotein 1

BAL: Bronchial alveolar liquid

IL: interleukin

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, που αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια. Μεταξύ αυτών το H_2O_2 , το οποίο παρόλο που δεν έχει ελεύθερα ιόντα αποτελεί ιδιαίτερα δραστική ουσία και αντιδρά τόσο με άλλα αέρια που παράγονται στον οργανισμό, όπως το NO αλλά έχει και την ικανότητα να ενεργοποιεί μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή μορίων και στην ενεργοποίηση ενζύμων, που στόχο έχουν την ελάττωση της δραστικότητας των ROS.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προέρχονται από εξωγενείς, όπως οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και το τσιγάρο αλλά και από ενδογενείς πηγές, όπως από τα μιτοχόνδρια αλλά και από ένζυμα του οργανισμού, όπως οξειδάσες και οξυγενάσες (1). Η παραγωγή των ROS είναι επίσης αυξημένη από κύτταρα της φλεγμονής σε φλεγμονώδεις παθήσεις. Όταν ο ρυθμός παραγωγής των ROS είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό απομάκρυνσής τους, ή όταν οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες μειώνονται αναλογικά με τους οξειδωτικούς, τότε ο οργανισμός υποβάλλεται σε οξειδωτικό στρες (2, 3). Η αυξημένη παρουσία των οξειδωτικών μορίων μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή τους στο εσωτερικό, είτε σε επιπλέον παροχή τους από το εξωτερικό περιβάλλον (4).

Το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα βλάβες τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο συστημάτων καθώς επιτείνει ή εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νόσων, άμεσα επιδρώντας σε μόρια ή έμμεσα ενεργοποιώντας γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο (2, 3). Είναι λοιπόν κρίσιμο να λειτουργούν μηχανισμοί που είτε αναστέλλουν είτε αναστρέφουν μια τέτοια κατάσταση. Ο οργανισμός διαθέτει πλήθος τέτοιων μηχανισμών, όπως ένζυμα που διασπούν τις ROS αλλά και αντιοξειδωτικά μόρια ή συστήματα που αναστρέφουν το οξειδωτικό ισοζύγιο. Επιπλέον, η λήψη

αντιοξειδωτικών παραγόντων μέσω της διατροφής ή η ενίσχυση της παραγωγής τους, από τον ίδιο τον οργανισμό, όπως για παράδειγμα μέσω της άσκησης, θα μπορούσε να διατηρήσει το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η συσχέτιση παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος με το οξειδωτικό στρες έγκειται κατά κύριο λόγο στην παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων από τα κύτταρα της φλεγμονής τα οποία κινητοποιούνται στη διάρκεια τόσο εξάρσεων των νόσων όσο και στην χρόνια έκβασή τους. Έτσι, το οξειδωτικό φορτίο εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένο σε άτομα που πάσχουν από άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, πνευμονική ίνωση και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας. Μάλιστα ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα H_2O_2 στο συμπύκνωμα της εκπνοής στους ασθενείς με άσθμα, σε σύγκριση με μη ασθενείς, με τα επίπεδα H_2O_2 να συσχετίζονται σημαντικά με δείκτες αναπνευστικής δυσλειτουργίας (2, 3). Επιπλέον, βλαβερές συνήθειες όπως το κάπνισμα (1) αυξάνουν το οξειδωτικό στρες στους αεραγωγούς. Είναι σημαντικές επίσης οι διαπιστώσεις μετά από πρόσφατες μελέτες σε απομονωμένα κύτταρα λείου μυός (ASM) και σε καλλιέργειες γέλης ASM αλλά και *in vivo* παρατηρήσεις, ότι ο «ασθματικός» λείος μυς παρουσιάζει εγγενή υπερσυσταλτικότητα (hypercontractility), καθώς και αυξημένο οξειδωτικό φορτίο, αν και οι ως σήμερα μελέτες δεν μπορούν να απαντήσουν πόσο αυτή συμβάλει στον βρογχόσπασμο ανεξάρτητα της φλεγμονής ούτε μπορούν να καθορίσουν επακριβώς τον ρόλο του οξειδωτικού στρες (4). Η κατανόηση επομένως των μηχανισμών μέσω των οποίων πιθανώς επιδρά το οξειδωτικό στρες στη συσταλτικότητα των λείων μυών και ειδικότερα της τραχείας, μπορεί να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις νόσων του αναπνευστικού όπου έχουν διαπιστωθεί αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει κατά πόσο το οξειδωτικό στρες και πιο συγκεκριμένα η έκθεση σε H_2O_2 θα μπορούσε να επιδράσει στη συσταλτικότητα λείου μυός τραχείας κονίκλου. Η επιλογή του πειραματόζωου έγινε με κριτήριο το γεγονός ότι το αναπνευστικό σύστημα των κονίκλων ομοιάζει με αυτό των ανθρώπων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως ερευνητικό μοντέλο. Η σημαντικότητα της μελέτης είναι μεγάλη καθώς σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού παρατηρείται τόσο ανίχνευση υψηλών επιπέδων H_2O_2 στον οργανισμό, η οποία σχετίζεται με τον αριθμό των εξάρσεων των νόσων, όσο και με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων τους.

Οι ερευνητικές υποθέσεις που τέθηκαν ήταν:

1) Ότι το H_2O_2 επηρεάζει τον βασικό τόνο των λείων μυών της τραχείας κονίκλου

2) ότι το επιθήλιο διαφοροποιεί πιθανώς τη δράση του,

καθώς μια επίδραση στον βασικό τόνο θα είχε μεγάλη σημασία για τη ρύθμιση της διαμέτρου των αεραγωγών, ενώ η καταστροφή του επιθηλίου που παρατηρείται στη φλεγμονή θα μπορούσε να επηρεάσει αυτή τη δράση. Επιπλέον,

3) ότι το οξειδωτικό δυναμικό του ιστού τροποποιεί μια πιθανή δράση του H_2O_2

και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί παράγοντες, όπως διαφορετικό pH στο διάλυμα εμποτισμού, αλλά και ο αναγωγικός παράγοντας DTT (dithiothreitol). Εφόσον στις χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού παρουσιάζεται συχνά υπεραντιδραστικότητα και απότομη σύσπαση των αεραγωγών μελετήθηκε ακόμη η επίδραση του H_2O_2 σε λείους μυς τραχείας κονίκλου που βρίσκονταν ήδη σε σύσπαση με τη δράση διαλύματος KCl.

Περιορισμοί της Έρευνας: ο αριθμός των πειραματόζωων είναι ένας βασικός περιορισμός, διότι πάντοτε καταβάλλεται προσπάθεια για τη χρήση του ελάχιστου αριθμού πειραματόζωων, αλλά και αντιδραστηρίων.

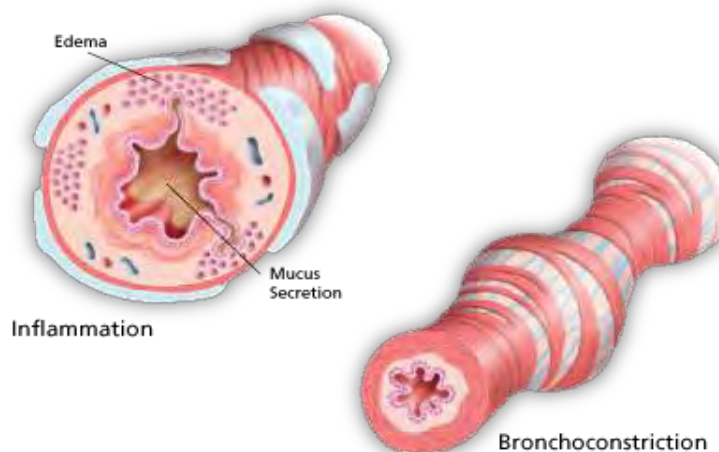
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Αναπνευστικό σύστημα

2.1.1 Αεραγωγοί

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τους πνεύμονες και τους αεραγωγούς. Η διάμετρος των αεραγωγών ρυθμίζει την ποσότητα του αέρα που φτάνει στους πνεύμονες και διατίθεται στον οργανισμό. Η διάσταση αυτή ελέγχεται από τις λείες μυϊκές ίνες του τοιχώματος των αεραγωγών μέσω της σύσπασης και της χάλασής τους. Σε παθήσεις του αναπνευστικού, στις οποίες υπάρχει εκτεταμένη φλεγμονή, όπως για παράδειγμα στο άσθμα, παρουσιάζεται πάχυνση στο τοίχωμα του αεραγωγού, η οποία οδηγεί σε ελάττωση της διαμέτρου των αεραγωγών και αυξημένη ανταποκρισιμότητά τους σε παράγοντες που προκαλούν σύσπαση όπως ισταμίνη ή ακετυλοχολίνη (5) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Επίδραση της φλεγμονής στη διάμετρο των αεραγωγών.
Gosens et al 2009

2.1.2 Σύσπαση λείων μυών των αεραγωγών

Οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκονται εκτός από τους αεραγωγούς, σε όλα τα εσωτερικά όργανα, όπου πραγματοποιούνται αργές και ομοιόμορφες κινήσεις και η σύσπασή τους γίνεται ακούσια. Είναι ατρακτοειδείς ίνες μικρού μήκους, χωρίς

εγκάρσιες γραμμώσεις, με χαρακτηριστικό την βραδεία και παρατεταμένης διάρκειας συστολή (6).

Τα κύτταρα του λείου μυός δεν περιέχουν σαρκομερίδια (όπως οι γραμμωτοί μύες) και T-σωληνάρια, ενώ το σαρκοπλασματικό δίκτυο δεν είναι τόσο ανεπτυγμένο όσο στον γραμμωτό μυ. Η κυτταροπλασματική του μεμβράνη όμως δημιουργεί πολλές εγκολπώσεις, ώστε η είσοδος ιόντων Ca^{+2} να γίνεται ταχύτερα. Μεταξύ γειτονικών λείων μυϊκών κυττάρων υπάρχουν χασματικές συνδέσεις (gap junctions) που επιτρέπουν την άμεση επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, άρα τη συντονισμένη συστολή τους. Δεν υπάρχει τροπονίνη, ενώ η μυοσίνη παίζει κύριο ρόλο στη συστολή του κυττάρου (6, 7).

Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από 6 υπομονάδες, από 2 βαριές αλυσίδες που έχουν μία κεφαλή, μία ράβδο και μία ουρά, και από 4 ελαφριές αλυσίδες, που βρίσκονται ανά 2 δίπλα σε κάθε κεφαλή μυοσίνης. Στην περιοχή της σύνδεσης κάθε μυοσίνης, τα μόρια ανοίγουν για να σχηματίσουν τις εγκάρσιες γέφυρες μεταξύ των νηματίων μυοσίνης-ακτίνης (7). Καθεμία από τις κεφαλές έχει μια θέση δέσμευσης για την ακτίνη και μια θέση δέσμευσης και υδρόλυσης ενός μορίου ATP. Η κεφαλή συνδέεται ακόμη με 2 ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης, την αλκαλική, με ρόλο την σταθεροποίηση της περιοχής της κεφαλής, και τη ρυθμιστική, η οποία ελέγχει τη δραστηριότητα της ATPάσης. Η βάση της μυϊκής συστολής είναι ένας επαναλαμβανόμενος κύκλος, καθώς αρχικά οι κεφαλές της μυοσίνης συνδέονται με τα νημάτια της ακτίνης, οι εγκάρσιες γέφυρες παραμορφώνονται και τέλος οι κεφαλές της μυοσίνης αποσυνδέονται από την ακτίνη (7).

Η αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου και η σύνδεσή του με την κυτοσολική καλμοδουλίνη οδηγεί στη μυϊκή συστολή. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο καλμοδουλίνης – ασβεστίου συνδέεται με την κινάση της ελαφράς αλυσού της

μυοσίνης, η οποία χρησιμοποιεί ATP για να φωσφορυλιώσει τις μυοσινικές εγκάρσιες γέφυρες, που συνδέονται με τα νημάτια ακτίνης και με τον τρόπο αυτό ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας παράγει τάση και επέρχεται βράχυνση (8) (Εικόνα 2).

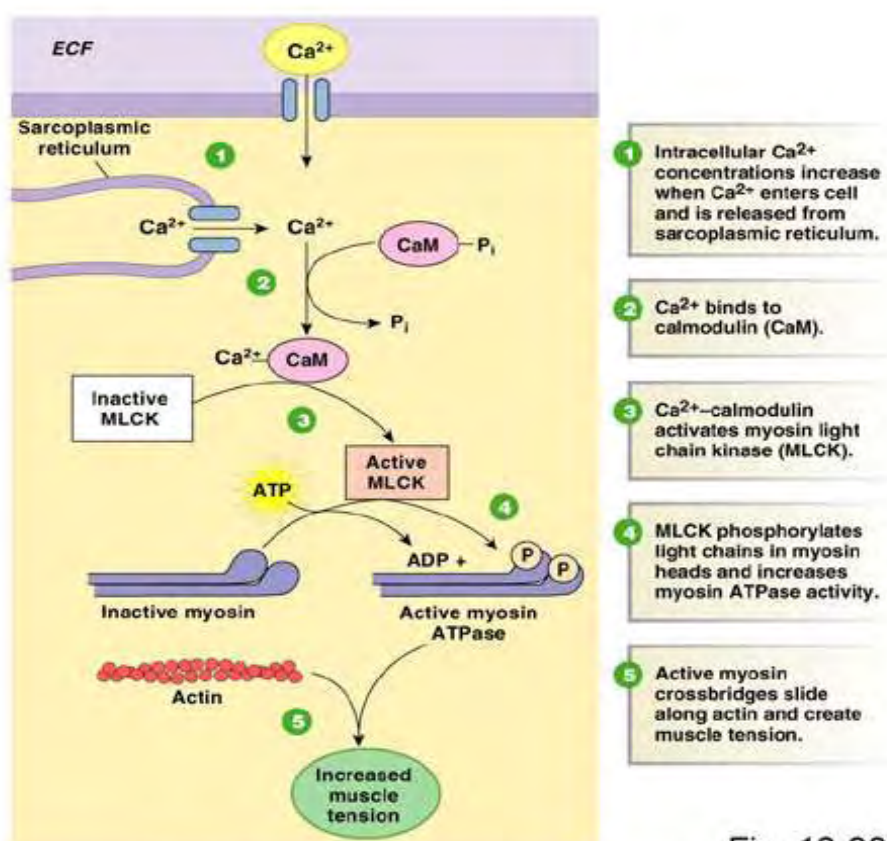


Fig. 12-28

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 2. Μυϊκή συστολή. Cummings et al 2000

Οι λείοι μύες δέχονται νευρώση από το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό σύστημα και ο κύριος νευροδιαβιβαστής της νευρομυϊκής σύναψης είναι η ακετυλοχολίνη, η οποία δεσμεύεται κατά κύριο λόγο σε μουσκαρινικούς μετασυναπτικούς υποδοχείς οδηγώντας σε ενεργοποίηση καταρρακτών σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία έχουν ως τελικό στόχο την ανταπόκριση με σύσπαση ή χάλαση σε διάφορα ερεθίσματα.

Το επιθήλιο βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με τα λεία μυϊκά κύτταρα, μέσω της δράσης παρακρινών ουσιών. Τα επιθηλιακά κι ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν

NO, προσταγλανδίνες, βραδυκινίνη και άλλες ουσίες που μπορούν να επάγουν χάλαση στους λείους μύες (9, 10). Το μη-αδρενεργικό-μη-χολινεργικό σύστημα (NANC) δρα κυρίως μέσω του μονοπατιού του NO και λιγότερο της βραδυκινίνης. Η ανασταλτική επίδραση του επιθηλίου μπορεί να είναι είτε προσυναπτική (επηρεάζοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης), είτε άμεσα σε υποδοχείς της μεμβράνης του λείου μυϊκού κυττάρου.

Σε πειραματικές συνθήκες συχνά χρησιμοποιούνται ως παράγοντες που προκαλούν σύσπαση το σταθερό ανάλογο της ακετυλοχολίνης καρβαχόλη, αλλά και το KCl το οποίο προκαλεί σύσπαση μέσω της αλλαγής της ηλεκτροχημικής κλίσης της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της υψηλότερης εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ αλλάζει η ηλεκτροχημική του κλίση, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαδικασία της επαναπόλωσης της μεμβράνης (συμμετέχουν κυρίως οι διάλυτοι καλίου) και να παρατείνεται η σύσπαση του κυττάρου. Όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ ξεπεράσει τα 40 mM, εκτός από τη μετασυναπτική ενεργοποίηση των VDCC, προκαλείται κι εκπόλωση του προσυναπτικού, νευρικού κυττάρου. Η προσυναπτική εκπόλωση προκαλεί αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, που με τη σειρά της δρα στους μουσκαρινικούς υποδοχείς μετασυναπτικά και πυροδοτεί τη συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου (6). Η πρόσδεση κάποιου αγωνιστή σε έναν υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του λείου μυϊκού κυττάρου προκαλεί την παραγωγή ενδοκυττάριου μηνύματος, που με τη σειρά του δρα σε διάφορα στάδια του καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγούν στη συστολή του κυττάρου.

Η χάλαση στον λείο μυ επέρχεται όταν αφαιρεθεί από το περιβάλλον του μυός ο παράγοντας που προκαλεί σύσπαση, είτε με απευθείας δράση κάποιας ουσίας που επάγει χάλαση. Ο κοινός τόπος αυτών των δύο μηχανισμών είναι η ελάττωση των επιπέδων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα του λείου μυϊκού κυττάρου και η

απενεργοποίηση των καναλιών της μεμβράνης που δημιουργούσαν το δυναμικό ενεργείας ή την αύξηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (7, 8). Τα ιόντα ασβεστίου μπορούν να ελαττωθούν μέσω δέσμευσής τους από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ή από την απενεργοποίηση καναλιών που τα εισάγουν στο κύτταρο, ενώ σημαντικό ρόλο παίζουν και πρωτεϊνικές κινάσες αλλά και δεύτεροι μηνύτορες, όπως το cGMP. Σημαντική είναι και η δράση του επιθηλίου στην χάλαση καθώς μέσω των ουσιών που παράγει, όπως το NO μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια που τερματίζουν την μυϊκή συστολή (11).

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) φυσιολογικά παράγεται από συνθετάσες που καταλύουν την μετατροπή της L-αργινίνης σε κιτρουλλίνη. Έχουν αναγνωριστεί 3 διαφορετικά ισοένζυμα: η νευρωνική μορφή (neuronal, nNOS ή τύπου I NOS), η επαγώγιμη μορφή (inducible, iNOS ή τύπου II NOS) και η δομική μορφή (constitutive, cNOS ή τύπου III NOS). Αρχικά, η cNOS ήταν γνωστή ως eNOS γιατί ανακαλύφθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση picomoles μονοξειδίου του αζώτου μέσα σε δευτερόλεπτα ή λίγα λεπτά, μετά την ενεργοποίησή της από αγωνιστές όπως η ακετυλοχολίνη, η βραδυκίνη, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και η ισταμίνη, με την ενεργοποίηση αυτή να εμφανίζεται συχνά σε εξάρσεις αποφρακτικών ασθενειών των αεραγωγών (12). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδά της αυξάνονται στη χρόνια άσκηση (13). Το NO που παράγεται από την iNOS είναι της τάξης των nanomolar. Στους αεραγωγούς, το NO παράγεται από τα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, φλεγμονώδη και νευροαισθητικά κύτταρα. Σε φυσιολογικούς αεραγωγούς ανθρώπων το σημαντικότερο ισοένζυμο είναι το iNOS, (13) ενώ η έκφρασή του παρουσιάζει αύξηση σε χρόνιες παθολογικές καταστάσεις, όπως το άσθμα (14).

