



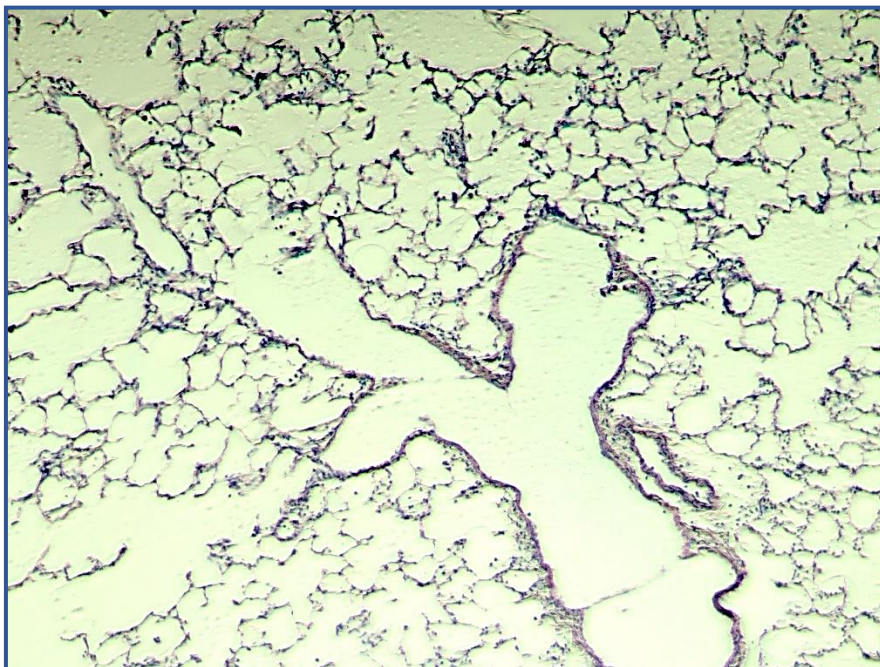
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός ιστικής
καλλιέργειας πνεύμονα αρουραίου»**
**«Development and characterization of rat tissue
culture»**



Ορφανίδου Δήμητρα του Αντωνίου
Λάρισα 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ

(Επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής
Φυσιολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΨΑΡΡΑ ANNA MARIA

(Συνεπιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας
στο Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΒΑΣΙΛΑΚΗ ANNA

Επίκουρος Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας στο Τμήμα Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε σε διάστημα πέντε μηνών, από τον Μάρτιο έως τον Ιούλιο του 2022, στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κα Χατζηευθυμίου. Μετά το πέρας της υλοποίησης της θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν και συμμετείχαν στην διεκπεραίωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κα Χατζηευθυμίου που δέχθηκε να με αναλάβει, να με επιβλέπει και να μου αναθέσει το συγκεκριμένο θέμα της διπλωματικής μου. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το μεγάλο ενδιαφέρον, την άμεση υποστήριξη, καθοδήγηση, επικοινωνία και συμμετοχή που έδειξε σε κάθε βήμα της διπλωματικής μου, από την αρχή έως την ολοκλήρωση της, καθώς επίσης και για την άμεση συμπαράσταση της για την επίλυση των προβλημάτων που προέκυψαν.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Βασιλάκη για την άμεση συνδρομή, ενδιαφέρον και την συμμετοχή της κατά την διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων μου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κα Ψαρρά για την διάθεση και την συμμετοχή της στη τριμελή μου επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κα Λιακούλη Βασιλική, μέλος της Μονάδα Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του τμήματος Ιατρικής, που με προθυμία μου έδωσε το πρωτόκολλο της Ιστοκινέτας και της κοπής τομών παραφίνης σε μικροτόμο, καθώς επίσης με βοήθησε ιδιαιτέρως στην πραγματοποίηση των παραπάνω τεχνικών κατά την διάρκεια εκτέλεσης της διπλωματικής μου.

Θα ήταν παράλειψη εάν δεν ευχαριστούσα τα μέλη των εργαστηρίων της Φυσιολογίας και Φαρμακολογίας και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές που εκπονούσαν την διπλωματική τους παράλληλα με εμένα καθώς με ευχάριστη διάθεση δέχτηκαν να με βοηθήσουν και να με καθοδηγήσουν κατά την διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την αγάπη που μου έδειξαν σε όλη την διάρκεια εκτέλεσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
Σκοπός.....	10
Εισαγωγή.....	11
1. Αναπνευστικό Σύστημα.....	11
1.1 Λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος.....	11
1.2 Ανατομία και ιστολογία του αναπνευστικού συστήματος.....	14
1.2.1. Εμβρυική ανάπτυξη.....	14
1.2.2. Ανατομικά – ιστολογικά στοιχεία του αναπνευστικού συστήματος του αρουραίου.....	15
2. Σύγκριση αναπνευστικού συστήματος ανθρώπου – αρουραίου.....	20
3. Κυτταρικός θάνατος.....	24
3.1 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο.....	26
4. Μοντέλα ex vivo.....	30
Πειραματικό Μέρος.....	32
1. Πειραματόζωα.....	32
2. Αποστείρωση υλικών και αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση και καλλιέργεια του ιστού.....	32
3. Απομόνωση πνευμόνων.....	35
4. Δημιουργία τομών για ιστοκαλλιέργεια.....	35
5. Ιστοκαλλιέργεια.....	37
5. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot Blot).....	38
5.1. Ομογενοποίηση Ιστών.....	38
5.2. Μέθοδος Bradford.....	40
5.3. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot Blot).....	41
6. Εκτίμηση αριθμού κυττάρων καλλιέργειας με την χρωστική Trypan Blue.....	47
7. Χρώση Giemsa.....	48
8. Παρασκευή τομών παραφίνης για ιστοχημική χρώση.....	48
9. Χρώση ιστών με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη.....	56

Αποτελέσματα	58
1. Έκφραση των πρωτεϊνών Caspase -3, LC3 και Beclin.....	58
2. Χαρακτηρισμός κυττάρων στο θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας.....	61
3. Μορφολογία των ιστών μετά από χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης.....	65
Συζήτηση	68
Βιβλιογραφία	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως είναι οι παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος. Συχνά η μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών και των κατάλληλων θεραπειών βασίζεται σε κυτταροκαλλιέργειες, χρήση οργανοειδών (απλούστερες μορφές οργάνων τρισδιάστατης μορφής) ή πειραματικών ζωικών μοντέλων που προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες. Ωστόσο εμφανίζουν μερικούς περιορισμούς καθώς οι κυτταροκαλλιέργειες αποτυγχάνουν να αναπαραστήσουν τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στους πνεύμονες *in vivo* και τα ζωικά μοντέλα συχνά δεν επιτρέπουν αναλύσεις υψηλής απόδοσης. Για αυτό το λόγο καθίσταται αναγκαία η χρησιμοποίηση καινούργιων και βελτιωμένων μοντέλων. Ένα από αυτά τα μοντέλα είναι τα *ex vivo* μοντέλα και ειδικότερα η καλλιέργεια τομών από πνεύμονες. Τα παραπάνω μοντέλα προσφέρουν τη δυνατότητα αναδημιουργίας του κυτταρικού περιβάλλοντος και των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων στον πνεύμονα όπως πραγματοποιούνται *in vivo*. Συνεπώς, καθιστούν πιο εύκολη την μελέτη των λειτουργιών και μεταβολών σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος συμβάλλοντας έτσι στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων σε νόσους του αναπνευστικού. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και χαρακτηρισμός ενός *ex vivo* μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για ιστοκαλλιέργεια τομών από πνεύμονα αρουραίου Wistar.

Οι πνεύμονες φυσιολογικού αρουραίου απομονώθηκαν χειρουργικά, μετά από έγχυση αгарόζης 2% διαμέσου της τραχείας, κόπηκαν σε τομές πάχους 350μm, 500μm ή 700μm και καλλιεργήθηκαν για 21 μέρες σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – F12), το οποίο περιέχει 10% Fetal Bovine Serum, L-Glutamine, Penicillin, Streptomycin, και Fluconazole. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνονταν ανά δυο ημέρες. Οι ιστοί συλλέχθηκαν την ημέρα θανάτωσης του ζώου (ημέρα 0), την 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα καλλιέργειας και ομογενοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοαποτύπωσης κηλίδας ώστε να μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών Caspase-3, που εμπλέκεται στην απόπτωση και των Beclin 1/LC3 που συμμετέχουν στην αυτοφαγία. Επίσης τις ίδιες ημέρες συλλογής των ιστών έγιναν τομές παραφίνης (3μm), ακολούθησε η χρώση τους με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη και παρατηρήθηκε έπειτα η μορφολογία τους στο μικροσκόπιο. Ακόμη, από το θρεπτικό υλικό ελήφθησαν κύτταρα κατά την 14^η ημέρα καλλιέργειας, τα οποία χαρακτηρίστηκαν μετά από χρώσεις Trypan Blue, Giemsa και May Grunwald.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι ελαττώθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Caspase-3, Beclin 1 και LC3 από την 0 μέρα έως την 21^η καλλιέργειας. Επιπροσθέτως, τα περισσότερα κύτταρα που βρίσκονταν στο θρεπτικό υλικό από το οποίο απομονώθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως μακροφάγα. Τέλος, από την χρώση των ιστών παρατηρήθηκε ότι οι τομές μεγαλύτερου πάχους (500 ή 700μm) εμφανίζουν φυσιολογική σχετικά δομή όταν καλλιεργηθούν για 7 ημέρες. Με την παράταση του χρόνου καλλιέργειας οι τομές εμφανίζουν καταστροφή στη δομή τους και νέκρωση. Συνεπώς, το παραπάνω *ex vivo* πειραματικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πειράματα βραχύχρονης (έως 7 ημέρες) καλλιέργειας ιστοτεμαχίων πνευμόνων.

ABSTRACT

One of the deadliest diseases in the world are the ones that damage the respiratory system. Research of the cellular mechanism and effective treatments so far is based on the use of the cell cultures, organoids (which are more simple and smaller 3D forms of organs) and laboratory animals. Although these methods provide a great amount of information, they present some limitations and difficulties such as the failure of the *in vivo* representation of the cellular interactions in the lung. Also, the laboratory animals do not offer high throughput analyzes of pathogens and drugs. This is the reason why they should be used new and better methods than the above. One of those new methods is the use of the *ex vivo* models and more specifically, the slices of lung tissues. This model provides the *in vivo* recreation of the cellular environment and interactions in the lung. Therefore, the studies about the functions of the respiratory system in normal and pathophysiological conditions as well as the discovery of new medical treatments have become easier and better to make. The purpose of the present study was to develop and characterize an *ex vivo* tissue culture model of Wistar rat lung sections.

Normal rat lungs were surgically removed after they were filled with 2% agarose through the trachea and they were cut into thin slices of 350 μ m, 500 μ m and 700 μ m. The slices were cultivated for 21 days in a tissue culture with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – F12) which contains 10% Fetal Bovine Serum, L-Glutamine, Penicillin, Streptomycin, and Fluconazole. The slices were obtained on the day of death of the rat (day 0), on the 2nd, 7th, 14th and 21st day of the tissue cultivation. Next, they were homogenized for the analysis of Dot Blot in order to study the expression of the Caspase-3, Beclin and LC3, which are proteins that take part in processes of apoptosis and autophagy respectively. Moreover, at the same time, cutting of the paraffin embedded slices (3 μ m) of the rat lung tissues took place. These slices were stained with Hematoxylin and Eosin stains in order to be observed under a microscope. Also, on the fourteenth day of the tissue culture, cells were removed from the culture media and stained with Trypan Blue, Giemsa, and May Grunwald.

The obtained results from the techniques above showed that there was a reduction in the expression of the proteins Caspase-3, Beclin and LC3 from the day 0 until the 21 days of the tissue culture. Also, the majority of the cells that have been found inside the culture media were macrophages. Lastly, from the Hematoxylin and Eosin stain it was observed that the 500 μ m or 700 μ m slices represent better the rat lung parenchyma than

the other slices, when they were cultivated until the seventh day of the tissue culture. With the extension of the cultivation time, the sections show destruction in their structure and necrosis. Therefore, the above protocol can be used in future short-term (up to 7 days) lung tissue culture experiments.

ΣΚΟΠΟΣ

Η χρήση *ex vivo* μοντέλων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη και έρευνα ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος καθώς μπορούν να «μιμηθούν» την δομή και τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του πνευμονικού παρεγχύματος. Συγκεκριμένα, οι τομές ιστών από πνεύμονα αρουραίου αποτελούν συχνό *ex vivo* μοντέλο γιατί εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, με το κυριότερο να αποτελεί τη διατήρηση της κυτταρικής πολυπλοκότητας και της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα. Επίσης, παρέχουν την δυνατότητα διερεύνησης φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων του αναπνευστικού συστήματος σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός τροποποιημένου πρωτοκόλλου για την ιστοκαλλιέργεια τομών διαφορετικού πάχους από φυσιολογικούς πνεύμονες αρουραίου, το οποίο θα εξασφαλίζει την ακεραιότητα της δομής του ιστού και την βιωσιμότητα του. Συγκεκριμένα, επιδιώχθηκε η μελέτη του συγκεκριμένου *ex vivo* μοντέλου και ο καθορισμός του βέλτιστου πάχους των τομών (του πνευμονικού ιστού του αρουραίου) που μπορούν να καλλιεργηθούν. Επίσης αξιολογήθηκε και το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι ιστοί διατηρούν τη δομή και τη βιωσιμότητα τους ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί αυτό το *ex vivo* μοντέλο σε μελλοντικές έρευνες που θα αφορούν τη διερεύνηση παθήσεων του αναπνευστικού.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αναπνευστικό Σύστημα

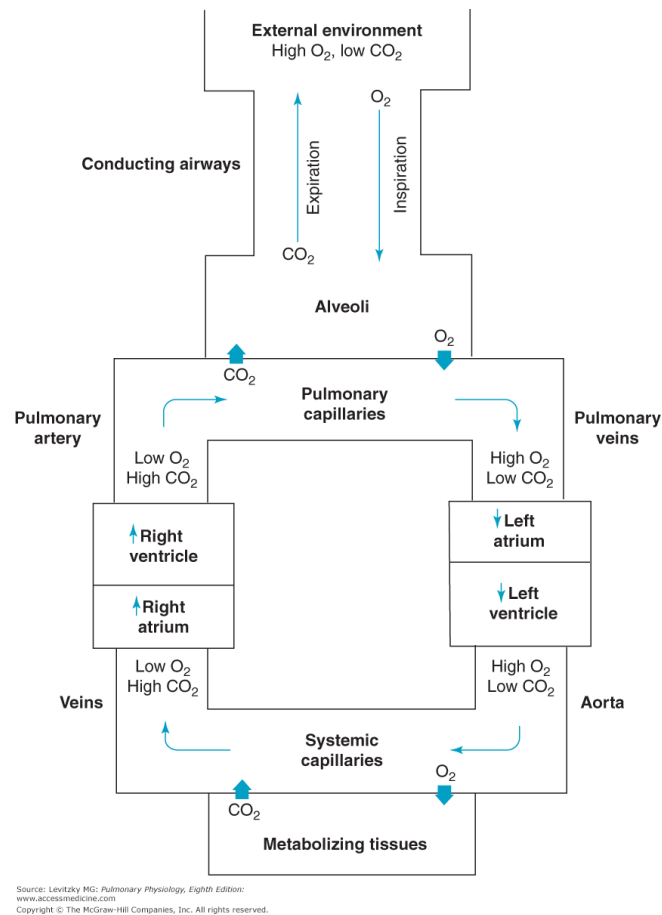
1.1 Λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από την ανώτερη (ρινική κοιλότητα, λάρυγγας και φάρυγγας) και την κατώτερη αναπνευστική οδό (τραχεία, βρόγχους, βρογχιόλια και κυψελίδες). Η θεμελιώδης λειτουργία του είναι η αποβολή του διοξειδίου του άνθρακα και η δέσμευση του οξυγόνου από το περιβάλλον με σκοπό την μεταφορά του σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού.

Οι λειτουργίες του αναπνευστικού συστήματος περιλαμβάνουν: την ανταλλαγή αερίων (οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα), την διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, την πνευμονική άμυνα και τον μεταβολισμό ουσιών και ενώσεων. (Letvitzky M.G., 2013)

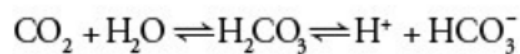
Ανταλλαγή αερίων. Το οξυγόνο που βρίσκεται στον ατμοσφαιρικό αέρα εισέρχεται στους πνεύμονες μέσω των αεραγωγών του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και μεταφέρεται στις κυψελίδες των πνευμόνων. Εκεί πραγματοποιείται η ανταλλαγή του οξυγόνου με το διοξείδιο του άνθρακα (που παράγεται από τα κύτταρα) και αποβάλλεται από το σώμα. Η κίνηση και μεταφορά του εισπνεόμενου αέρα που περιέχει το οξυγόνο γίνεται μέσω δυνάμεων που προέρχονται από τους αντίστοιχους αναπνευστικούς μυς, οι οποίοι δρουν σύμφωνα με εντολές του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ταυτοχρόνως, από την δεξιά κοιλία της καρδιάς αντλείται το φλεβικό αίμα που επιστρέφει από όλους τους ιστούς του σώματος, το οποίο περιλαμβάνει οξυγόνο σε χαμηλή και διοξείδιο του άνθρακα σε υψηλή περιεκτικότητα. Η ανταλλαγή των αερίων γίνεται με την βοήθεια των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων στις κυψελίδες και μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, το αίμα περιλαμβάνει οξυγόνο σε υψηλή περιεκτικότητα και διοξείδιο του άνθρακα σε χαμηλή αντίστοιχα. Έπειτα, το αίμα μεταφέρεται πίσω στην καρδιά και διανέμεται σε όλους τους ιστούς από την αριστερή κοιλία (Εικόνα 1). (Letvitzky M.G., 2013)



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της ανταλλαγής αερίων μεταξύ των ιστών του σώματος και του περιβάλλοντος. (Πηγή: Letvitzky M.G., 2013)

Οξεοβασική ισορροπία: Είναι ιδιαίτερα σημαντική η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας για την εξασφάλιση ενός σταθερού εσωτερικού περιβάλλοντος και των φυσιολογικών λειτουργιών του σώματος. Η αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα στο σώμα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου σύμφωνα με τη εξίσωση:



Το κεντρικό νευρικό σύστημα διαθέτει αισθητήρες για την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα και των επιπέδων των ιόντων υδρογόνου στο αίμα και στέλνει πληροφορίες στο κέντρο ελέγχου της αναπνοής. Το αναπνευστικό σύστημα αφαιρεί το διοξείδιο του άνθρακα από το σώμα με την διαδικασία της ανταλλαγής αερίων και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει και να ρυθμίζει την οξεοβασική ισορροπία. (Letvitzky M.G., 2013)

Πνευμονική άμυνα: Το αναπνευστικό σύστημα διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς, καθώς με κάθε εισπνοή, εισέρχονται στο σώμα σκόνη, παθογόνοι μικροοργανισμοί, σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου ή αμίαντου, τοξικά αέρια και άλλοι ρύποι οι οποίοι απειλούν την υγεία. Συνεπώς, ο αέρας που εισπνέεται στους αεραγωγούς φιλτράρεται συνεχώς από τις τρίχες της ρινικής κοιλότητας για την αποτροπή της εισόδου ανεπιθύμητων μικροοργανισμών καθώς επίσης, τα διάφορα επιβλαβή σωματίδια που υπάρχουν σε αυτόν παγιδεύονται στην βλέννα που εκκρίνεται από την ρινική κοιλότητα. Επίσης, η θερμοκρασία και η υγρασία της τοπικής ατμόσφαιρας ποικίλλουν και μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τους πνεύμονες και την λειτουργία τους. Έτσι, για την αποφυγή αυτού, ο αέρας που εισέρχεται, θερμαίνεται από τα άφθονα αιμοφόρα αγγεία που υπάρχουν στον βλεννογόνο της ρινικής κοιλότητας.

Ακόμη, το αναπνευστικό επιθήλιο που καλύπτει την κατώτερη αναπνευστική οδό λειτουργεί ως αμυντικό φράγμα ενάντια σε μικρόβια, βακτήρια, αλλεργιογόνα και άλλα βλαβερά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, το ψευδο-στρωματοποιημένο επιθήλιο των αεραγωγών αποτελείται από τα κύτταρα Goblet, τα οποία εκκρίνουν γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, τις βλεννίνες, οι οποίες μαζί με το νερό σχηματίζουν την βλέννα που εκκρίνεται στους αεραγωγούς. Το παχύ στρώμα βλέννας που δημιουργείται καλύπτει το κροσσωτό επιθήλιο των αεραγωγών, απομακρύνει τα βλαβερά σωματίδια και προάγει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των μικροοργανισμών, καθώς επίσης λειτουργεί ως άμυνα ενάντια στον τραυματισμό του επιθηλίου. Ωστόσο η υπερβολική παραγωγή βλέννας σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις, αναπνευστικές αλλεργίες και εμφάνιση αναπνευστικών ασθενειών, όπως η πνευμονία και το άσθμα. (Invernizzi R. et al, 2020)

Επίσης, κύτταρα του αμυντικού συστήματος, όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα, βρίσκονται στους αεραγωγούς και στις κυψελίδες αντίστοιχα και είναι υπεύθυνα για την καταστροφή βακτηρίων και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. (Letvitzky M.G., 2013)

Μεταβολισμός ουσιών: Τα κύτταρα του πνεύμονα έχουν μεταβολική δραστηριότητα για να εξασφαλίζεται η απαραίτητη ενέργεια και τα θρεπτικά συστατικά για την ομαλή λειτουργία τους. Ωστόσο, πέρα από την βασική μεταβολική δραστηριότητα, ο πνεύμονας έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται και στον μεταβολισμό αγγειοδραστικών ουσιών. Συγκεκριμένα, πολλές αγγειοδραστικές ουσίες απενεργοποιούνται,

τροποποιούνται ή αποβάλλονται από το αίμα καθώς περνούν από τους πνεύμονες και ειδικότερα από το ενδοθήλιο των αγγείων της πνευμονικής κυκλοφορίας.

Επιπροσθέτως, τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II είναι υπεύθυνα για την σύνθεση και απελευθέρωση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας, η οποία αποτελεί ένα μείγμα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών που έχει ως στόχο την μείωση της επιφανειακής τάσης στην διεπαφή κυψελίδων – αέρα. Τέλος, τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του πνεύμονα σε τραυματισμό. Ειδικότερα, όταν τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου I τραυματίζονται, τα κύτταρα τύπου II πολλαπλασιάζονται για να αποκαταστήσουν την επιθηλιακή επιφάνεια. Τέλος, τα κύτταρα τύπου II μπορούν να μετατραπούν σε τύπου I μετά από τραυματισμό. (Letvitzky M.G., 2013)

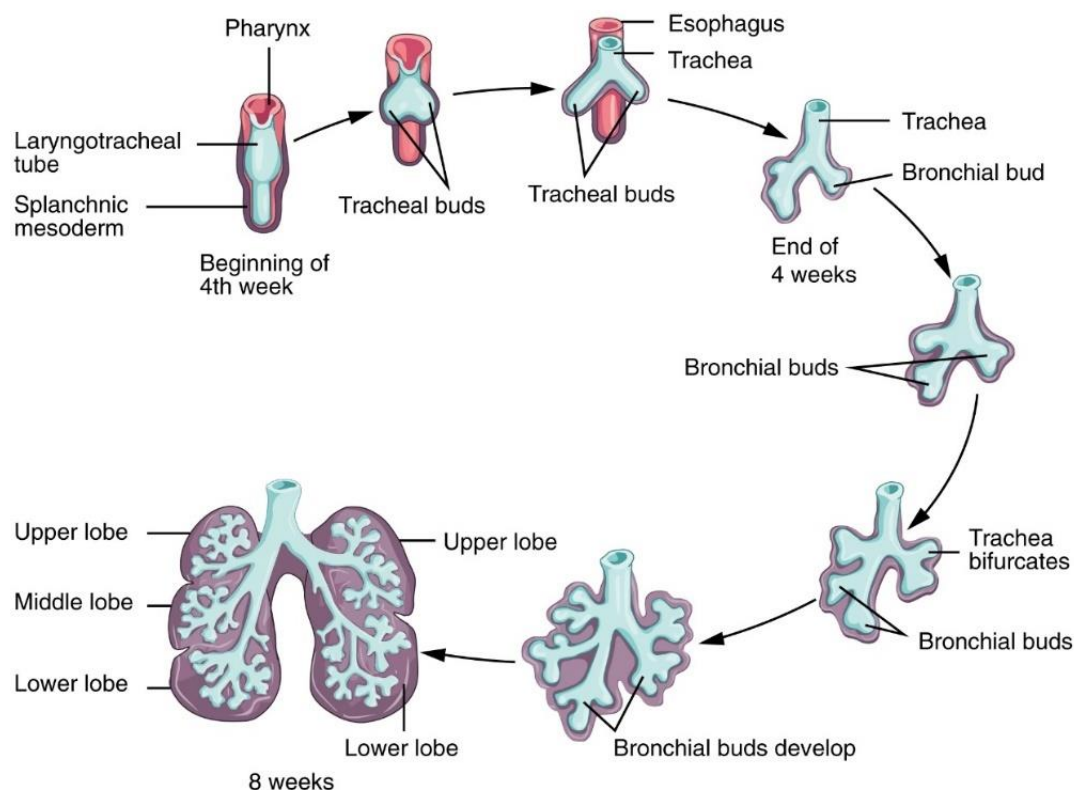
1.2 Ανατομία και ιστολογία του αναπνευστικού συστήματος

1.2.1 Εμβρυική ανάπτυξη

Η εμβρυική ανάπτυξη των πνευμόνων του αρουραίου ξεκινάει από τον σχηματισμό αυλάκωσης στον φάρυγγα, που βρίσκεται στην κοιλιακή χώρα και συγκεκριμένα από τον λαρυγγοτραχειακό σωλήνα. Ο πνευμονικός οφθαλμός προκύπτει από το ουραίο τμήμα του πρόσθιου εντέρου και καθώς αναπτύσσεται το ανώτερο άκρο του οδηγεί στον σχηματισμό του τραχειακού οφθαλμού. Ο τραχειακός οφθαλμός χωρίζεται σε δύο κύριους βρογχικούς οφθαλμούς από τους οποίους αναπτύσσονται οι δύο βρόγχοι, ο ένας στα αριστερά και ο άλλος στα δεξιά (ο βρόγχος στα δεξιά είναι μεγαλύτερος από αυτόν στα αριστερά). Επίσης, αρχίζει να δημιουργείται η τραχεία και να διαχωρίζεται από το πρόσθιο έντερο μέσω των τραχειοοισοφαγικών ραβδώσεων, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέονται για να σχηματίσουν το τραχειοοισοφαγικό διάφραγμα.

