



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**



**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επίδραση της πρωτεΐνης των αποφρακτικών συνδέσμων κλωντίνης-3 (CLDN3) στην κυψελιδοτριχοειδική διαπερατότητα μέσω του βιοχημικού διαύλου MEKK/ERK/IKK/NFκB σε πειραματικό μοντέλο πνευμονικής βλάβης.**

**GRADUATE THESIS**

**Tight junction protein claudin-3 (CLDN3) effects alveolar capillary permeability through MEK/ERK/IKK/NFκB pathway in murine lung injury model.**

**ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ NAME OF STUDENT**

**Κούσκουλας Μάριος/ Kouskoulas Marios**

**AM: 62115022**

**ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΙΣΗΓΗΤΩΝ/NAMES OF SUPERVISORS:**

**Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου / Βασιλική Καραβάνα /Fragiski Anthouli-Anagnostopoulou/Vasiliki Karavana**

**ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ/2021**



**FACULTY OF HEALTH AND CARING SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**

**SECTOR OF MEDICAL LABORATORIES**



**GRADUATE THESIS**

**Tight junction protein claudin-3 (CLDN3) effects alveolar capillary permeability through MEK/ERK/IKK/NFκB pathway in murine lung injury model.**

**NAME OF STUDENT**

**Kouskoulas Marios**

**Registration Number : 62115022**

**FIRST SUPERVISORS**

**Fragiski Anthouli-Anagnostopoulou/Vasiliki Karavana**

**SECOND SUPERVOSOR**

**Maria Venetikou**

**THIRD SUPERVISOR**

**Nikolaos Thalassinos**

**AIGALEO 2021**



## Τίτλος εργασίας

Επίδραση της πρωτεΐνης των αποφρακτικών συνδέσμων κλωντίνης-3 (CLDN3) στην κυψελιδοτριχοειδική διαπερατότητα μέσω του βιοχημικού διαύλου MEKK/ERK/IKK/NFκB σε πειραματικό μοντέλο πνευμονικής βλάβης.

## Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και των Εισηγητών

Η προπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ ΑΝΘΟΥΛΗ-ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ-ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ Α ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ	
2	ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΡΑΒΑΝΑ	ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ/ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ	
3	ΜΑΡΙΑ ΒΕΝΕΤΙΚΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ Β ΙΑΤΡΟΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΣ	
4	ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ Γ ΙΑΤΡΟΣ ΘΩΡΑΚΟΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ	

## Δήλωση συγγραφέα διπλωματικής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος, Μάριος Κούσκουλας του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 62115022, φοιτητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών με κατεύθυνση Ιατρικά Εργαστήρια, της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι 6 μήνες και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο δηλών

**Μάριος Κούσκουλας**



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Θώραξ, στα Ερευνητικά εργαστήρια Μ. Σίμου και Γ. Π. Λιβανός, 1<sup>η</sup> Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Γ.Ν. «Ο Ευαγγελισμός», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. Σε αυτό το σημείο θέλω να ευχαριστήσω τα άτομα χάρις στα οποία ήταν δυνατή η υλοποίηση του εγχειρήματος. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βασιλική Καραβάνα, που ήταν υπεύθυνη όλης της πειραματικής διαδικασίας, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί το εγχείρημα αυτό. Με σαφή καθοδήγηση, τόσο στο πρακτικό όσο και στο θεωρητικό μέρος, επιμονή και προσοχή σε κάθε λεπτομέρεια, με εκπαίδευσε κατάλληλα και με βοήθησε στην περάτωση της εν λόγω εργασίας. Μου έδειξε τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να προσεγγίζω κάθε εγχείρημα, είτε ακαδημαϊκό είτε προσωπικό και η συνεργασία μας με αφήνει καλύτερο από πριν. Σε συνδυασμό θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Δρ. Φραγκίσκη Ανθούλη για την ανάθεση αυτού του θέματος πτυχιακής και για την βοήθειάς της σε οποιαδήποτε στιγμή την χρειάστηκα.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Σπύρο Ζακυνθινό, οποίος με καλωσόρισε ένθερμα στο εργαστήριο του και με έκανε να νιώθω σαν μέλος του εργαστηρίου. Οι εμπειρίες που αποκόμισα είναι αναντικατάστατες και τους ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένεια μου, που με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πνευμονική βλάβη χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία φλεγμονωδών μεσολαβητών και κυτοκινών, διαπερατότητα της κυψελιδοτριχοειδικής μεμβράνης και πνευμονικό οίδημα. Η κατάρρευση των αεροθυλάκων εμποδίζει την ανταλλαγή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα με επακόλουθο την αναπνευστική ανεπάρκεια. Η πρωτεΐνη κλωντίνη 3 (CLDN3), μέλος των κλωντινών, σχηματίζει αποφρακτικούς συνδέσμους μεταξύ των κυττάρων, ελέγχοντας επιλεκτικά την παρακυττάρια διαπερατότητα ιόντων, αερίων και μικρομοριακών ενώσεων. Η έκφραση της CLDN3 στην πνευμονική βλάβη καθώς και ο μηχανισμός ενεργοποίησης της από φλεγμονώδεις παράγοντες όπως είναι η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) παραμένει αδιευκρίνιστος.

Η ενεργοποίηση της IL-1β σηματοδοτεί ένα καταρράκτη ενδοκυττάρων βιοχημικών διεργασιών που επιφέρουν δραστηριοποίηση μοριακών μονοπατιών όπως είναι ο MAPK/ERK και IKK/NFκB. Η απελευθέρωση της προάγει την πυρόπτωση, απόπτωση και την φλεγμονή. Η συμμετοχή της στην βρογχοκυψελιδική διαπερατότητα μέσω διάσπασης της CLDN3, παραμένει άγνωστη. Για τον λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συμμετοχής της IL-1β, μέσω διάσπασης της κλωντίνης 3, στην διαπερατότητα, σε καταστάσεις πειραματικής πνευμονικής βλάβης. Για τον λόγο αυτό η πνευμονική βλάβη προκλήθηκε με την χορήγηση LPS σε ενήλικες αρσενικούς μύες C57BL/6 (Wild Type ή WT) και IL-1β  $-/-$  strain C57BL/6. Ο βαθμός πνευμονικής βλάβης ελέγχθηκε με κλασικές παθολογοανατομικές τεχνικές. Η πρωτεϊνική έκφραση της CLDN3 καθώς και των μορίων που συμμετέχουν στο καθοδικό μονοπάτι της IL-1β, ERK1/2 και IKKα/β, αναλύθηκαν με στύπωμα κατά Western και ανοσοϊστοχημεία. Η κυψελιδοτριχοειδική διαπερατότητα διερευνήθηκε με τη μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο BAL των μυών με την μέθοδο Lowry. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS – Kruskal Wallis Test, ενώ διαφορές  $P \leq 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

**Λέξεις κλειδιά:** Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας ; Εκτεταμένη Πνευμονική Βλάβη ; Κυψελιδοτριχοειδική Διαπερατότητα ; Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι ; CLDN3 ; IL-1β



## ABSTRACT

Lung injury is characterized by an increased release of inflammatory mediators and cytokines production, alveolar-capillary membrane permeability and pulmonary edema. The airway epithelial collapse prevents the exchange of oxygen and carbon dioxide, leading to respiratory failure. The protein claudin 3 (CLDN3), is a member of claudin family, forming tight junctions between adjacent cells. CLDN3 expression selectively controls the paracellular permeability of ions, gases and micro molecular compounds. The CLDN3 expression in lung injury as well as its mechanism of activation by inflammatory agents such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) remains unknown.