Δεν είναι τυχαίο ότι από πολύ παλιά είναι γνωστή η βρογχοδιασταλτική επίδραση των νιτρωδών (15), καθώς μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεοτίδια. Στο μηχανισμό της συστολής του λείου μυϊκού κυττάρου το NO συμμετέχει μέσω ενεργοποίησης μιας ομάδας γουανυλικών κυκλασών (GC), που διακρίνονται σε δύο τύπους: στον τύπο που συνδέεται με μεμβρανικό υποδοχέα (receptor containing particulate, pGC) και στον τύπο που είναι διαλυτός στο κυτταρόπλασμα (soluble intracellular enzyme, sGC). Η ενεργοποίηση των GC έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του cGMP, το οποίο οδηγεί στη χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι σε φυσιολογικά άτομα τα επίπεδα του εισπνεόμενου οξυγόνου ρυθμίζουν τη λειτουργικότητα των iNOS συνθετασών και την παραγωγή NO (15), ενώ σε περιπτώσεις οξειδωτικής ανισορροπίας η παραγωγή του NO εμφανίζεται αυξημένη. Αυτή η αύξηση προκαλείται τόσο από την παρουσία φλεγμονής όσο και από ελαττωμένη ικανότητα αποικοδόμησής του. Υπάρχουν ακόμη ισχυρές ενδείξεις ότι η σηματοδότηση από NO μπορεί να επιδράσει στη μεταγραφή διάφορων γονιδίων, μέσω ισχυρών μεταγραφικών παραγόντων όπως του NF-k-B και της ενεργοποιούσας πρωτεΐνης-1 (AP- 1) (17). Επιπρόσθετα, τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από το NO μπορεί να ρυθμίζουν τον αριθμό των μεμβρανικών υποδοχέων για το ασπαρτικό και να τροποποιούν πρωτεΐνες- μηνύτορες, όπως το p21ras και η πρωτεϊνική κινάση C (18).

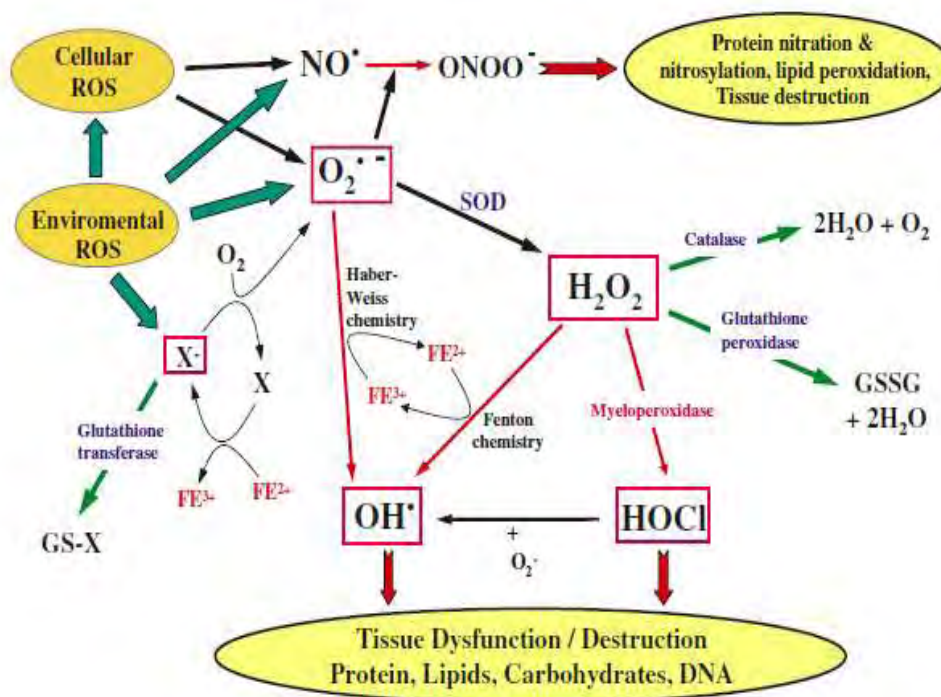
2.2 Οξειδωτικό στρες

2.2.1 Οξειδωτικό στρες

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:

1. ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$),
2. ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως (HClO),
3. συνδυασμούς ελεύθερων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}^{2-}$) και
4. μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).

Τα μόρια αυτά είναι πολύ ασταθή με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, μετατρέποντάς τα σε ελεύθερες ρίζες (19), ενώ τα ίδια μετατρέπονται στις οξειδωμένες μορφές τους και έτσι διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Μόρια τα οποία οξειδώνονται από τις ROS είναι οι πρωτεΐνες, το DNA αλλά και τα λιπίδια τόσο της κυτταρικής μεμβράνης όσο και ελεύθερα λιπίδια της κυκλοφορίας. Οι βλάβες που προκαλούνται είναι είτε άμεσες είτε έμμεσες λόγω ενεργοποίησης δευτερογενών μεταβολικών διεργασιών. Η αλληλεπίδραση των ROS με άλλα μόρια μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της δραστηριότητας σηματοδοτικών μονοπατιών και ενεργοποίηση γονιδίων (3) (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν κυρίως με τις πλευρικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης των κυττάρων, με προτίμηση στις αλυσίδες που περιέχουν διπλούς δεσμούς όπως το αραχιδονικό οξύ (19, 20).

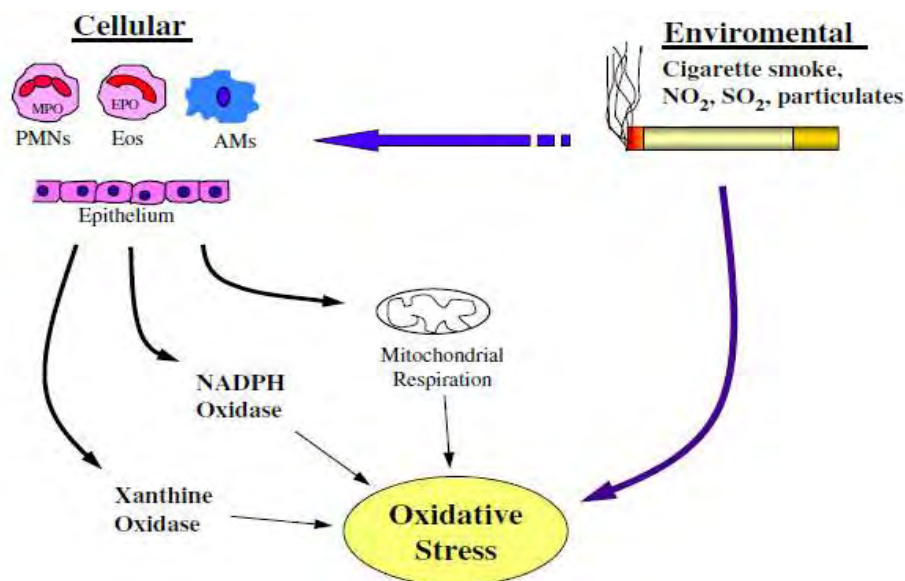


Εικόνα 3. Δράσεις των ROS. Kirkham et al 2006

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προέρχονται από εξωγενείς αλλά και ενδογενείς πηγές. Είναι για παράδειγμα συστατικά των ατμοσφαιρικών ρύπων αλλά και του καπνού που προέρχεται από το τσιγάρο. Ενδογενώς παράγονται σε φυσιολογικές συνθήκες σε κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και από ένζυμα του οργανισμού όπως η οξειδάση της ξανθίνης, μονο-οξυγενάσες και κύκλο-οξυγενάσες (1), αλλά και από την αυτοοξειδωση μικρών μορίων όπως η ντοπαμίνη, οι φλαβίνες, η επινεφρίνη και οι υδροκινόνες (20). Παράγονται όμως και σε παθολογικές καταστάσεις από κύτταρα της φλεγμονής, όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και μακροφάγα (21, 22, 23).

Όταν ο ρυθμός παραγωγής των ROS είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό απομάκρυνσής τους τότε ο οργανισμός υποβάλλεται σε οξειδωτικό στρες. Και περιγράφεται από μια ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ή αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), όπως το NO και στην

ικανότητα για αδρανοποίησή τους από τα βιολογικά συστήματα ενός οργανισμού. Η αυξημένη παρουσία των οξειδωτικών μορίων μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή τους στο εσωτερικό, όπως κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, είτε σε επιπλέον παροχή τους από το εξωτερικό περιβάλλον όπως ο καπνός του τσιγάρου που περιέχει περισσότερες από 10^6 διαφορετικές ROS (Εικόνα 4) (3).



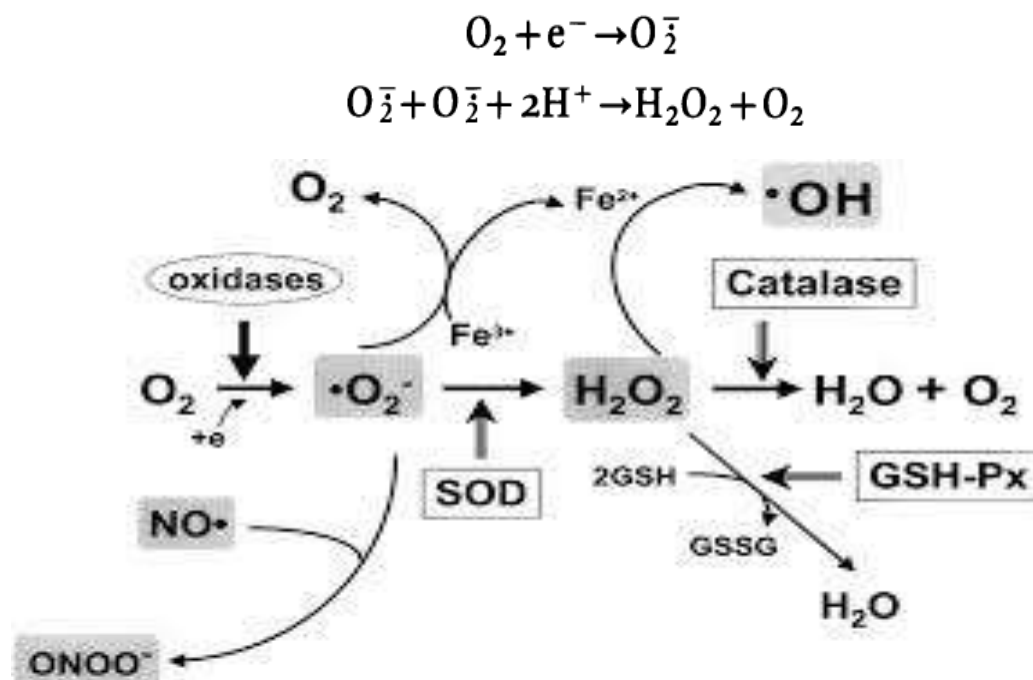
Εικόνα 4. Πηγές οξειδωτικού στρες. Kirkham et al 2006

Η κύρια πηγή ROS είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ενώ μπορούν να παραχθούν και από τις αντιδράσεις ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως και από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, H_2O_2 μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450 (2).

2.2.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου: σύνθεση-αποικοδόμηση

Μεταξύ των ROS σημαντικό ρόλο παίζει το H_2O_2 , το οποίο παρόλο που δεν διαθέτει ελεύθερο φορτίο, αποτελεί ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο. Το μόριο αυτό

παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό καθώς τα ηλεκτρόνια που κατά λάθος διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση των μιτοχονδρίων μετατρέπουν το οξυγόνο σε ιόν οξυγόνου και αυτό με τη σειρά του μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με τη βοήθεια της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (superoxide dismutase SOD) (19) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Μεταβολισμός του H₂O₂. Halliwell et al 1989

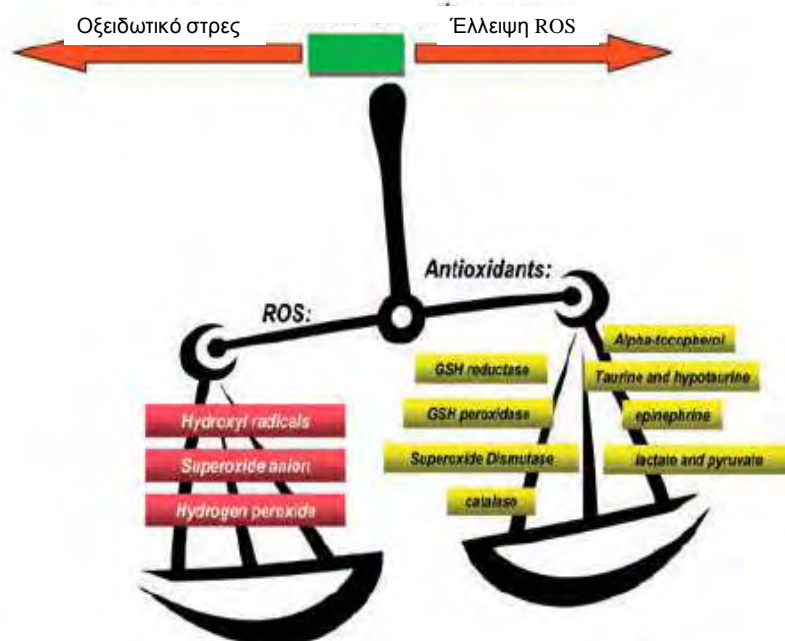
Η υψηλή τοξικότητα του H₂O₂ για τους παρακείμενους ιστούς, καθώς σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί βλάβες στο DNA, διαταραχές στη μεμβράνη και απελευθέρωση ιόντων Ca⁺² στα κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιήσουν πρωτεολυτικά ένζυμα, καθιστά αναγκαία την άμεση απομάκρυνση ή απενεργοποίησή του. Τον ρόλο αυτό επιτελούν τα ένζυμα της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, τα οποία δρουν συζευγμένα με την δισμουτάση του υπεροξειδίου προς απομάκρυνσή του τη στιγμή της δημιουργίας του. Το τελευταίο ένζυμο συγκεκριμένα χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο για την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSC). Η

μέτρηση του υπεροξειδίου στον οργανισμό είτε στο αίμα είτε σε διάφορα υγρά ή ιστούς είναι προβληματική λόγω του μικρού χρόνου ζωής του και έτσι συχνά χρησιμοποιούνται έμμεσες μετρήσεις όπως οι συγκεντρώσεις των παραπάνω υποστρωμάτων (GSH και GSSC) (19).

2.2.3 Προστασία από το οξειδωτικό στρες

Ο οργανισμός διαθέτει ένα ‘οπλοστάσιο’ ενζύμων τα οποία έχουν ως ρόλο την απενεργοποίηση των ROS. Στα ένζυμα αυτά ανήκουν οι καταλάσες, οι δισμουτάσες και οι υπεροξειδάσες. Επιπλέον, υπάρχουν μόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών, που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται και συστατικά τροφών, όπως οι βιταμίνες A, D και E, κάποια μεταλλικά ιόντα, καθώς και οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή.

Όταν η ισορροπία ανάμεσα σε ROS και αντιοξειδωτικά προϊόντα διαταράσσεται με υπέρσχυση των οξειδωτικών στοιχείων προκαλούνται βλάβες στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, ακόμα και στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Οι βλάβες αυτές μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και απόπτωση των κυττάρων, κυτταρικό δηλαδή θάνατο. Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται μετά από υπερβολική προσφορά οξυγόνου, για παράδειγμα στους μύες κατά την έντονη άσκηση (Εικόνα 6).



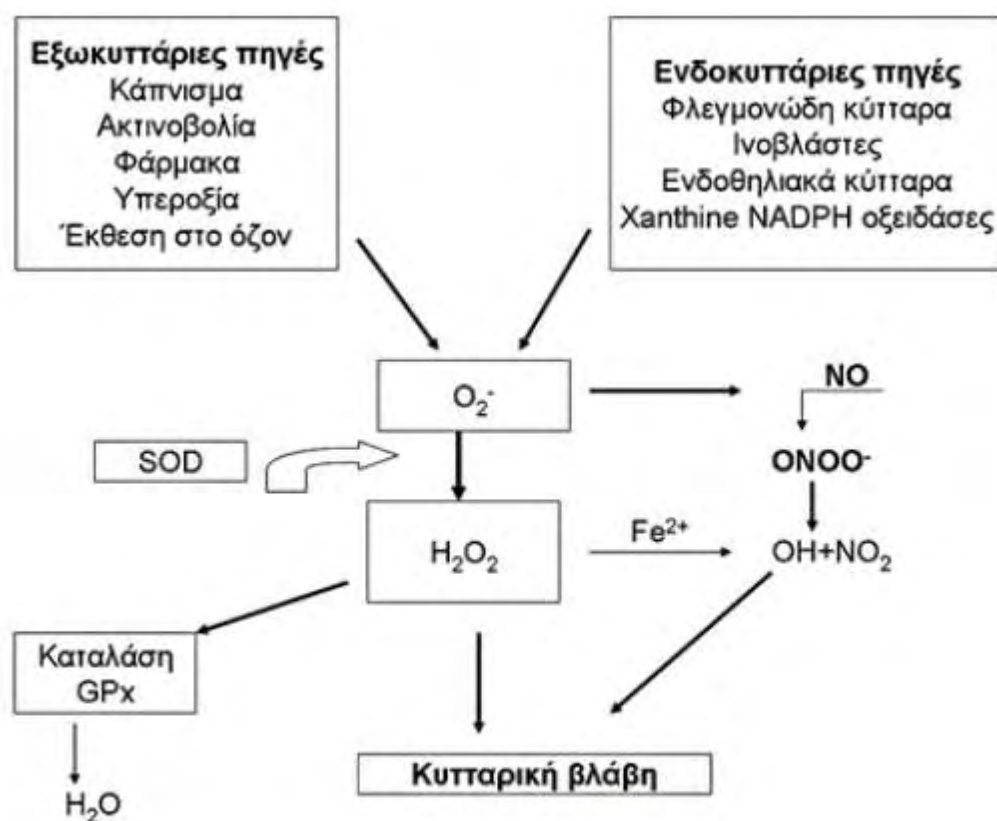
Εικόνα 6. Ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων
Garrido et al 2004

2.3 Ρόλος του οξειδωτικού στρες στο αναπνευστικό σύστημα

Στο αναπνευστικό σύστημα παρατηρείται ένα πλήθος από χρόνιες φλεγμονώδους νόσους στις οποίες η παρουσία κυττάρων που συμμετέχουν στην φλεγμονή και η παραγωγή από αυτά τα κύτταρα οξειδωτικών μορίων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία τους. Επιπλέον, η παρουσία κυτταροκινών της φλεγμονής λειτουργεί χημειοτακτικά για περαιτέρω φλεγμονώδη κύτταρα, η παρουσία των οποίων οδηγεί σε επιδείνωση των συμπτωμάτων της νόσου, ενώ τα ίδια τα οξειδωτικά μόρια συχνά επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών.

Οι πηγές των οξειδωτικών μορίων στο αναπνευστικό πρέπει να διακριθούν σε εξωτερικές και εσωτερικές (Εικόνα 7). Οι εξωτερικές πηγές αφορούν τεχνητές συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το άτομο κατά τη διάρκεια της ζωής του, όπως το κάπνισμα, η ακτινοβολία, η έκθεση σε όζον, κυρίως μέσω των καυσαερίων της ρύπανσης, η υπεροξία, η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, μέσω των τροφίμων και του

σύγχρονου τρόπου ζωής, καθώς και η λήψη φαρμακευτικών ουσιών (24). Από την άλλη πλευρά οι εσωτερικές πηγές περιλαμβάνουν την παραγωγή οξειδωτικών μορίων από φλεγμονώδη κύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, κατά την εκδήλωση της φλεγμονώδους αντίδρασης ή ως απόκριση σε τραυματισμούς καθώς και από τις οξειδάσες που υπάρχουν φυσιολογικά μέσα στο κύτταρο και έχουν ως στόχο την αδρανοποίηση τοξικών προϊόντων (25, 26).