Διακρίνονται τρία στάδια εμβρυικής ανάπτυξης των πνευμόνων (Εικόνα 2): α) η «αδενική περίοδος», η οποία διαρκεί μέχρι την δέκατη ημέρα κύησης, όπου οι πνεύμονες χαρακτηρίζονται από μερικώς ανεπτυγμένο συνδετικό ιστό και επιθήλιο, β) η «σωληνώδης περίοδος», κατά την οποία αρχίζουν να αναπτύσσονται το βρογχικό δέντρο και τα αγγειακά συστήματα που περιβάλλουν τους πνεύμονες και διαρκεί από το τέλος της αδενικής περιόδου έως λίγες μέρες πριν την γέννηση και τέλος, γ) η «κυψελιδική περίοδος» στην οποία ξεκινάει ο σχηματισμός και η ανάπτυξη των

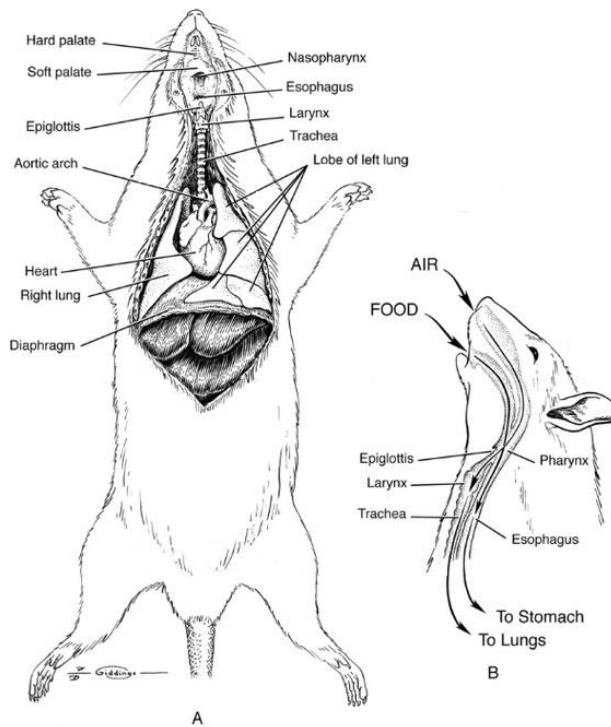
κυψελίδων δύο μέρες πριν τη γέννηση και ολοκληρώνονται λίγες ημέρες μετά τον τοκετό. (McInees E., 2019)



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση εμβρυικής ανάπτυξης των πνευμόνων του αρουραίου. (Πηγή: 2328_Development_of_Lower_Respiratory_SystemN.jpg(1950×1481)) (opentextbc.ca)

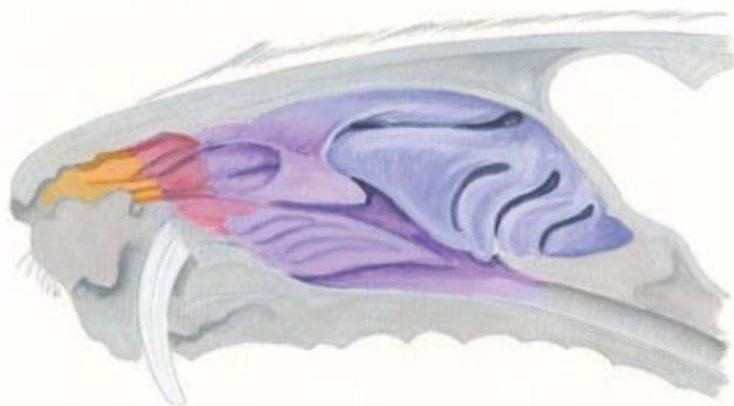
1.2.2. Ανατομικά-ιστολογικά στοιχεία του αναπνευστικού συστήματος του αρουραίου

Το αναπνευστικό σύστημα διαχωρίζεται σε δύο κύρια τμήματα, το τμήμα των αεραγωγών και το αναπνευστικό τμήμα (Εικόνα 3). Το τμήμα των αεραγωγών είναι υπεύθυνο για την μεταφορά του αέρα από το εξωτερικό περιβάλλον στους πνεύμονες και περιλαμβάνει την ρινική κοιλότητα, το στόμα, τον φάρυγγα, τον λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους και τα βρογχιόλια. Το αναπνευστικό τμήμα περιλαμβάνει τους πνεύμονες, τους κυψελιδικούς αγωγούς, τους κυψελιδικούς σάκους και τις κυψελίδες και έχει ως στόχο την ανταλλαγή του οξυγόνου με το διοξείδιο του άνθρακα. (McInees E., 2019)



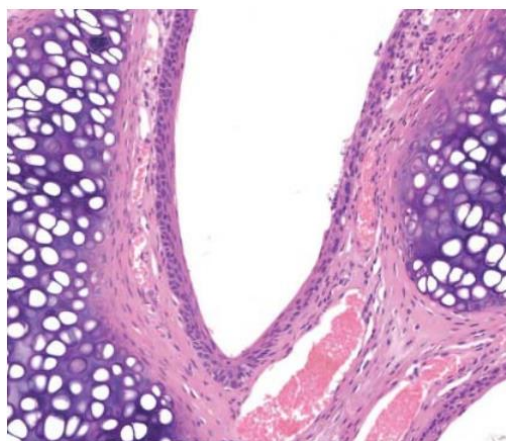
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του αναπνευστικού συστήματος αρουραίου. (Πηγή: <https://www.medicalimages.com/stock-photo-illustration-showing-the-rat-respiratory-system-major-respiratory-organs-ventral-view-a-head-image9929360.html>)

Ρινική κοιλότητα: Η ρινική κοιλότητα του αρουραίου χωρίζεται από το ρινικό διάφραγμα σε δύο κύριες διόδους από τις οποίες εισέρχεται ο αέρας. Κάθε ρινική διόδος εκτείνεται μέχρι τον ρινοφάρυγγα. Στην ρινική κοιλότητα βρίσκονται τέσσερα είδη επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία δημιουργούν το: πλακώδες, μεταβατικό, αναπνευστικό και οσφρητικό επιθήλιο (Εικόνα 4).



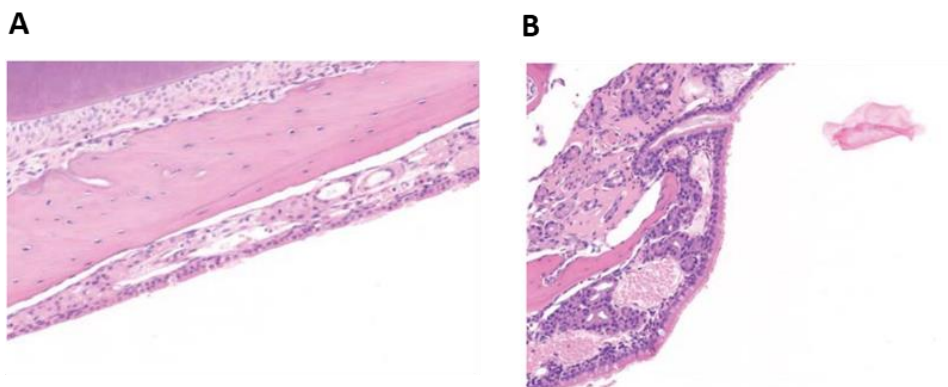
Εικόνα 4: Η κατανομή των τεσσάρων ειδών επιθηλίων στην ρινική κοιλότητα όπου απεικονίζονται: το πλακώδες επιθήλιο (πορτοκαλί), το μεταβατικό επιθήλιο (ροζ), το αναπνευστικό επιθήλιο (λilά) και το οσφρητικό επιθήλιο (μπλε). (Πηγή: McInees E., 2019)

Το στρωτό πλακώδες επιθήλιο καλύπτει τον ρινικό προθάλαμο, ο οποίος βρίσκεται αμέσως μετά τα ρουθούνια (Εικόνα 5). Το παραπάνω στρώμα επιθηλιακών κυττάρων, το οποίο αποτελείται από πολλές λωρίδες πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων που γίνονται πιο επίπεδα όσο πλησιάζουν προς την επιφάνεια του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας, είναι υπεύθυνο για την προστασία των υποκείμενων ιστών του προθαλάμου από βλαβερές εισπνεόμενες ουσίες.



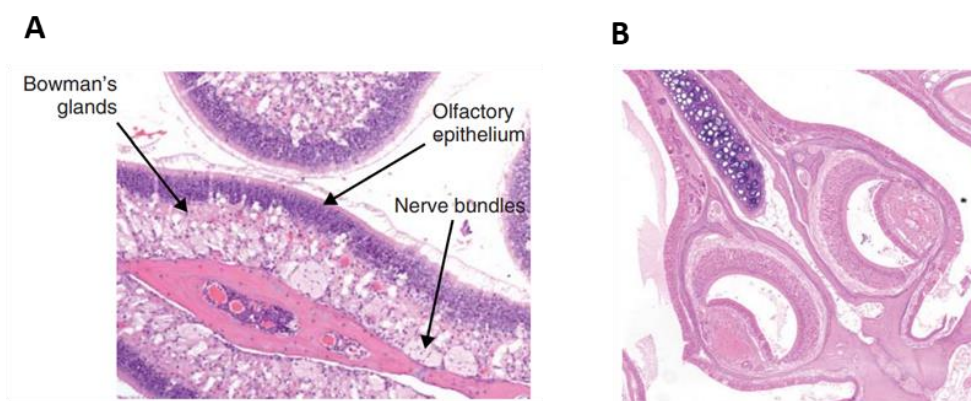
Εικόνα 5: Ιστολογική απεικόνιση του στρωτού πλακώδους επιθηλίου που περιβάλλει τον ρινικό προθάλαμο. (Πηγή: McInees E., 2019)

Ο αέρας εισέρχεται από τον προθάλαμο και μετακινείται στους ρινικούς θαλάμους οι οποίοι αποτελούνται από τις κόγχες. Οι κόγχες είναι οστέινες δομές που προεξέχουν στον αυλό της ρινικής κοιλότητας και οδηγούν στην αύξηση της επιφάνειας της μύτης και της εισόδου περισσότερου αέρα. Το στρώμα του πλακώδους επιθηλίου του προθαλάμου μετατρέπεται στο μεταβατικό επιθήλιο (στο οποίο αποθηκεύονται ένζυμα μεταβολισμού για ξενοβιοτικές ουσίες, όπως είναι το κυτόχρωμα p40) από το οποίο στη συνέχεια προκύπτει το αναπνευστικό επιθήλιο που καλύπτει τις κόγχες (Εικόνα 6).



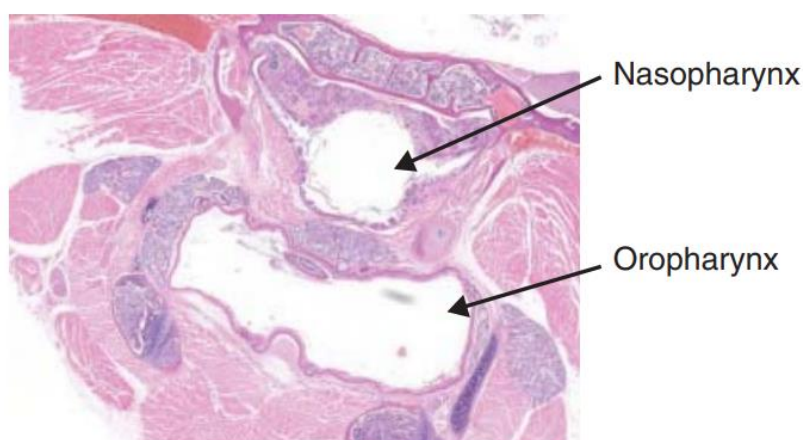
Εικόνα 6: A) Ιστολογική απεικόνιση του μεταβατικού επιθηλίου που προκύπτει από το πλακώδες επιθήλιο του προθαλάμου και B) ιστολογική απεικόνιση του αναπνευστικού επιθηλίου. (Πηγή: McInees E., 2019)

Στην βάση του ρινικού διαφράγματος βρίσκονται οι αδένες του Bowman, οι οποίοι παράγουν ένζυμα για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώσεων και εκκρίνουν την βλέννα που καλύπτει την επιφάνεια της ρινικής κοιλότητας (Εικόνα 7). Το όργανο vomeronasal (VNO) ή όργανο Jacobson αποτελείται από ένα ζευγάρι αδένων που βρίσκονται στη βάση του ρινικού διαφράγματος και δεν υπάρχουν στο ανθρώπινο αναπνευστικό σύστημα (Εικόνα 7B). Η λειτουργία τους είναι η όσφρηση, η αναγνώριση των φερομονών και η αντίληψη της γεύσης των τροφίμων. (McInees E., 2019)



Εικόνα 7: Α) Ιστολογική απεικόνιση του οσφρητικού επιθηλίου όπου φαίνονται οι αδένες του Bowman και οι ομάδες των οσφρητικών δεματίων (nerve bundles) και Β) ιστολογική απεικόνιση του οργάνου Jacobson (Πηγή: McInees E., 2019).

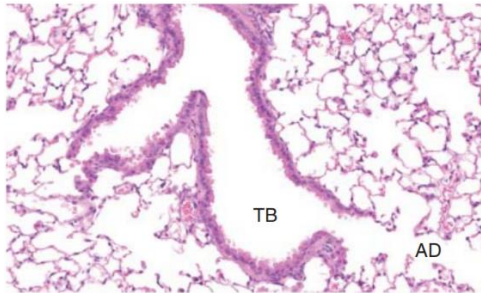
Φάρυγγας: Ο φάρυγγας χρησιμεύει ως κοινό πέρασμα του φαγητού και του αέρα και αποτελείται από τον ρινοφάρυγγα, τον στοματοφάρυγγα και τον λαρυγγοφάρυγγα (Εικόνα 8). Εκτείνεται από την ρινική κοιλότητα και το στόμα και καταλήγει στον λάρυγγα. Ο φάρυγγας περιλαμβάνει το πλακώδες και το αναπνευστικό επιθήλιο. (McInees E., 2019)



Εικόνα 8: Ιστολογική απεικόνιση του ρινοφάρυγγα (Nasopharynx) και του στοματοφάρυγγα (Oropharynx). (Πηγή: McInees E., 2019)

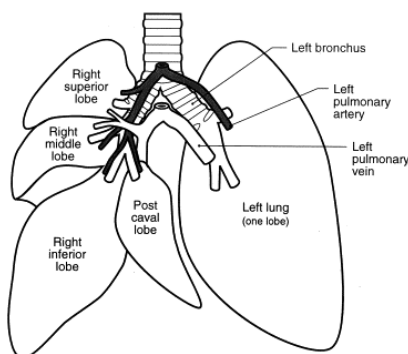
Λάρυγγας: Ο λάρυγγας βρίσκεται πίσω από το κάτω μέρος της γλώσσας και προς τον οισοφάγο. Εντοπίζεται μεταξύ του φάρυγγα και της τραχείας. Αποτελείται από τρία ζευγάρια χόνδρων («αρυτενοειδή», «κερατοειδή», «σφηνοειδή») και δύο μονούς χόνδρους («θυροειδής» και «αρυτενοειδής»). Το επιθήλιο του λάρυγγα μεταβάλλεται από πλακώδες επιθήλιο σε αναπνευστικό επιθήλιο. (McInees E., 2019)

Τραχεία: Η τραχεία εντοπίζεται κάτω ακριβώς από τον λάρυγγα και καλύπτεται από αναπνευστικό, κροσσωτό και κυλινδρικό επιθήλιο. Το τραχειακό επιθήλιο περιλαμβάνει πολλών ειδών κυττάρων όπως τα κύτταρα «Clara» (τα οποία εκκρίνουν τις επιφανειοδραστικές ουσίες), τα νευροενδοκρινικά κύτταρα, τα ανοσοποιητικά κύτταρα όπως λευκοκύτταρα και άλλα. Τέλος, η τραχεία χωρίζεται στους δύο βρόγχους οι οποίοι σχηματίζουν στη συνέχεια τα βρογχιόλια, τα τελικά βρογχιόλια και τους κυψελιδικούς πόρους που καταλήγουν στις κυψελίδες (Εικόνα 9). (McInees E., 2019)



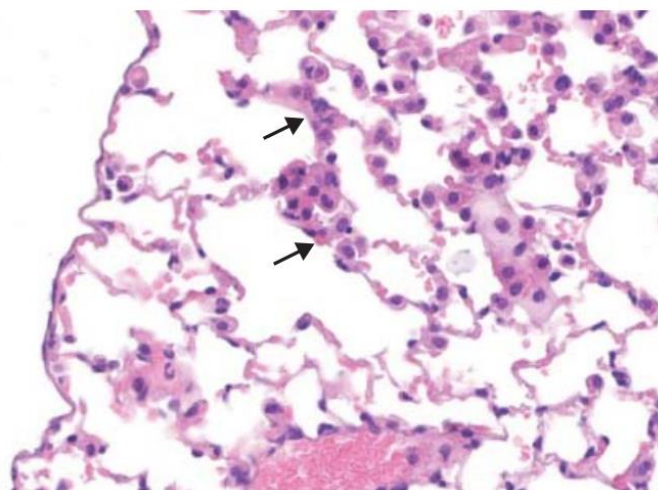
Εικόνα 9: Ιστολογική απεικόνιση ενός τελικού βρογχιολίου (TB) το οποίο καταλήγει σε κυψελίδα του πνεύμονα (AD). (Πηγή: McInees E., 2019)

Πνεύμονες: Οι πνεύμονες βρίσκονται στην θωρακική κοιλότητα του αρουραίου και καλύπτονται από την μεμβράνη του υπεζωκότα. Χωρίζονται σε δύο λοβούς, τον αριστερό, ο οποίος είναι ενιαίος, και στον δεξί λοβό, ο οποίος χωρίζεται με τη σειρά του σε τέσσερις διακριτούς λοβούς (Εικόνα 10). Οι βρόγχοι καλύπτονται από κροσσωτό και κυλινδρικό επιθήλιο, κύτταρα Clara και θυσανωτά κύτταρα (brush cells). (McInees E., 2019)



Εικόνα 10: Απεικόνιση των δεξιού και αριστερού λοβού των πνευμόνων. [Sequential Bilateral Isolated Lung Perfusion in the Rat: An Experimental Model - The Annals of Thoracic Surgery (annalsthoracicsurgery.org)]

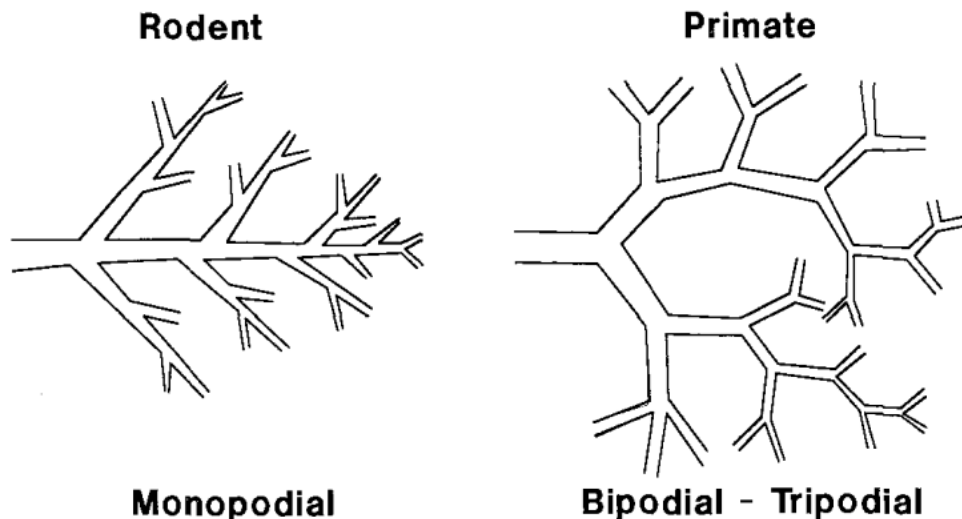
Οι κυψελίδες είναι η λειτουργική δομή των πνευμόνων. Το κυψελιδικό επιθήλιο αποτελείται από πεπλατυσμένα πλακώδη πνευμονικά κύτταρα τύπου 1 και από κυβοειδή πνευμονικά κύτταρα τύπου 2 (Εικόνα 11). Τα πνευμονοκύτταρα τύπου 1 εμπλέκονται στην ανταλλαγή αερίων ενώ τα τύπου 2 εκκρίνουν την επιφανειοδραστική ουσία. Επίσης, κατά την ανταλλαγή των αερίων στους πνεύμονες, το οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα διαπερνούν το κυψελιδικό τοίχωμα και τα αιμοφόρα αγγεία που βρίσκονται σε στενή επαφή με τις κυψελίδες. Τέλος, στις κυψελίδες βρίσκονται τα κυψελιδικά μακροφάγα τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από τυχόν κατάποση ξένου βλαβερού υλικού στους πνεύμονες. (McInees E., 2019)



Εικόνα 11: Ιστολογική απεικόνιση του κυψελιδικού επιθηλίου που αποτελείται από τα πεπλατυσμένα πλακώδη πνευμονικά κύτταρα τύπου 1 και από τα κυβοειδή πνευμονικά κύτταρα τύπου 2 (απεικονίζονται με τα βέλη). Συνήθως, τα κύτταρα τύπου 2 είναι δύσκολο να εντοπιστούν σε φυσιολογικούς πνευμονικούς ιστούς και είναι πιο ευδιάκριτα στην περίπτωση υπερπλασίας. (Πηγή: McInees E., 2019)

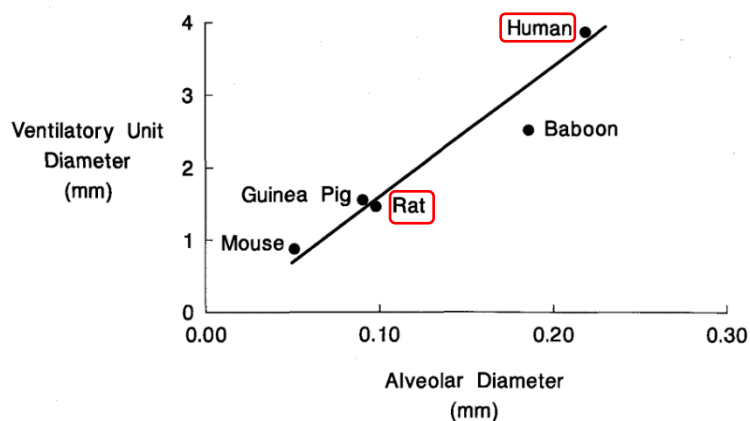
2. Σύγκριση αναπνευστικού συστήματος ανθρώπου – αρουραίου

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές που αφορούν το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα τόσο εντός των ειδών όσο και μεταξύ των ειδών. Το αναπνευστικό σύστημα του αρουραίου και του ανθρώπου εμφανίζει αρκετές ομοιότητες όσον αφορά την λειτουργία, ανατομία και ιστολογία. Ωστόσο υπάρχουν και αρκετές διαφορές. Αρχικά, η κυρία διαφορά μεταξύ των δύο είναι η δομή των πνευμόνων. Οι πνεύμονες στους ανθρώπους είναι μεγαλύτεροι σε διαστάσεις από τους αντίστοιχους των αρουραίων και έχουν διαφορετικό σύστημα διακλάδωσης των βρόγχων. Στους ανθρώπους οι βρόγχοι είναι συμμετρικοί και «διποδικοί» ή «τριποδικοί», δηλαδή διαχωρίζονται σε δύο ή τρεις βρογχικούς αεραγωγούς ενώ στους αρουραίους οι βρόγχοι είναι ασύμμετροι και «μονοποδικοί» (Εικόνα 12). (Miller F.J et al, 1993)



Εικόνα 12: Απεικόνιση «μονοποδικού» και «διποδικού-τριποδικού» βρογχικού συστήματος διακλάδωσης σε αρουραίο (αριστερά) και σε άνθρωπο (δεξιά). (Miller F.J et al, 1993)

Το μονοποδικό βρογχικό σύστημα των αρουραίων είναι ασύμμετρο διότι κάθε κλάδος του βρογχικού δέντρου έχει διαφορετικό μήκος και γωνία από τους προηγούμενους σε αντίθεση με το διποδικό ή τριποδικό σύστημα, το οποίο διχοτομείται σε δύο ή τρεις αντίστοιχα κύριους αεραγωγούς, οι κλάδοι των οποίων έχουν παρόμοια γωνία και μήκος με τους προηγούμενους. (Hofmann W. et al, 1989)

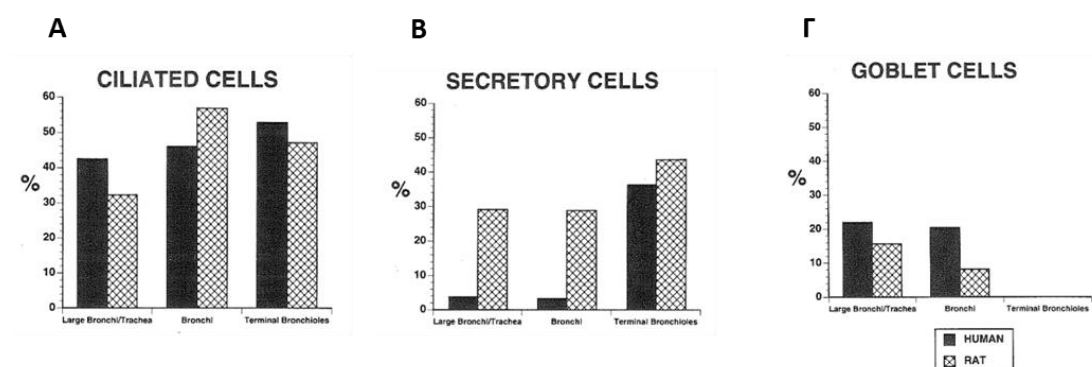


Εικόνα 13: Σύγκριση της διαμέτρου των αναπνευστικών μονάδων και των κυψελίδων των διαφόρων ειδών μεταξύ τους (Πηγή: Miller F.J et al, 1993).