IL-1 $\beta$  activation signals a cascade of intracellular biochemical processes that triggers molecular pathways such as MAPK / ERK and IKK / NF $\kappa$ B. Its release promotes pyroptosis, apoptosis and inflammation. However, IL1 $\beta$  involvement in lung permeability through CLDN3 degradation remains elusive. Therefore, the aim of the present study is to investigate the involvement of IL-1 $\beta$ , in CLDN3 disorganization causes permeability in experimental lung injury. Thus, lung injury was induced by LPS administration in adult male C57BL / 6 (Wild Type or WT) and IL-1 $\beta$  - / - strain C57BL / 6 mice. The degree of lung injury was investigated by standard pathological techniques. The protein expression of CLDN3 as well as the molecules involved in IL-1 $\beta$  downstream pathways, ERK1 / 2 and IKK $\alpha$  /  $\beta$ , were analyzed by Western blotting and immunohistochemistry. Alveolar capillary permeability was examined by measuring total proteins concentration in mice BAL by the Lowry method. The statistical analysis was performed using the SPSS program - Kruskal Wallis Test, while differences  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

**Keywords: Acute Respiratory Distress Syndrome ; Acute Lung Injury ; Alveolar-Capillary Permeability ; Tight Junctions ; CLDN3 ; IL-1 $\beta$**

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- 2-ME: 2-Mercaptoethanol, 2-μερκαπτοαιθανόλη
- Ab: Antibody, Αντίσωμα
- AECC: American and European Consensus Conference, Αμερικανική και Ευρωπαϊκή επιτροπή ομοφωνίας
- Ag: Antigen, Αντιγόνο
- ALI: Acute Lung Injury, Οξεία πνευμονική βλάβη
- AMPS: 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid, 2-ακρυλαμιδο-2-μεθυλοπροπανικό σουλφονικό οξύ
- ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome, Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας
- ATS: American Thoracic Society, Αμερικανική Πνευμονολογική Εταιρία
- BAL: Bronchoalveolar Lavage, Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
- BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid, Υγρό βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος
- BSA: Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη ορού βοός
- CLDN: Claudin, Κλωντίνη
- CPAP: Continuous Positive Airway Pressure, Συνεχής τελική πίεση των αεραγωγών
- Ctrl: Control, Ομάδα ελέγχου
- Cx43: Connexin 43, Κονεξίνη 43
- DAB: 3,3'-diaminobenzidine, διαμινοβενζιδίνη (χρωμογόνος ουσία)
- DAD: Diffused Alveolar Damage, Διάχυτη κυψελιδική βλάβη
- ddH<sub>2</sub>O: Double Distilled H<sub>2</sub>O, διπλά απεσταγμένο H<sub>2</sub>O
- DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
- ECL: Electrochemiluminescence, Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
- EDTA: ethylene-diamino-tetracetic acid, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
- EGTA: ethylene-glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N',N'-tetra-acetic acid, αιθυλενογλυκόλη-δισ (β-αμινοαιθυλαιθέρας) -N, N, N', N2-τετραοξικό οξύ
- ENAP-78: Epithelial Neutrophil-Activating Peptide 78, Επιθηλιακό πεπτίδιο ενεργοποίησης ουδετερόφιλων 78
- ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase, Εξωκυττάρια κινάση
- ESICM: European Society of intensive Care Medicine, Ευρωπαϊκή Εταιρία Εντατικής Ιατρικής
- FGF: Fibroblast Growth Factor, Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
- HGF: Hepatocyte Growth Factor, Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων

- HRP: Horseradish Peroxidase, Υπεροξειδάση
- Ig: Immunoglobulin, Ανοσοσφαιρίνη
- IL: Interleukin, Ιντερλευκίνη
- INF-γ: Interferon γ, Ιντερφερόνη γ
- JAM: Junctional Adhesion Molecules, Συνδετικά μόρια προσκόλλησης
- kDa: Kílodalton, κιλοντάλτον (μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους πρωτεϊνών)
- LIS: Lung injury Score, Σκορ της «πνευμονικής βλάβης»
- LPB: Lipopolysaccharide Binding Protein, Πρωτεΐνη πρόσδεσης λιποπολυσακχαρίτη
- LPS: Lipopolysaccharide, Λιποπολυσακχαρίτης
- MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, Ενεργοποιημένη με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση
- MAL protein: Myelin and Lymphocyte protein, Πρωτεΐνη μυελίνης και λεμφοκυττάρων
- MARVEL: MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link, MAL και σχετικές πρωτεΐνες για κίνηση κυστιδίων και σύνδεση μεμβρανών
- MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1, Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων 1
- MeOH: Methanol, Μεθανόλη
- MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein 1, Φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1
- MLC: Myosin Light-Chain, Ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης
- MUPP: Multi-PDZ domain Protein, πρωτεΐνη του μοτίβου PDZ
- NHLBI: National Heart, Lung and Blood Institute, Ινστιτούτο Καρδιάς, Πνευμόνων και Αίματος
- NPPV: Noninvasive Positive-Pressure Ventilation, Μη επεμβατικός αερισμός θετικής πίεσης
- OCLN: Occludin, Οκλουντίνη
- PALS: Protein Associated with Lin Seven, πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη Lin-7
- PATJ: PALS Associated Tight Junction Protein, Πρωτεΐνη των αποφρακτικών συνδέσμων που σχετίζεται με την PALS
- PBS: Phosphate Buffered Saline, Ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού και και φωσφορικών ιόντων
- PDGF: Platelet-Derived Growth Factor, Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
- PEEP: Positive End-Expiratory Pressure, Θετική τελοεκπνευστική πίεση
- PKA: Protein Kinase A, Πρωτεϊνική κινάση A
- PKC: Protein Kinase C Πρωτεϊνική κινάση C

- PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο
- PVDF: Polyvinylidene Fluoride, Φθοριούχο πολυβινυλιδένιο
- RIPA Buffer: Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού ανοσοκατακρίμνισης
- RNA: Ribonucleic Acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ
- rpm: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
- RTK: Receptor Tyrosine Kinase, διαμεμβρανικός υποδοχέας
- SDS: Sodium Dodecyl Sulphate, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
- TBS: Tris Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού με Tris
- TBS-T: Tris Buffer Saline – Tween 20
- TEMED: N,N,N',N'-tetramethylene-diamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλενο-διαμίνη
- TGF-β: Transforming Growth Factor β, Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
- TJ: Tight Junction, Αποφρακτικός σύνδεσμος
- TNF-α: Tumor Necrosis Factor α, Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
- Tris: tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, τρις-(υδροξυ-μεθυλο)-αμινο-μεθάνιο
- Tween 20: Polysorbate 20, πολυσορβικό 20
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων
- VILI: Ventilation Induced Lung Injury, Πνευμονική βλάβη προκαλούμενη από αναπνευστήρα
- ZO: Zonula Occludens, Ζονούλα οκλουντίνη
- AEO: Αραιά Εξωκυττάρια Ουσία
- ΑΣ: Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι
- ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας



## Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	2
1.1.1. Ανατομία του Αναπνευστικού Συστήματος.....	2
1.1.2. Θωρακική Κοιλότητα.....	4
1.2. Ιστολογία Πνεύμονα.....	6
1.2.1. Διακλάδωση Βρογχικού Δέντρου.....	7
1.2.2. Πνευμονικό Λόβιο – Πνευμονικό Λοβίδιο.....	8
1.3. Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας.....	12
1.3.1. Παθολογοανατομικά ευρήματα του ARDS.....	14
1.3.2. Παθοφυσιολογία του ALI/ARDS.....	18
1.3.3. Επιδημιολογία.....	21
1.3.4. Θεραπεία.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΛΩΝΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΟΙ ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ.....	
2.1. Διακυτταρικές Συνδέσεις.....	27
2.2. Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι (Tight Junctions).....	28
2.3. Οι Κλωντίνες.....	30
2.4. Αλληλεπιδράσεις και ρύθμιση της έκφρασης των Κλωντινών.....	32
2.5. Ρύθμιση της Έκφρασης Κλωντινών.....	34
2. 6. ALI/ARDS και Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	
3. ΣΚΟΠΟΣ.....	39
3.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	39
3.1.1. Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου πνευμονικής βλάβης.....	39
3.1.2. Ενδοτραχειακή Χορήγηση LPS.....	40
3.2. Συλλογή Βιολογικών δειγμάτων.....	41
3.2.1. Συλλογή BAL.....	41
3.2.2. Συλλογή Πνευμονικού Ιστού.....	41
3.3 Ιστολογική Επεξεργασία.....	42

3.3.1. Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.....	42
3.3.2. Χρώση Ανοσοϊστοχημείας.....	43
3.3.3. Κυτταρολογική Επεξεργασία του BALF .....	44
3.4. Πρωτεϊνική Ανάλυση.....	45
3.4.1. Εκχύλιση Πρωτεϊνών .....	45
3.4.2. Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στον ιστό .....	46
3.5. Στύπωμα κατά Western (Western Blot).....	46
3.5.1. Αρχή Μεθόδου .....	46
3.5.2. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	46
3.5.3. Προετοιμασία δειγμάτων .....	49
3.6. Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών .....	49
3.7. Ανίχνευση πρωτεϊνών .....	50
3.8. Διαδοχικές ανοσοανιχνεύσεις πρωτεϊνών.....	51
3.9. Στατιστική Ανάλυση .....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	
4.1. Εκτίμηση της Πνευμονικής βλάβης.....	54
4.2. Έκφραση της CLDN3.....	55
4.3. Ιστική Ανοσοεντόπιση της CLDN3 .....	56
4.4. Έκφραση της Οκλουντίνης .....	57
4.5. Έκφραση της ZO-1 .....	58
4.6. Διερεύνηση του μονοπατιού MAPK/ERK1/2 .....	59
4.7. Έκφραση του IKKα/β .....	59
4.8. Διαπερατότητα του ενδοεπιθηλιακού φραγμού.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	77
ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ .....	77

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος «Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας» (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) περιγράφει μια οξεία πάθηση, που χαρακτηρίζεται από βαριά αναπνευστική ανεπάρκεια υποξαιμικού τύπου, με διάχυτες αμφοτερόπλευρες πνευμονικές διηθήσεις και μεγάλη μείωση της πνευμονικής διατασιμότητας. Το σύνδρομο είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης πνευμονικής βλάβης (Acute Lung Injury, ALI), που προκαλείται από πολλές, διαφορετικές μεταξύ τους αιτίες, συνήθως σε άτομα χωρίς προηγούμενη αναπνευστική νόσο. Λόγω της παρουσίας οξείας πνευμονικής βλάβης αναγράφεται ως ALI/ARDS.

Το ALI/ARDS αποτελεί κοινή αιτία αναπνευστικής ανεπάρκειας σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση. Το σύνδρομο εμφανίζεται κυρίως μετά από πνευμονία, σήψη ή τραύμα στην θωρακική χώρα. Το ALI/ARDS οφείλεται στην διάσπαση του φυσιολογικού φραγμού και διαρροή υγρού από τα κυψελιδικά τριχοειδή στο διάμεσο χώρο και κυψελιδικό χώρο. Η θνητότητα του συνδρόμου είναι άμεσα συνυφασμένη με το αίτιο που το πυροδότησε.

Το ALI/ARDS είναι μία πολυπαραγοντική νόσος. Η έγκαιρη και σωστή διάγνωση επιτρέπει την εφαρμογή καλύτερης φαρμακευτικής αγωγής, με σωτήρια πολλές φορές αποτελέσματα. Τα τελευταία χρόνια η διάγνωση βασίζεται στα διαγνωστικά κριτήρια του ορισμού του Βερολίνου (Berlin definition). Η πρόοδος στην διάγνωση και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο, δεν επέφερε και ανάλογη θεραπευτική πρόοδο. Η συντηρητική αγωγή με χρήση μηχανικού αερισμού και φαρμακευτική καταπολέμηση του αρχικού αιτίου παραμένει πρώτης γραμμής επιλογή. Ως εκ τούτου κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω κατανόηση της φυσιοπαθολογίας του ALI/ARDS και η εφαρμογή νέων θεραπευτικών σχημάτων.

## 1.1. ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 1.1.1. Ανατομία του Αναπνευστικού Συστήματος

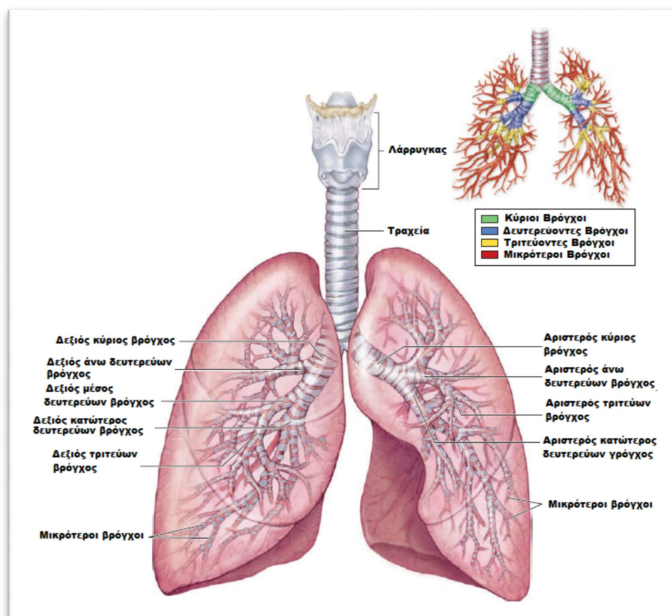
Ανατομικά, η αναπνευστική οδός αποτελείται από το άνω και το κάτω αναπνευστικό τμήμα. Με βάση τα ιστολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, αναφέρονται σαν μεταφορικό και ένα αναπνευστικό τμήμα. Η δομή και μορφολογία του μεταφορικού τμήματος προετοιμάζουν κατάλληλα τον αέρα και τον διοχετεύουν εντός των πνευμόνων. Το αναπνευστικό τμήμα είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή των αερίων (Mescher, 2015).