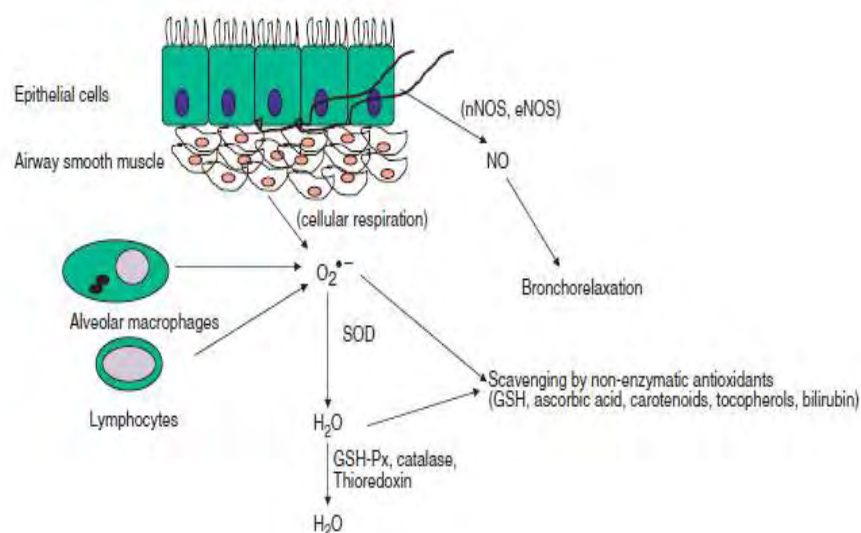
Εικόνα 7. Πηγές οξειδωτικών μορίων Rahman et al 2006

Ιδιαίτερη σημασία δίνεται σε διάφορες μελέτες στην συσχέτιση του καπνού του τσιγάρου με το οξειδωτικό στρες. Ο καπνός του τσιγάρου στην αέρια μορφή του περιέχει περισσότερα από 10^{15} οξειδωτικά μόρια per puff, καθώς και υψηλές συγκεντρώσεις O_2^- και NO. Η υγρή μορφή περιέχει οργανικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας H_2O_2 , O_2^- και OH (25, 26). Το

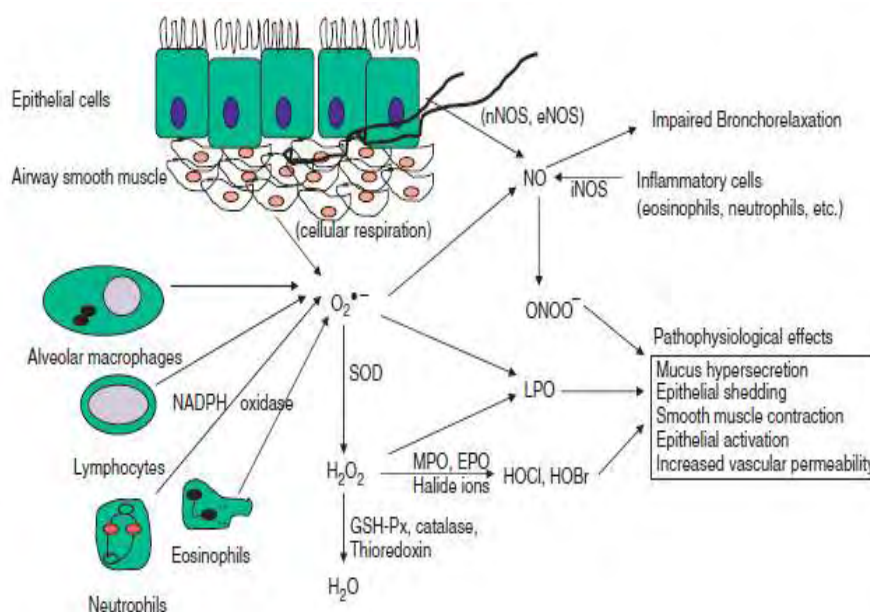
αναπνευστικό σύστημα στην προσπάθειά του να αποκαταστήσει την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων αυξάνει την παραγωγή αντιοξειδωτικών μορίων όπως η GSH, το ασκορβικό οξύ και η NADPH που μειώνουν μεν το οξειδωτικό φορτίο αλλά το επαναφέρουν στην αρχική αντίδραση με αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή O_2 , καθώς είναι διαθέσιμο για μια εκ νέου διάσπαση στα τοξικά προϊόντα του (24, 26).

2.3.1 Επίδραση οξειδωτικού στρες στους αεραγωγούς

Οι ποσότητες του οξυγόνου που εισέρχονται στους πνεύμονες φυσιολογικά μεταβολίζονται χωρίς να προκαλείται πρόβλημα στα κύτταρα (Εικόνα 8). Ωστόσο σε περίπτωση που εμφανίζονται δυσλειτουργίες στους μηχανισμούς διοχέτευσης του οξυγόνου παράγονται στο αναπνευστικό σύστημα ROS οι οποίες προκαλούν προβλήματα (Εικόνα 9). Οι δυσλειτουργίες αυτές μπορεί να οφείλονται σε παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, με αποτέλεσμα να δημιουργείται αύξηση στο οξειδωτικό δυναμικό των ιστών, η οποία επιδεινώνει περαιτέρω τις παθολογικές αυτές καταστάσεις (27).



Εικόνα 8. Μεταβολισμός του O_2 στους πνεύμονες.
Nadeem et al 2008



Εικόνα 9. Μεταβολισμός του O_2 στους πνεύμονες παρουσία φλεγμονής.
Nadeem et al 2008

2.3.2 Παθοφυσιολογία, ασθένειες

Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες όσον αφορά την φυσιολογική λειτουργία των αεραγωγών, καθώς έχειδειχθεί ότι μπορεί να επηρεάσει την ικανότητά τους να αποκρίνονται σε εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα, μέσω σύσπασης.

Η παρουσία οξειδωτικού στρες στο αναπνευστικό σύστημα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία παρατηρείται στις χρόνιες παθήσεις του συστήματος επηρεάζει διάφορες παραμέτρους της φυσιολογικής λειτουργίας. Για παράδειγμα, η αυξημένη παρουσία οξειδωτικών παραγόντων έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την συσταλτικότητα των λείων μυών των αεραγωγών, είτε αυτοί βρίσκονται ήδη σε σύσπαση κατά τη διάρκεια κρίσεων αποφρακτικών παθήσεων του αναπνευστικού, είτε βρίσκονται σε χάλαση, παρεμβαίνοντας και τροποποιώντας τον μηχανισμό σύσπασης που αναφέρθηκε προηγουμένως (28, 29). Η εμπλοκή των οξειδωτικών παραγόντων στην ικανότητα διόδου του αέρα διαμέσου των αεραγωγών δείχνει την

ιδιαίτερη κλινική τους σημασία στην έκβαση των εξάρσεων των φλεγμονωδών παθήσεων του αναπνευστικού και κατ' επέκταση στην ποιότητα ζωής των ασθενών.

Η αξιολόγηση και μελέτη των οξειδωτικών μορίων στις διάφορες παθήσεις γίνεται με επεμβατικές μεθόδους (βρογχοσκόπηση, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)) ή/και με τις νεότερες μη επεμβατικές μεθόδους, όπως η ανίχνευσή τους στον εκπνεόμενο αέρα και στο συμπύκνωμα αυτού (29).

2.3.2.1 Άσθμα

Αρκετές μελέτες σε βιολογικά υγρά όπως: περιφερικό αίμα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, κύτταρα βρογχικού βλεννογόνου, εκπνεόμενο αέρα, συμπύκνωμα, ακόμη και ούρα, έχουν δείξει αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα με συνυπάρχουσα διαταραχή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, καθώς επίσης και συμμετοχή ελεύθερων ριζών στην παθογένεια και παθοφυσιολογία της νόσου (29, 30). Υπάρχουν ενδείξεις συσχέτισης του οξειδωτικού στρες με την υποκείμενη φλεγμονή ή σε ορισμένες περιπτώσεις και με τη βαρύτητα της νόσου (30), όπως και στις περισσότερες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού.

Μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι ιδιαίτερα υψηλά τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά που πάσχουν από άσθμα. Οι συγκεντρώσεις των οξειδωτικών μορίων εμφανίζονται αυξημένες τόσο στους πνεύμονες, όσο και στην κυκλοφορία του αίματος, αναδεικνύοντας την έκταση των πιθανών βλαβών, οι οποίες δεν περιορίζονται στο αναπνευστικό σύστημα. Έχει βρεθεί ότι αυτά τα μόρια είναι παρόντα ακόμη και σε άτομα με ελεγχόμενο άσθμα (30, 31, 32). Έμμεσοι αλλά και άμεσοι δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως η οξειδωμένη γλουταθειόνη, έχουν ανιχνευθεί στα ούρα, το πλάσμα, το σάλιο και το BAL ασθματικών ασθενών (30, 31,

32, 33). Τα επίπεδα των παραπάνω δεικτών εμφανίζουν συσχέτιση με την βαρύτητα της ασθένειας.

Μεταβολές έχουν παρατηρηθεί και στην παρουσία των αντιοξειδωτικών μορίων σε άτομα που πάσχουν από άσθμα, τόσο σε ασθενείς με σταθεροποιημένο άσθμα, όσο και σε άτομα που βρίσκονται σε κρίση. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στην απενεργοποίηση των οξειδωτικών μορίων (31, 24). Πολλές μελέτες επικεντρώνονται στην ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων που παρατηρούνται στο άσθμα, ενώ λιγότερα στοιχεία υπάρχουν για την συσχέτιση μεταξύ των κρίσεων του άσθματος και την παρουσία του οξειδωτικού στρες.

Η έκθεση πειραματόζων *in vivo* και η έκθεση ανθρώπινου ιστού αεραγωγών *in vitro* έχει δείξει ότι διάφορα οξειδωτικά μπορούν να προκαλέσουν βρογχοσύσπαση και υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (33, 34, 35). Έχει βρεθεί επίσης ότι οι ROS συμμετέχουν στη βλάβη του επιθηλίου, η οποία χαρακτηρίζει την ασθματική φλεγμονή. Επιπλέον, αυξάνουν την έκκριση βλέννας και προκαλούν εξαγγείωση οδηγώντας στο σχηματισμό οιδήματος. Είναι πιθανό ακόμη να προκαλέσουν διαταραχή στην ισορροπία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, μεταξύ της βρογχοσύσπασης, της εξαρτώμενης από τη χολινεργική οδό και της βρογχοδιαστολής, της εξαρτώμενης από το αδρενεργικό σύστημα (35).

Οι ROS ενέχονται ακόμη και στην παρόξυνση του άσθματος με μηχανισμούς που μετέχουν τόσο στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών όσο και στην έκκριση βλέννας (35). Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών εκφράζουν ισχυρά το NEP (ουδέτερη ενδοπεπτιδάση) που αποτελεί σημαντικό ένζυμο στην αποδόμηση πεπτιδίων με βρογχοσυσπαστική δράση, όπως οι ταχυκινίνες (ουσία P και ταχυκινίνη A), η βραδυκινίνη και η ενδοθηλίνη-1. Πολλοί παράγοντες που οδηγούν σε εξάρσεις

άσθματος, μεταξύ των οποίων και τα οξειδωτικά, φαίνεται να ρυθμίζουν αρνητικά τη λειτουργία του επιθηλιακού NEP (31).

Σε μεγάλο ποσοστό ασθματικών ασθενών, που πάσχουν ακόμη και από ήπιες μορφές της νόσου, έχει ανιχνευθεί κυρίως στον εκπνεόμενο αέρα, H_2O_2 μεταξύ άλλων ROS. Η παρουσία αυτής της ένωσης αποτελεί ένδειξη αυξημένης παραγωγής οξειδωτικών μορίων ή/και μειωμένης παραγωγής αντιοξειδωτικών παραγόντων στους αεραγωγούς αυτών των ασθενών. Τα αυξημένα επίπεδα στον εκπνεόμενο αέρα έχουν συσχετισθεί με διαφοροποιημένη παρουσία ηωσινόφιλων στα πτύελα των ασθενών και αυξημένη δραστηριότητα των περιφερικών ουδετερόφιλων (36, 37). Η έλλειψη φορτίου στο μόριο του υπεροξειδίου το καθιστά ιδιαίτερα ευκίνητο, καθώς μπορεί να διαπερνά οποιαδήποτε κυτταρική μεμβράνη ή αεραγωγό. Το H_2O_2 στους ασθματικούς ασθενείς έχει συσχετισθεί με την παρουσία προϊόντων του θειο-βαρβιτουρικού οξέος σε συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα, όπως και νιτρικού οξέος, αλλά και με υπεραντιδραστικότητα του αεραγωγού στη μεθαχολίνη η οποία οδηγεί σε βρογχοσπασμό (32, 38, 39). Η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών συσχετίζεται εξάλλου και με τον μέσο αριθμό των λευκοκυττάρων, τα οποία αυξάνονται στην φλεγμονή, και πιο συγκεκριμένα των μαστοκυττάρων, αλλά και των ενεργοποιημένων ηωσινόφιλων και CD8 CD45RO κυττάρων (35, 36).

Η επιδείνωση που παρατηρείται στη διάρκεια των ασθματικών κρίσεων σχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση φλεγμονής στους αεραγωγούς, αλλά και με την παρουσία οξειδωτικού στρες, τόσο συστηματικά όσο και τοπικά στους πνεύμονες (40). Παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχθεί άμεση συσχέτιση μεταξύ της οξειδωτικής ανισορροπίας και της έναρξης μιας ασθματικής κρίσης. Η υπάρχουσα θεωρία υποστηρίζει ότι πιθανόν η παραγωγή των ROS ενισχύεται από παράγοντες που εκκρίνονται κατά την φλεγμονή, όπως ο TNF α και η IL1 β , οι οποίοι ενεργοποιούν

οξειδάσες, που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των οξειδωτικών μορφών (41, 42, 43).

2.3.2.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Τα άτομα που πάσχουν από ΧΑΠ, εμφανίζουν οξειδωτικό στρες, το οποίο οφείλεται εν μέρει στα οξειδωτικά μόρια, αλλά και στις ουσίες που επάγουν την σύνθεση ROS και βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου, αλλά και στην αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίων λόγω των ουδετερόφιλων που εμφανίζονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο αίμα κατά τη διάρκεια της χρόνιας φλεγμονής (40). Η αυξημένη παρουσία των οξειδωτικών μορίων οδηγεί σε βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω οξείδωσης των λιπιδίων τους, τα παράγωγα των οποίων ανιχνεύονται σε αυξημένες ποσότητες στο πλάσμα, αλλά και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΧΑΠ (41, 42, 43, 44).

Παρόλο που στην ΧΑΠ, όπως και σε άλλες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού παρατηρείται αύξηση στα ποσοστά των ουδετερόφιλων στο αίμα, τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην δημιουργία οξειδωτικού στρες, η έλλειψη άμεσων μετρήσεων οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων στους ασθενείς αυτούς καθιστά την εκτίμηση της οξειδωτικής ανισορροπίας δύσκολη. Υπάρχουν ωστόσο ικανοποιητικά στοιχεία, που δείχνουν ότι η δημιουργία αυτής της ανισορροπίας παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου, μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων ευαίσθητων στο αναγωγικό δυναμικό, οι οποίοι προωθούν την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων, αλλά και αντιοξειδωτικών γονιδίων (3).

2.3.2.3 Άλλες παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού

Παρόμοια με το άσθμα και την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Το οξειδωτικό φορτίο αυξάνεται στους ασθενείς λόγω της αυξημένης παρουσίας φλεγμονωδών κυττάρων τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ROS (44, 45, 29), ενώ όπως είναι αναμενόμενο αυξάνεται και η συγκέντρωση των προϊόντων της δράσης των οξειδωτικών μορίων. Τα συμπτώματα των ασθενειών, όπως η δύσπνοια, έχειδειχθεί ότι επιδεινώνονται παρουσία οξειδωτικών μορίων, όπως το H_2O_2 και το 8-ισοπροστάνιο, τα οποία ανιχνεύονται σε βιολογικά υγρά, όπως αίμα, πτύελα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, αλλά και στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (46). Αυτά τα οξειδωτικά μπορεί να προέρχονται είτε από τοπικό είτε από γενικευμένο οξειδωτικό στρες στον οργανισμό των ασθενών ή στο εσωτερικό των κυττάρων τους. Ο μηχανισμός δράσης που προτείνεται είναι παρόμοιος με αυτόν που ενεργοποιείται στο άσθμα. Μελέτες δείχνουν ότι το αναγωγικό δυναμικό των κυττάρων και η παρουσία οξειδωτικού στρες συμβάλουν στην εξέλιξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, όπως και σε άλλες παθήσεις των πνευμόνων με παρουσία ίνωσης και φλεγμονής όπως η σαρκοείδωση και η διάχυτη πνευμονική ίνωση (47, 48), αλλά και σε διαφόρων τύπων βρογχεκτασίες (49). Ύπαρξη οξειδωτικού στρες έχει αναφερθεί ακόμα και σε μεγάλης έντασης αλλά μικρής διάρκειας παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού όπως το οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) (50, 51).

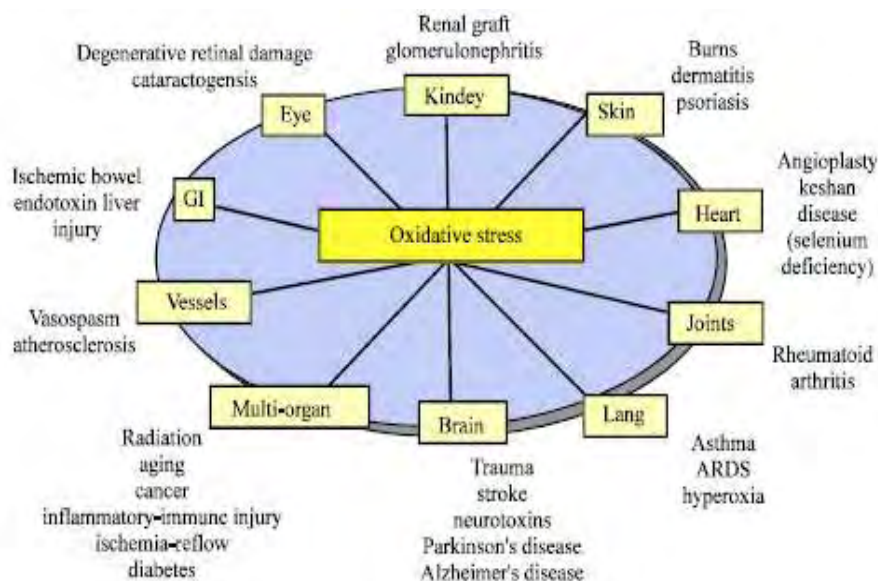
Σημαντικό δε ρόλο παίζει και η καπνιστική συνήθεια, καθώς ο καπνός του τσιγάρου είναι από μόνος του πηγή οξειδωτικών μορίων, ενώ η φλεγμονή που προκαλεί στους αεραγωγούς αποτελεί επιπλέον επιβάρυνση σε οξειδωτικό φορτίο. Μελέτες δείχνουν ότι τόσο οι συγκεντρώσεις οξειδωτικών μορίων, όσο και αυτές των

αντιοξειδωτικών που παράγει ο οργανισμός είναι ιδιαίτερα αυξημένες στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές (52, 53).

2.3.3 Άλλες παθήσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως το Alzheimer, στο οποίο ανιχνεύονται υπεροξειδωμένα λιπίδια και πρωτεΐνες που συσσωρεύονται στα λυσοσώματα των εγκεφαλικών κυττάρων (1), αλλά και στη νόσο του Parkinson και την χορεία του Huntington. Το οξειδωτικό στρες, πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, κυρίως μέσω του σχηματισμού αθηρωμάτωσης, λόγω της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο, αλλά και μέσω του τραυματισμού του μυοκαρδίου, που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας, καθώς η αποκατάσταση της ροής του οξυγόνου οδηγεί στο σχηματισμό ROS (54).

Η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες έχει διαπιστωθεί επίσης σε ασθένειες όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή και το σύνδρομο εύθραυστου Χ χρωμοσώματος, όπως και το σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως (1) (Εικόνα 10). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι σε άτομα μεγάλης ηλικίας παρουσιάζεται μεγαλύτερη διαρροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, καθώς τα μιτοχόνδρια υπολειτουργούν, οδηγώντας, όπως προαναφέρθηκε, στην παραγωγή ROS, ιδιαίτερα δε σε αυτούς που εμφανίζουν επιπλέον και μυϊκή ατροφία λόγω γήρανσης (55).



Εικόνα 10. Οξειδωτικό στρες και ασθένειες. Galli et al 2005

2.4 Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού στρες σε παθήσεις του αναπνευστικού

Μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες επάγει βλάβες σε επίπεδο κυττάρων στους αεραγωγούς και όχι μόνο. Μεταξύ των ROS που παράγονται κατά την φλεγμονή, το H_2O_2 εμφανίζει την μεγαλύτερη ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλεί βλάβες στο εσωτερικό των κυττάρων (58, 59). Παρόλα αυτά οι ρόλοι του υπεροξειδίου δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί. Είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβες σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και επηρεάζει την ίδια την σύσπαση των λείων μυών του αναπνευστικού αλλά και άλλων συστημάτων, χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχθεί ποιος από τους προτεινόμενους μηχανισμούς είναι ο επικρατέστερος. Έχει προταθεί ότι η δράση του H_2O_2 επηρεάζεται από την παρουσία του επιθηλίου, καθώς η αφαίρεση του επιθηλίου τροποποιεί την επαγόμενη χάλαση των λείων μυών (9). Η δράση των οξειδωτικών μορίων μελετάται σε σχέση με το επιθήλιο των αεραγωγών, καθώς το επιθήλιο τροποποιεί τόσο την πρόσβαση των μορίων αυτών στους υποκείμενους ιστούς των λείων μυών, αλλά επηρεάζει και την

σύσπαση των αεραγωγών μέσω της παραγωγής μορίων όπως το NO, τα οποία σε συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να θεωρηθούν ως ROS (16).