Μια άλλη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών είναι ο αριθμός των βρογχολίων και κυψελίδων. Μια «αναπνευστική μονάδα» είναι η κυψελίδα, ο κυψελιδικός σάκος και η πλησιέστερη σε αυτά βρογχική-κυψελιδική σύνδεση. Στους ανθρώπους, οι πνεύμονες είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος και επομένως έχουν περισσότερες αναπνευστικές μονάδες, δηλαδή περισσότερες κυψελίδες και

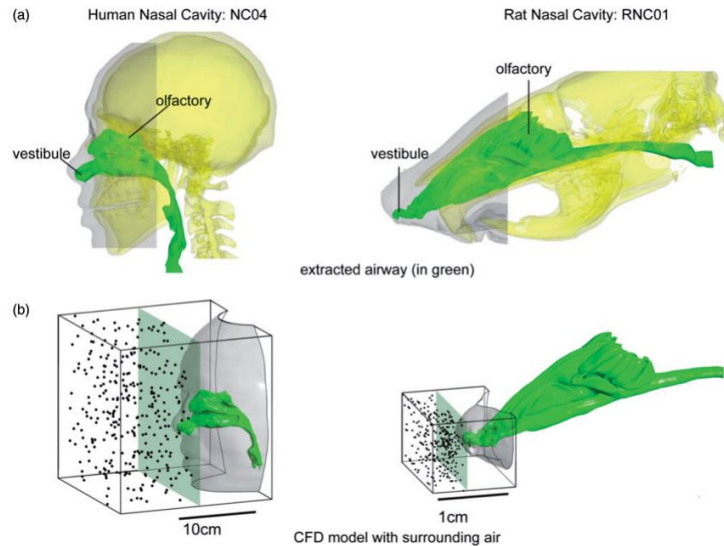
βρογχιόλια, τα οποία έχουν μεγαλύτερη διάμετρο σε σχέση με τα αντίστοιχα των αρουραίων (Εικόνα 13). (Miller F.J et al, 1993)

Μικρές διαφορές, παρατηρούνται επίσης στη δομή του επιθηλίου των αεραγωγών όσον αφορά τα τρία είδη κυττάρων. Τα κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν ομοιότητες και στα δύο είδη όσο αφορά τον αριθμό και την κατανομή τους στην τραχεία, στο βρογχικό δέντρο και στα τελικά βρογχιόλια. Τα κύτταρα Goblet (που και αυτά αποτελούν μέρος του αναπνευστικού επιθηλίου και εκκρίνουν βλεννίνες) μειώνονται σημαντικά σε αριθμό από τους βρόγχους στα τελικά βρογχιόλια στους αρουραίους και ακόμα περισσότερο στους ανθρώπους. Επιπλέον, οι αρουραίοι περιέχουν μικρότερο αριθμό κυττάρων Goblet, σε σχέση με τους ανθρώπους. Τέλος, τα εκκριτικά κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου αυξάνονται σε αριθμό όσο φτάνουν προς τα τελικά βρογχιόλια και είναι περισσότερα σε αριθμό στους αρουραίους από ότι στους ανθρώπους (Εικόνα 14). (Miller F.J et al, 1993)



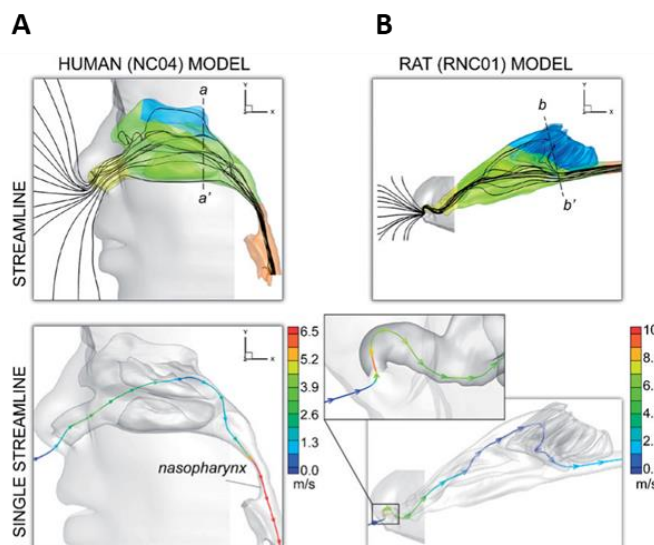
Εικόνα 14: Σύγκριση επιθηλίου των αεραγωγών ανθρώπου και αρουραίου για διάφορους τύπους κυττάρων ως συνάρτηση της θέσης τους στο βρογχικό δέντρο και στα τελικά βρογχιόλια όπου: Α) κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα (ciliated cells), Β)εκκριτικά κύτταρα (secretory cells) και Γ) κύτταρα Goblet (Πηγή: Miller F.J et al, 1993).

Τέλος, υπάρχουν διαφορές και στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα των δύο ειδών. Συγκρίσεις μεταξύ της ανατομίας της ρινικής κοιλότητας και επιφάνειας έδειξαν ότι στον άνθρωπο η επιφάνεια της ρινικής κοιλότητας είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή του αρουραίου. Οι περιοχές που καλύπτουν την μεγαλύτερη επιφάνεια στον άνθρωπο (περίπου το 52.8%) είναι οι μεσαίοι και οι κατώτεροι αεραγωγοί ενώ στον αρουραίο η οσφρητική περιοχή καλύπτει το 55.6% της ρινικής κοιλότητας (Εικόνα 15). (Shang Y. et al, 2015)



Εικόνα 15: α) Απεικόνιση των ρινικών διόδων του αέρα (με πράσινο) στον άνθρωπο αριστερά και στον αρουραίο δεξιά όπου φαίνεται ο προθάλαμος και η οσφρητική περιοχή της ρινικής κοιλότητας (προέρχονται από αξονικές τομογραφίες), β) υπολογιστικά μοντέλα που δείχνουν την επιφάνεια προσώπου-ρινικής κοιλότητας που έρχεται σε επαφή με τον αέρα (Πηγή: Shang Y. et al, 2015).

Μια άλλη ανατομική διαφορά είναι το σχήμα του ρινικού προθαλάμου που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του αέρα στους αεραγωγούς. Στον άνθρωπο ο αέρας παίρνει στροφή 90 μοιρών καθώς διαπερνάει τον προθάλαμο και συνεπώς η ταχύτητα του είναι 15 L/min. Αντίθετα, στον αρουραίο ο εισερχόμενος αέρας παίρνει απότομη στροφή των 180 μοιρών καθώς διέρχεται από τον προθάλαμο και έτσι η ταχύτητα μεταφοράς του είναι 0.4 L/min (Εικόνα 16). Τέλος, η διάμετρος των σωματιδίων που εισπνέονται είναι 2.5 με 20 μm στον άνθρωπο και 1 με 3 μm στον αρουραίο. (Shang Y. et al, 2015)

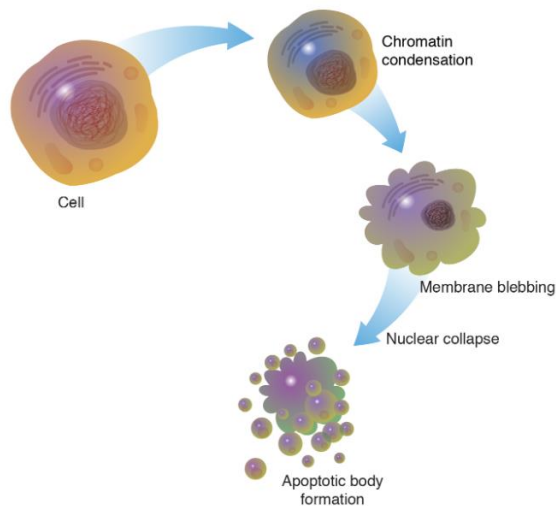


Εικόνα 16: Α) Απεικόνιση της διόδου του αέρα από την ρινική κοιλότητα του ανθρώπου όπου φαίνονται οι ταχύτητες μεταφοράς σε κάθε περιοχή της κοιλότητας και η γωνία στροφής (90°) και Β) απεικόνιση της διόδου του αέρα από την ρινική κοιλότητα του αρουραίου (γωνία στροφής: 180°) (Πηγή: Shang Y. et al, 2015).

3. Κυτταρικός Θάνατος

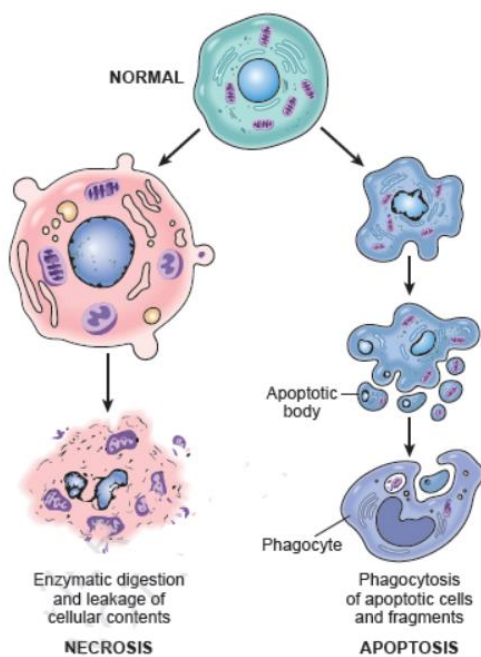
Στους πολυκύτταρους οργανισμούς υπάρχει συνεχής προσπάθεια διατήρησης της ισορροπίας μεταξύ των νέων κυττάρων που δημιουργούνται, με την διαδικασία της μίτωσης, και των κατεστραμμένων ή ανεπιθύμητων κυττάρων που απομακρύνονται από το σώμα με την διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. Ο σκοπός του κυτταρικού θανάτου είναι να απομακρύνει από το σώμα τα κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα από τους ιστούς που έχουν προσβληθεί ώστε τα κύτταρα από γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς να διατηρηθούν υγιή. Ο κυτταρικός θάνατος είναι αποτέλεσμα πολλών διαδικασιών από τις οποίες οι πιο κύριες είναι η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία. Οι μηχανισμοί των παραπάνω διαδικασιών ρυθμίζονται από ποίκιλλα ρυθμιστικά γονίδια και μονοπάτια και ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer, Parkinson και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Επίσης, και ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος καθώς και να οδηγήσει στον θάνατο του οργανισμού. (Sauler M., et al, 2019)

Απόπτωση: Η απόπτωση (Εικόνα 17) είναι η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ο οποίος δεν οδηγεί σε ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα, όπως γίνεται στην νέκρωση. Είναι υψηλά συντηρημένη διαδικασία μεταξύ των πολυκύτταρων οργανισμών και ρυθμίζεται από ειδικές πρωτεάσες, τις κασπάσες. Μόλις ανιχνευτεί η κυτταρική βλάβη, οι κασπάσες ενεργοποιούνται και ξεκινούν μια σειρά διαδικασιών που έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA, μέσω ενεργοποίησης των ενδονουκλεασών, την καταστροφή πυρηνικών πρωτεϊνών και του κυτταροσκελετού, τη έκφραση συνδετών για την πρόσδεση φαγοκυττάρων και τέλος, τον σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων που λειτουργούν ως «σακούλες απορριμμάτων». Η απόπτωση μπορεί να ξεκινήσει είτε από το ίδιο το κύτταρο, όταν αυτό ανιχνεύει βλάβες μέσω αισθητήρων, είτε από την αλληλεπίδραση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και των κατεστραμμένων ή μολυσμένων κυττάρων. (D'Arcy MS., 2019)



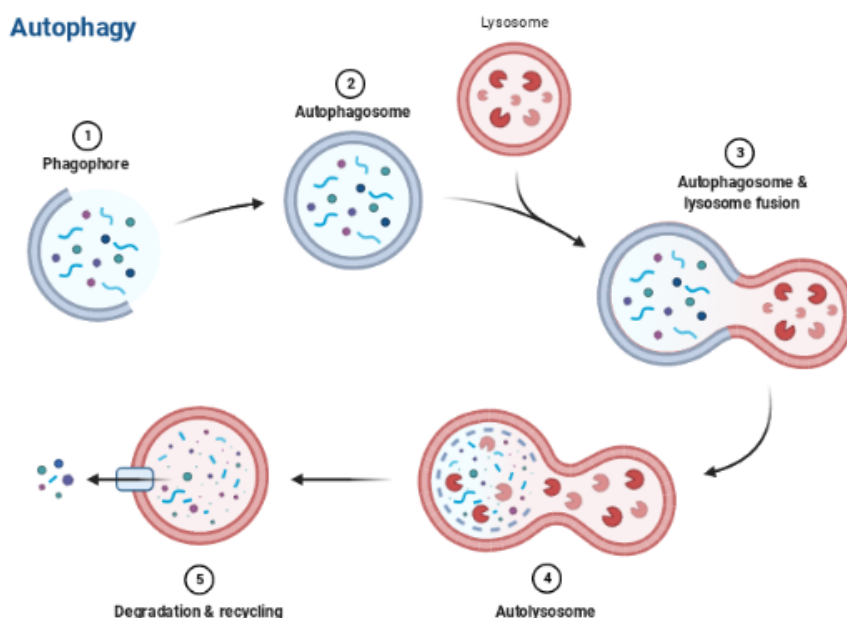
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της απόπτωσης όπου φαίνονται ο κατακερματισμός του DNA και η δημιουργία του αποπτωτικού σώματος. (Πηγή: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/apoptosis>)

Νέκρωση: Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση (Εικόνα 18) είναι ανεξέλεγκτη μορφή κυτταρικού θανάτου η οποία προκαλείται από εξωτερικό τραυματισμό όπως υποξία ή φλεγμονή. Κατά την νέκρωση ενεργοποιούνται διάφορες προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες και σύμπλοκα (όπως ο πυρηνικός παράγοντας κΒ) τα οποία οδηγούν στην ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου του τραυματισμένου κυττάρου. Σε αντίθεση με τη απόπτωση και την αυτοφαγία, η νέκρωση είναι ενεργειακά ανεξάρτητη διαδικασία στην οποία το κύτταρο καταστρέφεται από ξαφνικό σοκ (θερμότητα, χημικές ουσίες, υποξία) με αποτέλεσμα να πεθάνει και να μην ανακυκλωθούν τα κυτταρικά του συστατικά. (D'Arcy MS., 2019)



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της νέκρωσης (αριστερά) σε σύγκριση με την απόπτωση (δεξιά) όπου στην νέκρωση φαίνεται η ενζυματική διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και η απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. (Πηγή: <https://knowledgepandemicm.wixsite.com/mysite/post/types-of-cell-death>)

Αυτοφαγία: Η αυτοφαγία (Εικόνα 19) είναι η διαδικασία στην οποία τα κυτταρικά συστατικά όπως οι διάφορες πρωτεΐνες και τα οργανίδια απομακρύνονται από το κύτταρο και μεταφέρονται στα λυσοσώματα για αποδόμηση τους. Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια τα οποία συνδέονται με τα αυτοφαγοσώματα (που περιέχουν τα συστατικά προς αποικοδόμηση) και δημιουργείται το αυτοφαγο-λυσόσωμα στο οποίο πραγματοποιείται η πέψη των κυτταρικών συστατικών ώστε στη συνέχεια αυτά να ανακυκλωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν για την δημιουργία νέων κυτταρικών δομών και συστατικών. Μπορούν επίσης αυτά τα συστατικά να επεξεργαστούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν ως πηγές ενέργειας για το κύτταρο. Η αυτοφαγία ενεργοποιείται από ποικιλία στρεσογόνων παραγόντων (όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών) και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει και στο ανοσοποιητικό σύστημα καταστρέφοντας παθογόνους μικροοργανισμούς. (D'Arcy MS., 2019)

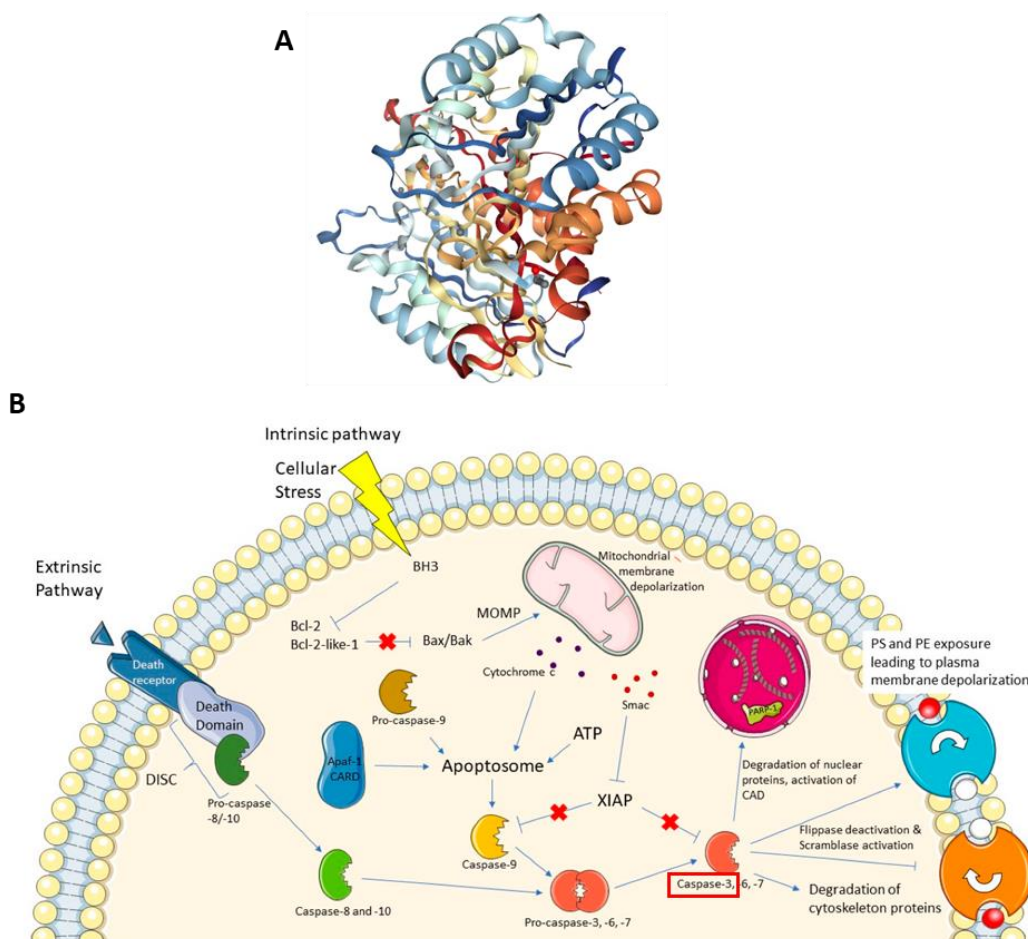


Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της αυτοφαγίας όπου φαίνονται τα στάδια διαδικασίας της αποικοδόμησης των κυτταρικών συστατικών.
(Πηγή: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0033y?proof=true&platform=osc&draft=collection><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006683>)

3.1 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο

Κασπάση-3 (Caspase-3): Η κασπάση-3 αποτελεί μέρος των κασπασών, της οικογένειας πρωτεϊνών κυστεΐνης - ασπαρτικού οξέος (Cysteine-Aspartic Acid protease), οι οποίες συμμετέχουν στην διαδικασία της απόπτωσης.

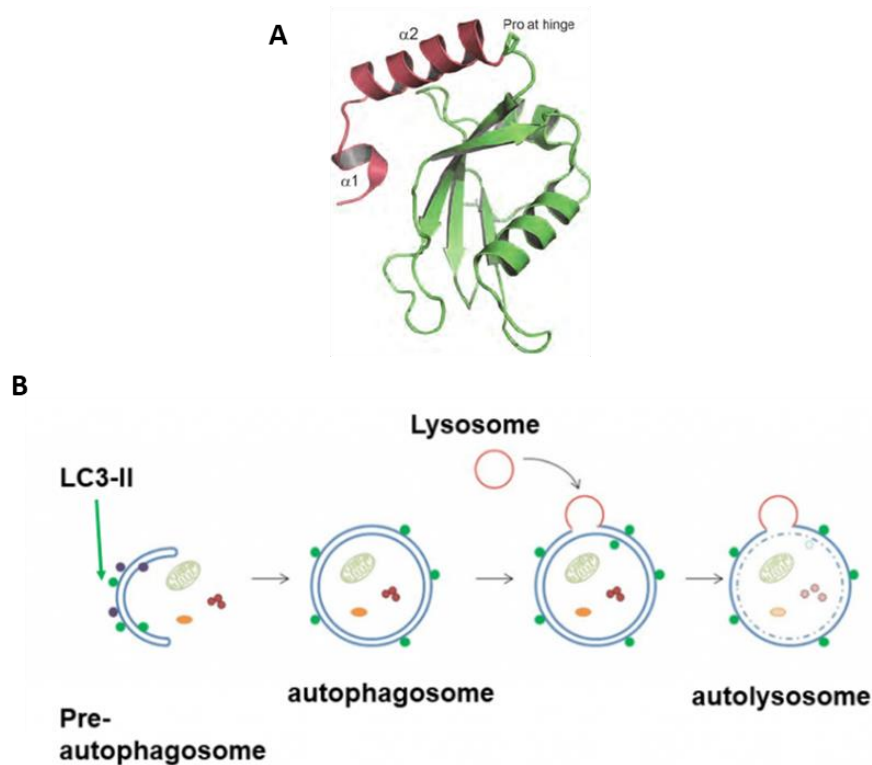
Η κασπάση -3 (Εικόνα 20Α) είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 2 υπομονάδες των 12 KDa και 17 kDa και ο κύριος ρόλος της είναι να ενεργοποιεί τις κασπάσες-6 και -7 (Εικόνα 20Β) οι οποίες με την σειρά τους αποικοδομούν τις πρωτεΐνες του κυττάρου που υπόκειται σε απόπτωση. (Miller D.K., 1997) Επίσης, είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου, τη συμπύκνωση της αποπτωτικής χρωματίνης και τον κατακερματισμό του DNA καθώς επίσης συμμετέχει στον σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων. (Porter A.G., 1999)



Εικόνα 20: Α) αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της κασπάσης-3 (Πηγή: <https://www.sinobiological.com/resource/caspase-3/proteins>) και Β) αναπαράσταση του μηχανισμού ενεργοποίησης της κασπάσης -3: οι υποδοχείς θανάτου (death receptor) ενεργοποιούν τις κασπάσες -8 και -10 που με την σειρά τους ενεργοποιούν την κασπάση -3 και το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την κασπάση -9 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης -3. Έπειτα η κασπάση -3 ξεκινάει την αποικοδόμηση του ενδοκυτταρικού υλικού και τον θάνατο του κυττάρου. (Πηγή: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3948>)

Πρωτεΐνη LC3: Η πρωτεΐνη LC3 (Εικόνα 21Α) που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους (Microtubule-associated protein 1A/1B – light chain 3) είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη μάζας 17 kDa και υπάρχει σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Η LC3 συμμετέχει στην διαδικασία της αυτοφαγίας και ειδικότερα δημιουργεί σύμπλοκα με την

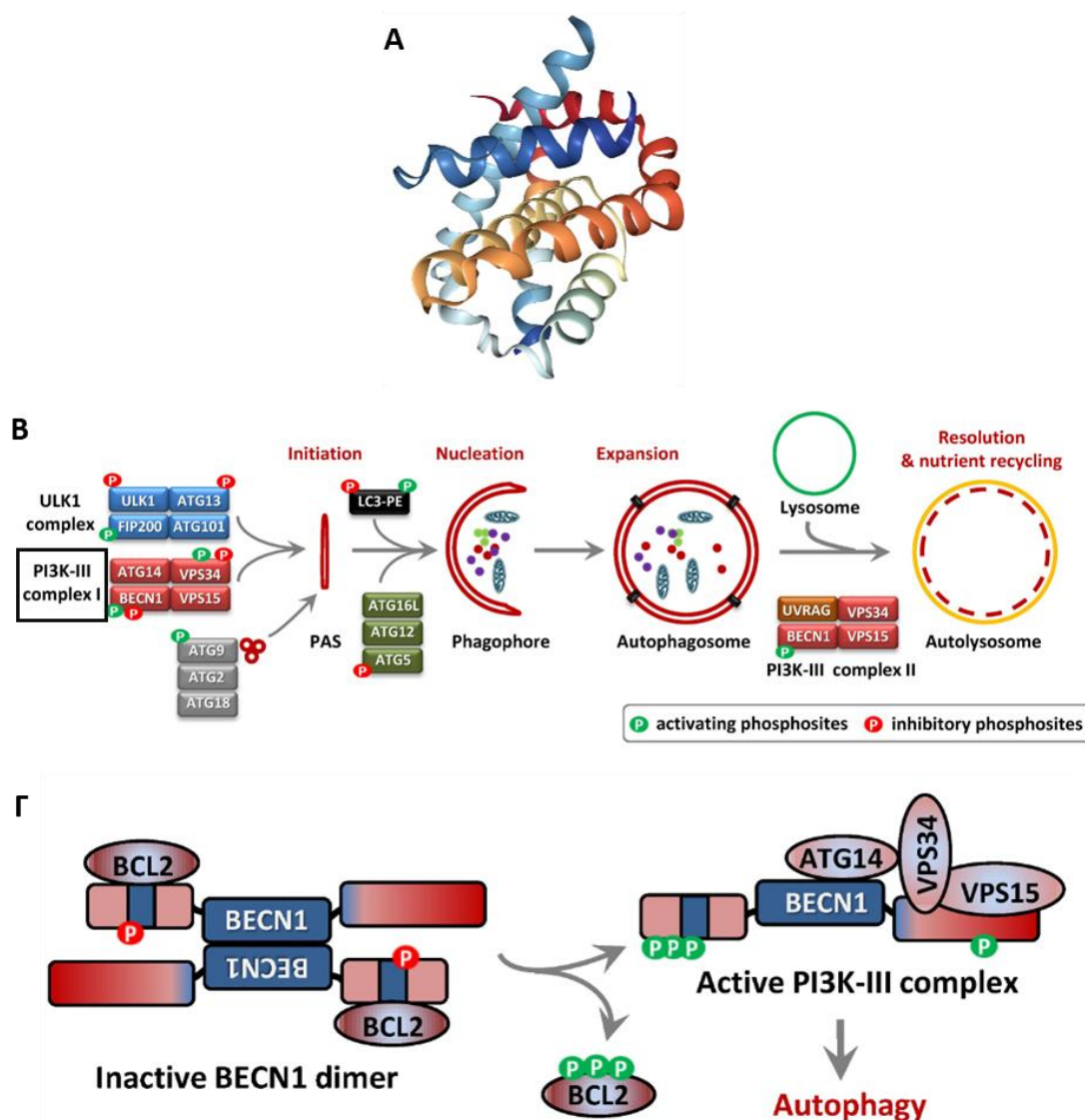
φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, τα οποία βοηθούν στον σχηματισμό της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων (Εικόνα 21B). Τα αυτοφαγοσώματα συλλέγουν τα κυτταροπλασματικά συστατικά και πραγματοποιούν συζεύξεις με τα λυσοσώματα ώστε να καταστραφούν και να ανακυκλωθούν τα κυτταροπλασματικά συστατικά. Ύστερα από την επίτευξη της σύνδεσης των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα η LC3 αποικοδομείται. (Tanida I. et al, 2008)