Ανατομικά, η άνω αναπνευστική οδός αποτελείται από:

- Τον σφηνοειδή κόλπο
- Τον μετωπιαίο κόλπο
- Την ρινική κοιλότητα
- Τον φάρυγγα

Ανατομικά, η κάτω αναπνευστική οδός αποτελείται από (Εικόνα 1):

- Τον λάρυγγα
- Τη τραχεία
- Τους πνεύμονες
- Τους βρόγχους



**Εικόνα 1.** Εικόνα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Διακρίνονται ο λάρυγγας, η τραχεία οι βρόγχοι και το βρογχικό δέντρο στους δύο πνεύμονες. Πηγή: (Mescher, 2015).

Ο λάρυγγας είναι ένας σύντομος σε μήκος αεραγωγός μεταξύ του φάρυγγα και της τραχείας. Οι κύριες λειτουργίες του λάρυγγα είναι δύο: Η παραγωγή ήχου και η σύγκλειση της τραχείας κατά την κατάποση ώστε να παρεμποδίζεται η είσοδος τροφής και σιέλου στους αεραγωγούς. Το τοίχωμα του λάρυγγα αποτελείται από τον θυρεοειδή, τον κρικοειδή υαλοειδή χόνδρο και τον ελαστικό χόνδρινο πυρήνα της επιγλωττίδας που εκτείνεται πάνω από τον λαρυγγικό αυλό. Οι εξωγενείς λαρυγγικοί μύες προσδένουν τον λάρυγγα στο υοειδές οστό, ώστε ο λάρυγγας να ανέρχεται κατά την κατάποση. Οι ενδογενείς λαρυγγικοί μύες ενώνουν τον θυρεοειδή και κρικοειδή χόνδρο. Όταν συσπώνται, η τάση των φωνητικών χορδών μεταβάλλεται ρυθμίζοντας τη δημιουργία της φωνής.

Ο λάρυγγας υποδιαιρείται σε τρεις περιοχές:

1. Την υπεργλωττιδική, που περιλαμβάνει την επιγλωττίδα, τις νόθες φωνητικές χορδές και τις λαρυγγικές κοιλίες.
2. Τη γλωττιδική, που αποτελείται από τις γνήσιες φωνητικές χορδές, τον πρόσθιο και τον οπίσθιο σύνδεσμο.
3. Την υπογλωττιδική, την περιοχή κάτω από τις γνήσιες φωνητικές χορδές, που εκτείνεται πέρα από το όριο του κρικοειδούς χόνδρου.

Ο βλεννογόνος του λάρυγγα είναι συνεχόμενος με αυτόν του φάρυγγα και της τραχείας. Η γλωσσική επιφάνεια επενδύεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Στην επιγλωττίδα και τις γνήσιες φωνητικές χορδές το επιθήλιο είναι ψευδοπολύστιβο κροσσωτό με καλυκοειδή κύτταρα (Mescher, 2015). Κάτω από το επιθήλιο, στο χόριο, εντοπίζονται αναμεμιγμένοι βλεννογόνοι και ορογόνοι αδένες.

Η τραχεία, αποτελεί τη συνέχεια του λάρυγγα και είναι το κύριο τμήμα της μεταφορικής οδού του αναπνευστικού συστήματος. Η τραχεία διακλαδίζεται σχηματίζοντας το δεξιό και αριστερό κύριο βρόγχο. Το τοίχωμα της τραχείας και των εξωπνευμονικών βρόγχων ενισχύεται από μια στήλη υαλοειδών χόνδρων σε σχήμα πετάλου. Ο κατώτερος χόνδρος της τραχείας είναι η τροπίδα. Στους διακλαδιζόμενους βρόγχους, οι χόνδρινοι δακτύλιοι αντικαθίστανται από μεμονωμένες πλάκες υαλοειδούς χόνδρου και περιβάλλονται λείες μυϊκές δεσμίδες με σπειροειδή διάταξη.

Η τραχεία επενδύεται από ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό κροσσωτό επιθήλιο (αναπνευστικό επιθήλιο), στο οποίο αναγνωρίζονται πολλοί τύποι κυττάρων:

1. Τα κυλινδρικά κροσσωτά κύτταρα αποτελούν τον κυρίαρχο κυτταρικό πληθυσμό.
2. Άφθονα καλυκοειδή μη κροσσωτά κύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή των πολυμερή βλεννινών MUC5AC και MUC5B.
3. Τα βασικά κύτταρα που εδράζονται στον βασικό υμένα.
4. Τα νευροενδοκρινικά κύτταρα του Kulchitsky που εδράζονται στον βασικό υμένα.

Το χόριο περιέχει ελαστικές ίνες. Ο υποβλεννογόσιος χιτώνας διαθέτει βλεννώδεις και ορώδεις αδένες, που μαζί με τα καλυκοειδή κύτταρα παράγουν συστατικά της βλέννης των αεραγωγών (Brand-Saberi BEM, 2014).

### 1.1.2. Θωρακική Κοιλότητα

Η θωρακική κοιλότητα έχει νεφροειδές σχήμα και ανατομικά χωρίζεται στην δεξιά και αριστερή υπεζωκοτική κοιλότητα. Ουσιαστικά είναι δύο διαμερίσματα που περιέχουν τους πνεύμονες, τους υπεζωκότες (επενδύουσες μεμβράνες) και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της θωρακικής κοιλότητας. Το κεντρικό μεσοθωράκιο είναι ένα διαμέρισμα που παρεμβάλλεται και χωρίζει πλήρως τις δύο υπεζωκοτικές κοιλότητες. Περιέχει την καρδιά, τις θωρακικές μοίρες των μεγάλων αγγείων, τη θωρακική μοίρα της τραχείας, τον οισοφάγο, τον θύμο και δομές όπως είναι οι λεμφαδένες (Moore, et al., 2012).