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης του H_2O_2 που έχει προταθεί περιλαμβάνει την επίδρασή του στα ιόντα Ca^{+2} , τα οποία συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της σύσπασης. Τα ερευνητικά ευρήματα και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται αντικρουόμενα, καθώς έχει δειχθεί ότι το H_2O_2 συμμετέχει στην υπερπόλωση τραχείας σκύλου, η οποία έχει υποστεί σύσπαση με καρβαχόλη (56), ελαττώνοντας την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{+2} , που επάγεται από την καρβαχόλη στα λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι προκλήθηκε αύξηση στο ενδοκυττάριο Ca^{+2} μετά την επίδραση του H_2O_2 (57).

2.5 Πιθανές κλινικές εφαρμογές-θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η ταυτόχρονη παρουσία φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στο αναπνευστικό σύστημα ασθενών που πάσχουν από χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού, αλλά και η συσχέτιση του οξειδωτικού δυναμικού του οργανισμού με την αντίδραση αλλά και την συχνότητα των εξάρσεων της φλεγμονής, οδηγεί σε θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τόσο ελάττωση της φλεγμονής, όσο και επαναφορά της οξειδωτικής ισορροπίας. Έχει βρεθεί ότι στις φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού παρατηρείται αύξηση των ουδετερόφιλων, των ηωσινόφιλων, των μαστοκυττάρων αλλά και των λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα ενεργοποιούνται ανοσολογικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν τις IL-5 και IL-8. Και τα δύο αυτά μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, οι οποίες σε συνδυασμό με την έκθεση σε εξωγενή οξειδωτικά μόρια που προέρχονται από τον καπνό του τσιγάρου ή την ρύπανση, οδηγούν σε έναν φαύλο κύκλο αύξησης του οξειδωτικού φορτίου του αναπνευστικού. Η φλεγμονή οδηγεί σε παραγωγή ROS και το επαγόμενο οξειδωτικό

στρες προκαλεί βλάβες και αποκρίσεις που ενεργοποιούν την φλεγμονή με αποτέλεσμα την επιδείνωση της ποιότητας ζωής των ασθενών (58).

Η θεραπευτική προσέγγιση που θα μπορούσε να προταθεί θα έπρεπε να περιλαμβάνει ελάττωση της φλεγμονής στο ένα σκέλος της , αλλά και ταυτόχρονη ελάττωση του οξειδωτικού φορτίου. Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται η κλινική έρευνα με διερεύνηση της χορήγησης αντιοξειδωτικών παραγόντων, κυρίως μέσω της τροφής, προκειμένου να σταματήσει η δημιουργία οξειδωτικής ανισορροπίας στον οργανισμό των ασθενών (59) (Πίνακας 1).

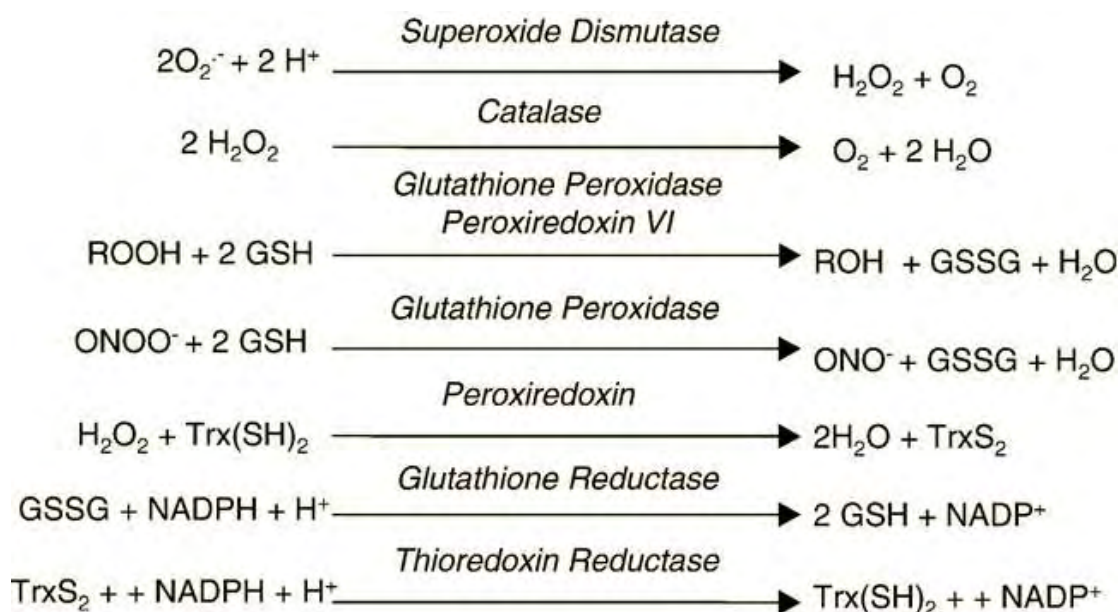
Μια άλλη πιο μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην περαιτέρω ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων στον οργανισμό ατόμων που παρουσιάζουν οξειδωτικό στρες και φλεγμονή (3). Σε πειραματικά πρωτόκολλα χρησιμοποιούνται συχνά αναγωγικά μόρια, όπως η Διθειοθρεϊτόλη – DTT, η οποία διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών και συμβάλει στην πλήρη μετουσίωσή τους, επιδρώντας έτσι στην παραγωγή των ROS. Μεγάλο ρόλο παίζει επίσης το pH του περιβάλλοντος του ιστού που υφίσταται το οξειδωτικό στρες, καθώς επηρεάζει την ικανότητα διάστασης και επακολούθως την παραγωγή των ROS μέσω των ενζυμικών συστημάτων των ιστών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Κυριότεροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες: Θέση, λειτουργία, εμπλεκόμενες παθήσεις.

Ένζυμο	Θέση	Λειτουργία	Παθήσεις
CuZn SOD	Βρόγχοι, κυψελίδες μακροφάγα, ινοβλάστες.	Καταστέλλει O_2^-	ΧΑΠ, Υποξία, Σαρκοείδωση, Πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας.
MnSOD	Βρόγχοι, αγγειακό ενδοθήλιο, μακροφάγα, ουδετερόφιλα.	Καταστέλλει O_2^-	Άσθμα, διάμεσα, Κάπνισμα, Σαρκοείδωση.
Καταλάση	Μακροφάγα, ινοβλάστες, πνευμονοκύτταρα.	H_2O_2 σε νερό.	Υπεροξία, άσθμα.
Περοξειδάση γλουταθιόνης	Επιθήλιο, μακροφάγα, κυψελιδικά κύτταρα.	Μετατροπή οργανικών υδροπεροξειδίων σε οργανικά υδροξείδια.	ΧΑΠ, άσθμα, ARDS, τοξικότητα από όζον, κυστική ίνωση.
Οξυγενάση αιμης	Βρόγχοι, κυψελίδες Μακροφάγα, φλεγμονώδη κύτταρα.	Μετατροπή αιμης σε CO και χολερυθρίνη.	ΧΑΠ, διάμεσα νοσήματα, κυστική ίνωση.
Θειορεντοξίνη	Βρόγχοι, κυψελίδες μακροφάγα.	Μεταγραφική τροποποίηση, Prot SS σε Prot SH.	Ca πνεύμονος, Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.
GCLss	Βρόγχοι, κυψελίδες μακροφάγα.	Σύνθεση γλουταθιόνης.	ΧΑΠ, Ca πνεύμονος.

Οι αναφορές στην βιβλιογραφία αλληλοαναιρούνται, δείχνοντας πόσο επιτακτική ανάγκη υπάρχει να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί γένεσης, ενίσχυσης και απαλοιφής του οξειδωτικού στρες, με την συμμετοχή περαιτέρω μελετών που θα βοηθήσουν στην διευκρίνιση του ρόλου του οξειδωτικού στρες στις παραμέτρους της φυσιολογικής λειτουργίας του αναπνευστικού, μεταξύ άλλων, συστήματος.

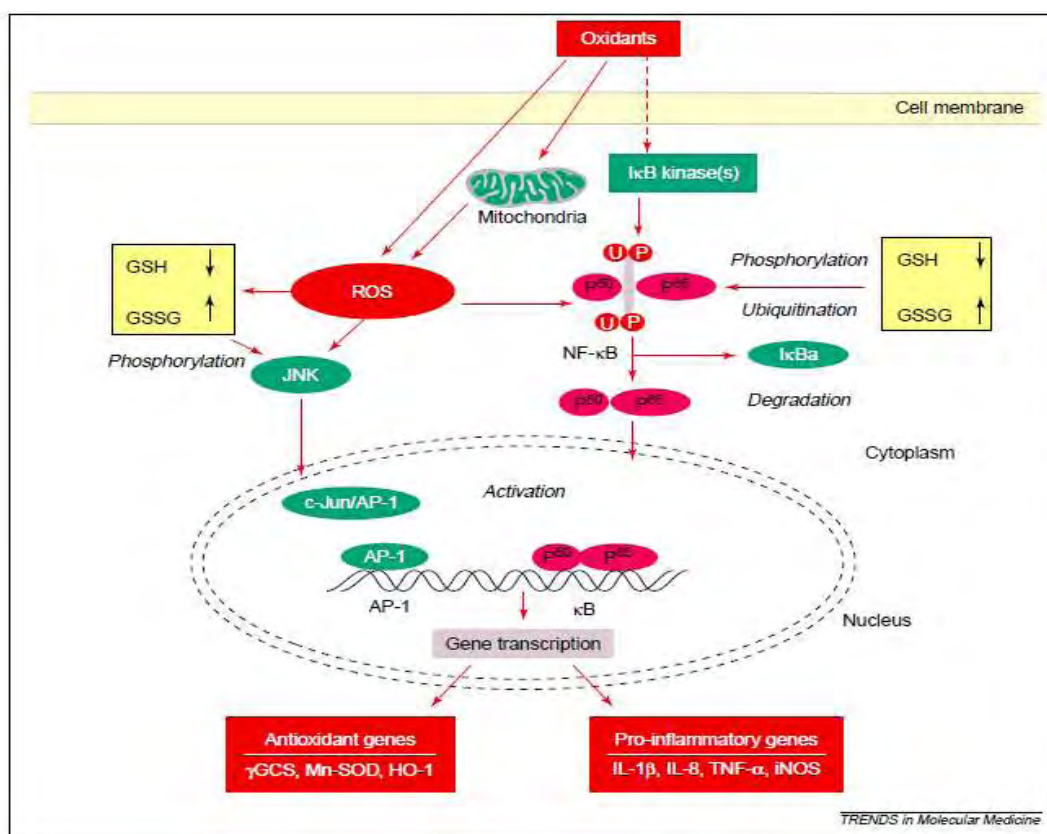
Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει μια πληθώρα φυσιολογικών μηχανισμών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εξουδετέρωση των οξειδωτικών μορίων που παράγονται φυσιολογικά στα κύτταρα (Εικόνα 11). Οι μηχανισμοί αυτοί περιέχουν την ενεργοποίηση ένζυμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την διάσπαση των ROS.



Εικόνα 11. Απενεργοποίηση οξειδωτικού στρες. Rahman et al 2006

Τα ένζυμα αυτά εκφράζονται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, ενώ η έκφρασή τους μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Αν για παράδειγμα ο οργανισμός βρεθεί σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, προκειμένου να το μειώσει ενεργοποιεί γονίδια τα οποία ενισχύουν τα αντιοξειδωτικά

μονοπάτια, αλλά και εμποδίζουν την παραγωγή φλεγμονής η οποία μπορεί να επιτείνει το οξειδωτικό στρες (Εικόνα 12). Η αυξημένη παραγωγή αντιοξειδωτικών επομένως ελαττώνει το οξειδωτικό φορτίο, επιφέροντας μια νέα ισορροπία, η οποία είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία. Το οξειδωτικό στρες εξάλλου ορίζεται ως η ανισορροπία ανάμεσα σε οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες.



Εικόνα 12. Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων . Macnee et al 2001

Τόσο τα ένζυμα του οργανισμού που απενεργοποιούν τα οξειδωτικά μόρια όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και οι υπεροξειδάσες, όσο και αυτά που ως στόχο έχουν να προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, εμποδίζοντας την ενσωμάτωση των οξειδωτικών μορίων από τα κύτταρα, όπως ρεδοξίνες, οι οξυγενάσες και οι ρεδοουκτάσες δεν είναι αρκετά για να προστατέψουν

τον οργανισμό από κυτταρικές βλάβες σε περιπτώσεις που το οξειδωτικό φορτίο είτε είναι ιδιαίτερα αυξημένο είτε η παρουσία του είναι μακροχρόνια. Στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητο να υπάρχει ενίσχυση του οργανισμού με αντιοξειδωτικά μόρια (4, 59).

Τα πιο κοινά αντιοξειδωτικά, που δεν αποτελούν ένζυμα είναι η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες C και E, τα β-καροτένια και το ουρικό οξύ (59, 26). Τα μόρια αυτά δρουν τόσο μόνα τους όσο και σε συνδυασμό με άλλες ουσίες. Για παράδειγμα, όταν η α-τοκοφερόλη αντιδρά με το ασκορβικό οξύ, δηλαδή την βιταμίνη C φαίνεται να ελαττώνονται οι συνέπειες της οξείδωσης των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών (25). Μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμη και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας μιας φλεγμονώδους νόσου του αναπνευστικού μπορεί να επηρεαστεί λόγω του οξειδωτικού ισοζυγίου, όπως η τροποποίηση της δράσης των χορηγούμενων κορτικοστεροειδών από την από-ακετυλάση-2 της ιστόνης (histone deacetylase-2 (HDAC-2), που είναι ρυθμιστής της λειτουργίας της χρωματίνης, η οποία επηρεάζεται από τις ROS στην ΧΑΠ και στο άσθμα.

Η έρευνα έχει στραφεί στην προσπάθεια χρήσης αντιοξειδωτικών, τα οποία μπορούν να χορηγηθούν κυρίως μέσω της τροφής, προκειμένου να ελαττωθούν οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Έχει βρεθεί ότι στο αίμα ασθενών που πάσχουν από άσθμα η συγκέντρωση της βιταμίνης C (22, 23) ,αλλά και του ασκορβικού οξέος και της α-τοκοφερόλης εμφανίζεται σε χαμηλά επίπεδα. Η αυξημένη κατανάλωση των ενδογενώς παραγόμενων ποσοτήτων λόγω της φλεγμονής, έχει προταθεί ως πιθανή αιτία και έχειδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών αυξάνονται με χορήγησή τους μέσω της διατροφής.

Παρόλα αυτά οι προσπάθειες χορήγησης αντιοξειδωτικών δεν είναι τόσο εύκολες ή αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στην πράξη.

Υπάρχουν δε περιπτώσεις στις οποίες έχουν χορηγηθεί ακόμη και ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως γλουταθειόνη ή πρόδρομες ουσίες της, χωρίς εντυπωσιακά αποτελέσματα (22).

Ανάγκη για ρύθμιση του οξειδωτικού φορτίου του οργανισμού δεν έχει παρατηρηθεί μόνο σε παθολογικές καταστάσεις, αλλά και σε φυσιολογικές καταστάσεις στις οποίες εμφανίζεται αύξηση στην παραγωγή των ROS, όπως κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (59), στους καπνιστές που δεν εμφανίζουν νόσους του αναπνευστικού, αλλά και κατά την άθληση. Η άσκηση για παράδειγμα, είναι δυνατό να διαταράξει την ισορροπία μεταξύ ROS και αντιροπριστικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Πολλοί αθλητές λαμβάνουν διάφορα διαιτητικά συμπληρώματα αντιοξειδωτικών, προκειμένου να αντιμετωπίσουν το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποδειχθεί κατά πόσο η έντονη άσκηση δημιουργεί επιπρόσθετη ανάγκη για λήψη αντιοξειδωτικών. Η χρήση αντιοξειδωτικών για τον περιορισμό και την επιδιόρθωση των βλαβών είναι ευρέως αμφιλεγόμενη, καθώς έχει αποδειχθεί η συσχέτιση αρκετών από αυτά με διάφορες επιπλοκές (22).

Η χορήγηση ωστόσο αντιοξειδωτικών ουσιών ελαττώνει κατά πολύ το οξειδωτικό φορτίο του οργανισμού με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS από το σώμα σε μια προσπάθεια να αποκαταστήσει την οξειδωτική του ισορροπία. Αυτή η επιπρόσθετη παραγωγή οδηγεί σε νέα προβλήματα, καθώς λόγω των βλαβών που προκαλούνται στους ιστούς ενεργοποιείται φλεγμονώδης αντίδραση, με αποτέλεσμα την επιδείνωση του οξειδωτικού στρες.

4.6 Άσκηση

Είναι γνωστό ότι η διαδικασία της γήρανσης περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και αυξημένη συχνότητα φλεγμονής στον οργανισμό, αλλά και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Οι δε διαρροές από την αναπνευστική αλυσίδα είναι ιδιαίτερα αυξημένες σε κύτταρα ατόμων μεγάλης ηλικίας. Τα δύο αυτά φαινόμενα σχετίζονται άμεσα με την παρουσία αυξημένων οξειδωτικών φορτίων στα άτομα μεγάλης ηλικίας. Η επιπλέον ελάττωση της μυϊκής λειτουργίας, λόγω ατροφίας, συμπεριλαμβανομένης και της λειτουργίας των λείων μυών στα άτομα αυτά, επιτείνει την ήδη βεβαρημένη κατάσταση (55). Μια πιθανή βελτίωση της παρουσίας του οξειδωτικού στρες και κατά επέκταση των συνεπειών του στα άτομα αυτά, θα μπορούσε να ελαττώσει αρκετά την εκδήλωση φλεγμονών και να βελτιώσει την ποιότητα ζωής τους (53).

Η άσκηση έχειδειχθεί ότι βελτιώνει την γενικότερη λειτουργία του οργανισμού, ενεργοποιώντας και μηχανισμούς, μεταξύ άλλων, που βοηθούν στην εξουδετέρωση των οξειδωτικών μορίων. Τα δε άτομα μεγάλης ηλικίας που πάσχουν και από παθήσεις του αναπνευστικού, θα μπορούσαν να βοηθηθούν ιδιαίτερα από την ελάττωση του οξειδωτικού φορτίου (55). Βέβαια, μια τέτοια προσέγγιση δεν θα έπρεπε να περιοριστεί μόνο σε μεγαλύτερα, αλλά και σε άτομα νεότερα, τα οποία θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αναπνευστική τους λειτουργία μέσω ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής δράσης των κυττάρων τους (60, 61).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Υλικό και Μέθοδοι

3.1.1 Έγκριση Δεοντολογίας

Η παρούσα πειραματική έρευνα εκπονήθηκε με άδεια της Εσωτερικής Επιτροπής Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (ΠΘ) μετά την υπ' αριθμ. 2-3/11-12-2013 συνεδρίασή της, όπου αποφάσισε ότι εγκρίνει την διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας.

3.1.2 Πειραματόζωα

Για την μελέτη χρησιμοποιήσαμε 13 αρσενικούς και θηλυκούς, ενήλικους (περίπου 6 εβδομάδων), λευκούς κόνικλους, του είδους *Oryctolagus cuniculus*, της ράτσας New Zealand και βάρους περίπου 2,5kg. Οι κόνικλοι διατηρήθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά υπό ελεγχόμενες συνθήκες για περίοδο 1 εβδομάδας. Τους παρέχονταν τροφή και νερό μέχρι και την ημέρα ευθανασίας τους.

Πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων κόνικλων ελέγχου, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο άλλων εγκεκριμένων πρωτοκόλλων του ΠΘ (των Χ. Καρατζαφέρη ΤΕΦΑΑ, Ι. Στεφανίδη και Α. Χατζηευθυμίου, Ιατρικής ΠΘ) για την αποφυγή ανώφελης ευθανασίας ζώων και οικονομία.

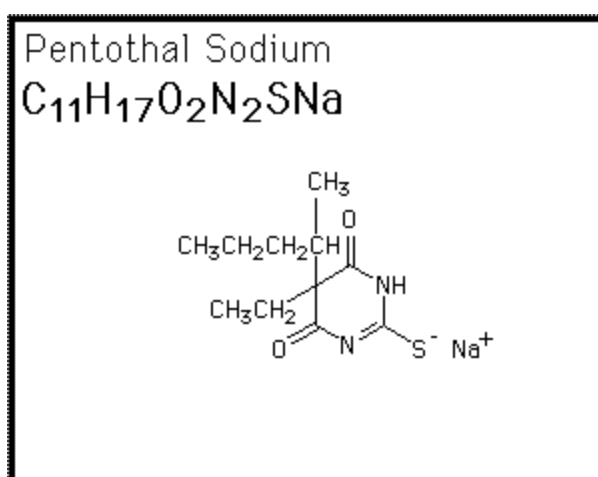
Κατά τη φύλαξη, εκτροφή, μεταφορά και θυσία των πειραματόζωων τηρήθηκαν όλα τα προβλεπόμενα από την υπ'αριθμ.86/609 Κοινοτική Οδηγία και από εγκεκριμένα πρωτόκολλα διεθνών πρακτικών δεοντολογίας, σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο στην Μονάδα Πειραματόζωων του Τμήματος Ιατρικής του ΠΘ.

3.1.3 Αναισθησία-Ευθανασία

Η αναισθησία, η διεγχειρητική παρακολούθηση και η ευθανασία πραγματοποιήθηκαν εξολοκλήρου από ιατρούς της ερευνητικής ομάδας, ενώ η

ευθανασία πραγματοποιήθηκε με ενδοφλέβια έγχυση πεντοθάλης (Abbott, Illinois, USA).

Η Πεντοθάλη ή Νατριούχος Θειοπεντόνη (Εικόνα 13) είναι μία χημική ουσία της κατηγορίας των βαρβιτουρικών βραχείας δράσης, που χρησιμοποιείται στην αναισθησιολογία ως ηρεμιστικό-κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ευθανασία των ζώων πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες στο πειραματικό χειρουργείο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του ΠΘ, με ενδοφλέβια έγχυση πεντοθάλης σε δόση 20 mg/kg, ενώ ακολούθησε καλλωπισμός της περιοχής του τραχήλου με ηλεκτρική ξυριστική μηχανή και αποστείρωση με αντισηπτικό διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης.



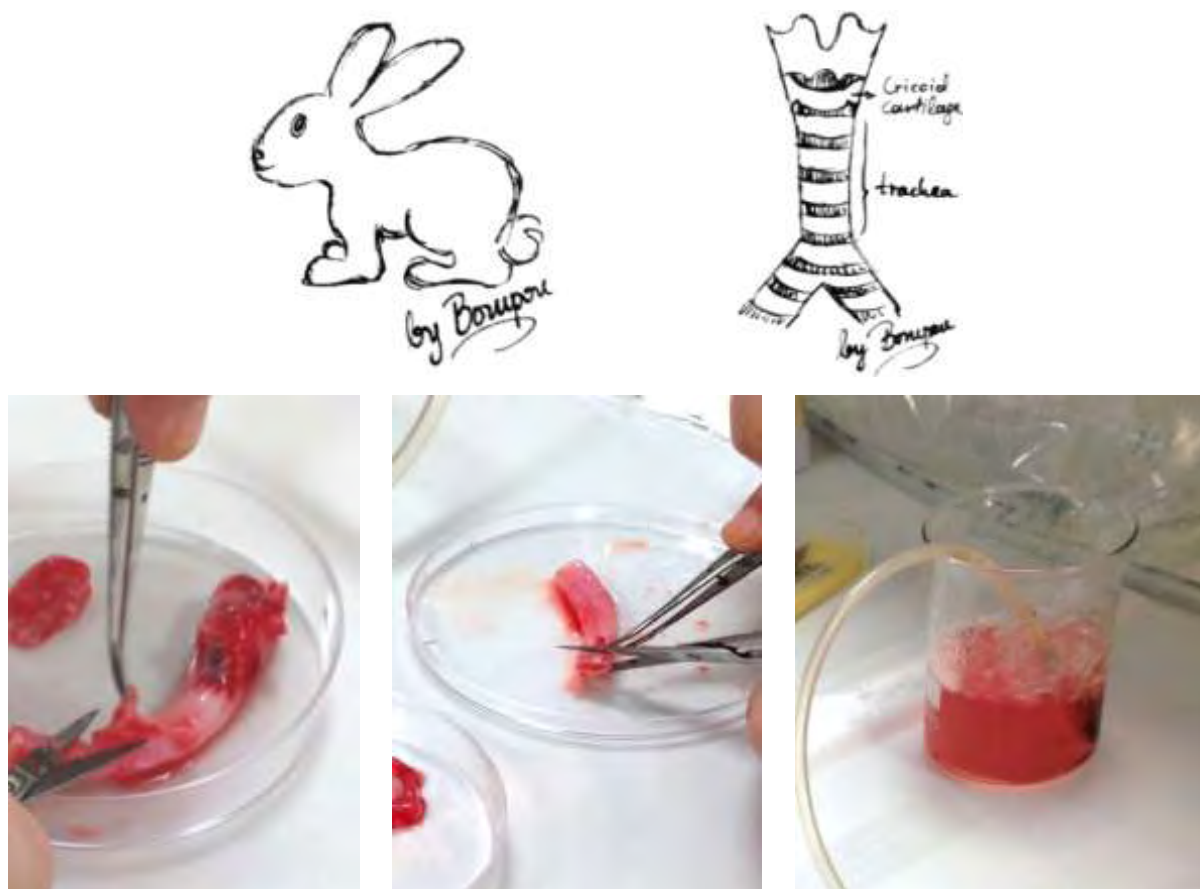
Εικόνα 13. Δομή και Μοριακός τύπος (C₁₁H₁₇N₂NaO₂S) Νατριούχου Θειοπεντόνης (Pentothal Sodium). Σχετική Μοριακή Μάζα: 264.32 g/mol

3.1.4 Δειγματοληψία

Προχωρήσαμε σε χειρουργική διάνοιξη του τραχήλου και ανεύρεση της τραχείας. Η αφαίρεσή της έγινε εκ των άνωθεν στο ύψος του κρικοειδούς χόνδρου, και εκ των κάτωθεν στο ύψος της εισόδου της στον θώρακα. Στη συνέχεια

απομακρύνθηκαν από την τραχεία οι περιβάλλοντες συνδετικοί ιστοί στο συντομότερο χρονικό διάστημα και εμβαπτίστηκε αμέσως σε διάλυμα Krebs με την ακόλουθη σύσταση: Na^+ 137mM, Mg^{2+} 1.1mM, K^+ 5.9mM, Cl^- 123.0mM, Ca^{2+} 2mM, H_2PO_4^- 1.2mM, HCO_3^- 24.9mM και γλυκόζη 9.6mM. Στο διάλυμα υπήρχε συνεχής παροχή μείγματος 95% O_2 - 5% CO_2

Το μέσο τμήμα της τραχείας τεμαχίστηκε σε κρίκους πλάτους περίπου 3mm. Κάθε κρίκος περιείχε 2-3 ημικρίκια χόνδρου με αντίστοιχη περιοχή λείων μυϊκών ινών. Εν συνεχεία, οι κρίκοι κόπηκαν κατά μήκος του χόνδρου απέναντι από την στοιβάδα των λείων μυϊκών ινών (6) (Εικόνα 14). Στην ομάδα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε ιστό χωρίς επιθήλιο, το επιθήλιο απομακρύνθηκε μηχανικά με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό.



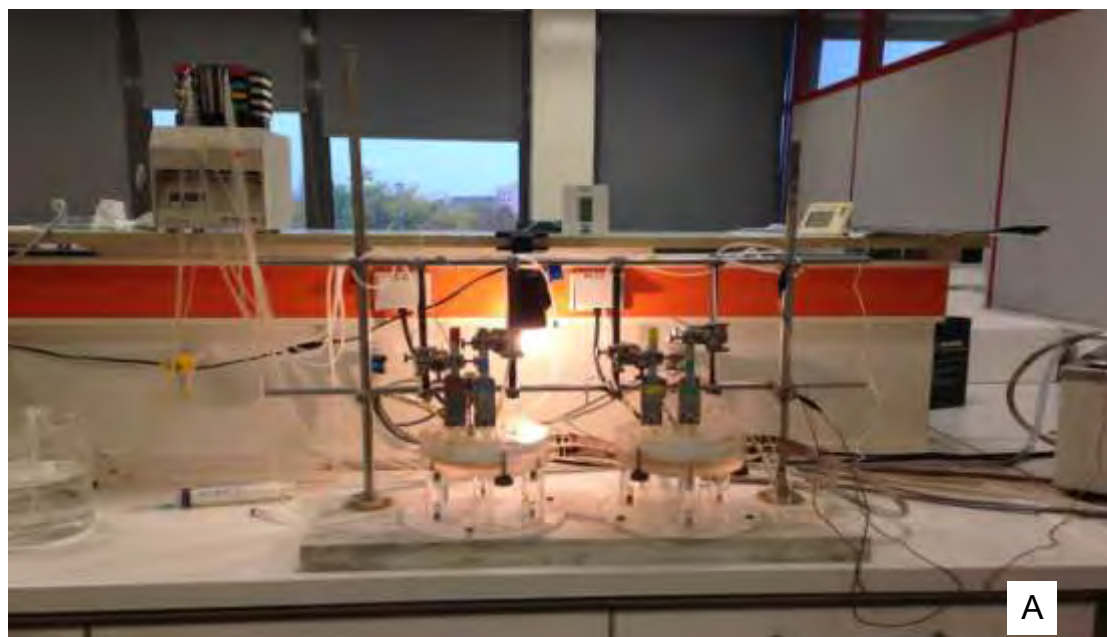
Εικόνα 14. Παρασκεύασμα ημικρικών λείου μυ τραχείας κονίκλου.

3.1.5 Μηχανική Αξιολόγηση

Τα ημικρίκια τοποθετήθηκαν σε λουτρά διαπότισης, όγκου 16ml, με συνεχή ροή διαλύματος Krebs, pH 7.4 ή 7.2 ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος με την ενδοαυλική πλευρά προς τα άνω. Η παροχή του διαλύματος και η απομάκρυνσή του έγινε με περισταλτική αντλία (Gilson, miniplus 3) με ταχύτητα διάχυσης 5ml/min. Το ένα άκρο του ιστού στερεώθηκε σταθερά στο λουτρό διαπότισης και το άλλο στο ελεύθερο άκρο ενός μηχανομετατροπέα (Grass FT03C force displacement transducer) (Εικόνα 15). Η θερμοκρασία σε κάθε λουτρό διαπότισης διατηρούνταν σταθερή στους 37°C, με τη βοήθεια κυκλοφορητή θερμού ύδατος (Selectra, ultratem).

Στο κάθε δείγμα εφαρμόστηκε αρχικά χειροκίνητα, με τη βοήθεια μικρομετρικού κοχλίου, μια τάση 1 γραμμαρίου και στη συνέχεια ο ιστός αφέθηκε να σταθεροποιηθεί και να ισορροπήσει για τουλάχιστον 60min πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Οι μεταβολές της τάσης του ιστού καταγράφηκαν σε καταγραφικό με συνεχή ένδειξη σήματος σε οθόνη παλμογράφου, όπως και σε καταγραφικό μηχάνημα τεσσάρων διαύλων (Grass 7400 Physiological Recorder). Τα πειράματα, όπως περιγράφονται παρακάτω στα πειραματικά πρωτόκολλα, γίνονταν παράλληλα σε ιστό από το ίδιο πειραματόζωο που τοποθετούνταν σε διαφορετικά λουτρά διαπότισης. Μετά το τέλος του πειράματος η τάση που καταγράφονταν σε mm μετατρέπονταν σε g με βάση πρότυπες καμπύλες. Επίσης ο ιστός από κάθε υδατόλουτρο αφαιρούνταν μετά το τέλος του πειράματος και το πάχος και το μήκος του μετρήθηκε με τη χρήση παχύμετρου, ενώ το βάρος τους σε ζυγό ακριβείας. Η τελική έκφραση της τάσης έγινε σε g/mm².



Εικόνα 15. Α. πειραματική διάταξη μελέτης συσταλτικότητας λείου μυ τραχείας κονίκλου, Β. λουτρό διαπότισης, Γ. μηχανομετατροπείς Grass FT03C force displacement transducer, Δ. θερμαντήρας νερού, Ε. καταγραφικό 4^{ων} καναλιών Grass 7400 Physiological Recorder

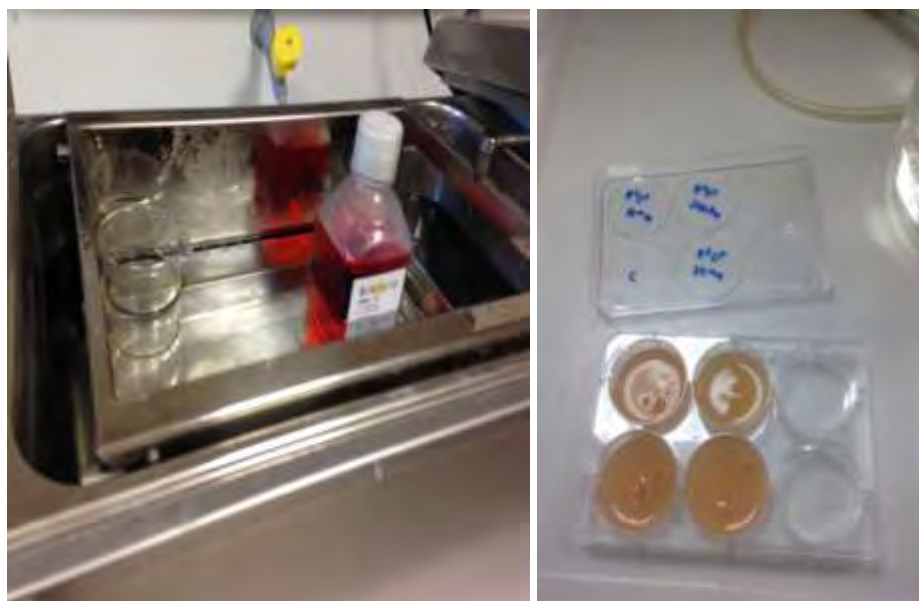
3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

A. Προκαταρκτικά πειράματα:

1. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 300 μM , 1mM, 10mM και 30mM στον βασικό τόνο των λείων μυϊκών ινών, δηλαδή σε παρασκευάσματα που δεν είχε εφαρμοστεί συσπαστικός παράγοντας. Στα πειράματα αυτά το H_2O_2 διαλύονταν σε διάλυμα Krebs και ο ιστός διαποτίζονταν με το διάλυμα της κάθε συγκέντρωσης για 15min. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δεν είχαν επαναληψιμότητα και έδειχναν μια παροδική σύσπαση του ιστού σε συγκέντρωση άλλοτε 1mM ή άλλοτε 10 mM ή και 30 mM. Για το λόγο αυτό η μεθοδολογία αυτή τροποποιήθηκε και στα πειράματα που ακολούθησαν και τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται τελικά το H_2O_2 , σε συγκεντρώσεις 300 μM , 500 μM , 1mM και 10mM, τοποθετήθηκε άμεσα στο λουτρό διαπότισης σε όγκο τέτοιον ώστε να επιτευχθεί η τελική επιθυμούμενη συγκέντρωση του H_2O_2 .
2. Σε άλλη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση του H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 300 μM , 1mM, 10mM και 30mM σε ιστούς που βρίσκονταν ήδη σε σύσπαση με 80mM KCl (9). Τα πειράματα αυτά δεν ανέδειξαν κάποια δράση του H_2O_2 και διεκόπησαν.

Μελέτη της βραχυπρόθεσμης επίδρασης του οξειδωτικού στρες. Ιστοτεμάχια τραχείας επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό παρουσία ή απουσία H_2O_2 (300 μM , 10mM και 30mM) με ή χωρίς DTT(10mM) για 3 ημέρες και στη συνέχεια μελετήθηκε η ανταπόκρισή του σε KCl (80mM) και καρβαχόλη (10^{-9} – 10^{-5}M) (Εικόνα 16).

Τα πειράματα αυτά δεν ολοκληρώθηκαν, καθώς διαπιστώθηκε ότι ο ιστός δεν επιβίωνε παρουσία H_2O_2 ούτε και στις χαμηλές συγκεντρώσεις του (300 μM).



Εικόνα 16. Ιστοτεμάχια τραχείας που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ή παρουσία H_2O_2 (300 μM , 1mM , 10mM και 30mM).

Β. Τελικά πειράματα:

1. Μελετήθηκε η επίδραση του οξειδωτικού στρες σε pH 7.4 , σε ιστό με άθικτο επιθήλιο και σε ιστό που το επιθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά. Τα πειράματα σε ιστό με ή χωρίς επιθήλιο γίνονταν παράλληλα σε διαφορετικά λουτρά διαπότισης. Η συνθήκη έκθεσης σε οξειδωτικό στρες επιτεύχθηκε με τη προσθήκη H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 300 μM , 500 μM , 1mM και 10mM το οποίο δίνει κυρίως το οξειδωτικό ανιόν $O_2^{\bullet -}$ και μικρή ή καθόλου ποσότητα OH^{\bullet} , αφού ο λείος μυς θεωρητικά δεν περιέχει μυοσφαιρίνη ώστε να υπάρξει αντίδραση με τον Fe^{2+} της αίμης (62, 63). Ο ιστός εκτέθηκε στις διάφορες συγκεντρώσεις H_2O_2 συσσωρευτικά. Αναλυτικά το

παρασκεύασμα διαποτίστηκε για 15 min, μέχρι να καταγραφεί το plateau της μέγιστης τάση που αναπτύσσονταν, σε κάθε συγκέντρωση και στη συνέχεια εκτίθονταν παρόμοια στην επόμενη συγκέντρωση H_2O_2 κοκ.

2. Οι παραπάνω πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε με διάλυμα διαπότισης (Krebs) με pH 7.2, προκειμένου να εκτιμήσουμε την πιθανή συνεπίδραση της μεταβολικής οξέωσης με τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες στη συσταλτικότητα του μυϊκού παρασκευάσματος. Η μέτρηση του pH έγινε με πεχάμετρο Bante 930 (Εικόνα 17). Η τιτλοποίηση του διαλύματος Krebs ώστε το pH να φτάσει την τιμή 7.2 έγινε με διάλυμα HCl 1:4 σε H_2O , υπό συνεχή ανάδευση και μέτρηση του pH.

3. Η μελέτη της επίδρασης του αναγωγικού παράγοντα dithiothreitol (DTT), στη δράση του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 στον λείο μυ της τραχείας κουνελιού με ή χωρίς επιθήλιο έγινε σε σειρά πειραμάτων όπου ο ιστός πριν την έκθεσή του στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 (300 μ m, 500 μ m, 1mM και 10mM) προεπωάστηκε για 15 min με DTT σε συγκέντρωση 10mM. Τα πειράματα έγιναν με διάλυμα Krebs pH 7.4. Η πειραματική διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφεται παραπάνω και τα πειράματα σε ιστό που προεπωάστηκε με DTT γίνονταν παράλληλα με τα πειράματα σε ιστό που δεν είχε εκτεθεί στον αναγωγικό παράγοντα (ομάδα ελέγχου-control).



Εικόνα 17. Μέτρηση του pH του διαλύματος διαπότισης (Krebs) –
πεχάμετρο Bante 930.