Εικόνα 21: A) Αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της LC3 πρωτεΐνης (Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-LC3-left-and-Atg8-in-complex-with-a-WEEL-peptide-right-The-N-terminal_fig2_221921304) και B) αναπαράσταση της συμμετοχής της LC3 στο σχηματισμό της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με το λυσόσωμα, δημιουργείται το αυτοφαγο-λυσόσωμα και πραγματοποιείται η αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών. (Πηγή: <https://www.gentarget.com/fluorescent-lc3-fusion-for-autophagy-research>)

Πρωτεΐνη Beclin 1: Η Beclin 1 (Εικόνα 22A) αποτελεί μέρος της οικογένειας πρωτεϊνών με την δομική περιοχή BH3 και είναι κύριο συστατικό του συμπλέγματος PI3KC3 (σύμπλοκο κινασών με λιπίδια) το οποίο συμμετέχει στην δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Η Beclin 1 αλληλοεπιδρά με διάφορους συμπαράγοντες που ενεργοποιούν την διαδικασία της αυτοφαγίας. Αντίθετα, όταν αλληλοεπιδρά και δεσμεύεται με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και Bcl-XL (μέσω

της περιοχής BH3), εμποδίζεται ο σχηματισμός του συμπλέγματος PI3KC3 και συνεπώς αναστέλλεται η αυτοφαγία. Επιπλέον, η δημιουργία του συμπλόκου Beclin 1/Bcl-2 (Εικόνα 22B) μπορεί να βοηθήσει στην διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της αυτοφαγίας και στην αποφυγή του ανεξέλεγκτου κυτταρικού θανάτου, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην διατήρηση της ομοιόστασης. (DeVorkin L. et al, 2014)



Εικόνα 22: A) Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης Beclin 1 (Πηγή: <https://www.sinobiological.com/resource/beclin-1-becn1/proteins>), B) η Beclin 1 αποτελεί μέρος του συμπλέγματος PI3KC3 το οποίο συμμετέχει στην δημιουργία της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος το οποίο στη συνέχεια πραγματοποιεί σύζευξη με το λυσόσωμα (Πηγή: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00137/full>) και Γ) η σύνδεση της BCL-2 στην Beclin 1 οδηγεί στην απενεργοποίηση της Beclin ενώ η απομάκρυνση της BCL-2 οδηγεί στην ενεργοποίηση της Beclin 1 και στη επαγωγή της αυτοφαγίας. (Πηγή: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00137/full>)

4. Μοντέλα *ex vivo*

Σε έρευνες στις οποίες γίνονται ανακαλύψεις και δοκιμασίες φαρμάκων που αποσκοπούν στην θεραπεία διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών είναι απαραίτητη η χρήση μοντέλων που εμφανίζουν όμοιες με τον άνθρωπο φυσιολογικές και κυτταρικές λειτουργίες. Συνεπώς γίνεται χρήση διαφόρων *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* και άλλων πειραματικών μοντέλων που παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στην χρήση τους. Τα *ex vivo* μοντέλα χρησιμοποιούνται για καλλιέργειες ζωντανών ιστών εκτός του οργανισμού, που περιέχουν τα πολύπλοκα κυτταρικά συστήματα που υπάρχουν εντός του ζωντανού οργανισμού. Τα *in vitro* μοντέλα αφορούν την απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων εκτός του ζωντανού οργανισμού χωρίς όμως την ύπαρξη του κυτταρικού περιβάλλοντος των ιστών από τους οποίους απομονώθηκαν, όπως συμβαίνει στα *ex vivo* μοντέλα. (Pierce et al, 2018)

Υπάρχουν σαφείς διαφορές μεταξύ των *ex vivo* και *in vitro* μοντέλων που τα καθιστούν κατάλληλα για κλινικές μελέτες και έρευνες. Συγκεκριμένα τα *ex vivo* μοντέλα:

- i. χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, κυτταρική ποικιλότητα και διακυτταρική επικοινωνία σε σχέση με τα *in vitro* μοντέλα προσφέροντας μεγαλύτερη ομοιότητα προς τις λειτουργίες και τα χαρακτηριστικά των ανθρώπινων ιστών (Pierce et al, 2018)
- ii. επιτρέπουν την ελεγχόμενη αξιολόγηση συγκεκριμένων παραμέτρων για την κυτταρική συμπεριφορά, αναγέννηση των ιστών και άλλα, οδηγώντας έτσι στην μείωση του αριθμού των παραμέτρων που εξετάζονται σε ζωικά μοντέλα (Mobini et al, 2019)
- iii. έχουν τρισδιάστατη μορφή προσφέροντας συνεπώς την αναπαράσταση των πολλαπλών πτυχών του *in vivo* περιβάλλοντος καθώς και την αναπαράσταση της αρχιτεκτονικής, των μηχανικών ιδιοτήτων και της δομής του ιστού που μελετάται. (Mobini et al, 2019)

Ωστόσο υπάρχουν και μειονεκτήματα στην χρήση των παραπάνω μοντέλων. Ειδικότερα:

- i. είναι ακριβή η δημιουργία τους στο εργαστήριο σε σχέση με τα *in vitro* μοντέλα και δύσκολη η απόκτηση φρέσκων δειγμάτων από τους ιστούς που μελετώνται καθώς χρειάζεται ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός και γνώσεις για να επιτευχθεί η σωστή απόκτηση τους (Pierce et al, 2018)

- ii. δεν προσφέρουν μεγάλη ευκολία διαχείρισης των συνθηκών διαβίωσης πολλαπλών κυτταρικών τύπων (Pierce et al, 2018)
- iii. όταν γίνεται χρήση ανθρώπινων κυττάρων για την δημιουργία των *ex vivo* μοντέλων προκύπτουν ηθικά ζητήματα και προβληματισμοί διότι αναπτύσσονται οργανοειδή (απλούστερες μορφές οργάνων τρισδιάστατης μορφής) από πληθυσμούς ανθρώπινων βλαστοκυττάρων. Για τη αποφυγή τέτοιων ζητημάτων οι επιστήμονες χρησιμοποιούν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα για την δημιουργία των οργανιδίων των *ex vivo* μοντέλων. (Pierce et al, 2018)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η χειρουργική διάνοιξη του αρουραίου και η απομόνωση των πνευμόνων του βασίστηκε σε μια μίξη τεσσάρων πρωτοκόλλων (Guerrero RR., et al, 1977) (Nguyen DT., et al, 2013) (Nelson K., et al, 2015) (Placke ME., et al, 1987), χρησιμοποιώντας τα πλεονεκτήματα του καθενός για την εξασφάλιση της επιτυχίας του πειράματος.

1. Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα σε πολυάριθμες βιοϊατρικές έρευνες, σε νευροσυμπεριφορικές μελέτες και σε έρευνες του καρκίνου και της τοξικολογίας. Είναι κατάλληλοι για πειραματικούς σκοπούς λόγω της ανατομικής, φυσιολογικής και γενετικής ομοιότητας τους με τους ανθρώπους καθώς επίσης παρουσιάζουν μικρό μέγεθος, ευκολία στην εκτροφή τους, γρήγορη ενηλικίωση και μικρή διάρκεια ζωής. (Segupta P, 2013)

Το πειραματόζωο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν αρσενικός αρουραίος Wistar του γένους Επίμυς (*Rattus*). Είχε ηλικία ενός μήνα και μεγάλωσε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα πειραματόζωα του εργαστηρίου αυτού μεγάλωναν σε κλουβιά και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Η χρονική διάρκεια της ημέρας και της νύχτας ήταν 12 ώρες και οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματόζωων ήταν αρμόζουσες βάσει της Ελληνικής Νομοθεσίας (Π.Δ. 160/91).

2. Αποστείρωση υλικών και αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση και καλλιέργεια του ιστού

Αρχικά, συγκεντρώθηκαν όλα τα μεταλλικά εργαλεία για την χειρουργική διάνοιξη του αρουραίου όπως τα διαφόρων ειδών νυστέρια, οι διαστολείς θώρακα, οι στρόφιγγες και τα ψαλίδια εξωτερικής τομής και πλύθηκαν με ειδικό σαπούνι για εργαστηριακά εργαλεία. Στην συνέχεια, αφού ξεπλύθηκαν και στέγνωσαν, τοποθετήθηκαν όλα μαζί στον κλίβανο στους 180°C για 3 ώρες και αποστειρώθηκαν. Όσον αφορά τα αντιδραστήρια, τα γυάλινα τριβλύα, τις γάξεις, τα eppendorfs και τα πλαστικά tips των πιπετών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή του πειράματος, αυτά

αποστειρώθηκαν με την διαδικασία της υγρής αποστείρωσης, η οποία πραγματοποιήθηκε στον σε χύτρα ταχύτητας (Olis, Italia, SPA).

Για την ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν ειδικά καλαθάκια καλλιέργειας ιστού (Corning Netwell inserts) σε 12 wells - plate, τα οποία είναι διάτρητα στο κάτω μέρος τους ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη διάχυση του θρεπτικού μέσου στους καλλιεργούμενους ιστούς και η πρόσβαση σε οξυγόνο (Εικόνα 23). Τα καλαθάκια πρώτα πλύθηκαν ώστε να είναι πολύ καθαρά και ύστερα αποστειρώθηκαν για να είναι έτοιμα για ιστοκαλλιέργεια και να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση.



Εικόνα 23: Καλαθάκια Corning Netwell inserts που χρησιμοποιήθηκαν για την ιστοκαλλιέργεια.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό τους περιλαμβάνει τα εξής:

1. καθαρισμός του πλέγματος από τα καλαθάκια με βαμβάκι και μούλιασμα τους με ειδικό απορρυπαντικό σαπούνι για 1 μέρα
2. απαλός καθαρισμός ολόκληρων των καλαθιών με βαμβάκι και τοποθέτηση τους σε ειδικό plate
3. γέμισμα του plate με τα καλαθάκια με απεσταγμένο νερό
4. ανακίνηση του plate, το οποίο είναι καλυμμένο με το καπάκι του, αρκετές φορές για να ξεπλυθεί και μετά ακολουθεί η αφαίρεση του νερού
5. επανάληψη του παραπάνω βήματος για τουλάχιστον τρεις φορές
6. μούλιασμα του plate σε απεσταγμένο νερό για 1 ώρα
7. πλύσιμο του plate με διπλά απεσταγμένο νερό (double-distilled water) για αρκετές φορές και ξέπλυμα με αλκοόλη 70% με τον ίδιο τρόπο με το βήμα 4
8. στέγνωμα των καλαθιών με το plate σε διηθητικό χαρτί σε θερμοκρασία δωματίου
9. τοποθέτηση τους κάτω από UV ακτινοβολία σε θάλαμο νηματικής ροής για μια μέρα. (Celis J.E., 2006)

Η παρασκευή των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε ως εξής:

I. Διάλυμα PBS συμπύκνωσης 10X (V=200 ml): 5.12 g Na_2HPO_4 , 10 mM (MERCK), 16g NaCl , 137 mM (Honeywell - Fluka), 0.4g KCl , 2.7 mM (MERCK) και 0.4g KH_2PO_4 2 mM (MERCK) διαλύθηκαν υπό συνεχή ανάδευση σε 200 ml απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε στους 4°C και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διαλύματος 1X PBS το οποίο παρασκευάστηκε την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος (π.χ 500 ml 1X PBS παρασκευάστηκε με την προσθήκη 50 ml PBS 10X σε 450 ml απεσταγμένο νερό)

II. Διάλυμα αγαρόζης 4% w/v (V=20 ml): 0.8 g αγαρόζη (Agarose Serva Premium 250g) διαλύθηκε σε 20 ml 1X PBS αποστειρωμένο

III. Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (V=555.25 ml): 500 ml θρεπτικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biosera DMEM – F12) το οποίο περιέχει 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) 10% , L-Glutamine , 5 ml penicillin (100 U/ml, Biosera), 5 ml streptomycin (100g/ml, Biosera) και 250 μl (1mg/ml) Fluconazole (2mg/ml – Flucovein – ΚΟΠΕΡ Φαρμακοβιομηχανία).

Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά για την πρόληψη βακτηριακής μόλυνσης των κυτταροκαλλιεργειών λόγω της αποτελεσματικής συνδυασμένης δράσης τους έναντι στα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ο ορός FBS περιέχει αυξητικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και συντήρηση των καλλιεργημένων κυττάρων. Τέλος, η Fluconazole (φλουκοναζόλη) είναι αντιμυκητιασικό φάρμακο και ισχυρός ειδικός αναστολέας σύνθεσης των στερολών των μυκητών.

Την ημέρα αποστείρωσης των υλικών και των αντιδραστηρίων παρασκευάστηκαν τα διαλύματα 10XPBS και το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ενώ το διάλυμα αγαρόζης παρασκευάστηκε πριν την έναρξη του πειράματος, για να είναι το διάλυμα αγαρόζης αποστειρωμένο προτού εισαχθεί στους πνεύμονες καθώς επίσης να είναι και σε υγρή μορφή. Για να βρίσκεται η αγαρόζη σε υγρή μορφή πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία $>45^\circ\text{C}$, γιατί διαφορετικά στερεοποιείται. Μετά την παρασκευή της, η αγαρόζη τοποθετήθηκε στον κλίβανο στους 45°C και παρέμεινε εκεί μέχρι την στιγμή της έγχυσης της. Τέλος, το διάλυμα αγαρόζης το οποίο είχε συγκέντρωση 4 %, ακριβώς πριν την εισαγωγή της στους πνεύμονες, αναμείχθηκε με το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ιστοκαλλιέργεια ώστε να διαλυθεί καλύτερα και να έχει 2% τελική συγκέντρωση στους πνεύμονες.

3. Απομόνωση πνευμόνων

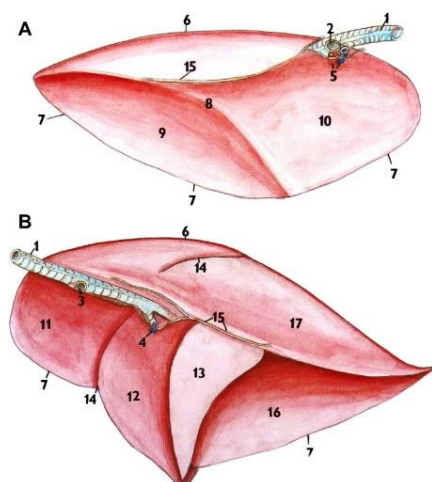
Ο αρουραίος μεταφέρθηκε από το κλουβί του σε γυάλινο δοχείο που περιείχε αιθέρα με σκοπό την αναισθητοποίηση του. Στη συνέχεια ζυγίστηκε, ώστε με βάσει το βάρος του να υπολογιστεί η δοσολογία των αναισθητικών φαρμάκων που απαιτούνται για τη νάρκωση του. Το βάρος του αρουραίου ήταν 270 γραμμάρια. Στην συνέχεια, ο αρουραίος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένη επιφάνεια και πραγματοποιήθηκε η έγχυση 200 μl του φαρμάκου κεταμίνης ενδομυϊκά (Ketamine hydrochloride 100 mg/ml, Imalgene 1000) και έπειτα έγινε η έγχυση 4 ml προποφόλης περιτοναϊκά (Propofol – Lipuro 2% - 20 mg/ml). Για να βεβαιωθεί το βάθος της αναισθησίας, πραγματοποιήθηκε το toe reflex, δηλαδή το αντανακλαστικό απόσυρσης του ποδιού όταν αυτό πιέζεται ή τσιμπιέται με λαβίδα. (Tupper DE.. et al, 1980)

Ακολούθησε η χειρουργική απομόνωση των πνευμόνων του σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Nelson K et al. (Nelson K., et al, 2015) Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η χειρουργική διάνοιξη του αρουραίου από την κοιλιακή χώρα προς τον θώρακα και απομακρύνθηκαν οι περιβαλλόμενοι ιστοί ώστε να εξασφαλιστεί πιο άμεση πρόσβαση σε αυτούς. Εκείνη την χρονική στιγμή εγχύθηκαν στους πνεύμονες 5 ml από το διάλυμα αγαρόζης αναμειγμένο με το θρεπτικό υλικό ιστοκαλλιέργειας (τελικό διάλυμα 2% αγαρόζης), το οποίο είχε προετοιμαστεί πριν την έναρξη της απομόνωσης των πνευμόνων. Η έγχυση έγινε με γρήγορους ρυθμούς ώστε η θερμοκρασία της αγαρόζης να διατηρηθεί στους ~45°C, να μην στερεοποιηθεί και να μπορέσει να γίνει αποτελεσματικά η έγχυση της στους πνεύμονες. Η έγχυση της αγαρόζης έγινε όταν οι πνεύμονες ήταν στο σώμα του αρουραίου με τη βοήθεια τομής στην τραχεία και την εισαγωγή καθετήρα μεγέθους 4G. Υστέρα από την εκτέλεση αυτού του σταδίου, οι πνεύμονες αφαιρέθηκαν προσεχτικά και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο γυάλινο τριβλύο το οποίο περιείχε αποστειρωμένο διάλυμα 1X PBS ώστε να ξεπλυθούν και να διατηρηθούν μέχρι να κοπούν στον ειδικό μικροτόμο σε μικρές τομές. (Nelson K., et al, 2015)

4. Δημιουργία τομών για ιστοκαλλιέργεια

Αρχικά αφαιρέθηκε ο καθετήρας, που χρησιμοποιήθηκε για την έγχυση της αγαρόζης, μαζί με την τραχεία και διαχωρίστηκαν ο δεξιός και αριστερός λοβός. Στον αρουραίο,

ο αριστερός λοβός του πνεύμονα είναι πιο μικρός σε σύγκριση με τον δεξιό γιατί βρίσκεται πάνω από την καρδιά (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Απεικόνιση των μεσοθωρακικών επιφανειών του αριστερού (Α) και του δεξιού (Β) πνεύμονα του αρουραίου. Τα βασικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τους κρανιακούς (11), έσω (12), βοηθητικούς (13) και ουραίους (16) λοβούς του δεξιού πνεύμονα. Ο αριστερός πνεύμονας έχει μόνο έναν λοβό. (Πηγή: Kling MA, 2011)

Στην συνέχεια, οι δυο λοβοί κόπηκαν σε αποστειρωμένες συνθήκες με ειδικό νυστέρι σε μικρότερα κομμάτια ώστε να διευκολυνθεί η τομή τους στο μηχάνημα του Slicer (McIlwain Tissue Chopper) το οποίο χρησιμοποιείται για την κοπή φρέσκων ιστών σε πολύ λεπτές τομές πάχους 0 – 1 mm (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Slicer McIlwain Tissue Chopper

Η δημιουργία των τομών ιστού στο Slicer γίνεται ως εξής:

- τοποθέτηση κυκλικής μεταλλικής βάσης (τράπεζα) στην αντίστοιχη θέση του μηχανήματος
- μεταφορά του ιστού που πρόκειται να κοπεί πάνω στην στρογγυλή βάση
- ρύθμιση του πάχους κοπής των ιστών καθώς και του ρυθμού με τον οποίο κινείται και κόβει ο βραχίονας κοπής με προσαρμοσμένη τη λεπίδα
- έναρξη της διαδικασίας κοπής και μεταφοράς της στρογγυλής βάσης με τον ιστό από τα αριστερά προς τα δεξιά

- ανύψωση και κατέβασμα της λεπίδας πάνω στην βάση με ρυθμιζόμενο ρυθμό και δύναμη
- κοπή του ιστού με το επιθυμητό πάχος
- παύση της κοπής μόλις ολοκληρωθεί η μετακίνηση της βάσης από αριστερά προς τα δεξιά

Με τον παραπάνω τρόπο, οι πνεύμονες του αρουραίου κόπηκαν σε πολλές τομές πάχους:

α) 350 μm

β) 500 μm

γ) 700 μm

και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα 1XPBS για να «απλωθούν». Από τις τομές που προέκυψαν επιλέχθηκαν 12 με 15 τομές με την καλύτερη μορφολογία, από το κάθε πάχος της τομής των ιστών, για να τοποθετηθούν αργότερα σε ιστοκαλλιέργεια.

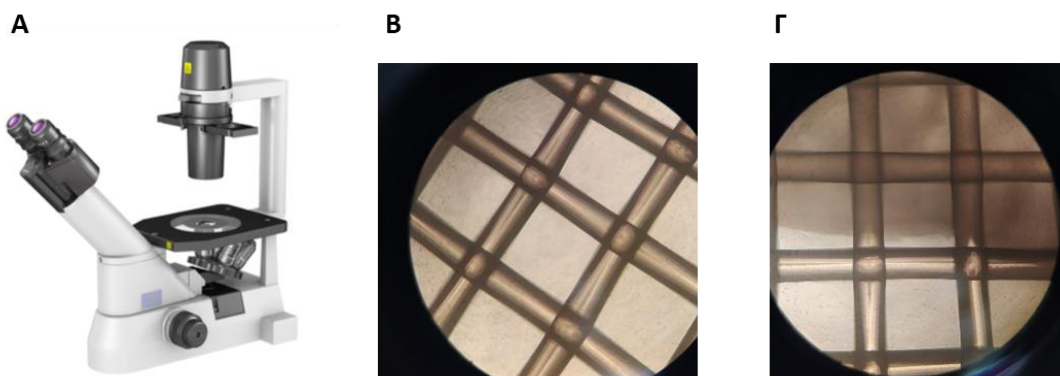
5. Ιστοκαλλιέργεια

Κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες, οι τομές ιστών που προέκυψαν από το μηχάνημα του Slicer, τοποθετήθηκαν στα καλαθάκια Corning Netwell μαζί με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που είχε ετοιμαστεί την προηγούμενη ημέρα. Οι τομές τοποθετήθηκαν συνολικά σε τέσσερα 12 wells plates με τα καλαθάκια για ιστοκαλλιέργεια. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ομάδες του ίδιου πάχους μεταξύ τους με τον κάθε ένα ξεχωριστά σε κάθε καλαθάκι και η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνονταν ανά δυο ημέρες.

Η συλλογή των ιστών έγινε κατά την 0^η, 2^η, την 7^η, την 14^η και την 21^η μέρα καλλιέργειας, η οποία ήταν και η τελευταία. Οι ιστοί κάθε φορά που συλλέγονταν, χωρίζονταν σε αυτούς που προορίζονταν για επεξεργασία μέσω ιστοκινέτας και χρώσης με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη και σε αυτούς που προορίζονταν για ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Dot Blot).

Η καλλιέργεια των ιστών ελέγχονταν κάθε μέρα μέσω μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (Nikon Eclipse TS 100) για τυχόν ύπαρξη μολύνσεων (Εικόνα 26). Το συγκεκριμένο είδος μικροσκοπίου χρησιμοποιείται ευρύτερα για την καλύτερη εξέταση και παρατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών, ιστοκαλλιιεργειών και οργανισμών που βρίσκονται στο κάτω μέρος των plates, διότι η πηγή φωτός βρίσκεται

στην κορυφή ενώ οι αντικειμενικοί φακοί βρίσκονται στο κάτω μέρος του μικροσκοπίου και με φορά προς τα πάνω, σε αντίθεση με τα συμβατικά μικροσκόπια.



Εικόνα 26: (Α) Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης Nikon Eclipse TS 100, (Β) Φωτογραφία με το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης όπου απεικονίζεται το πλέγμα από το καλαθάκι ιστοκαλλιέργειας καθώς και ότι η καλλιέργεια είναι καθαρή και χωρίς ύπαρξη μολύνσεων και (Γ) Απεικόνιση του ιστού (με γκρι-καφέ χρώμα) που καλλιεργείται στο καλαθάκι ιστοκαλλιέργειας.

Τέλος, μετά από κάθε συλλογή, οι ιστοί που προορίζονταν για δημιουργία τομών παραφίνης και για χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης επεξεργάζονταν άμεσα μέσω της Ιστοκινέτας, ενώ οι ιστοί που προορίζονταν για ομογενοποίηση και ανοσοαποτύπωση κηλίδας φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος.

5. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot Blot)

5.1. Ομογενοποίηση Ιστών

Για την πραγματοποίηση της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης κηλίδας χρειάζεται πρώτα η διεξαγωγή των τεχνικών της ομογενοποίησης ιστών και της μεθόδου Bradford. Η ομογενοποίηση ιστών είναι η διαδικασία λύσης της δομής των ιστών και δημιουργίας εναιωρήματος κυτταρικών θραυσμάτων που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες. (Kruger NJ., 1994) Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford χρειάζεται προηγουμένως να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση των ιστών ώστε να προκύψουν τα εναιωρήματα πρωτεϊνών. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή (Heidolph Silent Crusher S) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Μηχανικός ομογενοποιητής Heidolph Silent Crusher S.

Συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολούθησαν για την ομογενοποίηση των ιστών ήταν τα εξής:

- προστέθηκαν 500 μl του διαλύματος λύσης (Πίνακας 1) στα eppendorf που περιείχαν τους ιστούς
- τα eppendorf τοποθετήθηκαν το κάθε ένα ξεχωριστά στο μηχανήμα του ομογενοποιητή (Εικόνα 29) για 3 με 4 φορές, από 5 δευτερόλεπτα κάθε φορά, για να διαλυθούν καλά οι ιστοί, να μην υπερθερμανθούν και να προκύψει ένα διαυγές διάλυμα
- τα eppendorf με τους ομογενοποιημένους ιστούς τοποθετήθηκαν σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές, στους 4°C, για 5 λεπτά (Heraeus Biofuge Fresco)
- από το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε δημιουργήθηκαν aliquots των 90 μl τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος.

Πίνακας 1: Σύσταση του διαλύματος λύσης

Ουσίες	Συγκέντρωση
Tris-Cl, pH 8.0	20 Mm
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
PMSF	100 μg/ml
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
β-glycerolphosphate	10 mM

5.2. Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford αναπτύχθηκε από τον Marion M. Bradford το 1976 και χρησιμοποιείται για τον γρήγορο και ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε διαλύματα. Η μέθοδος στηρίζεται στην απορρόφηση της χρωστικής Coomassie Blue G250 όταν αυτή συνδέεται στις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η χρωστική αυτή εμφανίζει τρία διαφορετικά χρώματα:

- α) μπλε χρώμα όταν βρίσκεται σε ανιονική μορφή
- β) πράσινο χρώμα όταν βρίσκεται σε ουδέτερη μορφή
- γ) κόκκινο χρώμα όταν βρίσκεται σε κατιονική μορφή.