Οι πνεύμονες είναι τα ζωτικά όργανα της αναπνοής. Οι υγιείς πνεύμονες έχουν ανοιχτό χρώμα, είναι μαλακοί, ελαστικοί, επανασυσπειρώμενοι και σπογγώδεις. Καταλαμβάνουν πλήρως τις υπεζωκοτικές κοιλότητες και χωρίζονται μεταξύ τους από το μεσοθωράκιο. Κάθε πνεύμονας έχει:

- Μία κορυφή
- Μία βάση

- Δύο ( αριστερός) ή τρεις (δεξιός) λοβούς
- Τρεις επιφάνειες (πλευρική, μεσοθωρακική και διαφραγματική)
- Τρία χείλη (πρόσθιο, κάτω και οπίσθιο)

Η πύλη του πνεύμονα εντοπίζεται στην μεσοθωρακική επιφάνεια, και μέσα σε αυτή εισέρχονται οι κύριοι βρόγχοι και ξεκινάει το βρογχικό δέντρο (Murray, 2010). Στο αναπνευστικό σύστημα διακρίνουμε δύο κύριους βρόγχους, οι οποίοι εισέρχονται στον κάθε πνεύμονα από την πύλη του, μαζί με τις αρτηρίες, τις φλέβες και τα λεμφαγγεία. Αφού εισέλθουν στους πνεύμονες, οι κύριοι βρόγχοι εκφύονται προς τα κάτω και έξω, δίνοντας τρεις δευτερεύοντες (λοβαίους) βρόγχους στον δεξιό πνεύμονα και δύο στον αριστερό πνεύμονα. Κάθε ένας λοβαίος βρόγχος τροφοδοτεί ένα πνευμονικό λοβό και διαιρείται περαιτέρω σχηματίζοντας τους τριτεύοντες (τμηματικούς) βρόγχους. Οι τριτεύοντες βρόγχοι διακλαδίζονται σε όλο και μικρότερους βρόγχους, των οποίων οι τελικοί κλάδοι ονομάζονται βρογχιόλια. Κάθε βρογχιόλιο εισέρχεται σε ένα πνευμονικό λόβιο, όπου διακλαδίζεται για να σχηματίσει πέντε με επτά τελικά βρογχιόλια, καθένα από αυτά, οριοθετείται από ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού (Dallas M, 2009 ).

Ο βλεννογόνος των μεγαλύτερων βρόγχων αποτελείται από το αναπνευστικό επιθήλιο, τους μικρούς βλεννογόνους και ορογόνους αδένες οι πόροι των οποίων καταλήγουν στον αυλό των βρόγχων. Πολυάριθμα λεμφοκύτταρα εντοπίζονται τόσο στο χόριο όσο και μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου. Από τους βλεννοεκκριτικούς αδένες, τα καλυκοειδή κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου και από τα κύτταρα Clara των βρογχιολίων, παράγεται βλέννη, στην οποία παγιδεύονται παθογόνοι μικροοργανισμοί και σωματίδια του εισπνεόμενου αέρα. Η βλέννη αυτή απομακρύνεται μέσω των αεροφόρων οδών ως αποτέλεσμα της δράσης των κροσσών του αναπνευστικού επιθηλίου. Καθώς οι εκκρίσεις ανεβαίνουν διαμέσου των αεραγωγών, σχηματίζουν το βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF, Bronchoalveolar Fluid). Το βρογχοκυψελιδικό υγρό είναι βακτηριοστατικό, περιέχοντας λυσοζύμη και άλλους προστατευτικούς παράγοντες (Murray, 2010).

## 1.2. Ιστολογία Πνεύμονα

Η ιστολογία του πνεύμονα διέπεται από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση διαφόρων τύπων κυττάρων με κοινό σκοπό την ανταλλαγή των αερίων χρησιμοποιώντας την μικρότερη συνολική μάζα ιστού. Στον πίνακα 1 περιγράφονται συνολικά οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων που απαντώνται στο αναπνευστικό σύστημα.

**Πίνακας 1.** Συνοπτικός πίνακας με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των τμημάτων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος και τις σημαντικές λειτουργίες τους. Πηγή: (Mescher, 2015)

Χαρακτηριστικά των αεραγωγών μέσα στους πνεύμονες		
Περιοχή του αεραγωγού	Τύπος Επιθηλίου	Σημαντικές λειτουργίες
<b>Βρόγχοι</b>	Αναπνευστικό	Επαναλαμβανόμενη διακλάδωση, μεταφέρουν αέρα βαθύτερα στους πνεύμονες
<b>Βρογχιόλια</b>	Μονόστιβο κροσσωτό κυβοειδές προς κυλινδρικό, με κύτταρα Clara	Μεταφέρουν αέρα, είναι σημαντικά στο βρογχόσπασμο και τη βρογχοδιαστολή
<b>Τελικά Βρογχιόλια</b>	Μονόστιβο κυβοειδές, κροσσωτό με παρουσία κυττάρων Clara	Μεταφέρουν αέρα στα αναπνευστικά τμήματα των πνευμόνων, περιέχουν κύτταρα Clara με αρκετές προστατευτικές λειτουργίες
<b>Αναπνευστικά Βρογχιόλια</b>	Μονόστιβο κυβοειδές, κροσσωτό με παρουσία κυττάρων Clara	Μεταφέρουν αέρα βαθύτερα, με μερική ανταλλαγή αερίων και προστατευτικά κύτταρα Clara
<b>Κυψελιδικοί Πόροι και Σάκοι</b>	Μονόστιβο κυβοειδές μεταξύ πολλών κυψελίδων	Μεταφέρουν αέρα, με αρκετή ανταλλαγή αερίων.
<b>Κυψελίδες</b>	Τύπου I και τύπου II κυψελιδικά κύτταρα (πνευμονοκύτταρα)	Σημεία πλήρους ανταλλαγής αερίων, επιφανειοδραστικός παράγοντας από τύπου II πνευμονοκύτταρα.

### 1.2.1. Διακλάδωση Βρογχικού Δέντρου

Τα βρογχιόλια τυπικά ορίζονται ως οι ενδολοβιακοί αεραγωγοί διαμέτρου 1mm ή και λιγότερο. Στα μεγαλύτερα βρογχιόλια, το επιθήλιο είναι ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό κροσσωτό, στο οποίο εμπεριέχονται βασικά κύτταρα σε ποσοστό περίπου 30% των συνολικών κυττάρων. Τα καλυκοειδή κύτταρα (goblet), είναι υπεύθυνα για την έκκριση βλέννης, ενώ τα νευροενδοκρινικά κύτταρα ή Kulchitsky κύτταρα αποτελούν μέρος του διάχυτου ενδοκρινικού συστήματος.

Στα μικρότερα τελικά βρογχιόλια, που είναι τα τελικά τμήματα του συστήματος των αεραγωγών, το επιθήλιο μεταπίπτει σε μονόστιβο κροσσωτό κυλινδρικό και μονόστιβο κυβοειδές επιθήλιο ενώ επενδύονται και με κύτταρα Clara (Davis JD, 2021 ). Περιστασιακή είναι η παρουσία καλυκοειδών κυττάρων καθώς και μικρός αριθμός νευροενδοκρινικών κυττάρων που σχηματίζουν τα νευροεπιθηλιακά σωματίδια (Branchfield K, 2016 ). Ο υποβλεννογόσιος χιτώνας, επαλείφεται από ένα στρώμα συνδετικολιπώδους ιστού, όπου εντοπίζονται οι τραχειοβρογχικοί αδένες οι οποίοι φέρουν εκφορητικό πόρο. Ο υποβλεννογόσιος χιτώνας απαρτίζεται επίσης από ορώδη και βλενώδη κύτταρα, λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα, λιπώδη κλπ. Τον υποβλεννογόσιο χιτώνα διατρέχουν αρτηρίες, φλέβες, λεμφαγγεία. Οι λείες μυϊκές ίνες, είναι ένας μονόστιβος χιτώνας, με χολινεργική και αδρενεργική διέγερση και συγκυτιακούς χαρακτήρες.