3.3 Παρουσίαση αποτελεσμάτων-Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων

Οι μετρήσεις εκφράστηκαν σε γραμμάρια τάσης ανά εμβადό της εγκάρσιας διατομής του ιστού σε mm^2 (g/mm^2) και παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος (MO) \pm τυπικό σφάλμα (standard error, SEM). Οι μέσοι όροι προέρχονται από επιμέρους τιμές από πειράματα που έγιναν σε ανεξάρτητα ζώα και ο αριθμός τους στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ως N. Οι επιμέρους τιμές ήταν ο MO 1-2 πειραμάτων σε κάθε ζώο. Στα πειράματα που ο αριθμός των πειραματόζων που μελετήθηκαν ήταν μικρός (2 ή 3 ζώα), οι μέσοι όροι των τιμών και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από μετρήσεις που έγιναν σε ανεξάρτητα πειράματα αλλά σε ιστούς

που προέρχονται από ίδια ζώα. Στα αποτελέσματα αυτά ο αριθμός των ανεξάρτητων πειραμάτων σημειώνεται ως n και ο αριθμός των ζώων που μελετήθηκαν ως N .

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπως και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5. Στην ομάδα των πειραμάτων που μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων του H_2O_2 στον λείο μυ της τραχείας κονίκλου χρησιμοποιήθηκε nonlinear regression για τον υπολογισμό της μέγιστης τάσης (B_{max}) και της συγκέντρωσης που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης (EC_{50}). Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με t -test. Για τη σύγκριση τιμών που αφορούν τον ίδιο ιστό χρησιμοποιήθηκε το paired t -test. Για τη σύγκριση τιμών που αφορούν διαφορετικούς ιστούς έγινε αρχικά η μελέτη της κατανομής των τιμών (normality test, Kolmogorov-Smirnov) και σε περίπτωση κανονικής κατανομής των τιμών έγινε σύγκριση των τιμών με unpaired t -test. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των τιμών η σύγκριση έγινε με Mann-Whitney test (non-parametric). Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε, για κάθε είδος στατιστικής ανάλυσης, η τιμή $P < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

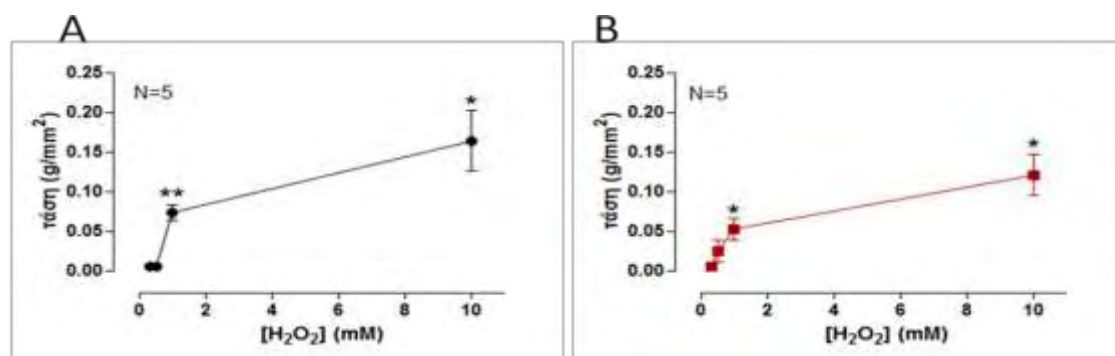
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Οξεία επίδραση οξειδωτικού στρες

4.1.1 Επίδραση H_2O_2 σε λείο μυ τραχείας κονίκλου σε pH 7,4

4.1.1.1 Επίδραση H_2O_2 στον βασικό τόνο λείου μυός τραχείας κονίκλου, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του H_2O_2 στον τόνο του λείου μυ τραχείας κονίκλου σε ιστό με άθικτο επιθήλιο όπως και σε ιστό που το επιθήλιο αφαιρέθηκε μηχανικά. Τα πειράματα σε ιστό με ή χωρίς επιθήλιο έγιναν σε λείο μυ από το ίδιο ζώο σε παρασκευάσματα που τοποθετήθηκαν όμως σε ξεχωριστά λουτρά διαπότισης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η παρουσία του H_2O_2 στο υγρό διαπότισης προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αύξηση της τάσης (g/mm^2) που αναπτυσσόταν στα ημικρίκια της τραχείας (Σχεδιάγραμμα 1).



Σχεδιάγραμμα 1. Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο (Α) ή χωρίς επιθήλιο (Β) σε pH 7.4. Οι τιμές εκφράζονται ως $MO \pm SEM$ από 5 ανεξάρτητα ζώα (N=5). Η τιμή της τάσης σε κάθε ζώο είναι MO από 1-2 πειράματα. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με τον τόνο του μυός πριν την διαπότιση του ιστού με το H_2O_2 (paired t-test).

Η σύσπαση του λείου μυ που προκλήθηκε από το H_2O_2 τόσο στον ιστό με άθικτο επιθήλιο όσο και στον ιστό χωρίς επιθήλιο, ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τον τόνο του λείου μυ πριν την διαπότισή του με το H_2O_2 ($P < 0.05$) για τις συγκεντρώσεις του H_2O_2 1 και 10mM (Σχεδιάγραμμα 1, Πίνακας 1).

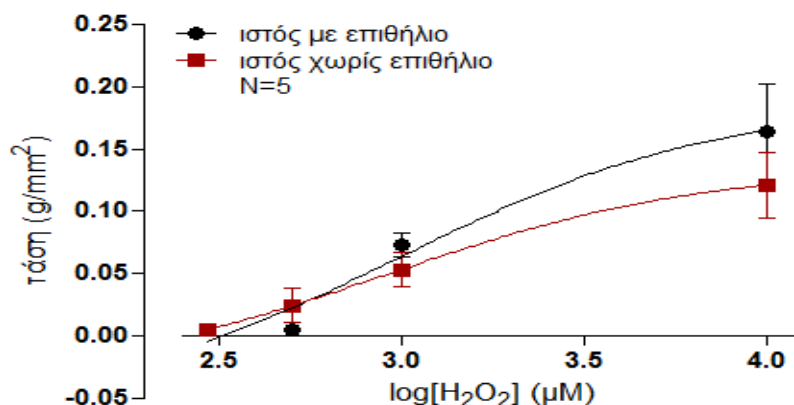
Πίνακας 1.

Η τάση (g/mm^2) που αναπτύσσεται μετά την διαπότιση του λείου μυ τραχείας κονίκλου για 15 λεπτά με H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 0.3-10 mM και pH 7.4.

[H_2O_2] mM	Ιστός με επιθήλιο		Ιστός χωρίς επιθήλιο	
	Τάση (g/mm^2)	P value	Τάση (g/mm^2)	P value
0.3	0.00458±0.004456	0.36	0.00448±0.00448	0.3739
0.5	0.00458±0.004456	0.36	0.02436±0.01408	0.1587
1	0.07309±0.009937	0.0018	0.05276±0.01374	0.0185
10	0.1639±0.03861	0.0132	0.1064±0.02511	0.0133

Οι τιμές εκφράζονται ως $MO \pm SEM$ από 5 διαφορετικά ζώα ($N=5$). Η σύγκριση των τιμών έγινε με την τάση του ιστού πριν την διαπότιση με H_2O_2 που θεωρήθηκε μηδέν. Η σύγκριση των τιμών έγινε με paired t-test.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της ανταποκρισιμότητας του λείου μυ της τραχείας κονίκλου στο H_2O_2 σε ιστό, με ή χωρίς επιθήλιο (Σχεδιάγραμμα 2)



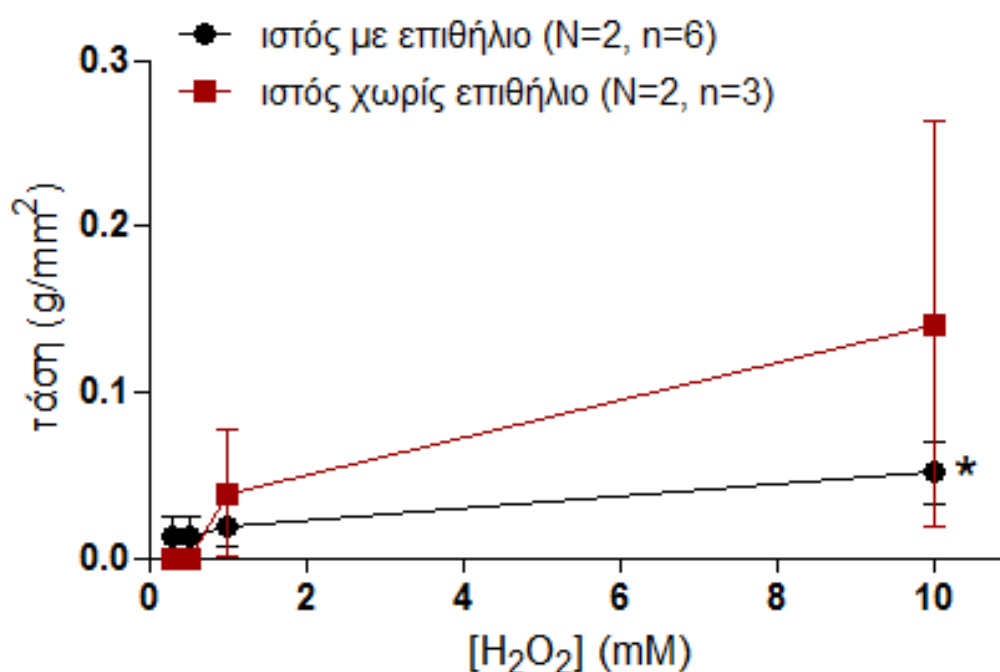
Σχεδιάγραμμα 2. Επίδραση του H₂O₂ (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο σε pH 7.4. Οι τιμές εκφράζονται ως MO±SEM από 5 ανεξάρτητα ζώα (N=5). Η τιμή της τάσης σε κάθε ζώο είναι MO από 1-2 πειράματα.

Χρησιμοποιώντας nonlinear regression (GraphPad Prism 5) υπολογίστηκαν οι τιμές για την μέγιστη τάση (Bmax) και για την συγκέντρωση που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης (EC₅₀) στον ιστό με ή χωρίς επιθήλιο. Η ανάλυση έδειξε ότι οι τιμές της Bmax ήταν 0.1874±0.03072 gr/mm² και 0.1353±0.02321 gr/mm² σε ιστό με και χωρίς επιθήλιο αντίστοιχα. Η σύγκριση των τιμών με Kolmogorov-Smirnov έδειξε ότι η κατανομή των τιμών ήταν κανονική και δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (paired t-test). Οι τιμές της EC₅₀ στον ιστό με επιθήλιο ήταν 987.2μM και στον ιστό χωρίς επιθήλιο ήταν 904.8μM.

4.1.2 Επίδραση H₂O₂ στον βασικό τόνο λείου μυός τραχείας κονίκλου, παρουσία επιθηλίου ή απουσία επιθηλίου, σε pH 7,2

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η ανταποκρισιμότητα του λείου μυ της τραχείας κονίκλου στο H₂O₂ (0.3-10 mM) σε pH=7,2. Τα αποτελέσματα των

πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η παρουσία του H_2O_2 στο υγρό διαπότισης, προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αύξηση της τάσης (g/mm^2) που αναπτύχθηκε στα ημικρίκια της τραχείας (Σχεδιάγραμμα 3). Η τάση που αναπτύχθηκε στο λείο μυ ήταν στατιστικά σημαντική ($P<0,05$ Mann Whitney test) μόνο για τη συγκέντρωση των 10 mM H_2O_2 και στον ιστό με άθικτο επιθήλιο (Σχεδιάγραμμα 3, Πίνακας 2).



Σχεδιάγραμμα 3. Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο σε pH=7.2. Οι τιμές εκφράζονται ως $MO \pm SEM$ από 3-6 πειράματα ($n=3-6$) από 2 ανεξάρτητα ζώα ($N=2$).

* $P<0.05$ σε σύγκριση με τον τόνο του μυός πριν την διαπότιση του ιστού με το H_2O_2 (paired t-test).

Πίνακας 2.

Η τάση (g/mm^2) που αναπτύσσεται μετά την διαπότιση του λείου μυ τραχείας κονίκλου για 15 λεπτά με H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 0.3-10 mM σε pH 7.2.

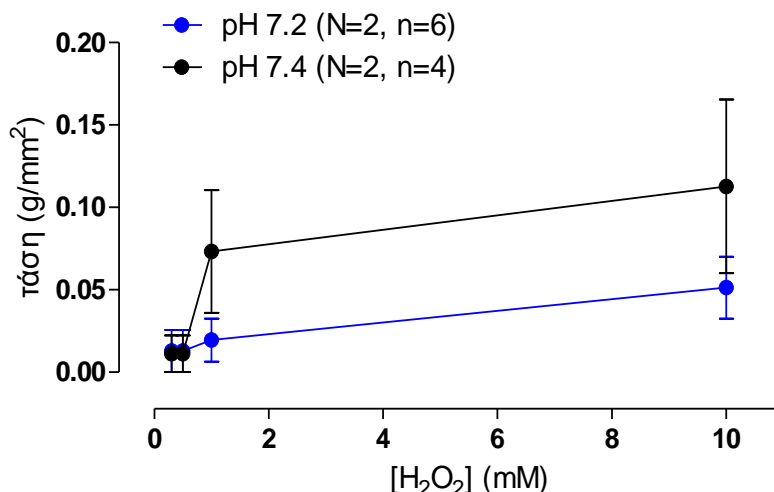
Ιστός με επιθήλιο (N=2, n=6)			Ιστός χωρίς επιθήλιο (N=2, n=3)	
[H ₂ O ₂] mM	Τάση (g/mm^2)	P value	Τάση (g/mm^2)	P value
0.3	0,0128± 0,0128	0.36	0±0	-
0.5	0,0128± 0,0128	0.36	0±0	-
1	0,0195 ± 0,0131	0.19	0.0392±0.0377	0.407
10	0,0513± 0,0187	0.041	0.1409±0.1225	0.369

Οι τιμές εκφράζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 3-6 πειράματα ($n=3-6$) που έγιναν σε 2 διαφορετικά ζώα ($N=2$) και. Η σύγκριση των τιμών έγινε με την τάση του ιστού πριν την διαπότιση με H_2O_2 που θεωρήθηκε μηδέν. Η σύγκριση των τιμών έγινε με paired t-test.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην τάση που ανέπτυξε ο ιστός σε κάθε συγκέντρωση H_2O_2 , για τα ιστοτεμάχια με ή χωρίς επιθήλιο (Σχεδιάγραμμα 3), αν και ο αριθμός πειραμάτων ήταν σχετικά μικρός και δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση της κατανομής των τιμών (Kolmogorov-Smirnov).

Η μεταβολή του pH από 7.4 σε 7.2, φαίνεται ότι ελάττωσε την ανταποκρισιμότητα του ιστού με άθικτο επιθήλιο στις συγκεντρώσεις 1 και 10 mM H_2O_2 , αλλά η μεταβολή αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχεδιάγραμμα 4). Ειδικότερα η τάση που αναπτύχθηκε σε ιστό με άθικτο επιθήλιο ήταν στη συγκέντρωση 1 mM H_2O_2 ήταν $0.0733 \pm 0.037 \text{ g/mm}^2$ και $0.0234 \pm 0.01529 \text{ g/mm}^2$ σε pH 7.4 και pH 7.2 αντίστοιχα.

Επιπλέον, η τάση που αναπτύχθηκε στη συγκέντρωση 10 mM H_2O_2 σε ιστό με άθικτο επιθήλιο ήταν $0.1128 \pm 0.05264 \text{ g/mm}^2$ σε pH 7.4 και $0.06126 \pm 0.01942 \text{ g/mm}^2$ σε pH 7.2.

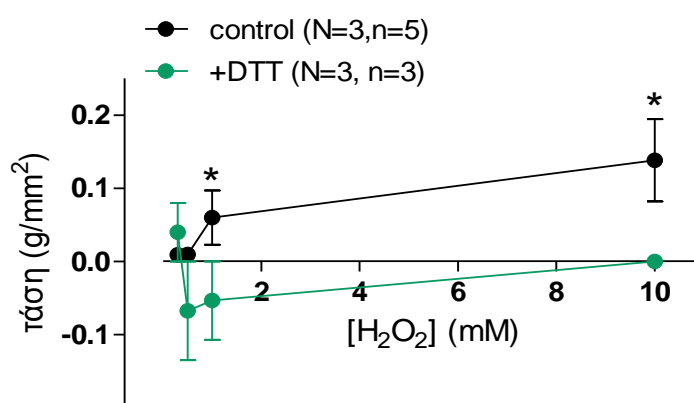


Σχεδιάγραμμα 4: Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο σε pH 7.2 και pH 7.4. Οι τιμές εκφράζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 4-6 πειράματα ($n=4-6$) από 2 ανεξάρτητα ζώα ($N=2$).

4.1.3 Επίδραση DTT σε συνδυασμό με H_2O_2 σε λείες μυϊκές ίνες, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.

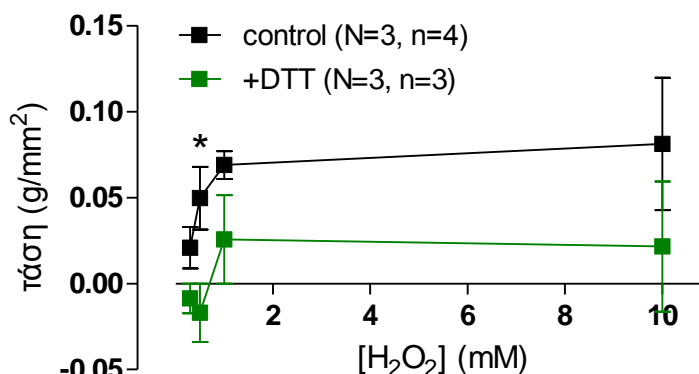
Στη συνέχεια, προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ στην επαγόμενη από το H_2O_2 σύσπαση και οξειδωτικού στρες στον ιστό, τα ημικρίκια της τραχείας προεπώστηκαν για 15 λεπτά με τον αναγωγικό παράγοντα DTT και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η προεπώση με DTT ανέστειλε την συσπαστική δράση του H_2O_2 σε ιστό που είχε επιθήλιο (Σχεδιάγραμμα 5). Η δράση αυτή του DTT ήταν στατιστικά

σημαντική για τις συγκεντρώσεις του H_2O_2 1 και 10mM ($P < 0.05$ Mann Whitney test). Συγκεκριμένα στη συγκέντρωση H_2O_2 1mM η τάση του λείου μυ ήταν $0.05984 \pm 0.03704 \text{ g/mm}^2$ ενώ όταν ο ιστός προεπώσθηκε με DTT ο ιστός παρουσίασε χάλαση ($-0.05367 \pm 0.05367 \text{ g/mm}^2$). Ανάλογα σε συγκέντρωση H_2O_2 10mM η τάση που αναπτύχθηκε στην ομάδα ελέγχου (control) ήταν $0.1381 \pm 0.05633 \text{ g/mm}^2$ ενώ παρουσία DTT ο ιστός δεν εμφάνισε σύσπαση (τάση 0 g/mm^2).



Σχεδιάγραμμα 5: Επίδραση του H_2O_2 (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου με επιθήλιο σε pH 7.4, σε ιστό με άθικτο επιθήλιο χωρίς ή με προεπώαση με DTT (10mM). Οι τιμές εκφράζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 3-5 πειράματα ($n=3-5$) από 3 ανεξάρτητα ζώα ($N=3$). * $P < 0.05$ Mann-Whitney's test στη σύγκριση control και ιστού που προεπώσθηκε παρουσία DTT.

Σε ιστό χωρίς επιθήλιο, η προεπώαση με DTT ελάττωσε την συσπαστική δράση του H_2O_2 (Σχεδιάγραμμα 6). Η δράση αυτή του DTT ήταν στατιστικά σημαντική για τη συγκέντρωση του H_2O_2 0.5mM ($P < 0.05$ Mann Whitney's test).