Σε όξινες συνθήκες, η χρωστική βρίσκεται στην ανιονική μορφή και εμφανίζει χρώμα μπλε και απορρόφηση στα 470 nm ενώ σε αλκαλικές συνθήκες εμφανίζει το κόκκινο χρώμα και απορρόφηση στα 595 nm αντίστοιχα. Η χρωστική δημιουργεί σύμπλοκα με τις καρβοξυλικές και αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και όταν πραγματοποιεί σύνδεση με τις πρωτεΐνες τότε αποκτά μπλε χρώμα και εμφανίζει απορρόφηση στα 594 nm. Αντίθετα, όταν δεν υπάρχουν πρωτεΐνες στο διάλυμα για να συνδεθεί, τότε αποκτά κόκκινο χρώμα. (McInnes E., 2013)

Για τον υπολογισμό της άγνωστης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ομογενοποίηση των ιστών κρίνεται απαραίτητη η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Για την κατασκευή της καμπύλης αυτής χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη (Bovine serum albumin – BSA) επειδή η χρωστική Coomassie Blue G αντιδρά με αυτή και δημιουργούν έτσι τα διαλύματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Συγκεκριμένα, τα διαλύματα αυτά είναι αυξανόμενης συγκέντρωσης με τελικό όγκο 800 μ l (Πίνακας 2):

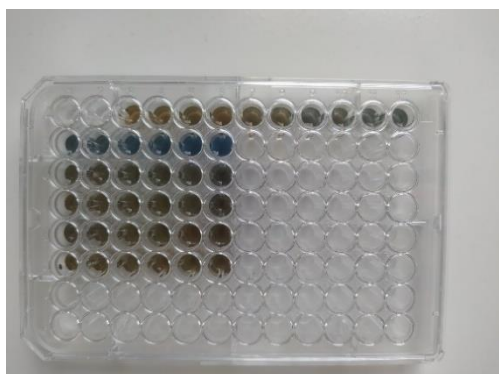
Πίνακας 2: Διαλύματα πρότυπης καμπύλης

Όγκος δείγματος BSA συγκέντρωσης 1mg/ml (μ l)	0	2	4	8	10	15	20	30
Όγκος H ₂ O (μ l)	800	798	796	792	790	785	780	770

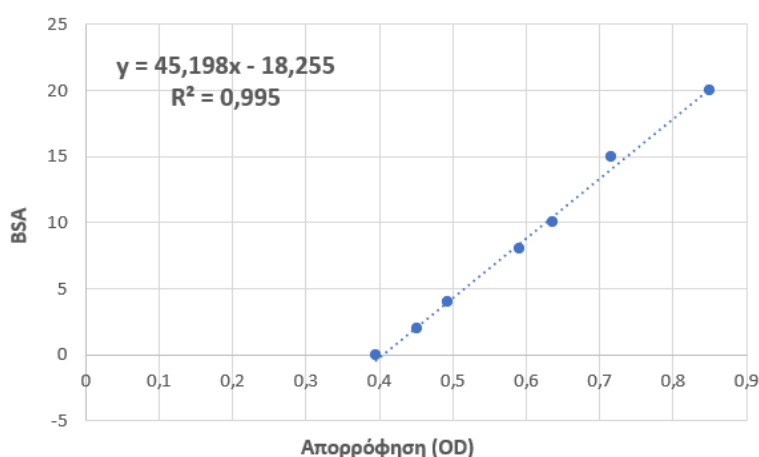
Στη συνέχεια, σε eppendorf τοποθετήθηκαν 5 μ L διαλύματος με άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης και προστέθηκαν 795 μ L απεσταγμένου νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 800 μ L. Τέλος, σε όλα τα διαλύματα (της πρότυπης καμπύλης καθώς

και αυτά της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης) προστέθηκαν 200 μ L της χρωστικής Coomassie Blue G (Bio–Rad Laboratories GmbH).

Για την πραγματοποίηση της φωτομέτρησης μεταφέρθηκαν 200 μ L από το κάθε eppendorf σε 96-well plate (ELISA plate) σε διπλέτα (Εικόνα 28) και έγινε φωτομέτρηση τους σε φασματοφωτόμετρο (BIO-TEK) στα 630 nm. Από τις τιμές φωτομέτρησης που προέκυψαν ως αποτέλεσμα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 1) για τον προσδιορισμό των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης.



Εικόνα 28: Απεικόνιση του 96-well plate που περιέχει τα πρότυπα διαλύματα BSA και τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης, μετά την προσθήκη της χρωστικής Coomassie Blue G.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford.

5.3. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot Blot)

Η τεχνική ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Dot Blot) αποτελεί τεχνική ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών η οποία εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με την τεχνική Western Blot με την διαφορά ότι στην τεχνική Dot Blot δεν απαιτείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα πρωτεϊνών τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε

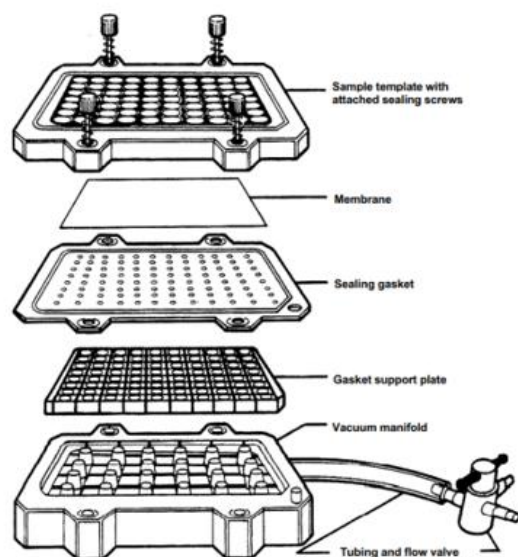
συσκευή Dot Blot (Bio-Dot, Bio-Rad) και πραγματοποιείται η ανοσοανίχνευση τους μέσω φθορισμού ή χρωματομετρίας. Η τεχνική αυτή προσφέρει την δυνατότητα της γρήγορης ανίχνευσης πρωτεϊνών σε σχέση με άλλες τεχνικές (Ortega Ibarra JM, 2021). Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 3:

Πίνακας 3: Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας

Διάλυμα	Τρόπος παρασκευής του διαλύματος
TBS 0.1M	6.1 g Trisma Base (SIGMA) 4.5 g NaCl σε H ₂ O (V _{τελ} =500ml)
TBS-T	5 μL Tween 100 mL TBS
BSA/TBS-T 0.1%	0.1 g BSA 0.2 100 ml TBS-T
Blocking Solution	1 g BSA + 20 ml TBS 2.5 g γάλα Regilait + 50 ml TBS-T
Stripping Buffer	0.750 g glycine (1.5 % w/v) 5 ml SDS (0.1-1 % w/v) 500 μl Tween 20 (1 % w/v)
Διάλυμα Λουμινόλης	100 ml λουμινόλη 100 μl κουμαρικό 50 μl H ₂ O ₂

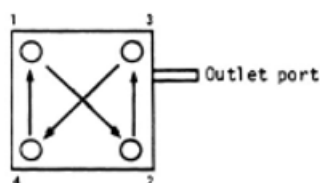
Για την φόρτωση των πρωτεϊνών στην συσκευή Dot Blot χρειάστηκε να γίνουν οι υπολογισμοί των όγκων του δειγμάτων σε μL με βάση τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που προέκυψαν με την μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια έγιναν αραιώσεις των δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffered Saline) ώστε να ληφθούν τελικά 4 μg πρωτεΐνης δείγματος σε τελικό όγκο 50 μL.

Αρχικά ξεπλύθηκαν όλα τα κομμάτια της συσκευής με απιονισμένο νερό ώστε να είναι καθαρά, κόπηκε προσεχτικά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε μέγεθος 8 x11.5 cm και τοποθετήθηκε σε διάλυμα TBS για 30 λεπτά. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρθηκε πάνω στην λαστιχένια μεμβράνη της συσκευής (Εικόνα 29) και ακολούθησε η συναρμολόγηση της συσκευής με προσοχή ώστε να εφάπτεται πλήρως η μεμβράνη πάνω στην λαστιχένια μεμβράνη της και να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.



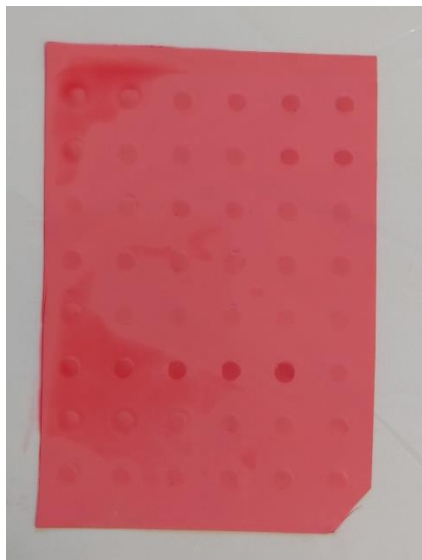
Εικόνα 29: Απεικόνιση της συναρμολόγησης της συσκευής Dot Blot (Bio-Dot, Bio-Rad) (<https://www.bio-rad.com/en-gr/product/bio-dot-bio-dot-sf-microfiltration-apparatus?ID=d986e28f-4a82-4c13-8ce1-3eae9bb4fdbb>).

Ύστερα, η συσκευή βιδώθηκε με συγκεκριμένες κινήσεις για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη πίεση κατά μήκος της μεμβράνης, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.



Για να εφαρμοστεί πλήρως η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πάνω στην συσκευή δημιουργήθηκε κενό αέρος με την βοήθεια αντλίας κενού. Ακολούθησε η προσθήκη 100 μL TBS με την multipipette σε κάθε πηγαδάκι (well) της μεμβράνης (με την αντλία εκτεθειμένη στον αέρα) και στη συνέχεια το TBS απομακρύνθηκε με την δημιουργία κενού αέρος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μL από τα δείγματα και η μεμβράνη αφέθηκε περίπου 1 - 2 ώρες, με την αντλία ρυθμισμένη στον αέρα, για να προσροφηθούν καλά οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη. Ύστερα από την προσρόφηση των πρωτεϊνών, προστέθηκαν ξανά 100 μL TBS σε όλα τα πηγαδάκια της μεμβράνης με τη αντλία ρυθμιζόμενη στον αέρα. Έπειτα το TBS απομακρύνθηκε με το άνοιγμα της αντλίας και την δημιουργία κενού και η μεμβράνη αφαιρέθηκε από την συσκευή και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο πάγκο για να κοπεί σε κατάλληλα τμήματα.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε χρωστική Ponceau S 0.2% για 5 λεπτά (Εικόνα 30), ώστε να ελεγχθεί εάν η προσρόφηση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη ήταν επιτυχής, ακολούθησε ύστερα η απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής και στο τέλος, η μεμβράνη φωτογραφήθηκε.



Εικόνα 30: Φωτογραφία της μεμβράνης που είναι εμβαπτισμένη σε Ponceau.

Μετά την ολοκλήρωση της φωτογράφισης ξεπλύθηκε η μεμβράνη με TBS (υπό συνεχή ανάδευση σε τραμπάλα) για να απομακρυνθεί η χρωστική και να αποκτήσει το αρχικό της χρώμα (άσπρο) και ακολούθησε έπειτα η διαδικασία του blocking.

Για το Blocking της μεμβράνης:

- η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που περιέχει τις καθηλωμένες πρωτεΐνες διαβρέχτηκε με το διάλυμα blocking 5% BSA (Πίνακας 3) σε TBS-Tween 20 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση σε τραμπάλα
- ακολούθησε η πλύση της μεμβράνης με διάλυμα 5% γάλακτος (Regilait) σε TBS-Tween 20 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση ώστε να κορεσθούν οι θέσεις σύνδεσης των πρωτεϊνών από τις πρωτεΐνες του ορού και του γάλακτος και να αποφευχθεί έτσι η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστέθηκε στη συνέχεια
- πραγματοποιήθηκαν δυο διαδοχικές πλύσεις με TBS-Tween 20 (για να απομακρυνθεί το προηγούμενο διάλυμα) από 10 λεπτά η κάθε μία σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση σε τραμπάλα
- προστέθηκαν στην μεμβράνη τρία διαφορετικά αντισώματα (anti - Caspase -3, anti - Beclin-1 και anti - LC3) τα οποία αποτελούν τα πρώτα αντισώματα διαλυμένα σε

διάλυμα BSA/TBS-T και έχουν σύσταση 0.1 g BSA 0.1% σε TBS-Tween 20 (Πίνακας 4)

- ακολούθησε επώση της μεμβράνης με τα αντισώματα για 16 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4 °C.

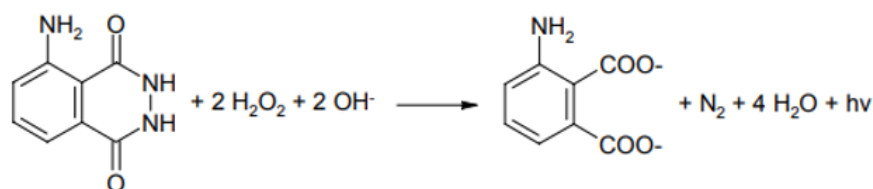
Πίνακας 4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας.

1 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση	2 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση
Rabbit anti - Caspase -3 (Cell Signaling #9662)	1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7074)	1:2000
Rabbit anti - Beclin-1 (Cell Signaling #3738)	1:1000	Anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7076)	1:2000
Rabbit anti - LC3 (Cell Signaling #2775)	1:1000		
Mouse anti - B-ακτίνη (Sigma A5316)	1:3000		

Στη συνέχεια:

- πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με διάλυμα TBS-Tween 20 σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση σε τραμπάλα
- ακολούθησε επώση με το δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit IgG) (Πίνακας 4) διαλυμένο σε διάλυμα 0.1 M TBS – 0.05% Tween 20 (TBS-T) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- στη συνέχεια έγιναν 3 διαδοχικές πλύσεις: η 1^η με διάλυμα TBS-T για 15 λεπτά, η 2^η με διάλυμα TBS-T για 5 λεπτά και η 3^η με διάλυμα TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- προστέθηκε το διάλυμα λουμινόλης (Πίνακας 3) πάνω στις μεμβράνες και ακολούθησε επώση για 5 λεπτά υπό σκοτάδι για να δράσει η λουμινόλη
- τέλος, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε ειδικό μηχάνημα και εμφανίστηκαν σε UV Imager (Uvitec Cambridge) με την βοήθεια του ειδικού προγράμματος UniTEC Alliance
- έπειτα, ακολούθησε το ξέπλυμα των μεμβρανών με TBS και η πραγματοποίηση του stripping.

Η λουμινόλη προστίθεται διότι εμφανίζει χημειοφωτάυγεια, δηλαδή παραγωγή φωτός και στην αντίδραση της χρησιμοποιείται ως καταλύτης η Υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας (HPR), η οποία αποτελεί ένζυμο του δεύτερου αντισώματος που προστέθηκε.



Εικόνα 31: Η αντίδραση της λουμινόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και η παραγωγή φωτός.

Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία του Stripping για την απομάκρυνση των προηγούμενων αντισωμάτων ώστε στη μεμβράνη να προστεθεί στην συνέχεια η β-ακτίνη που χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Στη διαδικασία αυτή η μεμβράνη:

- εμποτίστηκε με το stripping buffer (Πίνακας 3) για 20 λεπτά
- ξεπλύθηκε με 2 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών με TBS-Tween 20 σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση
- ακολούθησαν άλλες 2 διαδοχικές πλύσεις με TBS-Tween των 5 λεπτών υπό ανάδευση
- στη συνέχεια εμβαπτίστηκε στο διάλυμα του Blocking (Πίνακας 3)
- ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις με TBS-Tween για 10 λεπτά υπό ανάδευση

Τέλος, στη μεμβράνη προστέθηκε το αντίσωμα για τη β-ακτίνη (anti - B-ακτίνη) (Πίνακας 4) και ακολούθησε η επώση των μεμβρανών με την ακτίνη για 16 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 4°C και υπό ανάδευση σε τραμπάλα. Ακολούθησε στη συνέχεια η ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως για την εμφάνιση των μεμβρανών σε UV Imager, με τη μόνη διαφορά ότι ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το anti-mouse IgG. Οι φωτογραφίες των μεμβρανών που προέκυψαν από το UV Imager επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ για την ανάλυση δεδομένων.

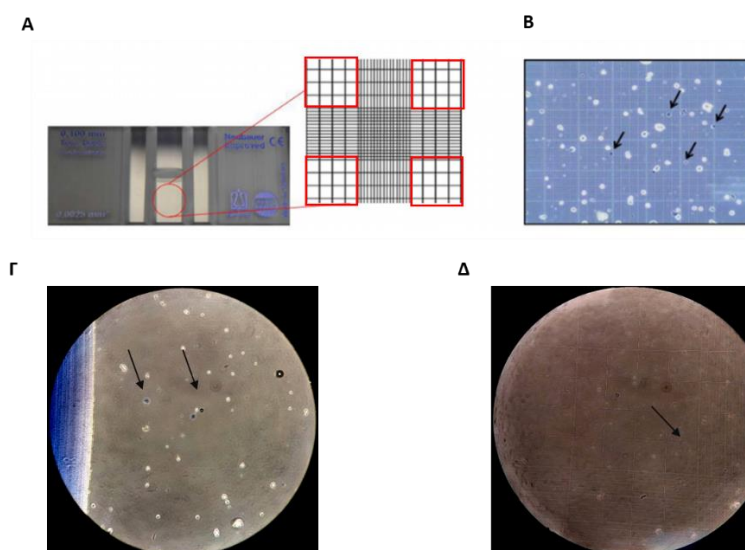
6. Εκτίμηση αριθμού κυττάρων καλλιέργειας με την χρωστική Trypan Blue

Η χρωστική Trypan Blue χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των ζωντανών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα ζωντανά κύτταρα δεν επιτρέπουν να εισχωρήσει η παραπάνω χρωστική σε αυτά και στο κυτταρόπλασμα τους. Αντιθέτως, στα νεκρά κύτταρα η χρωστική μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική τους μεμβράνη, να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα τους και να τα χρωματίσει. Επομένως, τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται με μπλε χρώμα ενώ τα ζωντανά δεν χρωματίζονται και μπορούν στη συνέχεια να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο και να υπολογιστεί ο αριθμός τους. (Fang I. J and Trewyn B.G, 2012)

Σε 100 μL αιωρήματος κυττάρων, το οποίο απομονώθηκε από το θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας, προστέθηκαν 300 μL PBS και 100 μL Trypan Blue. Ποσότητα του διαλύματος τοποθετήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) (Εικόνα 32) και ο αριθμός των κυττάρων που περιέχονταν σε αυτό υπολογίστηκε με την βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$\frac{a}{8} \times 5 \times 10^4$$

όπου: $a \rightarrow$ ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε 8 τετράγωνα της πλάκας Neubauer (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα παρακάτω).



Εικόνα 32: Καταμέτρηση κυττάρων με την πλάκα Neubauer όπου: A) απεικονίζονται τα 4 τετράγωνα της πλάκας, B) απεικονίζονται με μπλε χρώμα τα νεκρά κύτταρα που έχουν χρωματιστεί με την Trypan Blue (Vembadi A, 2019), Γ) απεικονίζονται τα νεκρά μπλε κύτταρα του εναιωρήματος κυττάρων της ιστοκαλλιέργειας που «βάφτηκε» με την Trypan Blue και Δ) απεικονίζεται το πλέγμα της πλάκας Neubauer.

7. Χρώση Giemsa

Τα βήματα που ακολούθησαν για τη χρώση των κυττάρων ήταν τα εξής:

- 100 μL από το διάλυμα των κυττάρων τοποθετήθηκαν σε ειδικό μηχάνημα της κυτταροφυγόκεντρου επιχρίσματος (Cytospin3, Shandon) η οποία μεταφέρει το επίχρισμα των κυττάρων πάνω σε ειδική θέση σε αντικειμενοφόρους πλάκες
- ακολούθησε η χρώση των κυττάρων στις αντικειμενοφόρους με
 - α) μεθανόλη $> 85\%$ για 4 δευτερόλεπτα, για την μονιμοποίηση των κυττάρων
 - β) χρώση Giemsa για 4 δευτερόλεπτα
 - γ) χρώση May Grunwald για 4 δευτερόλεπτα

(οι παραπάνω χρωστικές παραχωρήθηκαν έτοιμες από το εργαστήριο της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας)

- τέλος, πραγματοποιήθηκε η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

8. Παρασκευή τομών παραφίνης για ιστοχημική χρώση

Η Ιστολογία αποτελεί επιστημονικό κλάδο της Βιολογίας και έχει ως στόχο την μικροσκοπική μελέτη και ανάλυση της δομής και των λειτουργιών διαφόρων φυτικών και ζωικών ιστών. (Chapman JA. et al, 2020) Σε συνεργασία με την επιστήμη της Ανατομίας, η Ιστολογία προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος όσον αφορά την μορφολογία και την λειτουργικότητα τους σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. Γενικότερα, οι ανθρώπινοι ιστοί αποτελούνται από κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από το εξωκυττάριο χώρο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μακρομορίων και μεταλλικών στοιχείων, όπως είναι το κολλαγόνο, τα ένζυμα, οι γλυκοπρωτεΐνες και παρέχει δομική υποστήριξη, ξεχωρίζει τους γειτονικούς ιστούς μεταξύ τους και ρυθμίζει την διακυτταρική επικοινωνία. Επομένως, ο κλάδος της Ιστολογίας χρησιμοποιείται ως συνδετικός κρίκος για να επιτευχθεί η καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας, ανατομίας και γενικότερης λειτουργίας του ανθρώπινου ιστού. Επιπροσθέτως, γίνεται χρήση του παραπάνω κλάδου και για την διάγνωση ανθρώπινων ασθενειών με την παρατήρηση χαρακτηριστικών των ιστών που εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις. (Chapman JA. et al, 2020)

Για το παρόν πείραμα ήταν απαραίτητη η ιστολογική ανάλυση των ιστών που καλλιεργήθηκαν ώστε να ελεγχθεί, να παρατηρηθεί και να συγκριθεί η μορφολογία και

τα χαρακτηριστικά τους καθώς και πώς αυτά μεταβάλλονται κατά την διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας. Η συλλογή των δειγμάτων από την καλλιέργεια για ιστολογική ανάλυση έγινε την 0^η, την 2^η, την 7^η, την 14^η και την 21^η μέρα καλλιέργειας και οι ιστοί που συλλέχθηκαν κάθε φορά είχαν πάχος 350 μm, 500 μm και 700 μm.

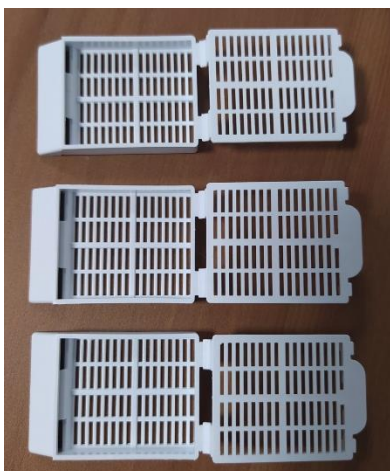
Η τεχνική ιστολογική ανάλυσης που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η τεχνική της Ιστοκινέτας, η οποία αποτελεί ειδικό επιτραπέζιο μηχάνημα μέσα στο οποίο καθίσταται δυνατή η ανάλυση και η επεξεργασία των ιστών. Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια που ακολουθούνται κατά την λειτουργία του μηχανήματος είναι με την σειρά τα εξής: η μονιμοποίηση (η οποία γίνεται κατευθείαν μετά την συλλογή του ιστού), η αφυδάτωση, η διαύγαση και η σκλήνωση των ιστών προς ανάλυση. (Μυλωνάς Μ. 2002)
Ο στόχος πραγματοποίησης του κάθε σταδίου είναι ο εξής (Μυλωνάς Μ. 2002):

- α) η μονιμοποίηση σε υλικά, όπως η φορμόλη, έχει στόχο την διατήρηση της μορφολογίας και χημικής σύστασης του ιστού στην οποία βρίσκεται την χρονική στιγμή μονιμοποίησης του
- β) η αφυδάτωση με αλκοόλες αυξανόμενης συγκέντρωσης (70% - 100%) στοχεύει στην απομάκρυνση νερού από τα κύτταρα του ιστού
- γ) η διαύγαση σε ξυλόλη οδηγεί σε αφαίρεση αλκοόλης και διάλυση λίπους του ιστού
- δ) η σκλήνωση σε υγρή παραφίνη έχει στόχο τον εμποτισμό του ιστού σε παραφίνη ώστε να εισχωρήσει η ουσία στα κύτταρα και να μετατρέψει τον ιστό σε πιο δύσκαμπτο και εύκολο στην κοπή.

Τα δείγματα που συλλέγονταν κάθε φορά τοποθετήθηκαν σε ειδικά κασετίνες – καλαθάκια (Εικόνα 33) τα οποία είναι διαπερατά στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των ιστών.

Οι ιστοί τοποθετούνται διαδοχικά σε:

- διάλυμα φορμόλης για ½ ώρα
- διάλυμα αιθανόλης 70% για 3 ώρες
- διάλυμα αιθανόλης 80% για 1+ ½ ώρα
- διάλυμα αιθανόλης 96% για 3 ώρες
- διάλυμα αιθανόλης 100% για 3 ώρες
- διάλυμα ξυλόλης για 3 ώρες.



***Εικόνα 33:** Οι ειδικές διαπερατές κασετίνες στις οποίες τοποθετούνται οι ιστοί κατά την επεξεργασία τους με την ιστοκινέτα (Sadeghipour A, 2019).*

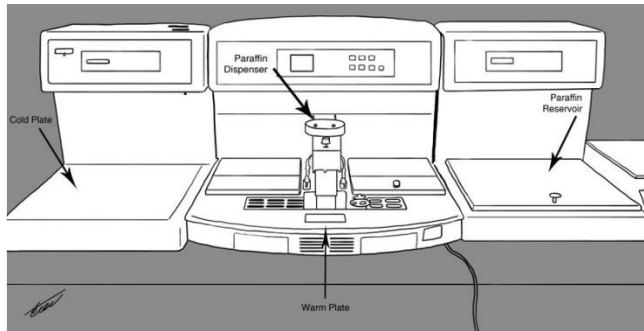
Τέλος οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε παραφίνη για 3 ώρες. Το τελευταίο αυτό στάδιο πραγματοποιήθηκε εκτός του μηχανήματος της ιστοκινέτας και η παραμονή των ιστών στην παραφίνη έγινε στον κλίβανο στους 60°C, καθώς σε θερμοκρασία κάτω των 60°C η παραφίνη μετατρέπεται σε στερεή μορφή.

Παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες ουσίες όπως είναι η ζελατίνη, τα συνθετικά ρητίνης και το εστερικό κερί, η παραφίνη συνεχίζει να αποτελεί το πιο δημοφιλές μέσο διείσδυσης και εμποτισμού σε ιστούς σε ιστοπαθολογικά εργαστήρια. Αυτό συμβαίνει διότι είναι συμβατή με τις περισσότερες μεθόδους και τα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο. Η παραφίνη που χρησιμοποιείται στο παρόν πρωτόκολλο είναι στερεή, άσπρη, άοσμη, με σημείο τήξης 45°C και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. (Sadeghipour A. et al, 2019)

Έπειτα από την παραμονή των ιστών σε λιωμένη παραφίνη δημιουργήθηκαν κύβοι στερεής παραφίνης, που εμπεριέχουν τους ιστούς και έχουν σκληρή μορφή ώστε αργότερα να τοποθετηθούν στο μηχάνημα της μικροτόμου και να κοπούν σε πολύ λεπτές τομές. Οι τομές αυτές στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίστηκαν με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη. (Sadeghipour A. et al, 2019)

Για να προκύψουν οι κύβοι στερεής παραφίνης γίνεται η χρήση μηχανήματος σκλήνωσης (Εικόνα 34) το οποίο αποτελείται από τέσσερα μέρη:

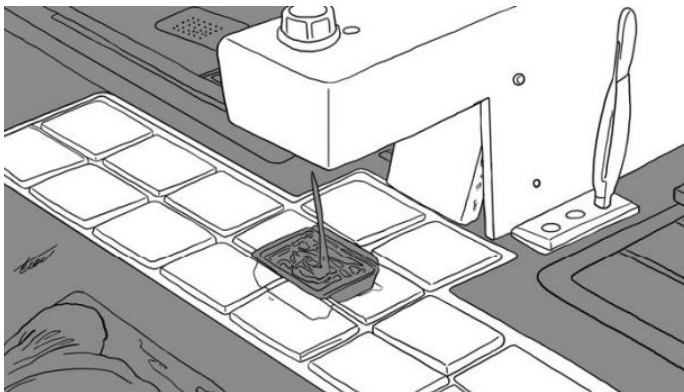
- α) δοχείο αποθήκευσης παραφίνης (paraffin reservoir)
- β) δοχείο εξαγωγής παραφίνης (paraffin dispenser)
- γ) κρύα επιφάνεια (cold plate)
- δ) θερμή επιφάνεια (warm plate).



Εικόνα 34: Το μηχάνημα παραγωγής των κύβων στερεής παραφίνης στο οποίο απεικονίζονται τα επιμέρους μέρη του. (Sadeghipour A. et al, 2019)

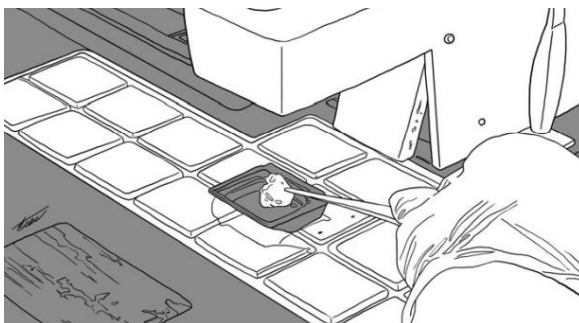
Όλη η διαδικασία διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου και αποτελείται από τα εξής στάδια:

- μεταλλικά καψάκια τοποθετούνται πάνω στη θερμή επιφάνεια του μηχανήματος για να διατηρούνται ζεστά
- στα μεταλλικά καψάκια τοποθετείται ζεστή παραφίνη, μέχρι να καλυφθεί ο μισός όγκος τους, από το δοχείο εξαγωγής παραφίνης, το οποίο περιέχει υγρή παραφίνη σε θερμοκρασία 60°C (Εικόνα 35)



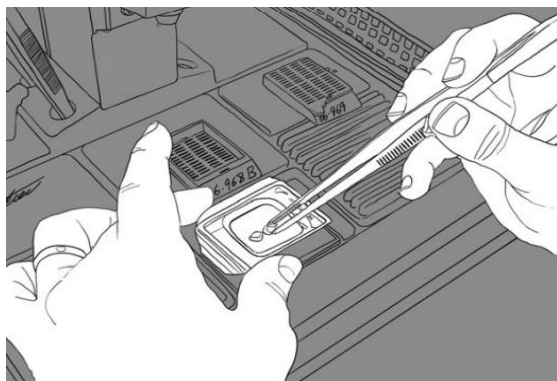
Εικόνα 35: Εξαγωγή υγρής παραφίνης σε θερμοκρασία 60°C στο μεταλλικό καψάκι μέχρι να καλυφθεί ο μισός όγκος του. (Sadeghipour A. et al, 2019)

- αφαιρείται ο ιστός από την κασετίνα που βρίσκονταν προηγουμένως και μεταφέρεται με ειδικές λαβίδες στον πάτο από τα μεταλλικά καψάκια με την παραφίνη (Εικόνα 36)



Εικόνα 36: Μεταφορά του ιστού στο μεταλλικό καψάκι με την παραφίνη και πίεση προς το πάτο από το καψάκι. (Sadeghipour A. et al, 2019)

- πιέζεται και αλλάζει η κατεύθυνση του ιστού με την βοήθεια των λαβίδων ώστε να ακουμπάει η μεγαλύτερη επιφάνεια του στον πάτο από το καψάκι (Εικόνα 37)



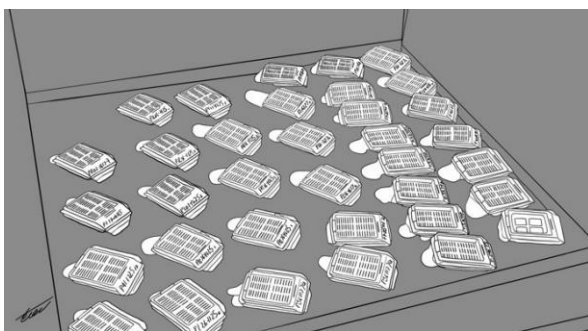
Εικόνα 37: Ανακατεύθυνση του ιστού ώστε να βρίσκεται η μεγαλύτερη επιφάνεια του ιστού στον πάτο από το μεταλλικό καψάκι. (Sadeghipour A. et al, 2019)

- μεταφέρεται το καψάκι στην κρύα επιφάνεια του μηχανήματος για λίγα λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί η παραφίνη, η οποία στη συνέχεια αποκτά άσπρο χρώμα και ξαναπιέζεται ο ιστός μαλακά με τις λαβίδες για να κολλήσει καλά στον πάτο και να μην επιπλέει
- τοποθετείται η κασετίνα που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως, χωρίς το καπάκι της, πάνω από το μεταλλικό καψάκι που περιέχει τον ιστό και πιέζεται με τις λαβίδες προς τα κάτω για να κολλήσει καλά (Εικόνα 38)



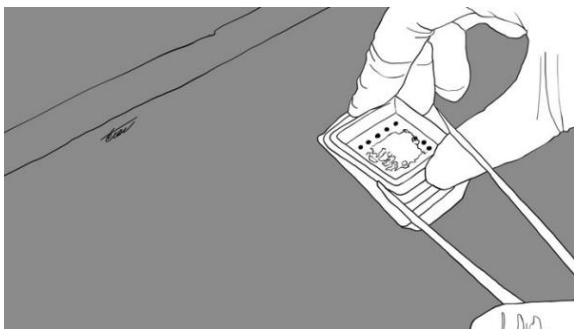
Εικόνα 38: Τοποθέτηση της κασετίνας πάνω στο μεταλλικό καψάκι με τον ιστό. (Sadeghipour A. et al, 2019)

- μεταφέρεται το καψάκι με την κασετίνα κάτω από το δοχείο εξαγωγής της παραφίνης και τοποθετείται υγρή και ζεστή παραφίνη μέχρι να γεμίσει το καψάκι και να συμπληρωθεί ο όγκος του με παραφίνη
- μεταφέρονται τα καψάκια με την κασετίνα και τον ιστό κάτω από την κρύα επιφάνεια του μηχανήματος για 15 λεπτά ώστε η παραφίνη να κρυώσει και να στερεοποιηθεί καλά. Έτσι δημιουργούνται οι κύβοι παραφίνης οι οποίοι βρίσκονται ενωμένοι με την κασετίνα. (Εικόνα 39)



Εικόνα 39: Τοποθέτηση των μεταλλικών καψακίων με τη κασετίνα και τον ιστό στην κρύα επιφάνεια για να στερεοποιηθεί η παραφίνη και να δημιουργηθούν οι κύβοι παραφίνης. (Sadeghipour A. et al, 2019)

- μετά το πέρας των 15 λεπτών, αφαιρείται προσεχτικά ο κύβος στερεής παραφίνης που έχει δημιουργηθεί από το μεταλλικό καψάκι με την βοήθεια λαβίδων και τοποθετείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 20°C για περαιτέρω στερεοποίηση της παραφίνης και σκλήρυνσης του ιστού ώστε να κοπεί πιο αποτελεσματικά στον μικροτόμο (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Αφαίρεση του κύβου παραφίνης που βρίσκεται προσκολλημένος στην κασετίνα από το μεταλλικό καψάκι. (Sadeghipour A. et al, 2019)

Με την εφαρμογή των παραπάνω βημάτων προέκυψε η δημιουργία των κύβων στερεής παραφίνης, που περιέχουν τον ιστό και ακολούθησε η μεταφορά τους στον μικροτόμο. Εκεί πραγματοποιήθηκε η κοπή τους σε πολύ μικρές και λεπτές τομές πάχους 3μm οι οποίες μεταφέρθηκαν στην συνέχεια σε αντικειμενοφόρους πλάκες.



Εικόνα 41: Απεικόνιση των κύβων στερεής παραφίνης που εμπεριέχουν τους πνευμονικούς ιστούς της ιστοκαλλιέργειας.

Η δημιουργία τομών παραφίνης είναι η διαδικασία κοπής των ιστών εμβαπτισμένων σε παραφίνη (Εικόνα 41) σε λεπτές τομές με την βοήθεια του μικροτόμου. Ο μικροτόμος είναι εργαστηριακή συσκευή που χρησιμοποιείται συχνά για την δημιουργία λεπτών τομών από ιστούς με σκοπό την παρατήρηση και ανάλυση τους στο μικροσκόπιο. Συνήθως, οι δυο πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τρόποι επεξεργασίας και προετοιμασίας των ιστών για την κοπή είναι:

- α) η μονιμοποίηση σε φορμόλη και ο εμποτισμός σε παραφίνη
- β) το πάγωμα φρέσκων ιστών απευθείας μετά την συλλογή τους σε υγρό άζωτο.

Οι ιστοί που προκύπτουν από την διαδικασία δημιουργίας και τομής κύβων στερεής παραφίνης εμφανίζουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τους φρέσκους κομμένους και παγωμένους ιστούς όσον αφορά την αποτελεσματικότερη διατήρηση, αποθήκευση και επαναχρησιμοποίηση τους σε μελλοντικές διαγνωστικές εξετάσεις. Επίσης είναι καταλληλότεροι για την χρώση με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη, για την ανοσοϊστοχημεία και για φθορίζων *in situ* υβριδισμό. (Sy J. et al, 2019)

Ο μικροτόμος που χρησιμοποιείται για την κοπή των μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εμποτισμένων ιστών σε παραφίνη είναι ο περιστροφικός μικροτόμος (Accu – Cut SMR 200 Rotary Microtome) (Εικόνα 42) ο οποίος αποτελείται από τα εξής μέρη:

- α) λεπίδα κοπής
- β) μηχανισμός στερέωσης λεπίδας
- γ) μηχανισμός συγκράτησης δείγματος του ιστού
- δ) τροχός περιστροφής
- ε) τροχός ελέγχου.

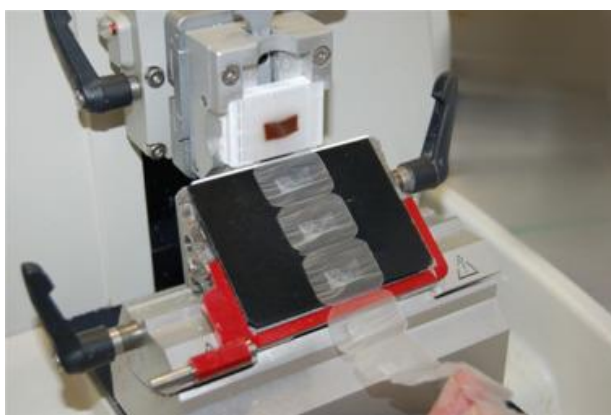


Εικόνα 42: Μικροτόμος που χρησιμοποιείται για την κοπή κύβων παραφίνης.

Σε αντίθεση με άλλα είδη μικροτόμων, στον περιστροφικό μικροτόμο η λεπίδα κοπής βρίσκεται σε σταθερή θέση σε σχέση με το δείγμα και με την βοήθεια του τροχού περιστροφής, το δείγμα μπορεί να μετακινηθεί οριζόντια κατά μήκος της λεπίδας. Επίσης, με τον τροχό ελέγχου γίνεται το δείγμα να μετακινηθεί υψηλότερα ή χαμηλότερα σε σχέση με την λεπίδα εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο το μέρος και την γωνία με την οποία θα γίνει η κοπή του ιστού του δείγματος. (Sy J. et al, 2019)

Για τη δημιουργία τομών παραφίνης στη μικροτόμο πραγματοποιούνται τα εξής:

- η λεπίδα τομής τοποθετείται προσεχτικά στον μηχανισμό στερέωσης της με την κατάλληλη γωνία
- ο κύβος στερεής παραφίνης, ο οποίος είναι προσκολλημένος στην κασετίνα, τοποθετείται στην κατάλληλη θήκη απέναντι από την λεπίδα
- μεταφέρεται ο κύβος αργά και προσεχτικά κοντά στην λεπίδα μέχρι το σημείο που εφάπτονται μεταξύ τους
- ξεκινάει το τριμάρισμα του κύβου, διότι ο ιστός βρίσκεται στο μέσο του κύβου και επομένως, χρειάζεται να τριμαριστεί και να φύγει η περίσσεια παραφίνης ώστε να αποκαλυφθεί στην συνέχεια ο ιστός
- με το τριμάρισμα η λεπίδα κόβει τον κύβο στα 30 μm μέχρι να αποκαλυφθεί ισόποσα όλη η επιφάνεια του ιστού
- μόλις τελειώσει το τριμάρισμα και έχει βεβαιωθεί ότι είναι εκτεθειμένη ισόποσα όλη η επιφάνεια του ιστού, ξεκινάει η κοπή του ιστού στα 4 μm (Εικόνα 43)



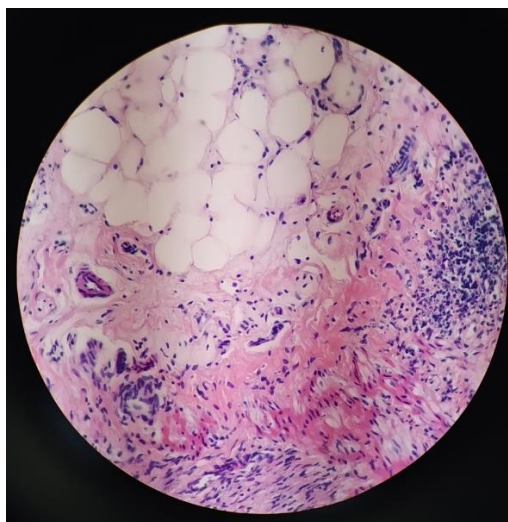
Εικόνα 43: Οι ροδέλες τομών του ιστού που προκύπτουν από την κοπή του κύβου στον μικροτόμο. (McMillan D.B., 2018)

- επειδή είναι πολύ λεπτές οι τομές δημιουργούνται ροδέλες τομών και αυτές μεταφέρονται προσεχτικά με την βοήθεια λαβίδας σε υδατόλουτρο στους 50°C για να ξεχωρίσουν μεταξύ τους και να «απλώσουν»

τέλος, οι τομές μεταφέρονται από το υδατόλουτρο πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν. (Sy J. et al, 2019)

9. Χρώση ιστών με Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη

Οι χρώσεις ιστών συνήθως είναι όξινες ή βασικές ουσίες που τείνουν να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών και αυτές που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι ο συνδυασμός Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης. (Μυλωνάς Μ, 2002) Η χρώση αιματοξυλίνη έχει μπλε - μωβ χρώμα, είναι βασική ουσία και χρωματίζει με σκούρο μπλε χρώμα τους πυρήνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Αντιθέτως, η χρώση Ηωσίνη έχει ανοιχτό ροζ – πορτοκαλί και βάφει με κόκκινο, ροζ ή πορτοκαλί χρώμα, αναλόγως την ποιότητα της, το κυτταρόπλασμα και τις πρωτεΐνες (Εικόνα 44).



Εικόνα 44: Χρώση ιστού με Ηωσίνη και Αιματοξυλίνη όπου απεικονίζονται το κυτταρόπλασμα (ροζ), οι πυρήνες (μπλε-μωβ) και οι κυψελίδες (με άσπρο).

Πριν την έναρξη της διαδικασίας της χρώσης, οι ιστοί που βρίσκονται στις αντικειμενοφόρους πλάκες τοποθετούνται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C για μια ώρα ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη που περιβάλλει στους ιστούς.

Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται διαδοχικά σε:

- διάλυμα ξυλόλης για 2 φορές x 10 λεπτά η κάθε μία
- διάλυμα αιθανόλης 100% για 2 φορές x 5 λεπτά
- διάλυμα αιθανόλης 95% για 2 λεπτά
- διάλυμα αιθανόλης 70% για 2 λεπτά
- ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα

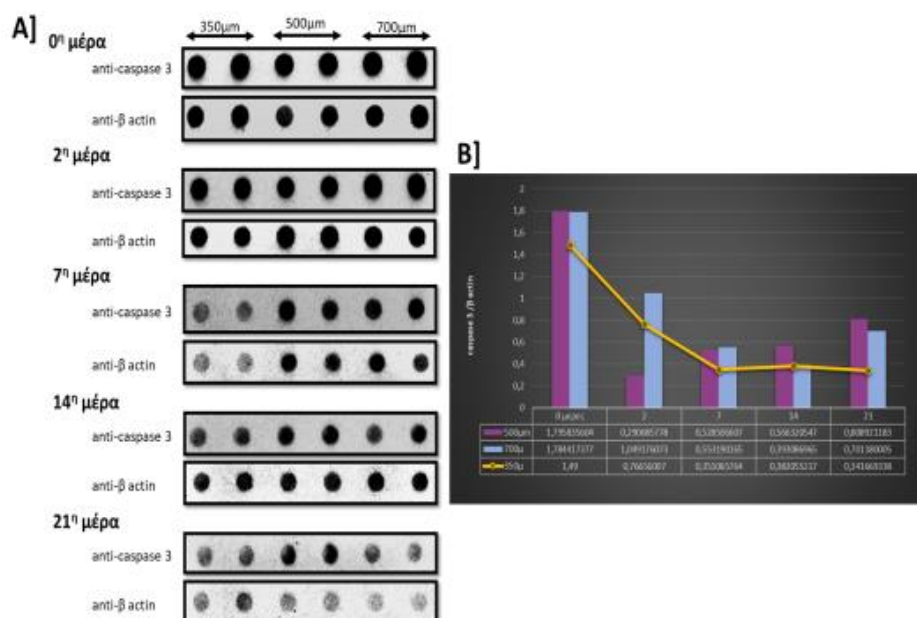
- διάλυμα Αιματοξυλίνης (Hematoxylin H, Biognost, 1L) για 8 λεπτά
- ξέπλυμα με νερό βρύσης για 2 λεπτά
- διάλυμα όξινου V=400 ml (acidic alcohol) (396 ml αλκοόλη 95% + 4 ml HCL 37%) για 4-5 γρήγορες εμβαπτίσεις
- ξέπλυμα με νερό βρύσης για σύντομο χρονικό διάστημα
- διάλυμα Bluing Agent V=250 ml (0.875 g NaHCO_3 + 5 g MgSO_4 + 250 ml απιονισμένο νερό) για 30 δευτερόλεπτα με 1 λεπτό
- ξέπλυμα με ζεστό νερό βρύσης για 8 λεπτά
- διάλυμα Ηωσίνης (Εοσίνη Δινατρική 2g, Chemco by Syndesmos) για 30 δευτερόλεπτα με 1 λεπτό
- διάλυμα αιθανόλης 95% για 2 φορές x 2 λεπτά
- διάλυμα αιθανόλης 100% για 2 φορές x 2 λεπτά
- έλεγχος με το μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί εάν έχει απομακρυνθεί τελείως η ηωσίνη από τις αντικειμενοφόρους πλάκες
- διάλυμα ξυλόλης για 2 x 5 λεπτά
- τοποθέτηση των πλακών σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν οι ιστοί. (Zhou X et al. 2017)

Τα διαλύματα αλκοόλης χρησιμοποιούνται για να αφυδατώσουν τον ιστό όπως γίνεται και στην διαδικασία της ιστοκινέτας. Το διάλυμα ξυλόλης χρησιμοποιείται στην αρχή για να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια παραφίνης που δεν έχει απομακρυνθεί με την παραμονή των πλακών στον κλίβανο καθώς επίσης, χρησιμοποιείται στην συνέχεια για να καθαρίσει και να απομακρύνει υπολείμματα που παραμένουν από τα διαλύματα στα εμβαπτίζονται κάθε φορά οι πλάκες. Το όξινο διάλυμα προσφέρει την δυνατότητα απομάκρυνσης της περίσσειας αιματοξυλίνης που προστίθεται σε προηγούμενο βήμα. Τέλος, το Bluing Agent χρησιμοποιείται για να ενισχύσει το μπλε χρώμα των πυρήνων που έχουν βαφτεί προηγουμένως με την αιματοξυλίνη. Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, τοποθετήθηκε καλυπτρίδα πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Έκφραση των πρωτεϊνών Caspase -3, LC3 και Beclin

Ένας από τους στόχους του πειράματος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο έλεγχος της βιωσιμότητας και ακεραιότητας των ιστών καθώς και το χρονικό διάστημα της ιστοκαλλιέργειας στο οποίο «αντέχουν» να επιβιώσουν οι ιστοί χωρίς να καταστραφούν ή να υποστούν μόλυνση. Συνεπώς, ελέγχθηκε η ύπαρξη απόπτωσης ή/αυτοφαγίας στα κύτταρα των πνευμονικών ιστών που καλλιιεργήθηκαν σε χρονικό διάστημα 21 ημερών. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Dot Blot) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τον προσδιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών Caspase-3 (Εικόνα 45), LC3 (Εικόνα 46), Beclin (Εικόνα 47) και β-ακτίνης στα δείγματα (ομογενοποιηήματα) που λήφθηκαν από την ιστοκαλλιέργεια των πνευμόνων. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών (Caspase-3, LC3 και Beclin) αποτελούν ένδειξη παρουσίας απόπτωσης ή/και αυτοφαγίας στα κύτταρα των ιστών που καλλιιεργήθηκαν. Ακόμη, η β-ακτίνη χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων γιατί εκφράζεται σταθερά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (αποτελεί housekeeping protein). (Ferguson RE et al, 2005)



Εικόνα 45: Α) Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντισώματα έναντι της Caspase-3 και της β-ακτίνης σε δείγματα ιστοκαλλιέργειας πάχους τομών 350 μm, 500 μm και 700 μm που λήφθηκαν την ημέρα λήψης του ιστού (0^η μέρα καλλιέργειας), την 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα καλλιέργειας. Β) Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της caspase-3 ως προς την β-ακτίνη στους ιστούς (πάχους 350 μm, 500 μm και 700 μm) από τις συγκεκριμένες μέρες ιστοκαλλιέργειας.

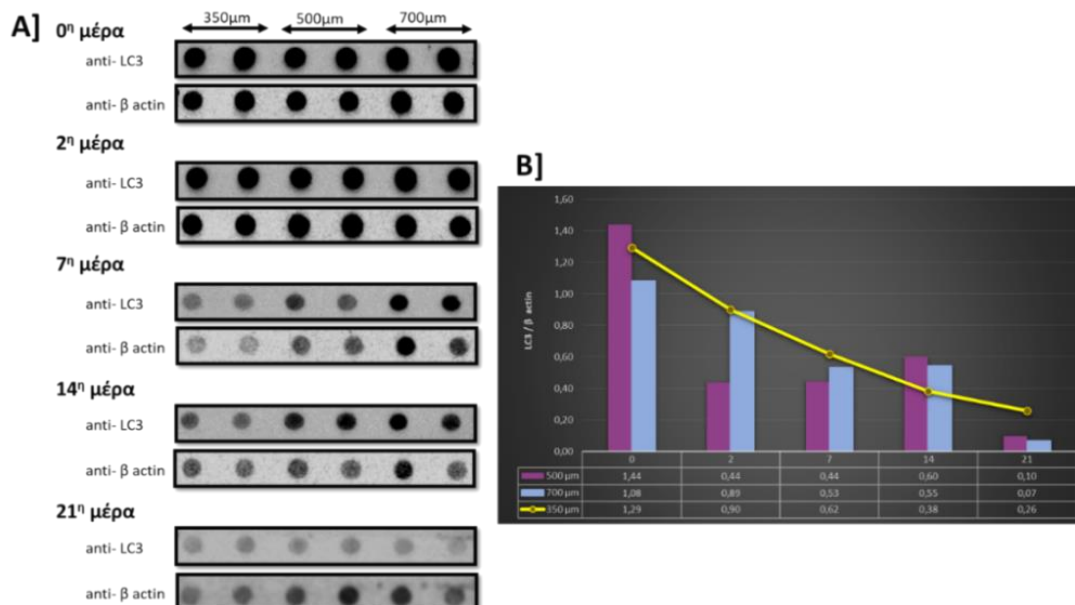
Ειδικότερα για την απόπτωση μελετήθηκε η έκφραση της Caspase-3 σε ιστούς πάχους 350 μm , 500 μm και 700 μm σε ομογενοποιημένα ιστών (Εικόνα 45). Η Caspase-3 συμμετέχει στο σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση άλλων κασπασών που αποικοδομούν κυτταρικές πρωτεΐνες. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε την ημέρα λήψης του ιστού (0 μέρα καλλιέργειας), την 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα καλλιέργειας.

Παρατηρήθηκε ότι την 0 μέρα καλλιέργειας η έκφραση της Caspase-3 είναι σε παρόμοια επίπεδα στο ομογενοποίημα των τριών διαφορετικών δειγμάτων (τομών πνευμόνων πάχους 350 μm , 500 μm και 700 μm) και η έκφραση της ελαττώνεται με την πάροδο των ημερών καλλιέργειας σε όλους τους ιστούς ανεξαρτήτως πάχους τομής (Εικόνα 45). Η ελάττωση της έκφρασης της Caspase-3 είναι σχεδόν γραμμική για τις τομές πάχους 350 μm από την 0 έως 7^η ημέρα καλλιέργειας καθώς επίσης και για τις τομές πάχους 700 μm από την 0 έως 14^η ημέρα. Αντίθετα η έκφραση της Caspase-3 ελαττώνεται απότομα από την 0 στην 2^η μέρα καλλιέργειας στις τομές πάχους 500 μm και στη συνέχεια μένει περίπου σε σταθερά επίπεδα (Εικόνα 45). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι μετά την 7^η ημέρα καλλιέργειας, η έκφραση της Caspase-3 είναι χαμηλότερη στα ομογενοποιημένα των τομών πάχους 350 μm συγκριτικά με τα άλλα δείγματα (Εικόνα 45).