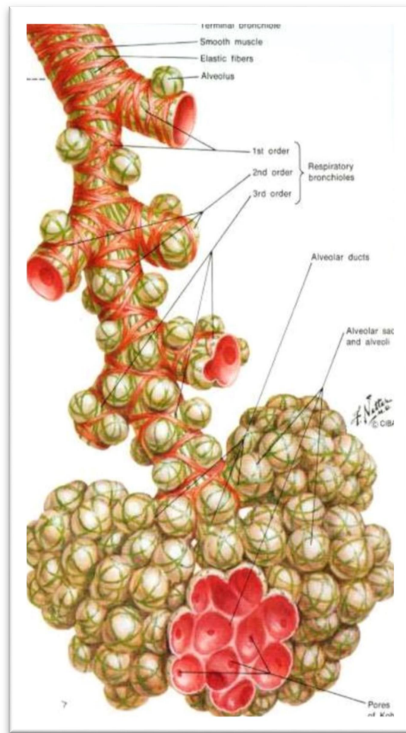
Τα κύτταρα clara ή εξωκρινή βρογχιολιδικά κύτταρα, αντιπροσωπεύουν το 80% των επιθηλιακών κυττάρων των τελικών βρογχιολίων (Davis JD, 2021 ). Μορφολογικά, είναι άκροσσα κορυφαία κύτταρα που περιέχουν εκκριτικά κοκκία στο κυτταρόπλασμά τους. Τα κύτταρα Clara αναπτύσσουν ποικίλες δράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ακόλουθων:

1. Έκκριση των λιποπρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.
2. Απομάκρυνση των τοξικών ουσιών των εισπνεόμενων ξενοβιοτικών συστατικών από τα ένζυμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου τους.
3. Έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων και κυτοκινών για την τοπική ανοσιακή απάντηση.

4. Αποτελούν δεξαμενή από την οποία διαφοροποιούνται νέα βρογχιολικά επιθήλια, μετά από πρόκληση πνευμονικής βλάβης .

### 1.2.2. Πνευμονικό Λόβιο – Πνευμονικό Λοβίδιο

Κάθε τελικό βρογχιόλιο αντιστοιχεί σε ένα πνευμονικό λόβιο. Ένα πνευμονικό λόβιο περιέχει αρκετά αναπνευστικά βρογχιόλια, τους κυψελιδικούς πόρους, τους κυψελιδικούς σάκους και τις κυψελίδες (Εικόνα 2). Κάθε αναπνευστικό βρογχιόλιο δίνει γένεση σε κυψελιδικούς πόρους και κυψελίδες, μία διάταξη γνωστή ως λοβίδιο ή τελική αναπνευστική μονάδα (Dallas MH, 2009).



**Εικόνα 2:** . Αναπαράσταση του πνευμονικού λοβίου. Το τελικό βρογχιόλιο διακλαδίζεται σε αναπνευστικό βρογχιόλιο με τελική κατάληξη την δημιουργία των κυψελίδων. Πηγή: (Netter, 1980)

Τα απομακρυσμένα άκρα των αναπνευστικών βρογχιολίων διακλαδίζονται σε σωλήνες που ονομάζονται κυψελιδικοί πόροι και μεμονωμένες κυψελίδες.

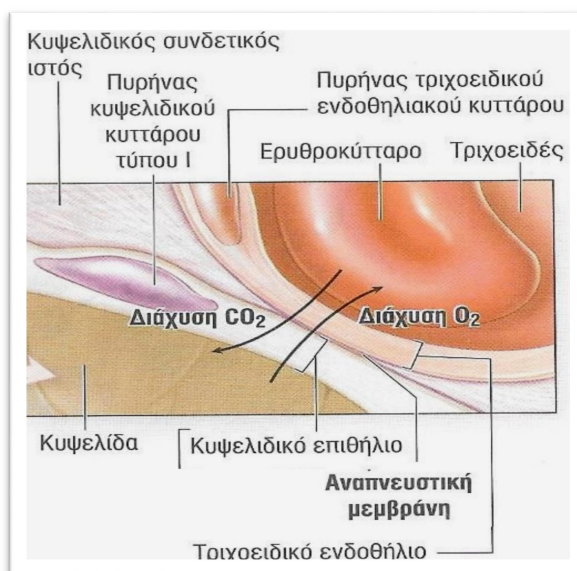
Μεγαλύτερα συμπλέγματα κυψελίδων που ονομάζονται κυψελιδικοί σάκοι σχηματίζουν τα τελικά άκρα των κυψελιδικών πόρων. Το υποκείμενο χόριο της περιοχής είναι πάρα πολύ λεπτό, αποτελούμενο κυρίως από ένα δίκτυο ελαστικών και δικτυωτών ινών που περικλείουν τα κυψελιδικά στόμια και περιβάλλουν στενά κάθε κυψελίδα (Netter, 1980).



Οι κυψελίδες είναι σακοειδείς εγκολπώσεις. Κάθε κυψελίδα περιβάλλεται από τριχοειδή αγγεία και επενδύεται από μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο. Το κυψελιδικό επιθήλιο αποτελείται από δύο κυτταρικούς τύπους (πνευμονοκύτταρα τύπου I και πνευμονοκύτταρα τύπου II). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μέρος του φραγμού αέρα-αίματος (Yang J, 2016; Mason RJ, 1977). Μεταξύ των γειτονικών κυψελίδων βρίσκονται λεπτά μεσοκυψελιδικά διαφράγματα που αποτελούνται από διάσπαρτους ινοβλάστες και αραιά εξωκυττάρια ουσία (AEO), καθώς και ελαστικές και δικτυωτές ίνες συνδετικού ιστού. Η διάταξη αυτή επιτρέπει την έκπτυξη και σύμπτυξη των κυψελίδων κατά την αναπνοή (Dallas MH, 2009).

Τα μεσοκυψελιδικά διαφράγματα αγγειώνονται από το πιο πλούσιο τριχοειδικό δίκτυο που υφίσταται στο σώμα. Τα πυκνά πνευμονικά τριχοειδή που βρίσκονται μεταξύ των μεσοκυψελιδικών διαφραγμάτων, υποστηρίζονται από ένα δίκτυο δικτυωτών και ελαστικών ινών. Ο αέρας στις κυψελίδες διαχωρίζεται από το αίμα των τριχοειδών μέσω τριών στοιχείων που αναφέρονται συλλογικά ως αναπνευστική μεμβράνη ή φραγμός αίματος – αέρα (Εικόνα 3). Η σύσταση του φραγμού αίματος – αέρα αποτελείται (Townsend, 2012):

- από πνευμονοκύτταρα τύπου I που επενδύουν το τοίχωμα της κυψελίδας
- από τα λεπτά ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων και
- από τις συγχωνευμένες βασικές μεμβράνες τους.