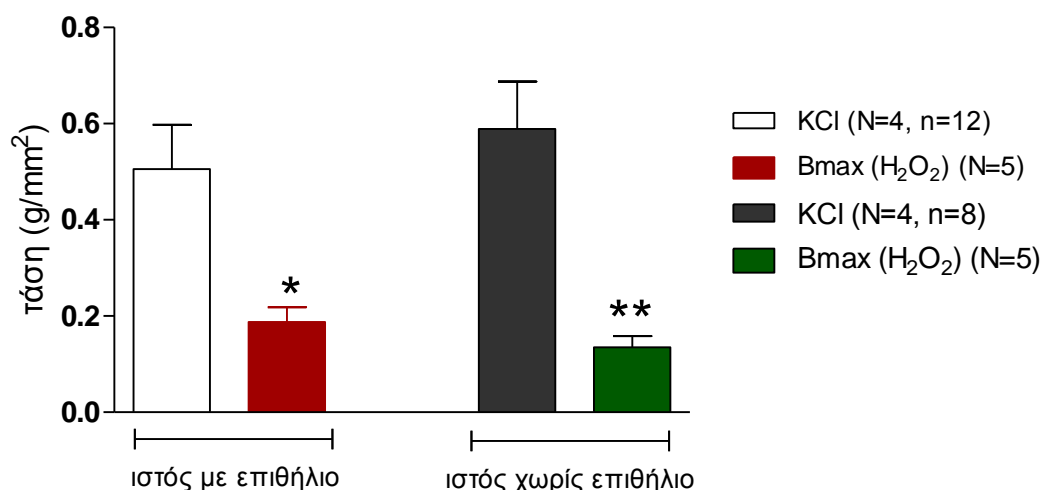


Σχεδιάγραμμα 6: Επίδραση του H₂O₂ (0.3-10 mM) στον βασικό τόνο του λείου μυός τραχείας κονίκλου χωρίς επιθήλιο σε pH 7.4. Οι τιμές εκφράζονται ως MO±SEM από 3-4 πειράματα (n=3-4) από 3 ανεξάρτητα ζώα (N=3). *P<0.05 Mann Whitney's test στη σύγκριση control και ιστού που προεπώσθη παρουσία DTT.

4.1.4 Επίδραση της έκθεσης σε H₂O₂ στην σύσπαση με KCl

4.1.4.1 Επίδραση σε λείες μυϊκές ίνες που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl, παρουσία ή απουσία επιθηλίου.

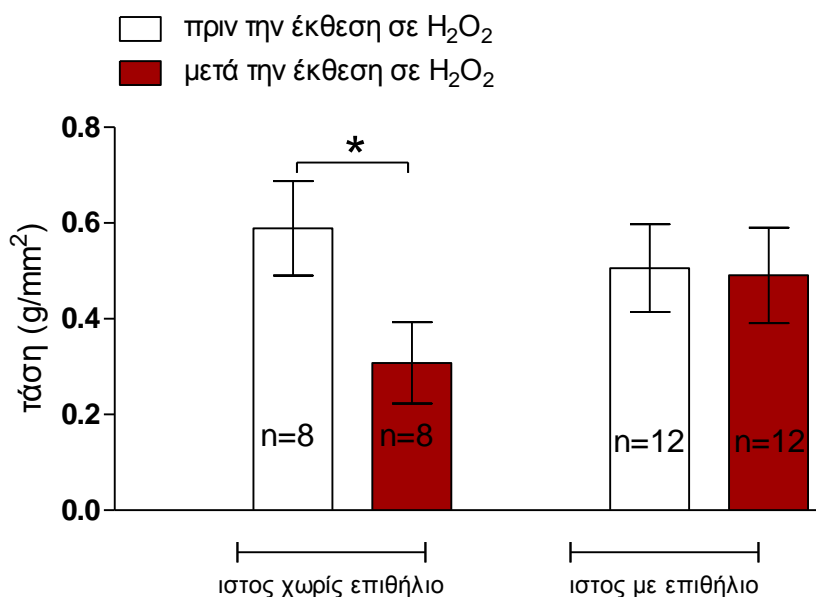
Η μέγιστη εκτιμώμενη σύσπαση (Bmax) του λείου μυός τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο που οφείλεται στη δράση του H₂O₂ ήτανε στατιστικά σημαντικά μικρότερη από τη σύσπαση που προκαλεί το KCl (80mM) πριν την έκθεση του ιστού στο H₂O₂ (Σχεδιάγραμμα 7).



Σχεδιάγραμμα 7: Η επίδραση του KCl (80 mM) σε λείο μυ τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο πριν την έκθεση σε H₂O₂ και η εκτιμώμενη Bmax στο H₂O₂. Οι τιμές εκφράζονται ως MO±SEM από 5 - 12 πειράματα (n=8 ή 12) από 4 ή 5 ανεξάρτητα ζώα (N=4 ή 5). *P<0.05 και **P<0.01 Mann Whitney test σε σύγκριση με την αντίστοιχη τάση που προκαλείται από το KCl.

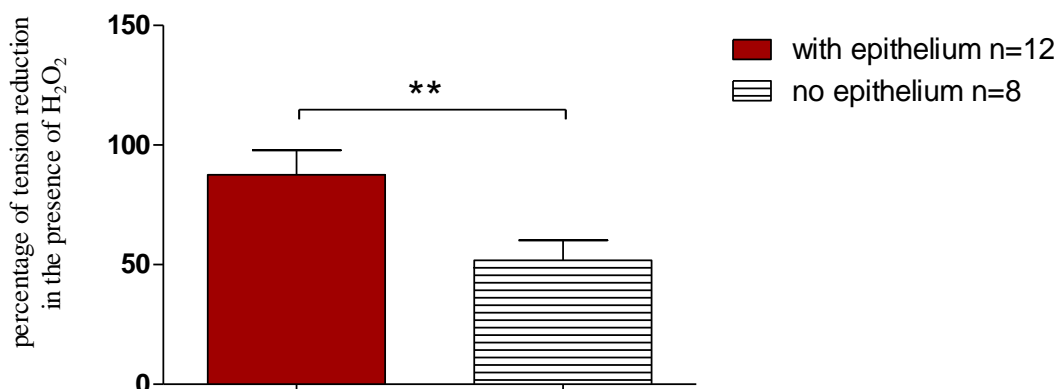
Σε ιστοτεμάχια τραχείας με ή χωρίς επιθήλιο, μετά την περίοδο ισορροπίας τους (όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία) μετρήθηκε η ανταπόκρισή τους σε 80 mM KCl πριν και μετά την έκθεσή τους σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (0,3-10mM). Η αφαίρεση του επιθηλίου δεν μετέβαλλε την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο KCl (Σχεδιάγραμμα 7). Επίσης η έκθεση του ιστού με άθικτο επιθήλιο στο H₂O₂ όπως περιγράφεται ανωτέρως δεν επηρέασε την ανταποκρισιμότητα του στο KCl (Σχεδιάγραμμα 7). Συγκεκριμένα η σύσπαση του ιστού με άθικτο επιθήλιο που καταγράφηκε παρουσία 80 mM KCl ήταν 0,5059±0,09175g/mm² πριν την έκθεση σε H₂O₂ και 0,4907±0,09992g/mm² μετά. Αντιθέτως η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου επηρέασε σημαντικά (P<0.05 Mann Whitney's test) την ανταποκρισιμότητα του λείου μυ τραχείας κονίκλου στο KCl όταν ο ιστός εκτέθηκε

σε H_2O_2 (Σχεδιάγραμμα 8). Αναλυτικότερα η προκαλούμενη από το KCl τάση του ιστού χωρίς επιθήλιο ήταν $0,5889 \pm 0,09888 \text{ g/mm}^2$ και $0,3079 \pm 0,08515 \text{ g/mm}^2$ πριν και μετά την έκθεση στο H_2O_2 αντίστοιχα.



Σχεδιάγραμμα 8: Η επίδραση του KCl σε λείο μυ τραχείας κονίκλου με ή χωρίς επιθήλιο πριν και μετά την έκθεση σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 (0.3-10mM). Οι τιμές εκφράζονται ως $MO \pm SEM$ από 8 ή 12 πειράματα (n=8 ή 12) από 4 ανεξάρτητα ζώα (N=4). * $P < 0.05$ Mann Whitney's test.

Φαίνεται ότι η απουσία επιθηλίου καθιστά το παρασκεύασμα πιο ευαίσθητο στην επίδραση του H_2O_2 αφού σε σχετική κλίμακα, η μετα- H_2O_2 ισομετρική τάση άγγιξε μόνο το ~50% της προ- H_2O_2 τιμής της, ενώ στα παρασκευάσματα με επιθήλιο η μετα- H_2O_2 ισομετρική τάση άγγιξε το 90% της προ- H_2O_2 τιμής της (Σχεδιάγραμμα 9), με τις μετα- H_2O_2 τιμές να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.001$, paired samples t-test).



Σχεδιάγραμμα 9. Ποσοστό ανάκτησης της KCl επαγόμενης μέγιστης ισομετρικής τάσης με και χωρίς επιθήλιο σε pH 7.4. Οι τιμές εκφράστηκαν ως MO \pm SEM 8 ή 12 πειράματα (n=8 ή 12) από 4 ανεξάρτητα ζώα (N=4). **P<0.01 paired sample t-test

4.2. Βραχυπρόθεσμη επίδραση οξειδωτικού στρες

Ιστοτεμάχια τραχείας επώστηκαν με θρεπτικό υλικό παρουσία ή απουσία H₂O₂ (300 μ m, 10mM και 30mM) με ή χωρίς DTT (10mM) για 3 ημέρες και στη συνέχεια επρόκειτο να μελετηθεί η ανταπόκρισή τους σε KCl (80mM). Ο ιστός ωστόσο, δεν επιβίωνε, σε οποιεσδήποτε συνθήκες, οπότε αυτή η ομάδα πειραμάτων εγκαταλείφθηκε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του οξειδωτικού stress στην ανταποκρισιμότητα του λείου μυ τραχείας κονίκλου. Ως οξειδωτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το H_2O_2 σε συγκεντρώσεις 0.3-10 mM. Οι συγκεντρώσεις του H_2O_2 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν μετρηθεί στον εκπνεόμενο αέρα ατόμων που πάσχουν από χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού (43, 40, 37). Παρόμοιες συγκεντρώσεις H_2O_2 έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και από άλλους ερευνητές σε παρόμοιες μελέτες. Ενδεικτικά ο Matyas και οι συν. (2002, 64) έχουν χρησιμοποιήσει ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων από 1 μ M ως και 10mM.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσης μελέτης που έγιναν σε παρασκευάσματα λείου μυ τραχείας κονίκλου σε pH 7.4 έδειξαν αύξηση της τάσης που αναπτύσσεται στα ημικρίκια της τραχείας κουνελιού, τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, παρουσία H_2O_2 . Η αύξηση αυτή της τάσης ακολουθούσε την αύξηση της συγκέντρωσης του οξειδωτικού μέσου, ήταν δηλαδή μεγαλύτερη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του H_2O_2 1mM και 10 mM. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από ανάλογες μελέτες σε ποντικούς (65), γάτες (64), ινδικά χοιρίδια (66, 67), και ανθρώπους (64), όπου φαίνεται ότι το H_2O_2 προκαλεί σύσπαση στους λείους μύες των αεραγωγών. Είναι ωστόσο ενδιαφέρον ότι σε κάποια άλλα είδη τα οξειδωτικά μόρια, όπως το H_2O_2 ή το ανιόν υπεροξειδίου φαίνεται να προκαλούν χάλαση σε λείους μύες, όπως σε κουνέλια (66) και σκύλους (64, 68). Οι Gau και Manuette (1993, 69), όσο και οι Matyas και συν (2003) παρατήρησαν μια διφασική δράση του H_2O_2 μετά από μακροχρόνια επίδρασή του σε τραχεία ινδικού χοιριδίου. Στα πειράματα αυτά το H_2O_2 αφέθηκε για 30min. Στην αρχή της χορήγησης, προκάλεσε αύξηση στην τάση του ιστού που βρισκόταν σε ηρεμία, ενώ σε δεύτερη φάση, αργότερα κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ελάττωση της

τάσης σε επίπεδα κάτω από τον βασικό τόνο, προκάλεσε δηλαδή χάλαση του ιστού. Στην παρούσα μελέτη η έκθεση του ιστού στο H_2O_2 ήταν 15 min. Επομένως δεν μπορεί να αποκλειστεί λόγω του σύντομου χρόνου έκθεσης του ιστού μία πιθανή διφασική δράση του οξειδωτικού μέσου στον λείο μυ της τραχείας κονίκλου ανάλογη με αυτή που παρατήρησαν οι Matyas και συν (2003).

Τα αποτελέσματα αυτά όπως και τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρονται παραπάνω καταδεικνύουν την ευαισθησία του λείου μυός του αναπνευστικού στο αυξημένο οξειδωτικό φορτίο σε πολλά είδη θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Παράλληλα όμως τα διάφορα είδη θηλαστικών φαίνεται πως διαθέτουν μία ποικιλία μηχανισμών αντιρρόπησης-αποκατάστασης του οξειδωτικού ισοζυγίου, όπως αύξηση της έκφρασης ενζύμων που ανάγουν τους οξειδωτικούς παράγοντες ή αντιοξειδωτικών γονιδίων (4).

Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου στα παρασκευάσματα της τραχείας δεν μετέβαλαν την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο H_2O_2 . Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η δράση του υπεροξειδίου στον λείο μυ είναι άμεση και δεν μεσολαβείται από την απελευθέρωση κάποιου μεσολαβητή από το επιθήλιο των αεραγωγών. Οι πιθανοί κυτταρικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη δράση του υπεροξειδίου δεν διερευνήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την άμεση επίδραση του H_2O_2 στο δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων (54). Το H_2O_2 , λόγω της έλλειψης φορτίου, διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και μεταβάλλει την λειτουργία ιοντικών διαύλων, οδηγώντας έτσι σε μετακινήσεις ιόντων και εκπόλωση της μεμβράνης. Το H_2O_2 δεν φαίνεται να συνδέεται σε κάποιο κυτταροπλασματικό υποδοχέα αλλά μπορεί να επηρεάσει την ανταποκρισιμότητα του ιστού. Έχειδειχθεί εξάλλου ότι ακόμη και το H_2O_2 που παράγεται ενδοκυτταρικά, λόγω των απωλειών στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, μπορεί να

επηρεάσει την συσταλτικότητα του λείου μυϊκού κυττάρου τόσο σε κύτταρα των αεραγωγών όσο και σε λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (54). Συγκεκριμένα, το H_2O_2 επιδρά σε τασεοεξαρτώμενους διαύλους K^+ , οι οποίοι μεταβάλλουν το δυναμικό της μεμβράνης και οδηγούν σε ενεργοποίηση τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου και είσοδο ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου οδηγεί τελικά σε συστολή του λείου μυός (6).

Μελέτες επίσης δείχνουν ότι το H_2O_2 μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου είτε μέσω κινητοποίησής του από τις ενδογενείς αποθήκες στο σαρκοπλασματικό δίκτυο το κυττάρου (70, 71, 72), είτε μέσω ενεργοποίησης διαύλων που οδηγούν σε είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο (73, 70).

Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορές στην ανταποκρισιμότητα των ιστοτεμαχίων μεταξύ παρασκευασμάτων που διέθεταν άθικτο επιθήλιο και άλλων στα οποία είχε αφαιρεθεί το επιθήλιο μηχανικά. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης των Matyas και συν. (2003) σε παρασκευάσματα τραχείας ινδικού χοιριδίου, όπου η ανταποκρισιμότητα του ιστού χωρίς επιθήλιο ήταν τριπλάσια από ότι στα παρασκευάσματα με ανέπαφο επιθήλιο. Η διαφορά αυτή των αποτελεσμάτων μεταξύ της παρούσης μελέτης και της μελέτης των Matyas και συν. μπορεί να οφείλεται αφενός μεν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 αφετέρου δε στην διαφορετική προέλευση των ιστών. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος του επιθηλίου στην επίδραση του H_2O_2 στον τόνο του λείου μυ καθώς είναι γνωστό ότι η παρουσία του επιθηλίου μπορεί να τροποποιήσει την ανταποκρισιμότητα του ιστού σε συσπαστικούς παράγοντες κυρίως μέσω απελευθέρωσης μεσολαβητών όπως μονοξείδιο του αζώτου (NO), προσταγλαδινών ή ενδοθηλίνης (74). Μελέτες δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες επιδρά στη φυσιολογική λειτουργία του επιθηλίου με

δοσοεξαρτώμενο αλλά και χρονοεξαρτώμενο τρόπο (64). Εντούτοις τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν έδειξαν πιθανή εμπλοκή του επιθηλίου των αεραγωγών στη δράση του H_2O_2 . Είναι πιθανό η υψηλή διεισδυτική ικανότητα του H_2O_2 να μην επηρεάζεται από τον επιθηλιακό φραγμό ή η απελευθέρωση μεσολαβητών από το επιθήλιο (70).

Σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως αναπνευστική ανεπάρκεια συχνά το οξειδωτικό stress μπορεί να συνυπάρχει με οξέωση. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση του H_2O_2 σε pH 7.2 με τον ίδιο σχεδιασμό όπως και τα πειράματα που έγιναν στο pH 7.4. Στην ομάδα αυτή των πειραμάτων τα παρασκευάσματα δεν ήταν βιώσιμα μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος και για αυτό το λόγο ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν μικρός. Η αδυναμία επιβίωσης του λείου μυ σε αυτές τις ακραίες συνθήκες οξειδωτικού φορτίου υποδηλώνει την πιθανή ευαισθησία των ιστών αυτών στις μεταβολές του οξειδωτικού ισοζυγίου, καθώς το όξινο pH εμποδίζει την δράση ενζύμων, όπως οι κυκλοοξυγενάσες, τα οποία επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικά μόρια (64). Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η μεταβολή του pH από 7.4 σε 7.2 ελαττώνει την ανταποκρισιμότητα του λείου μυ στο H_2O_2 , αν και η μεταβολή αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Είναι πιθανόν η έκθεση του ιστού σε έντονο οξειδωτικό stress, όπως μπορεί να συμβαίνει στην περίπτωση διαπότισης του ιστού με H_2O_2 σε pH 7.2, η ελαττωμένη ανταποκρισιμότητά του στο H_2O_2 μπορεί να οφείλεται σε πιθανή τοξικότητα του H_2O_2 που επηρεάζει την βιωσιμότητα του ιστού αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα στις ακραίες αυτές συνθήκες να κινητοποιούνται αντιροπιστικοί μηχανισμοί που να ελαττώνουν την σύσπαση του λείου μυ.

Εκτός από τον συνδυασμό όξινου pH- οξειδωτικού stress φαίνεται ότι και το επιθήλιο παίζει ρόλο στην βιωσιμότητα του λείου μυ της τραχείας του κονίκλου στην

έκθεσή του στο H_2O_2 . Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η επαγόμενη από το KCl (80mM) σύσπαση του λείου μυ της τραχείας του κονίκλου δεν μεταβλήθηκε μετά την έκθεση του ιστού σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 όταν το επιθήλιο είναι άθικτο. Αντιθέτως όταν στο παρασκεύασμα το επιθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά τότε η ανταποκρισιμότητα του ιστού στο KCl ελαττώθηκε σημαντικά μετά την διαπότιση του ιστού με H_2O_2 . Αν και τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν μια πιθανή προστατευτική δράση του επιθηλίου έναντι της τοξικότητας του H_2O_2 δεν μπορεί ωστόσο να αποκλειστεί η πιθανότητα η ακεραιότητα του επιθηλίου του αναπνευστικού να είναι αναγκαία για την επιβίωση του ιστού εν γένει ανεξάρτητα της ύπαρξης ή όχι οξειδωτικού stress.

Τέλος στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναγωγικός παράγοντας DTT για να εξετασθεί τόσο η προστατευτική του επίδραση όσο και για να επιβεβαιωθεί ότι η παρατηρούμενη συσπαστική δράση του H_2O_2 οφείλονταν σε οξειδωτικό stress και όχι σε άλλη πιθανή δράση του. Παρατηρήθηκε ότι η προεπώαση του ιστού με άθικτο επιθήλιο με DTT ανέστειλε την επαγόμενη από το H_2O_2 σύσπαση. Σε ιστό που το επιθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά το DTT ελάττωσε την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο H_2O_2 αν και η ελάττωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την συγκέντρωση 0.5 mM. Αν και στην παρούσα μελέτη δεν διερευνήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο το DTT αναστέλλει τη συσπαστική επίδραση του H_2O_2 , μελέτες έχουν δείξει ότι ο αναγωγικός αυτός παράγοντας παρεμποδίζει την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου που προκαλεί το H_2O_2 (75) επιδρώντας σε πρωτεϊνικές θειόλες του κυττάρου (76). Μελέτες σε παρασκεύασμα μεσεντέριας αρτηρίας κουνελιού έχουν δείξει ότι το DTT επηρεάζει την γουανυλική κυκλάση και οδηγεί σε παραγωγή cGMP που προκαλεί χάλαση του λείου μυ (70). Επίσης είναι πιθανό το DTT να ανάγει τα προϊόντα των αντιδράσεων που εμπλέκεται

το H_2O_2 και τα οποία εμπλέκονται στη συσπαστική δράση του οξειδωτικού παράγοντα ή μπορεί το DTT να ενεργοποιεί ενδογενείς ρεδοукτάσες που αναστρέφουν την επαγόμενη από το H_2O_2 οξειδωτική βλάβη (77).