Όσον αφορά την αυτοφαγία, αυτή μελετήθηκε με την έκφραση των LC3 (Εικόνα 46) και Beclin-1 πρωτεϊνών (Εικόνα 47) σε ομογενοποιημένα ιστών πάχους 350 μm , 500 μm και 700 μm , τις συγκεκριμένες μέρες που έγινε η συλλογή των παραπάνω δειγμάτων από την ιστοκαλλιέργεια (0, 2^η, 7^η, 14^η, και 21^η μέρα καλλιέργειας). Η διαδικασία που ακολούθησε είναι ίδια με την προηγούμενη διαδικασία για την Caspase-3. Γενικά, οι LC3 και Beclin-1 πρωτεΐνες βοηθούν στον σχηματισμό της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων.

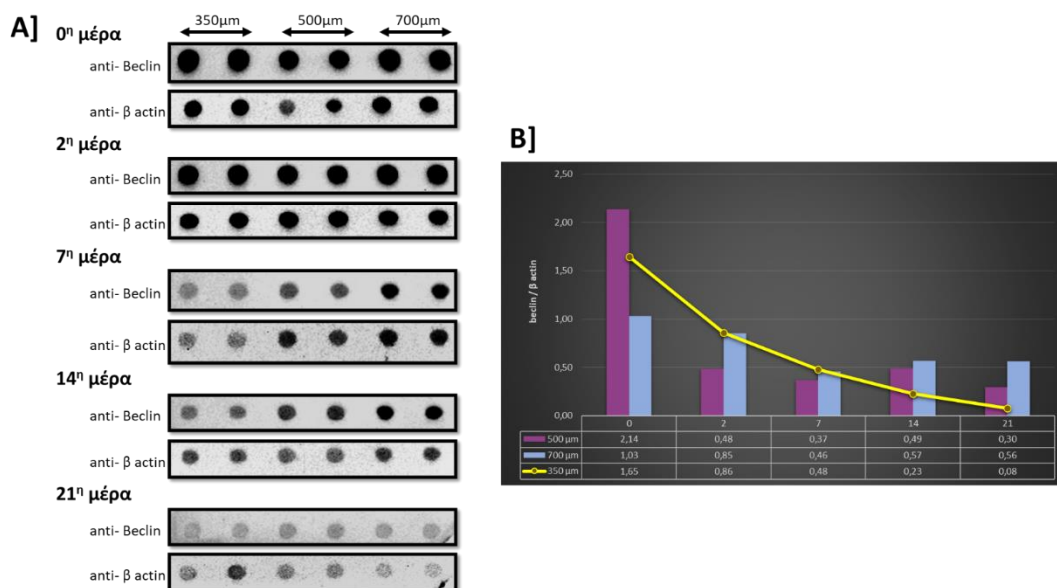
Παρατηρήθηκε ότι την 0 μέρα καλλιέργειας η έκφραση της πρωτεΐνης LC3 είναι σε παρόμοια επίπεδα στο ομογενοποίημα των τριών διαφορετικών δειγμάτων τομών πάχους 350 μm , 500 μm και 700 μm και η έκφραση της ελαττώνεται με την πάροδο των ημερών καλλιέργειας σε όλους τους ιστούς ανεξαρτήτως πάχους τομής (Εικόνα 47). Η ελάττωση της έκφρασης της LC3 είναι σχεδόν γραμμική τις 0 με 21 μέρες καλλιέργειας για τους ιστούς πάχους 350 μm (Εικόνα 47). Παρομοίως για τους ιστούς πάχους 700 μm η ελάττωση της έκφρασης είναι σχεδόν γραμμική για τις 0 έως 7 ημέρες καλλιέργειας, στη συνέχεια η έκφραση παραμένει σταθερή και την 21^η μέρα καλλιέργειας μειώνεται σημαντικά (Εικόνα 47). Όσον αφορά τους ιστούς πάχους 500

μm η έκφραση στο ομογενοποίημα των ιστών μειώνεται αισθητά από την 0 στην 2^η μέρα καλλιέργειας, έπειτα παραμένει σε παρόμοια επίπεδα μέχρι την 14^η μέρα όπου αυξάνεται λίγο και τέλος, όπως και στους υπόλοιπους ιστούς, η έκφραση της LC3 μειώνεται κατά πολύ την 21^η μέρα καλλιέργειας (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Α) Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντισώματα έναντι της LC3 και της β-ακτίνης των δειγμάτων ιστοκαλλιέργειας πάχους 350 μm, 500 μm και 700 μm που λήφθηκαν την ημέρα λήψης του ιστού (0^η μέρα καλλιέργειας), την 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα καλλιέργειας. Β) Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της LC3 ως προς την β-ακτίνη στους ιστούς (πάχους 350 μm, 500 μm και 700 μm) από τις συγκεκριμένες μέρες ιστοκαλλιέργειας.

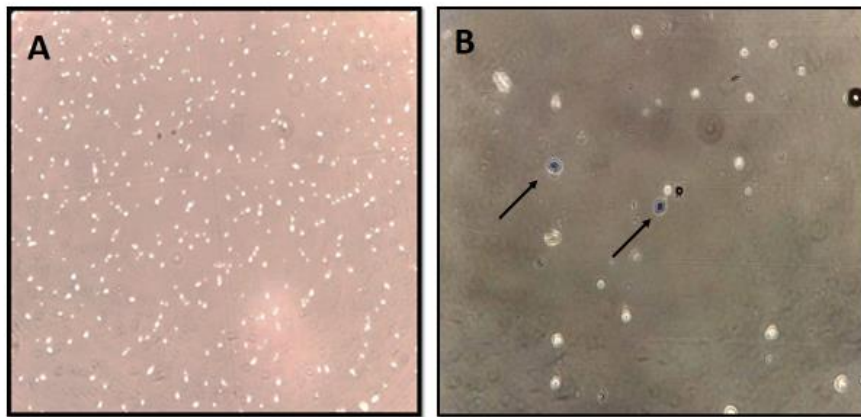
Παρατηρήθηκε ότι την 0 μέρα καλλιέργειας η έκφραση της πρωτεΐνης Beclin 1 είναι αυξημένη στο ομογενοποίημα των δειγμάτων ιστών πάχους 350 μm και 500 μm, ενώ στους ιστούς πάχους 700 μm η έκφραση της είναι σχετικά μικρότερη. Γενικότερα, η έκφραση της πρωτεΐνης ελαττώνεται με την πάροδο των ημερών καλλιέργειας σε όλους τους ιστούς ανεξαρτήτως του πάχους τομής (Εικόνα 48). Στους ιστούς πάχους 350 μm η έκφραση της Beclin 1 μειώνεται σχεδόν γραμμικά και φτάνει σε ελάχιστα επίπεδα την 21^η μέρα καλλιέργειας (Εικόνα 48). Η έκφραση της Beclin 1 στους ιστούς πάχους 500 μm μειώνεται σημαντικά την 2^η μέρα καλλιέργειας και παραμένει σε παρόμοια επίπεδα τις υπόλοιπες μέρες καλλιέργειας. Η έκφραση της Beclin 1 στους ιστούς πάχους 700 μm παραμένει σε παρόμοια επίπεδα την 0 και 2^η μέρα καλλιέργειας και μειώνεται την 7^η μέρα. Σε αντίθεση με τους προηγούμενους ιστούς, η έκφραση της αυξάνεται λίγο κατά την 14^η μέρα καλλιέργειας και παραμένει σε παρόμοια επίπεδα μέχρι την 21^η μέρα καλλιέργειας (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Α) Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντισώματα έναντι της Beclin 1 και της β-ακτίνης των δειγμάτων ιστοκαλλιέργειας πάχους 350 μm, 500 μm και 700 μm που λήφθηκαν την ημέρα λήψης του ιστού (0^η μέρα καλλιέργειας), την 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα καλλιέργειας. Β) Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της Beclin 1-ως προς την β-ακτίνη στους ιστούς (πάχους 350 μm, 500 μm και 700 μm) από τις συγκεκριμένες μέρες ιστοκαλλιέργειας.

2. Χαρακτηρισμός κυττάρων στο θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας

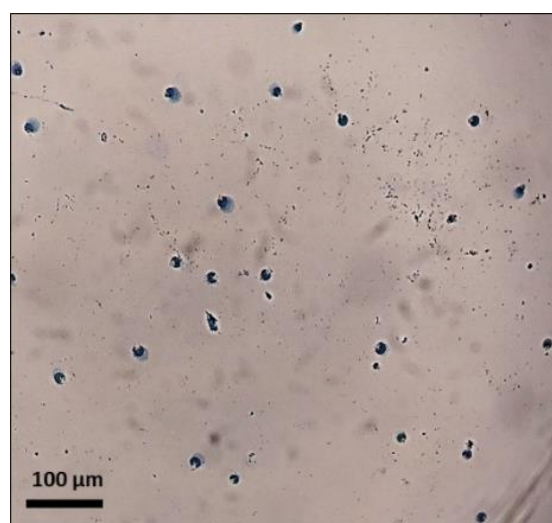
Από την 2^η μέρα ιστοκαλλιέργειας των δειγμάτων παρατηρήθηκε η ύπαρξη πολυάριθμων κυττάρων στο θρεπτικό υλικό. Συνεπώς, την 14^η μέρα καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε η συλλογή του θρεπτικού υλικού με τα παραπάνω κύτταρα για να μελετηθεί ο αριθμός και το είδος τους. Για τον υπολογισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρώση Trypan Blue η οποία έχει την ικανότητα να διαπερνά τα κυτταρικά τοιχώματα και να χρωματίζει με μπλε χρώμα τα νεκρά κύτταρα. Συνεπώς, με την παραπάνω χρώση και με την χρήση της πλάκας Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των νεκρών (μπλε) και ζωντανών κυττάρων (άσπρο) σε δείγμα θρεπτικού υλικού που προέρχεται από τους ιστούς πάχους 350 μm που καλλιεργήθηκαν μέχρι την 14^η μέρα καλλιέργειας (Εικόνα 49).



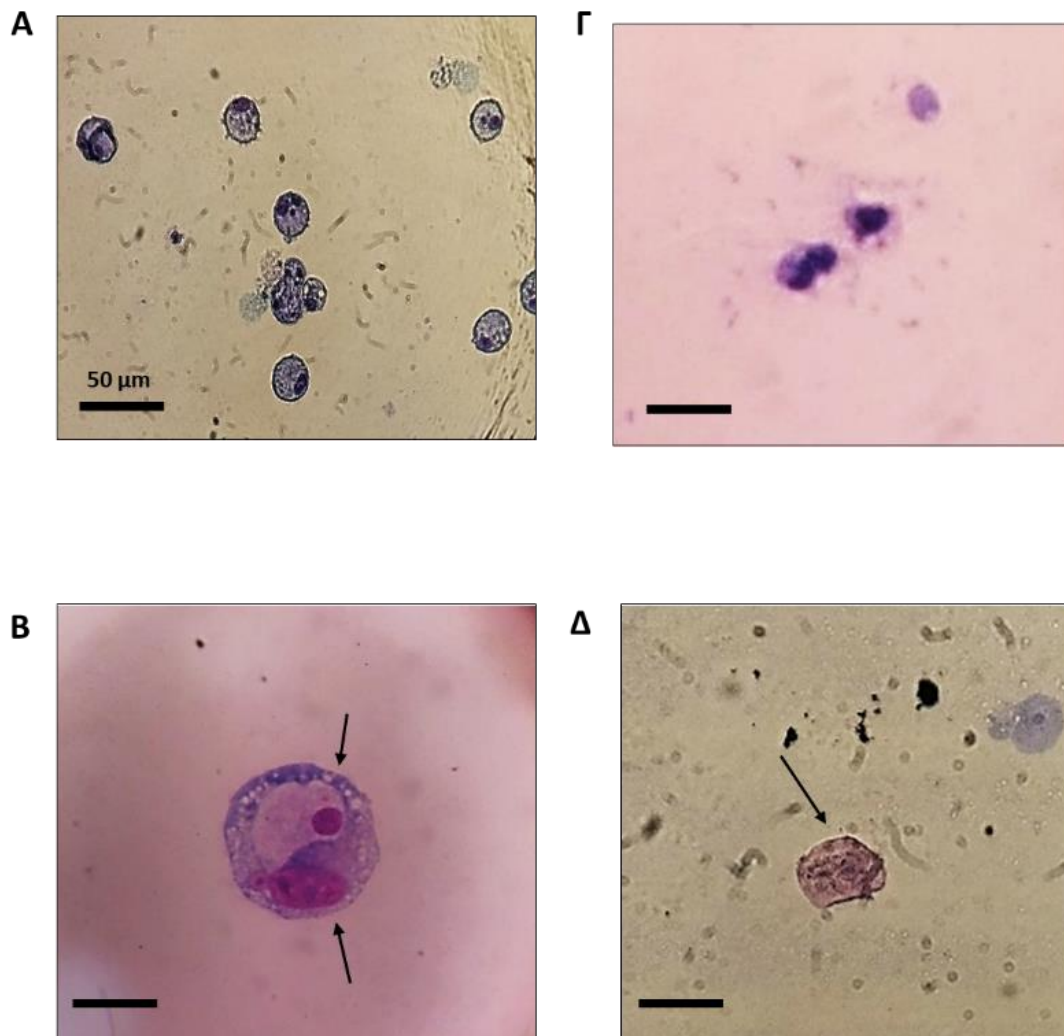
Εικόνα 49: Α) Απεικόνιση της ύπαρξης πολυάριθμων κυττάρων στο θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας Β) Χρώση των κυττάρων με Trypan Blue όπου με βέλη σημειώνονται τα νεκρά κύτταρα.

Σύμφωνα με τον τύπο $a/8 \times 5 \times 10^4$ ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων υπολογίστηκε σε **8.437.500 cells/ml** και των νεκρών σε **77.245 cells/ml**.

Μετά τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονταν στο θρεπτικό υλικό των ιστών πάχους 350 μm , μέρος του δείγματος μεταφέρθηκε σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες μέσω της κυτταροφυγόκεντρου επιχρίσματος. Στη συνέχεια έγινε χρώση των κυττάρων με Giemsa και May Grunwald και ακολούθησε η παρατήρηση/φωτογράφιση των κυττάρων με το μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) (Εικόνα 50).

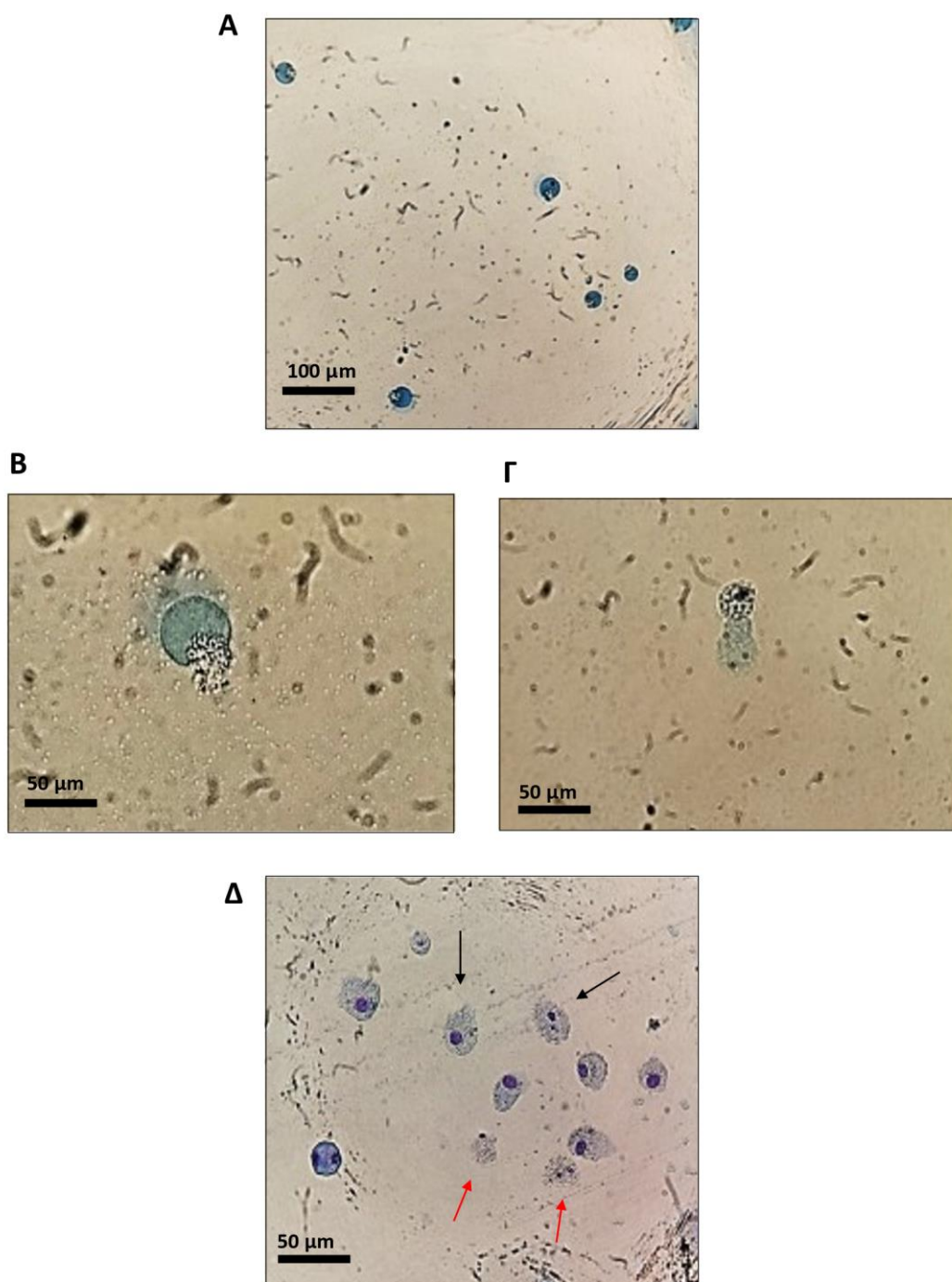


Εικόνα 50: Απεικόνιση κυττάρων στο θρεπτικό υλικό της 14^{ης} ημέρας καλλιέργειας τομών πάχους 350 μm . Η φωτογραφία ελήφθη με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) σε μεγέθυνση 10X. Κλίμακα 100 μm .



Εικόνα 51: Απεικόνιση κυττάρων στο θρεπτικό υλικό της 14^{ης} ημέρας καλλιέργειας τομών πάχους 350 μm . Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) σε μεγέθυνση 40X, κλίμακα: 50 μm . Απεικονίζονται Α) μακροφάγα Β) φαγοκύτταρο το οποίο περιλαμβάνει 2 πυρήνες, τον δικό του και τον πυρήνα ενός άλλου κυττάρου που φαγοκυτταρώθηκε (σημειώνονται με βέλη) Γ) πνευμονοκύτταρα τύπου 1 Δ) πνευμονοκύτταρα τύπου 2.

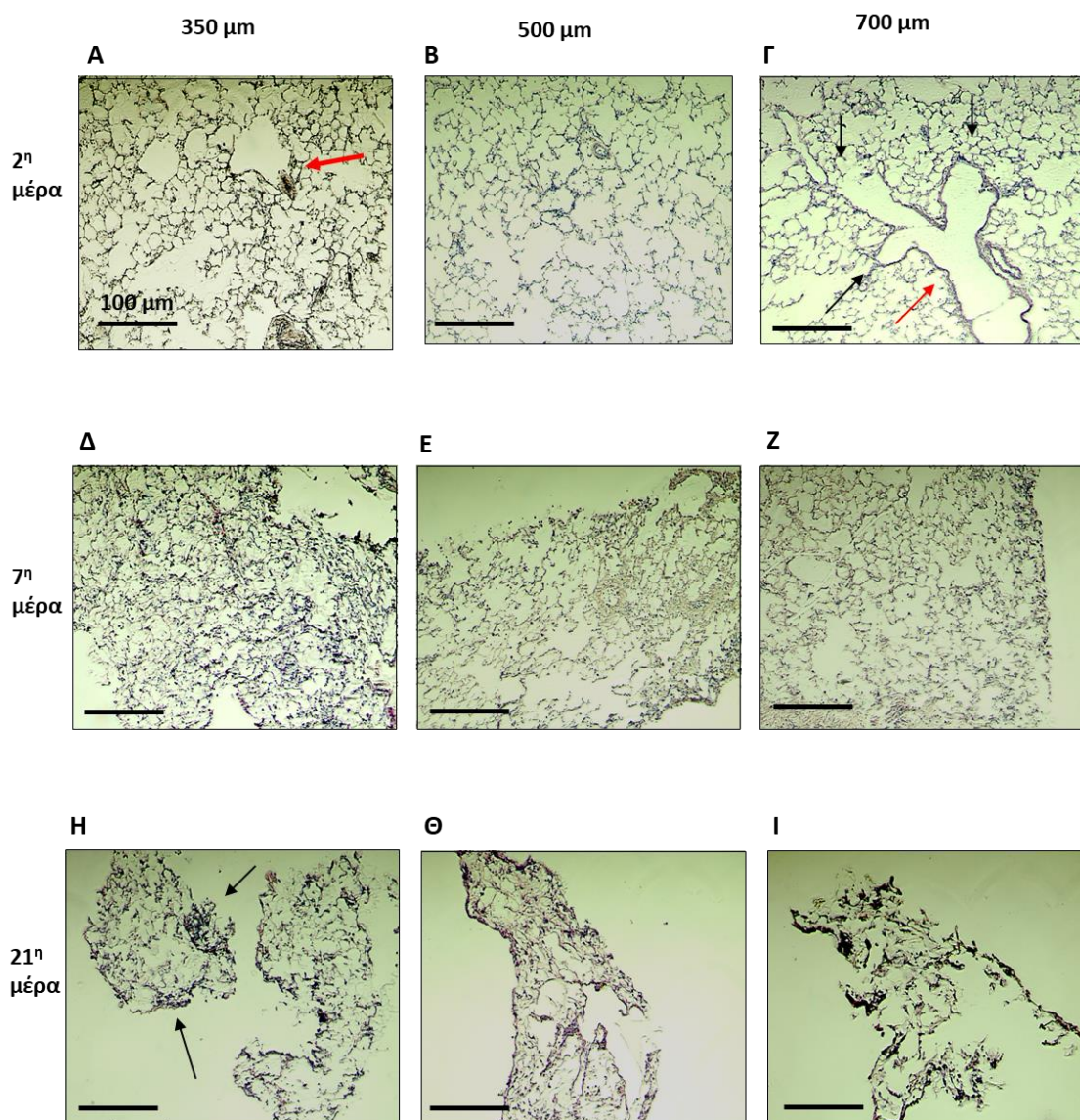
Οι κυτταρικοί τύποι που παρατηρήθηκαν στις φωτογραφίες που ελήφθησαν ήταν επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα, ιστιοκύτταρα (μακροφάγα) και φαγοκύτταρα, με τα περισσότερα από αυτά να είναι μακροφάγα, (Εικόνα 51, Εικόνα 52) ενώ πολλά από τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν ήταν νεκρά ή βρίσκονταν σε στάδιο κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 52).



Εικόνα 52: Κύτταρα στο θρεπτικό υλικό της 14^{ης} ημέρας καλλιέργειας τομών πάχους 350 μm . Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) σε μεγέθυνση 10X ή X40. Απεικονίζονται: Α) κύτταρα που υπόκεινται σε νέκρωση καθώς έχει διαρραγεί η κυτταρική τους μεμβράνη και απελευθερώνονται τα κυτταροπλασματικά συστατικά (κλίμακα 10X), Β) το ίδιο κύτταρο με τα προηγούμενα στο οποίο φαίνεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (40X) η διάρρηξη της μεμβράνης και η απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών, Γ) κύτταρο το οποίο βρίσκεται σε στάδιο κυτταρικού θανάτου και έχει κατακερματιστεί η χρωματίνη του καθώς έχει βγει έξω από το κύτταρο, Δ) μακροφάγα τα οποία βρίσκονται σε απόπτωση καθώς αποικοδομούνται οι μεμβράνες και το κυτταρόπλασμά τους (σημειώνεται με μαύρα βέλη) και φαίνονται επίσης νεκρά μακροφάγα στα οποία έχουν καταστραφεί τα κυτταροπλασματικά τους συστατικά (σημειώνεται κόκκινα βέλη).

3. Μορφολογία των ιστών μετά από χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης

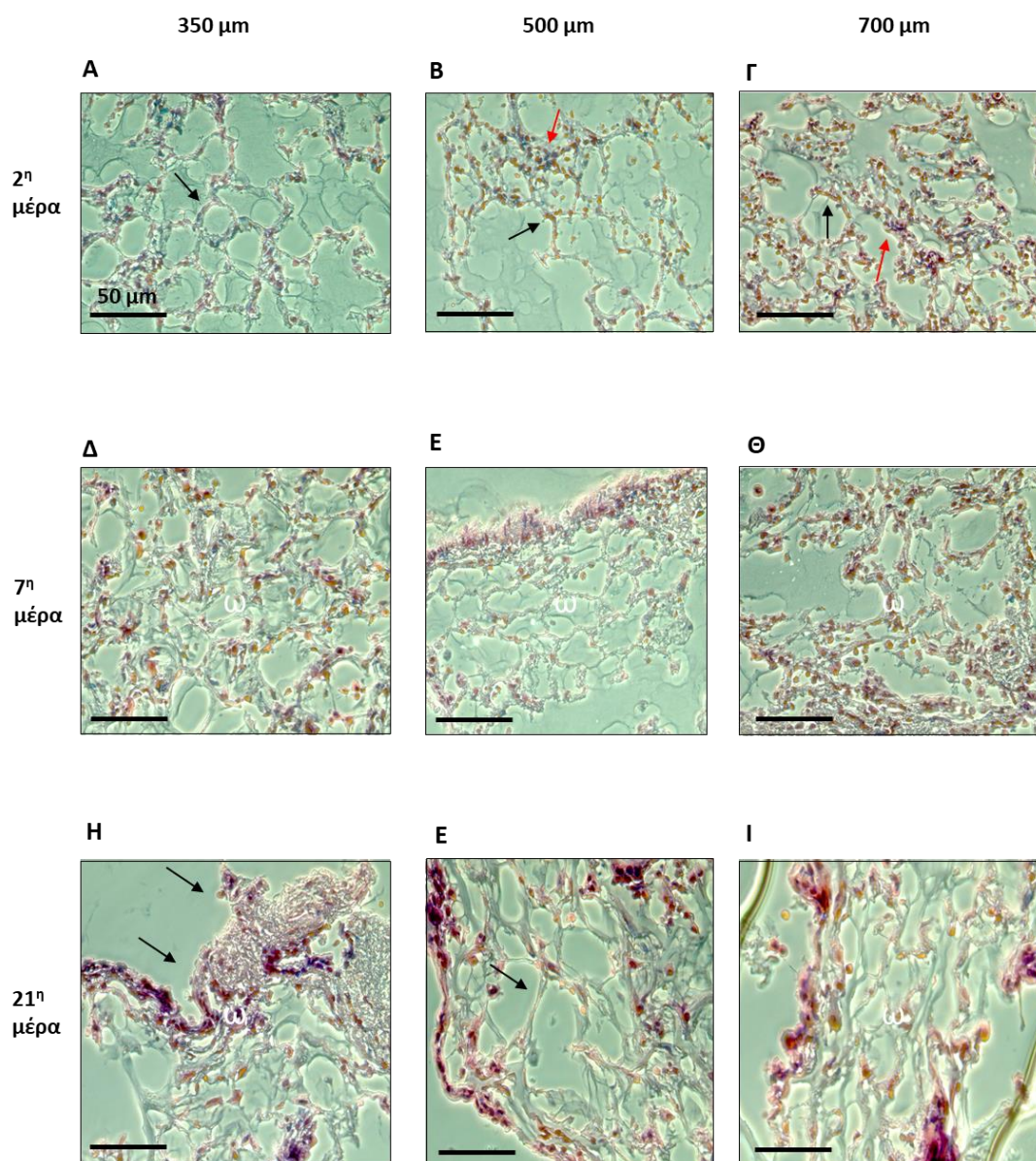
Για την χρώση με αιματοξυλίνη/ηωσίνη και τη παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) ελήφθησαν οι τομές παραφίνης πάχους 3μm που είχαν συλλεχθεί την 2^η, 7^η και 21^η μέρα καλλιέργειας (Εικόνα 53).