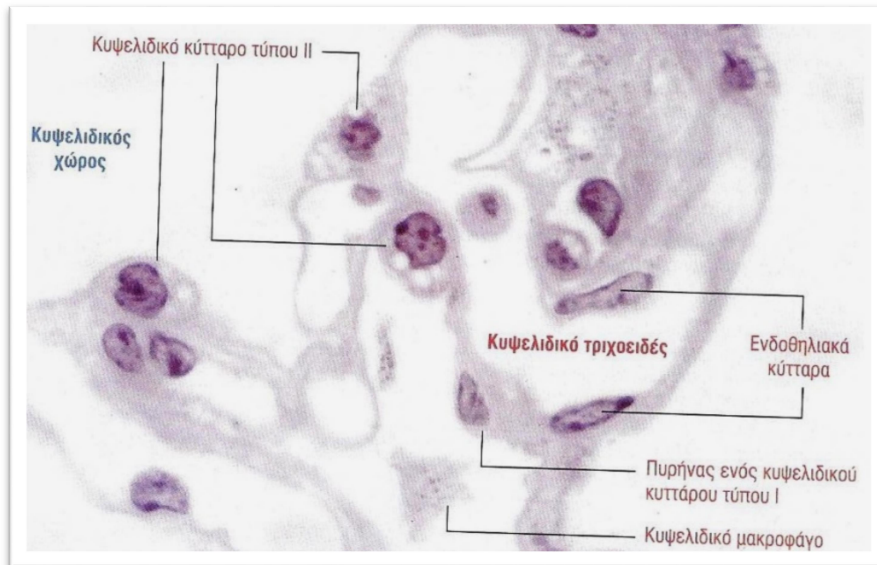


**Εικόνα 2:** Σχηματική παράσταση του φραγμού αίματος – αέρα. Το οξυγόνο διαχέεται από τον κυψελιδικό χώρο μέσω της αναπνευστικής μεμβράνης και το τοίχωμα του τριχοειδικού επιθηλίου, στο αίμα των τριχοειδών. Το διοξείδιο του άνθρακα κινείται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Πηγή: (Mescher, 2015).

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου I είναι αποπεπλατυσμένα κύτταρα που επενδύουν τις κυψελιδικές επιφάνειες. Τα τύπου I κύτταρα διατηρούν την κυψελιδική πλευρά του φραγμού αίματος – αέρα και καλύπτουν περίπου το 95% της κυψελιδικής επιφάνειας (Εικόνα 4). Τα οργανίδια των πνευμονοκυττάρων τύπου I βρίσκονται σε ομάδες γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου, μειώνοντας έτσι το πάχος του κυτταροπλάσματος στις θέσεις του φραγμού αίματος – αέρα. Όλα τα τύπου I επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με αποφρακτικές συνδέσεις που αποτρέπουν τη διαρροή ιστικού υγρού μέσα στον κυψελιδικό χώρο (Yang J, 2016). Όπως προαναφέρθηκε, πιστεύεται ότι τα πνευμονοκύτταρα τύπου I προέρχονται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ή μετά από ιστική βλάβη (Mason RJ, 1977). Στις λειτουργίες τους αναφέρεται η διΐδρωση νερού, η ενεργός μεταγωγή ιόντων, η κυτταροπροστασία, προπηκτικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες, η αυξητική δραστηριότητα, η συμβολή τους στην ιστική αναδιαμόρφωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Pattle, 1955). Τα πνευμονοκύτταρα τύπου I είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στις κακώσεις, και η απελευθέρωση πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και στον ορό μπορεί να αποτελεί δείκτη ιστικής βλάβης.

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι κυβοειδή κύτταρα που προβάλλουν μέσα στον κυψελιδικό χώρο. Βρίσκονται διεσπαρμένα μεταξύ των τύπου I κυψελιδικών κυττάρων και συνδέονται με αυτά με αποφρακτικές συνδέσεις και δεσμοσωμάτια (Mason RJ, 1977). Τα τύπου II κύτταρα συχνά υπάρχουν σε ομάδες των δύο ή τριών κυττάρων μαζί (Εικόνα 4).

Οι πυρήνες των κυττάρων τύπου II είναι σφαιρικοί και μπορεί να περιέχουν πυρηνίσκους. Στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων τύπου II εντοπίζονται άφθονα οργανύλια, και χαρακτηριστικά κυστίδια, τα πεταλιώδη σωμάτια. Τα πεταλιώδη σωμάτια περιέχουν ποικίλα λιπίδια, φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες που συντίθενται συνεχώς και απελευθερώνονται στην κορυφαία κυτταρική επιφάνεια (Bachofen H, 2001). Επικάθονται δε στην βασική μεμβράνη.



**Εικόνα 3.** Ιστολογική εικόνα της δομής της Κυψελίδας. Διακρίνονται τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και τύπου II, ενδοθηλιακά κύτταρα και ο κυψελιδικός χώρος. Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης. Πηγή: (Kierszenbaum & Tres, 2013).

Τα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα διαιρούνται έτσι ώστε να αποκαταστήσουν τον πληθυσμό τους και να παρέχουν προγονικά κύτταρα για την αντικατάσταση του τύπου I κυτταρικού πληθυσμού που έχει καταστραφεί μέσω μιτωτικών διαιρέσεων (Bowden, 1983; Guillot L, 2013). Η μεταβολική τους λειτουργία αναφέρεται στη σύνθεση της επιφανειοδραστικής ουσίας (Griese, 1999 ). Τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα είναι, ή τουλάχιστον περιέχουν, επιφανειοδραστική ουσία.

Όλη η εσωτερική κυψελιδική επιφάνεια περιβάλλεται από ένα λεπτό στρώμα συμπλέγματος λιποπρωτεϊνών και νερού, που αποτελούν συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας εκκρίνεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα. Χρησιμεύει στο να ελαττώνει την επιφανειακή τάση στην επιφάνεια μεταξύ αέρα και κυψελιδικού επιθηλίου, γεγονός που βοηθά στην αποτροπή της σύμπτυξης των κυψελίδων στην εκπνοή ενώ τις επιτρέπει να διατείνονται με λιγότερη εισπνευστική δύναμη, διευκολύνοντας το έργο της αναπνοής (Echaide M, 2017; Griese, 1999 ).

### 1.3. Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας

Το σύνδρομο της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1967 από τους Ashbaugh and Petty (Ashbaugh DG, 1967). Οι συγγραφείς ανέφεραν 12 ασθενείς που εισήχθησαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) λόγω σοβαρής οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας, από διάφορες αιτίες και χρειάστηκαν μηχανική υποστήριξη της αναπνοής. Όλοι οι ασθενείς είχαν κοινά ευρήματα την ασυνήθιστα επίμονη ταχύπνοια, σε συνδυασμό με εμμένουσα υποξαιμία και αμφοτερόπλευρες σκιάσεις στην ακτινογραφία θώρακος. Η διατασιμότητα (compliance) των πνευμόνων ήταν πολύ μειωμένη, γεγονός που καθιστούσε δύσκολο το μηχανικό αερισμό. Η θνητότητα του συνδρόμου ανερχόταν στο 60%.