Αδυναμίες της μελέτης-μελλοντικές μελέτες

Στην παρούσα μελέτη το σημαντικότερο πρόβλημα ήταν η μη βιωσιμότητα μεγάλου αριθμού παρασκευασμάτων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, που περιορίσε σημαντικά τον απαιτούμενο αριθμό επαναλήψεων που απαιτούνταν για μια εμπειριστατωμένη στατιστική ανάλυση και την διεξαγωγή καλά τεκμηριωμένων συμπερασμάτων. Το πρόβλημα αυτό, οδήγησε επίσης στην εγκατάλειψη ορισμένων πειραματικών προσεγγίσεων που είχαν αρχικά σχεδιαστεί, όπως για παράδειγμα τα πειράματα μελέτης της βραχυχρόνιας επίδρασης του H_2O_2 στην συσταλτικότητα του λείου μυ τραχείας κονίκλου.

Η παρούσα μελέτη δεν επεκτάθηκε σε διεξοδική διερεύνηση των κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση του H_2O_2 . Η μελέτη των μηχανισμών αυτών θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μιας μελλοντικής επιστημονικής έρευνας με στόχο την πιθανή εξειδικευμένη φαρμακευτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση των βλαβερών επιδράσεων του οξειδωτικού stress.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

1. Το H_2O_2 , σε συγκεντρώσεις 0.3, 0.5, 1 και 10 mM, προκαλεί δόσοεξαρτώμενη σύσπαση του λείου μυ της τραχείας κονίκλου. Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου δεν επηρεάζει την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο H_2O_2 .
2. Η μέγιστη σύσπαση που προκαλείται από το H_2O_2 τόσο σε ιστό με επιθήλιο όσο και σε ιστό χωρίς είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την σύσπαση που προκαλεί στον ιστό το KCl σε συγκέντρωση 80mM.
3. Η μεταβολή του pH από 7.4 σε 7.2 ελαττώνει την ανταποκρισιμότητα του ιστού με άθικτο επιθήλιο στο H_2O_2 αν και το αποτέλεσμα αυτό είναι δεν είναι στατιστικά σημαντικό.
4. Η προεπώαση ιστού με τον αναγωγικό παράγοντα DTT (10 mM), για 15 min, αναστέλλει την συσπαστική δράση του H_2O_2 σε ιστό με άθικτο επιθήλιο και ελαττώνει τη δράση του H_2O_2 σε ιστό χωρίς επιθήλιο.
5. Η έκθεση του ιστού σε διαδοχικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0.3, 0.5, 1, 10 mM) δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα του ιστού στο KCl (80mM) σε παρασκευάσματα με άθικτο επιθήλιο, ενώ αντίθετα την ελαττώνει σε παρασκευάσματα που έχει αφαιρεθεί μηχανικά το επιθήλιο.

Συμπερασματικά το H_2O_2 ασκεί στο λείο μυ της τραχείας κονίκλου δόσοεξαρτώμενη επιθηλιοανεξάρτητη σύσπαση μέσω οξειδωτικού stress. Η δράση του H_2O_2 στον λείο μυ είναι δηλαδή άμεση και δεν επιτυγχάνεται από την απελευθέρωση μεσολαβητών από το επιθήλιο της τραχείας. Η μεταβολή του pH σε πιο όξινες τιμές φαίνεται να ελαττώνουν την συσπαστική δράση του H_2O_2 στον λείο μυ αν και το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν ότι το H_2O_2 επιδρά άμεσα στον τόνο του λείου μυ αλλά δεν διερευνά τους πιθανούς κυτταρικούς μηχανισμούς

δράσης. Είναι απαραίτητο λοιπόν να διενεργηθούν επιπλέον μελέτες, ώστε να εξακριβωθεί ο κυτταρικός μηχανισμός δράσης των οξειδωτικών μορίων όπως το H_2O_2 , προκειμένου να προταθούν πιθανές φαρμακολογικές παρεμβάσεις σε περιπτώσεις οξειδωτικού stress. Αν μπορούσε να καταστεί δυνατή η ρύθμιση του οξειδωτικού ισοζυγίου με πιθανή θεραπευτική παρέμβαση, θα μπορούσε να βελτιωθεί και η κλινική εικόνα ασθενών που πάσχουν από χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού, αλλά και η ποιότητα ζωής ηλικιωμένων και όχι μόνο ατόμων, που εμφανίζουν δυσλειτουργία του αναπνευστικού συστήματος, καταστάσεις στις οποίες φαίνεται ότι το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθογένειά τους. Στα πλαίσια αυτά μέχρι σήμερα η φαρμακευτική παρέμβαση γίνεται με χρήση αντιοξειδωτικών μορίων σε συμπληρώματα διατροφής (γλουταθειόνη, βιταμίνες C, E, β-καροτένιο). Εντούτοις η εφαρμογή τέτοιων θεραπευτικών προσεγγίσεων δεν είναι ελεύθερη παρενεργειών, όπως η αύξηση του τελικού οξειδωτικού στρες λόγω μεγάλης ελάττωσης της συγκέντρωσης των οξειδωτικών μορίων, γεγονός που υποδηλώνει πως στοχευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις στην ρύθμιση του οξειδωτικού φορτίου θα μπορούσε να έχει καλύτερα και ασφαλέστερα αποτελέσματα και προς την κατεύθυνση αυτή συμβάλλουν μελέτες όπως η παρούσα. Μελέτες τέλος έχουν δείξει ότι η άσκηση ελαττώνει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η συστηματική άσκηση θα μπορούσε να ελαττώσει το οξειδωτικό στρες και βελτιώνει επομένως την γενικότερη φυσική κατάσταση αλλά και την απόκριση σε ασθένειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Halliwell B, (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis *Br. J. Exp. Path.* 70, 737-757
2. Emelyanov, A., Fedoseev, G., Abulimity, A., et al (2001). Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 120, 1136–1139
3. Kirkham P., Rahman I. (2006) Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 476 – 494
4. Berair R, Hollins F, Brightling C (2013). Airway Smooth Muscle Hypercontractility in Asthma. *Journal of Allergy* Article ID 185971
5. MacNee W., Rahman I. (2001). Isoxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *TRENDS in Molecular Medicine*
6. Zhao JJ, Shimizu Y, Dobashi K, et al (2008) The Relationship Between Oxidative Stress and Acid Stress in Adult Patients With Mild Asthma, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18: 41-45
7. W. Boron, E. Boulpaep, (2005) *Medical Physiology, a cellular and molecular approach*. Elsevier Inc.
8. Quevillon-Cheruel S, Foucault G, Desmadril M, et al (1999) Role of the C-terminal extremities of the smooth muscle myosin heavy chains: implication for assembly properties. *FEBS Lett*, 454:303-6.
9. Solaro RJ. (2000) Myosin light chain phosphatase: a Cinderella of cellular signaling. *Circ Res*, 87:173-5.

10. Hatziefthimiou AA, Karetsi E, Pratzoudis E, et al. (2005) Resting tension effect on airway smooth muscle: the involvement of epithelium. *Respir Physiol Neurobiol*, 145:201-8.
11. Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. (2002) Epithelium-dependent effect of L-glutamate on airways: involvement of prostaglandins. *Mediators Inflamm*, 11: 33-8.
12. Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. (1999) Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134:201-34.
13. Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE. (1994) Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery*, 116:439-44
14. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, et al. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:7809-13.
15. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, et al. (1993) Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 342:1510-3.
16. Gilman A, Goodman LS. (1936) The Secretion Of An Antidiuretic Hypophyseal Hormone In Response To The Need For Renal Water Conservation. *Science*, 84:24-25.
17. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, et al. (1998) Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest*, 101:660-6.

18. Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, et al (1995) Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J*, 9:552-8.
19. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. (1995) p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem*, 270:21195-8.
20. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, et al. (2003). Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111:72–78.
21. Freeman BA, Crapo JD. (1982) .Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412–426,
22. Conner, E.M., Grisham, M.B. (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12: 274–277.
23. Nadeem A., Masood A, Siddiqui N. (2008). Oxidant--antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options *Ther Adv Respir Dis* 2: 215-222
24. Mak JCW, Leung HCM, Ho SP, et al. (2004). Systemic oxidative and antioxidative status in Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 260–264
25. Kelly FJ, Mudway I, Blomberg A, et al. (1999). Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 354:482–483.
26. Thannickal VJ, Fanburg BL. (2000). Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 279:1005–1028.

27. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) Oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC Free radicals in Biology and Medicine, Oxford: Oxford University Press:24-27.
28. Cotrijo J, Matri-Cabrera M, De La Asuncion JG. (1999) Contraction of human airways by oxidative stress protection by N-acetylcysteine. Free Radic Biol Med, 27:392-400.
29. Hulsman AR, Raatgeep HR, Den Hollander JC. (1994) Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. Am J Respir Crit Care Med, 149:519-25
30. Doelman CJ, Bast A. (1990) Oxygen radicals in lung pathology. Free Rad Biol Med, 9:381-400
31. Bowler RP. (2004) Oxidative stress in pathogenesis of asthma. Cur Allergy Asthma Report, 4:116-122
32. Nadel JA. (1991) Neural endopeptidase modulates neurogenic inflammation. Eur Respir J; 4:745-754.
33. Horvath I, Donnely LE, Kiss A, et al. (1998) Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. Am J Respir Crit Care Med; 158:1042–1046
34. Antzak A, Nowak D, Bialasiewicz P, et al. (1999) Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. Arch Immunol Ther Exp (Warsz); 47:119–126

35. Sont JK, van Krieken JHJH, Evertse CE, et al. (1996) The relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsies and clinical severity asthma in patients treated with inhaled steroids. *Thorax*; 151:496–502
36. Sont JK. (1998) Airway inflammation in asthma: repeatability and therapeutic implications. *Eur Respir Rev*; 8:1089–1094
37. Kharitonov S.A. (2006) Exhaled Biomarkers, *CHEST* 130:1541–1546
38. Dohlman AW, Black HR, Royall JA. (1993) Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*; 148:955–960
39. Hulsmann AR, Raatgeep HR, Den Hollander JC. (1994) Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med*; 149:519-25.
40. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PAJ. (1996) Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*; 153:1697-701.
41. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*; 154:1055–60.
42. Morrison, D. et al. (1999) Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 473–479
43. Morrow, J.D. et al. (1995) Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *New Engl. J. Med.* 332, 1198–120

44. Van Der Heijden H.F.M. , Dekhuijzen P.N.R., Folgering H. , Van Herwaafden C.L.A. (1996) Pharmacotherapy of respiratory muscles in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 90, 513-522
45. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, et al (2003), Oxidative Stress in Expired Breath Condensate of Patients With COPD. *CHEST*, 124: 4
46. Repine JE., Bast A, Lankhorst I (1997) Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 341–357.
47. Wood LG., Garg ML., Simpson JL., et al (2005) Induced Sputum 8-Isoprostane Concentrations in Inflammatory Airway Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 426–430. .
48. Rottoli P, Magi B, Perari MG, et al. (2005). Cytokine profile and proteome analysis in BAL of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 5:1423-30.
49. Rahman I, Skwarska E, Henry M, et al (1999) Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biol Med*;27:60–8.
50. Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, et al. (1998) Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*; 158:991–994
51. Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, et al. (1986) Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*; 1:11–14

52. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, et al. (1989) Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest*; 96:606–612
53. Papaioannou A.I., Koutsokera A., Tanou K., et al (2010) The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers *Eur J Clin Invest* 40: 103–109
54. Kostikas K., Minas M, Nikolaou E, et al (2013) Secondhand smoke exposure induces acutely airway acidification and oxidative stress, *Respiratory Medicine* 107, 172-179
55. Moudgil R, Michelakis E D., Archer S L. (2005) Hypoxic pulmonary vasoconstriction, *J Appl Physiol* 98: 390–403.
56. Hepple RT. (2014) Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle *Frontiers in Aging Neuroscience* 6 : Article 211
57. Janssen, L.J., Netherton, S.J.,Walters, D.K., (2000). Ca^{2+} -dependent K^{+} channels and Na^{+} – K^{+} –ATPase mediate H_2O_2 - and superoxide-induced relaxations in canine trachealis. *J. Appl. Physiol.* 88, 745–752.
58. Lorenz, R.R., Warner, D.O., Jones, K.A., (1999). Hydrogen peroxide decreases Ca^{2+} sensitivity in airway smooth muscle by inhibiting rMLC phosphorylation. *Am. J. Physiol., Lung Cell Mol. Physiol.* 277, 816–822.
59. Rahman I., Biswas S. K., Kode A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* 533: 222–239
60. Grieger J. A., Wood L. G. and Clifton V. L. (2013). Improving Asthma during Pregnancy with Dietary Antioxidants: The Current Evidence *Nutrients*, 5, 3212-3234

61. Margaritelis N.V., Kyparos A., Paschalis V., et al (2014) Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality *Redox Biology* 2 : 520–528
62. Fisher-Wellman K., Bell H.K., Bloomer R.J. (2009) Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:43-51
63. Murphy RM, Dutka TL, Lamb GD. (2008) Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol.*;586:2203–2216.
64. Lamb G D and Westerblad H. (2011) Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle *J Physiol.*, 589 2119-2127
65. Mátyás Š, Pucovský V, Bauer V. (2002) Effects of Various Reactive Oxygen Species on the Guinea Pig Trachea and Its Epithelium *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 270-278
66. Hyslop PA., Zhang Z, Pearson DV., Phebus LA. (1995) Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro *Brain Research* 671 :181-186
67. Fish JE., Shaver JR., Peters SP. (1995) Airway Hyperresponsiveness in Asthma. Is It Unique? *CHEST* 107 : 3 Supplement
68. Rhoden K.J., Barnes P.J. (1989), Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 98: 325-330

69. Cantin A M., Fells GA., Hubbard RC., Crystal RG (1990) Antioxidant Macromolecules in the Epithelial Lining Fluid of the Normal Human Lower Respiratory Tract *The Journal of Clinical Investigation*, Inc.86: 962-971
70. Gao Y, Vanhoutte PM (1992) Effects of hydrogen peroxide on the responsiveness of isolated canine bronchi: role of prostaglandin E2 and I2. *Am J Physiol* 263: 402 – 408
71. Saito M, Watanabe Y, Itoh T (2007) Mechanism underlying H₂O₂-induced inhibition of acetylcholine-induced contraction in rabbit tracheal smooth muscle *European Journal of Pharmacology* 557: 195–203
72. Favero, T.G., Zable, A.C., Abramson, J.J., (1995). Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270, 25557–25563
73. Oba, T., Kurono, C., Nakajima, R., et al (2002). H₂O₂ activates ryanodine receptor but has little effect on recovery of releasable Ca²⁺ content after fatigue. *J. Appl. Physiol.* 93, 1999–2008
74. Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., et al (2004). Hydrogenperoxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels incultured rat dentate granule cells. *Neurosci. Lett.* 356, 25–28.
75. Hatziefthimiou A, Paschalis-Adam M, Efrosyni P. (2014) Physiological Parameters Affecting the Modulatory Role of Airway Epithelium on Airway Smooth Muscle Responsiveness. *Pulm Res Respir Med Open J* 1(1): 1-8.
76. Andrade FH., Reid MB.,Allen DG, Westerblad H. (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse *Journal of Physiology* 509: 565—575

77. Mingone CJ., Gupte SA., Ali N, et al (2006) Thiol oxidation inhibits nitric oxide-mediated pulmonary artery relaxation and guanylate cyclase stimulation
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: 549–557
78. Gutteridge JMC, Halliwell B. (2000) Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000 A Historical Look to the Future. ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Υπεύθυνη Δήλωση

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Ευφροσύνη Μπόμπου- ΑΕΜ.....**, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών **ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

δηλώνω υπεύθυνα ότι αποδέχομαι τους παρακάτω όρους που αφορούν

(α) στα πνευματικά δικαιώματα της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας (ΜΔΕ)/ Διδακτορικής διατριβής μου με τίτλο **Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στη συσταλτικότητα του λείου μυός.**

(β) στη διαχείριση των ερευνητικών δεδομένων που θα συλλέξω στην πορεία εκπόνησής της:

1. Τα πνευματικά δικαιώματα του τόμου της μεταπτυχιακής ή διδακτορικής διατριβής που θα προκύψει θα ανήκουν σε μένα. Θα ακολουθήσω τις οδηγίες συγγραφής, εκτύπωσης και κατάθεσης αντιτύπων της διατριβής στα ανάλογα αποθετήρια (σε έντυπη ή/και σε ηλεκτρονική μορφή).

2. Η διαχείριση των δεδομένων της διατριβής ανήκει από κοινού σε εμένα και στην κύριο επιβλέπουσα καθηγήτρια.

3. Οποιαδήποτε επιστημονική δημοσίευση ή ανακοίνωση (αναρτημένη ή προφορική), ή αναφορά που προέρχεται από το υλικό/δεδομένα της εργασίας αυτής θα γίνεται με συγγραφείς εμένα τον ίδιο, τον/την κύριο-α επιβλέποντα -ουσα ή/και άλλους ερευνητές (πχ μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, συνεργάτες κλπ), ανάλογα με τη συμβολή τους στην έρευνα και στη συγγραφή των ερευνητικών εργασιών.

4. Η σειρά των ονομάτων στις επιστημονικές δημοσιεύσεις ή επιστημονικές ανακοινώσεις θα αποφασίζεται από κοινού από εμένα και τον/την κύριο -α επιβλέποντα -ουσα της εργασίας, πριν αρχίσει η εκπόνησή της. Η απόφαση αυτή θα πιστοποιηθεί εγγράφως μεταξύ εμού και του/της κύριου-ας επιβλέποντος -ουσας.

Τέλος, δηλώνω ότι γνωρίζω τους κανόνες περί δεοντολογίας και περί λογοκλοπής και πνευματικής ιδιοκτησίας και ότι θα τους τηρώ απαρέγκλιτα καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης και κάλυψης των εκπαιδευτικών υποχρεώσεων μου που προκύπτουν από το ΠΜΣ/τμήμα και καθ' όλη τη διάρκεια των διαδικασιών δημοσίευσης που θα προκύψουν μετά την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

25/02/2015

Η δηλούσα

Ευφροσύνη Μπόμπου

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας

Τρίκαλα 11/12/2013
 Αριθμ. Πρωτ.: 812

Αίτηση Εξέτασης της πρότασης για διεξαγωγή Έρευνας με τίτλο: Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στη συστατικότητα του λείου μυός

Επιστημονικώς υπεύθυνη / επιβλέπουσα: κα Καρατζαφέρη Χριστίνα
Ιδιότητα: Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Άσκησης
Ίδρυμα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα: ΤΕΦΑΑ

Κύριος ερευνητής / φοιτήτρια: Μπόμπου Ευφροσύνη
Πρόγραμμα Σπουδών: ΠΜΣ<<Άσκηση και Υγεία>>
Ίδρυμα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα: ΤΕΦΑΑ

Η προτεινόμενη έρευνα θα είναι:

Ερευνητικό πρόγραμμα ☐ Μεταπτυχιακή διατριβή ☒ Διπλωματική εργασία ☐ Ανεξάρτητη έρευνα ☐

Τηλ. επικοινωνίας: 6945331351

Email επικοινωνίας: feybobou@hotmail.com

Η Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μετά την υπ. Αριθμ. 2-3/11-12-2013 συνεδρίασή της εγκρίνει τη διεξαγωγή της προτεινόμενης έρευνας.

Ο Πρόεδρος της
 Εσωτερικής Επιτροπής
 Δεοντολογίας – ΤΕΦΑΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Βιβλίο Συναντήσεων

Υπογραφές: Επιβλέπουσα : κα Καρατζαφέρη Χριστίνα
Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια : Μπόμπου Ευφροσύνη

Ημερομηνία συνάντησης	Υπογραφή Επιβλέπουσας Καθηγήτριας	Υπογραφή Φοιτήτριας
20/11/2013		
3/12/2013		
16/12/2013		
17/3/2014		
9/9/2014		
22/9/2014		
3/11/2014		
20/1/2015		
28/1/2015		
20/2/2015		
27/2/2015		
4/3/2015		