Εικόνα 53: Φωτογραφίες που ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) σε μεγέθυνση 10X, κλίμακα 100μm όπου απεικονίζεται το πνευμονικό παρέγχυμα με τις κυψελίδες, τους κυψελιδικούς σάκους και τα βρογχιόλια σε τομές ιστών πάχους 350μm, 500μm και 700μm που συλλέχθηκαν την 2^η, 7^η και 21^η μέρα καλλιέργειας.

Στην εικόνα Α φαίνεται σημειώνεται με το κόκκινο βέλος ο κυψελιδικό σάκος και γύρω του οι κυψελίδες. Στην εικόνα Γ σημειώνεται με το κόκκινο βέλος το τελικό βρογχιόλιο το οποίο καταλήγει στους κυψελιδικούς σάκους (μαύρα βέλη). Στην εικόνα Η με μαύρα βέλη σημειώνεται η συσσώρευση των μακροφάγων.

Από την παρατήρηση των τομών των ιστών στο μικροσκόπιο διαπιστώθηκε ότι την 2^η και 7^η μέρα καλλιέργειας όλοι οι ιστοί (ανεξαρτήτως πάχους τομών ιστοκαλλιέργειας) έχουν φυσιολογική δομή, χωρίς σημεία νέκρωσης (Εικόνα 53). Ωστόσο, την 21^η μέρα καλλιέργειας οι ιστοί έχουν συρρικνωθεί, έχει χαθεί το επιθήλιο των αεραγωγών και έχουν αθροιστεί τα μακροφάγα γεγονός που δηλώνει μόλυνση.



Εικόνα 54: Φωτογραφίες που ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM2000 Phase Contrast Microscope) σε μεγέθυνση 40X, κλίμακα 50μm, όπου απεικονίζεται το πνευμονικό παρέγχυμα με τις κυψελίδες, τους κυψελιδικούς σάκους και τα κύτταρα των ιστών πάχους 350μm, 500μm και 700μm που συλλέχθηκαν την 2^η, 7^η και 21^η μέρα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στην εικόνα A σημειώνεται με το μαύρο βέλος μια κυψελίδα. Στις εικόνες B και Γ σημειώνονται με μαύρα βέλη τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα (πορτοκαλί χρώμα) και με κόκκινα βέλη τα μακροφάγα (μπλε χρώμα). Στην εικόνα H φαίνεται η αποικοδόμηση των εξωτερικών κυττάρων του ιστού καθώς τα κύτταρα βρίσκονται σε απόπτωση/νέκρωση (μαύρα βέλη). Στην εικόνα E σημειώνεται με βέλος μία κυψελίδα που έχει μεγαλώσει και «σχιστεί».

Όταν οι ιστοί μελετήθηκαν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (40X) (Εικόνα 54) παρατηρήθηκε ότι την 2^η και την 7^η μέρα καλλιέργειας παραμένουν φυσιολογικοί όλοι οι ιστοί ανεξαρτήτου πάχους. Αντίθετα, την 21^η μέρα καλλιέργειας οι ιστοί εμφανίζουν ανώμαλη δομή καθώς οι κυψελίδες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και έχουν «σχιστεί» (σε σχέση με την μορφή που είχαν την 2^η και 7^η μέρα), ο επιθηλιακός ιστός έχει υποχωρήσει και έχουν συσσωρευτεί πολλά μακροφάγα και φαγοκύτταρα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι πολλά κύτταρα βρίσκονται σε στάδιο απόπτωσης/νέκρωσης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η αξιολόγηση του *ex vivo* μοντέλου τομών από πνεύμονα αρουραίου Wistar. Ειδικότερα, οι πνεύμονες αφαιρέθηκαν χειρουργικά και κόπηκαν σε ειδική μικροτόμο σε τομές πάχους 350 μm , 500 μm και 700 μm και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 21 μέρες. Οι τομές του ιστού ελέγχθηκαν για την ακεραιότητα της δομής τους και την βιωσιμότητα τους την 0, 2^η, 7^η, 14^η και 21^η μέρα της ιστοκαλλιέργειας. Όσον αφορά την βιωσιμότητα των ιστών εξετάστηκαν η απόπτωση και η αυτοφαγία.

Η απόπτωση είναι η μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου η οποία συμβαίνει φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και του γήρατος ως ομοιοστατικός μηχανισμός για την διατήρηση φυσιολογικών κυτταρικών πληθυσμών στους ιστούς. Αποτελεί μια ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ομάδας πρωτεασών που ονομάζονται “Caspases” οι οποίες συμμετέχουν σε πολύπλοκο καταρράκτη αντιδράσεων. Σε χαμηλή ένταση, ερεθίσματα όπως η θερμότητα, ακτινοβολία, υποξία και διάφορα κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα λειτουργούν ως ερεθίσματα επαγωγής της απόπτωσης με τελικό στάδιο τον κυτταρικό θάνατο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η ανίχνευση ενεργούς Caspase-3, η οποία θεωρείται βασικό ένζυμο που συμμετέχει στην απόπτωση καθώς η επαγωγή της σχετίζεται με την ενεργοποίηση των Caspase πρωτεϊνών. Οι πιο συνηθισμένες αναλύσεις για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της Caspase-3 περιλαμβάνουν την ανοσολογική χρώση, την τεχνική Western Blot και τις χρωματομετρικές αναλύσεις με χρήση φθορίζουσών υποστρωμάτων. (Mazumder S. et al, 2008) Η έκφραση της Caspase-3 έγινε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Dot Blot) η οποία εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με την τεχνική Western Blot με την διαφορά ότι στην τεχνική της ανοσοαποτύπωσης δεν απαιτείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα ποσά έκφρασης της Caspase-3 την ημέρα λήψης των ιστών (0 μέρα καλλιέργειας), δηλαδή πριν οι τομές καλλιεργηθούν είναι υψηλότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες μέρες καλλιέργειας, καθώς όσο περνάνε οι μέρες τα ποσά έκφρασης μειώνονται.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην έκφραση των πρωτεϊνών Beclin 1 και LC3, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αυτοφαγία καθώς αποτελούν μέρη του μηχανισμού δημιουργίας του αυτοφαγοςώματος.

Η αυτοφαγία είναι μορφή κυτταρικού θανάτου στην οποία το κύτταρο που παθαίνει βλάβη αυτοκαταστρέφεται και τα κυτταροπλασματικά συστατικά του ανακυκλώνονται. Επίσης, αποτελεί αντιστρεπτή διαδικασία καθώς όταν παύουν τα ερεθίσματα που την ενεργοποιούν (πείνα, υποξία, κατεστραμμένα οργανίδια κ.α.) αυτή διακόπτεται. (Glick D. et al, 2010) Οι διαδικασίες της απόπτωσης και της αυτοφαγίας ενεργοποιούνται από παρόμοια ερεθίσματα. Αρχικά τα κύτταρα ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα αυτά με αυτοφαγία αλλά όταν το ερέθισμα συνεχίζεται η αυτοφαγία οδηγεί σε απόπτωση. (Fan YJ. et al, 2013)

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κηλίδας έδειξαν ότι την πριν την καλλιέργεια του ιστού (0 μέρα καλλιέργειας) τα ποσά έκφρασης των πρωτεϊνών Beclin 1 και LC3 ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα αυτά των υπόλοιπων ημερών καλλιέργειας.

Κατά την καλλιέργεια των τομών παρατηρήθηκε η ύπαρξη πολυάριθμων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο από την 2^η μέρα καλλιέργειας του ιστού. Για τον λόγο αυτό λήφθηκε δείγμα του θρεπτικού μέσου, που περιείχε κύτταρα, την 14^η μέρα καλλιέργειας με σκοπό τον χαρακτηρισμό των κυττάρων αυτών. Η χρώση των κυττάρων έδειξε ότι τα περισσότερα κύτταρα ήταν ιστιοκύτταρα (μακροφάγα) και βρίσκονταν σε στάδιο κυτταρικού θανάτου (απόπτωση και νέκρωση).

Τα παραπάνω ευρήματα, δηλαδή το υψηλό επίπεδο έκφρασης της Caspase-3, LC3 και Beclin 1 (την 0 μέρα καλλιέργειας), καθώς επίσης και η ύπαρξη πολυάριθμων μακροφάγων κυττάρων (από την 2^η μέρα καλλιέργειας) στο θρεπτικό μέσο, υποδεικνύουν ότι την ημέρα λήψης του ιστού πολλά από τα μακροφάγα των πνευμόνων βρίσκονταν σε στάδιο απόπτωσης ή/και αυτοφαγίας, πιθανόν λόγω των χειρισμών απομόνωσης του ιστού, και απομακρύνθηκαν από τον ιστό στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Tyas L. et al, 2000, Rehm M. et al. 2002), η Caspase-3 ενεργοποιείται και εκφράζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα (5-30 λεπτά) από την δημιουργία κατάλληλου ερεθίσματος και την έναρξη της απόπτωσης. Στο παρόν πείραμα η διάρκεια απομόνωσης και προετοιμασίας των ιστών για καλλιέργεια ήταν περίπου 1 ώρα κατά την οποία οι ιστοί δεν είχαν πρόσβαση σε θρεπτικό υλικό και διατηρήθηκαν σε διάλυμα PBS. Επομένως, πολλά κύτταρα πέθαναν, αποκολλήθηκαν από την εξωτερική μεμβράνη των ιστών και υπέστησαν απόπτωση ή/και αυτοφαγία, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Η μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Caspase-3, Beclin 1 και LC3 από

την 0 μέρα έως την 21^η μέρα καλλιέργειας θα μπορούσε να αποδοθεί στην επιβίωση του ιστού στο θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε. Εντούτοις η παρατήρηση των τομών μετά από χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης ανέδειξαν ότι κατά την 21^η ημέρα της καλλιέργειας οι ιστοί χάνουν τη δομή τους και ο αριθμός των κυττάρων ελαττώνεται σημαντικά. Η μείωση λοιπόν της έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών μάλλον θα πρέπει να αποδοθεί στην ελάττωση του συνολικού αριθμού των κυττάρων στα τεμάχια της ιστοκαλλιέργειας.

Όσον αφορά την ποιότητα των τομών της ιστοκαλλιέργειας, εξετάστηκε η μορφολογία και αρχιτεκτονική των ιστών καθώς και ο τρόπος που μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους. Γενικότερα παρατηρήθηκε παρόμοια και φυσιολογική μορφολογία όλων των δειγμάτων των ιστών (350μm, 500μm, 700μm) την 2^η και 7^η μέρα καλλιέργειας. Αντίθετα, την τελευταία μέρα καλλιέργειας οι ιστοί είχαν παραμορφωθεί, «σχιστεί» και γενικότερα καταστραφεί. Η έκθεση των ιστών σε τοξικές συνθήκες (που προκύπτουν από την μεγάλη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας) οδηγεί σε αλλαγές του επιθηλίου των αεραγωγών, όπως είναι η στρογγυλοποίηση των κυβοειδών επιθηλιακών κυττάρων και απώλεια των κροσσωτών κυττάρων. Ακόμη, ο εκφυλισμός πολλών επιθηλιακών κυττάρων και η αποδιοργάνωση του επιθηλίου των αεραγωγών οδηγεί τελικά σε βλάβη (νέκρωση) του πνευμονικού παρεγχύματος. (Herbert R. et al, 2018)

Αλλαγές του επιθηλίου παρατηρήθηκαν επίσης στις τομές των ιστών την 21^η ημέρα καλλιέργειας σε αντίθεση με την μορφολογία των ιστών μέχρι και την 7^η μέρα όπου εμφάνιζαν φυσιολογική δομή του πνευμονικού παρεγχύματος. Η απώλεια του επιθηλίου, η συρρίκνωση και η γενικότερη καταστροφή του ιστού που παρατηρείται στις τομές των ιστών την 21^η μέρας καλλιέργειας οφείλεται στο ότι τα περισσότερα κύτταρα των ιστών έχουν πεθάνει με τις διαδικασίες της απόπτωσης ή/και αυτοφαγίας. Επίσης η συσσώρευση μακροφάγων στους ιστούς την τελευταία (21^η) μέρα καλλιέργειας υποδηλώνει νέκρωση των ιστών που συνδέεται με την εμφάνιση φλεγμονής.

Στους πνεύμονες υπάρχουν δύο ειδών μακροφάγα, τα κυψελιδικά μακροφάγα, που βρίσκονται σε στενή επαφή με τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου 1 και 2 και τα μακροφάγα που βρίσκονται στο παρέγχυμα μεταξύ του αγγειακού και κυψελιδικού επιθηλίου. Μετά από φλεγμονώδεις προσβολές στρατολογούνται άμεσα μονοκύτταρα από τον μυελό των οστών και μετατρέπονται σε κυψελιδικά μακροφάγα, επίσης, υπάρχουν και μακροφάγα που προέρχονται από εμβρυικά μονοκύτταρα και

παραμένουν σε όλη την διάρκεια της ζωής τους στους πνεύμονες. (Hu G., 2019) Η πνευμονική συσσώρευση των μακροφάγων σχετίζεται με τοξικότητα (σε κάποιο φάρμακο), μεταβολικές διαταραχές, νόσους όπως πνευμονία, βρογχιολίτιδα και με βρογχική απόφραξη. Ο μεγάλος αριθμός μακροφάγων που παρατηρήθηκε στους ιστούς, κυρίως την 21^η ημέρα της καλλιέργειας πιθανόν να υποδηλώνει την ύπαρξη φλεγμονής που οδηγεί στην νέκρωση και την απόπτωση.

Τέλος, όσον αφορά τους ιστούς διαφορετικού πάχους που καλλιεργήθηκαν (350μm, 500μm, 700μm) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη δομή και μορφολογία τους. Ωστόσο, παρατηρήθηκε διαφορά στον χειρισμό των ιστών στην καλλιέργεια, καθώς οι ιστοί με μεγαλύτερο πάχος ήταν πιο εύκολα διαχειρίσιμοι και πιο ευδιάκριτοι σε σχέση με τους ιστούς πάχους 350 μm.

Μέχρι σήμερα έχουν εφαρμοστεί διάφορα πρωτόκολλα ιστοκαλλιέργειας τομών από πνεύμονα αρουραίου. Συγκεκριμένα, στην έρευνα του Robert et al. πραγματοποιήθηκε η έγχυση άγαρ σε πνεύμονες αρουραίου, η δημιουργία τομών με το χέρι πάχους 200-300 μm και η χρήση των διαμερισμάτων Rose Chamber και της Visking dialysis μεμβράνης για την ιστοκαλλιέργεια, τα οποία επιτρέπουν την καλύτερη πρόσβαση των ιστών σε θρεπτικό υλικό και οξυγόνο. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με φωτογραφία time-lapse, παρατήρηση με μικροσκόπιο και χρώση των ιστών με ερυθροσύνη B. Από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο βρέθηκε ότι αυξήθηκε η διάρκεια ιστοκαλλιέργειας από μια εβδομάδα σε ένα μήνα, διότι οι ιστοί παρατηρήθηκαν ότι ήταν βιώσιμοι και είχαν φυσιολογική εμφάνιση. Στη παρούσα πτυχιακή, αντί των διαμερισμάτων Rose Chamber και της Visking dialysis μεμβράνης χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά καλαθάκια για ιστοκαλλιέργεια Corning Netwell inserts σε 12 wells – plate, τα οποία είχαν έως 2 ml θρεπτικό υλικό ώστε να διαποτίζεται καλά ο ιστός μέσα σε αυτό και να έχει πρόσβαση σε οξυγόνο. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα του πειράματος προέκυψε ότι η διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας που οι ιστοί διατηρούν την μορφολογία τους και την βιωσιμότητα τους είναι 7 ημέρες και όχι ένας μήνας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, καθώς τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια ήταν πιο φθηνά σε σχέση με αυτά της έρευνας του Robert et al.

Αντίθετα στην μελέτη των Wu et al, πραγματοποιήθηκε η έγχυση 1.5 ml αгарόζης στους πνεύμονες ποντικίου, η κοπή τους σε τομές πάχος 250 μm και η καλλιέργεια τους σε θρεπτικό υλικό DMEM, όπου σε κάθε πηγαδάκι (well) της ιστοκαλλιέργειας βρίσκονταν 3 με 4 τομές μαζί. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων

βρέθηκε ότι η καλλιέργεια των ιστών διήρκεσε 3 ημέρες, σε αντίθεση με την ιστοκαλλιέργεια του παρόντος πειράματος που κράτησε 7 ημέρες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι σε κάθε καλαθάκι ιστοκαλλιέργειας βρίσκονταν μόνο μια τομή και όχι πολλές μαζί, αυξάνοντας έτσι την πρόσβαση σε θρεπτικό υλικό και την αύξηση της διάρκειας καλλιέργειας. Ακόμη, η έγχυση περισσότερης ποσότητας αгарόζης στη παρούσα εργασία οδήγησε στην λήψη καταλληλότερων τομών για ιστοκαλλιέργεια. Ακόμη, όσον αφορά την έρευνα του Rory D. de Vries, στην οποία ακολουθήθηκε σχεδόν ίδιο πρωτόκολλο με αυτό της παρούσας διπλωματικής, τα αποτελέσματα συνάδουν μεταξύ τους καθώς απέδειξαν ότι η διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας των τομών των πνευμόνων ήταν 7 ημέρες.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε φαίνεται να είναι επιτυχής για την απομόνωση και καλλιέργεια ιστών από πνεύμονα αρουραίου Wistar. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν βρέθηκε ότι η καταλληλότερη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας είναι οι 7 ημέρες ώστε οι ιστοί να διατηρούν τη δομή και την βιωσιμότητα τους, η οποία δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το πάχος των τομών (350μm, 500μm ή 700μm). Ακόμη, αξιολογήθηκε ότι οι ιστοί μεγαλύτερου πάχους εμφανίζουν περισσότερη ευκολία διαχείρισης, μεταφοράς και μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Celis J.E., 2006, Cell biology. A laboratory handbook, Elsevier Academic Press, 3th edition, vol 1, p 584.
- Chapman JA, Lee LMJ, Swailes NT. From Scope to Screen: The Evolution of Histology Education. *Adv Exp Med Biol.* 2020, 1260:75-107. doi: 10.1007/978-3-030-47483-6_5.
- D'Arcy MS., 2019, Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.*, pages:582-592. doi: 10.1002/cbin.11137.
- DeVorkin L., Choutka C, Gorski S.M., 2014, Chapter 24 - The Interplay between Autophagy and Apoptosis, *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, Academic Press, vol:3, pages: 369-383, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405529-2.00024-X>.
- Diagnostic and Translational Research Guide, Introduction, p ix-xxix, Academic Press, Doi: 10.1016/B978-0-12-410424-2.00018-4.
- F. J. Miller, R. R. Mercer & J. D. Crapo (1993) Lower Respiratory Tract Structure of Laboratory Animals and Humans: Dosimetry Implications, *Aerosol Science and Technology*, 18:3, 257-271, doi: 10.1080/02786829308959603.
- Fan YJ, Zong WX. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer.* 2013 Mar;32(3):121-9. doi: 10.5732/cjc.012.10106. Epub 2012 Oct 10.
- Fang I. J and Trewyn B.G, 2012, Chapter three - Application of Mesoporous Silica Nanoparticles in Intracellular Delivery of Molecules and Proteins, *Methods in Enzymology*, Elsevier, Vol 508, p 41-59, Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391860-4.00003-3>.
- Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* 2005 Feb;5(2):566-71. doi: 10.1002/pmic.200400941.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.
- Guerrero RR, Rounds DE, Booher J. An improved organ culture method for adult mammalian lung. *In Vitro.* 1977 Aug;13(8):517-24. doi: 10.1007/BF02615145.
- Herbert R. et al, 2018, *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)*, Chapter 23 - Lung, Pleura, and Mediastinum, Academic Press, Pages: 437-466.

- Hofmann W, Koblinger L, Martonen TB., 1989, Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. *Health Phys.* doi: 10.1097/00004032-198907001-00005.
- http://histology.med.yale.edu/respiratory_system/respiratory_system_reading.php
- Hu G, Christman JW. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Front Immunol.* 2019 Sep 24;10, 2275. doi: 10.3389/fimmu.2019.02275.
- Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneaux PL. Respiratory microbiome, and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology.* 2020 Jun;160(2):171-182. doi: 10.1111/imm.13195. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32196653.
- Kling MA. A review of respiratory system anatomy, physiology, and disease in the mouse, rat, hamster, and gerbil. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2011 May;14(2):287-337, vi. doi: 10.1016/j.cvex.2011.03.007.
- Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994, 32:9-15. doi: 10.1385/0-89603-268-X:9.
- Levitzky M.G., 2013, Chapter 1. function and structure of the respiratory system, *Pulmonary Physiology*, 8e, McGraw Hill, doi: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=575§ionid=42512979>.
- Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2008, 414, 13-21. doi: 10.1007/978-1-59745-339-4_2.
- McInnes E., 2013, *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*, Chapter 11: “The respiratory system”, Editor: Scudamore C.L. p 179-194, doi: <https://doi.org/10.1002/9781118789568.ch11>.
- McMillan D.B., Harris R.J., 2018, *An Atlas of Comparative Vertebrate Histology*.
- Miller D.K., 1997, The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis, *Seminars in immunology*, Vol. 9 pages: 35-49.
- Mobini S, Song YH, McCrary MW, Schmidt CE., 2019, Advances in ex vivo models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering. *Biomaterials.*, pages:146-166 doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.05.012.
- Nelson K, Bobba C, Eren E, Spata T, Tadres M, Hayes D Jr, Black SM, Ghadiali S, Whitson BA. Method of isolated ex vivo lung perfusion in a rat model: lessons

- learned from developing a rat EVLP program. *J Vis Exp*. 2015 Feb 25;(96):52309. doi: 10.3791/52309.
- Nguyen DT, de Vries RD, Ludlow M, van den Hoogen BG, Lemon K, van Amerongen G, Osterhaus AD, de Swart RL, Duprex WP. Paramyxovirus infections in ex vivo lung slice cultures of different host species. *J Virol Methods*. 2013 Oct;193(1):159-65. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.06.016. Epub 2013 Jun 15.
- Ortega Ibarra JM, Cifuentes-Castro VH, Medina-Ceja L, Morales-Villagrán A. Nano dot blot: An alternative technique for protein identification and quantification in a high throughput format. *J Neurosci Methods*. 2021 Jul 1, 358, 109194. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109194. Epub 2021 Apr 24.
- Pearce S.C., Coia H.G., Karl J.P., Pantoja-Feliciano I.G., Zachos N.C. and Racicot K., 2018, Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors, *Front. Physiol*, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01584>.
- Placke ME, Fisher GL. Adult peripheral lung organ culture--a model for respiratory tract toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987 Sep 15;90(2):284-98. doi: 10.1016/0041-008x(87)90336-x.
- Porter AG, Jänicke RU., 1999, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, pages:99-104. doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.
- Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D, Prehn JH. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24506-14. doi: 10.1074/jbc.M110789200. Epub 2002 Apr 18.
- Rossi G, Cavazza A, Spagnolo P, Bellaïfiore S, Kuhn E, Carassai P, Caramanico L, Montanari G, Cappiello G, Andreani A, Bono F, Nannini N. The role of macrophages in interstitial lung diseases: Number 3 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *Eur Respir Rev*. 2017 Jul 19;26(145):170009. doi: 10.1183/16000617.0009-2017.
- Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol*. 2019, 1897, 253-268. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_22.
- Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. *Annu Rev Physiol*. 2019 Feb 10, 81, 375-402. doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114320. Epub 2018 Nov 28.

- Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624-30. PMID: 23930179.
- Sy J, Ang LC. Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. *Methods Mol Biol*. 2019, 1897, 269-278. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_23.
- Takach E., 2013, Tissue homogenization, *Tissue Analysis for Drug Development, Future Medicine*, Chapter 2, p 23-33, Doi: 10.4155/ebo.13.457.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E., 2008, LC3 and Autophagy, *Methods Mol Biol.*, pages:77-88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Tupper DE, Wallace RB. Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1980;40(6):999-1003.
- Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ, Tavaré JM. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep*. 2000 Sep;1(3):266-70. doi: 10.1093/embo-reports/kvd050. PMID: 11256610.
- Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 Jun 18, 7,147. doi: 10.3389/fbioe.2019.00147.
- Wu X, van Dijk EM, Bos IST, Kistemaker LEM, Gosens R. Mouse Lung Tissue Slice Culture. *Methods Mol Biol*. 2019, 1940:297-311. doi: 10.1007/978-1-4939-9086-3_21.
- Yidan Shang, Jingliang Dong, Kiao Inthavong & Jiyuan Tu (2015): Comparative numerical modeling of inhaled micron-sized particle deposition in human and rat nasal cavities, *Inhalation Toxicology*, doi: 10.3109/08958378.2015.1088600.
- Zhou X, Moore BB. Lung Section Staining and Microscopy. *Bio Protoc*. 2017 May 20;7(10), e2286. doi: 10.21769/BioProtoc.2286. PMID: 29170747.
- Μυλωνάς Μ, 2002, Ιστολογία, Εργαστήριο Ζωολογίας 1, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Εργαστηριακό Οδηγός, σελ. 2- 44.