Έκτοτε έγιναν μεγάλες προσπάθειες για ένα ακριβή ορισμό του ARDS για κλινικούς κυρίως λόγους. Το 1988 ο J Murray πρότεινε έναν ορισμό που στηρίζονταν στο σκορ της «πνευμονικής βλάβης» (lung injury score, LIS) (Murray JF, 1988). Ο ορισμός παρόλο που χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην κλινική πράξη, δεν καθόριζε τους παράγοντες κινδύνου για ARDS και δεν απέκλειε το καρδιογενές πνευμονικό οίδημα ως πιθανή αιτία της πνευμονικής διαταραχής. Το 1994 η Αμερικανική Πνευμονολογική Εταιρεία (ATS), η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Ιατρικής (ESICM), με την ταυτόχρονη υποστήριξη του Ινστιτούτου Καρδιάς, Πνευμόνων και Αίματος (NHLBI), δημοσίευσαν τα κριτήρια της Αμερικανικής και Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ομοφωνίας (AECC) για το ARDS (Bernard GR, 1994). Η AECC εισήγαγε, επίσης, ένα νέο όρο, την οξεία πνευμονική βλάβη (Acute Lung Injury, ALI). Επρόκειτο για έναν όρο ευρύτερο από το ARDS που χαρακτηρίζονταν απλώς από ηπιότερη υποξυγοναιμία ( $PaO_2/FiO_2 < 300$ ). Το 2012, σύμφωνα με τον ορισμό του Βερολίνου, ο βαθμός της υπεραιμίας ορίζει και τη σοβαρότητα του ARDS: (ARDS Definition Task Force, 2012).

**Ήπιο ARDS** ορίζεται, όταν το  $PaO_2/FiO_2$  είναι  $> 200$  mm Hg, αλλά  $\leq 300$  mm Hg, υπό μηχανική υποστήριξη με PEEP ή CPAP  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O.

**Μέτριας βαρύτητας ARDS** ορίζεται, όταν το  $PaO_2/FiO_2$  είναι  $> 100$  mm Hg, αλλά  $\leq 200$  mm Hg, υπό μηχανική υποστήριξη με PEEP  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O.

**Βαρύ ARDS** ορίζεται, όταν το  $PaO_2/FiO_2$  είναι  $\leq 100$  mm Hg, υπό μηχανική υποστήριξη με PEEP  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O (Reilly JP, 2019).

Έκτοτε, το ALI/ARDS χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη πνευμονική βλάβη, που προκαλείται από πολλές, διαφορετικές μεταξύ τους αιτίες. Το αιτιολογικό πάνελ είναι μεγάλο και συνεχώς αυξάνεται. Στις αιτίες συγκαταλέγονται οι: τραυματισμός, σήψη, παγκρεατίτιδα, περιφερική καταπληξία (Shock), διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, υπερβολική δόση φαρμάκων (ηρωίνη, μεθαδόνη, εθυλχλωρβινόλη κ.α.), πολλαπλές μεταγγίσεις αίματος και των παραγώγων αυτού, εισρόφηση γαστρικού περιεχομένου, διάχυτες λοιμώδεις πνευμονίες (μικρόβια, ιοί, μυκόπλασμα, πνευμονοκύστη, νόσος Λεγεωνάριων), εισπνοή ερεθιστικών αερίων ή καπνού, θλάση του πνεύμονα ακόμα και ακτινοβολία (Eworguke E, 2018).

Το ALI/ARDS εμφανίζεται συνήθως σε άτομα χωρίς προηγούμενη αναπνευστική νόσο. Χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη, με αμφίπλευρη πνευμονική διήθηση, υποξαιμία, αυξημένη διαπερατότητα και ανταλλαγή αερίων και ύπαρξη πνευμονικού οιδήματος (Rawal G, 2018; Johnson, 2010). Οι ασθενείς που προσβάλλονται από ARDS, μετά την αρχική επίδραση του βλαπτικού παράγοντα παραμένουν, για διάστημα ολίγων ωρών, ασυμπτωματικοί και ακολούθως εμφανίζουν ταχύπνοια και δύσπνοια. Η μέτρηση των αερίων αίματος αποκαλύπτει αρτηριακή υποξαιμία και υπερκαπνία (Apostolova E, 2020). Η εξέλιξη του ARDS, συνοδεύεται από δύσπνοια, κυάνωση και επιδείνωση του ασθενούς. Ο συνδυασμός της επιδείνωσης της ταχύπνοιας και της μείωσης του αναπνεόμενου όγκου αέρα (tidal volume) έχει ως αποτέλεσμα τον κυψελιδικό υπεραερισμό, την προοδευτική επιδείνωση της υποξαιμίας, της υπερκαπνίας, με αποτέλεσμα την σοβαρή επιδείνωση της νόσου (Fan E, 2018). Ασθενείς μετά από προσβολή από ARDS, είναι δυνατό να ανακτήσουν πλήρως την αναπνευστική τους λειτουργία. Όμως σε βαριές περιπτώσεις, το σύνδρομο καταλείπει μόνιμες βλάβες στο πνευμονικό παρέγχυμα, μείωση της λειτουργικότητας των πνευμόνων και σε ορισμένες περιπτώσεις, πνευμονική υπέρταση (Price LC, 2012; Gattinoni L, 2017).

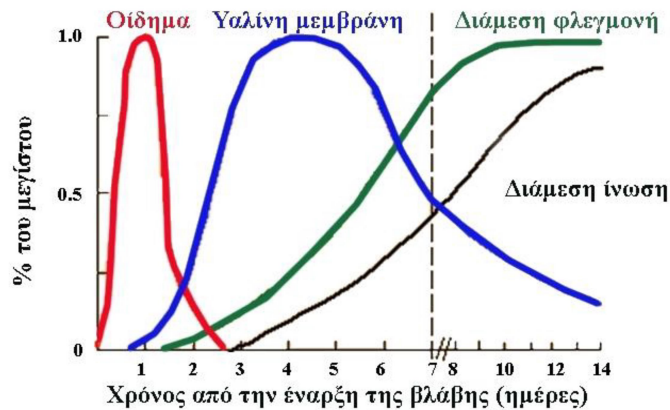
Δεν υπάρχουν εργαστηριακά ή παθολογικά ευρήματα του συνδρόμου. Τα περισσότερα παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα σχετίζονται με την γενικευμένη φλεγμονή ή τη δυσλειτουργία των οργάνων που συνοδεύουν το σύνδρομο. Τα ακτινολογικά ευρήματα συνίστανται στην παρουσία αμφοτερόπλευρων διηθημάτων, που μπορεί να είναι κυψελιδικά ή και διάμεσα, σαφώς περιγεγραμμένα ή συρρέοντα, με συμμετρική κατανομή ή όχι, ενώ μπορεί να συνυπάρχουν πλευριτικές συλλογές (Chiumello D, 2013; Vergani G, 2020). Η δυσλειτουργία του καρδιοαναπνευστικού

συστήματος εμφανίζεται με μεγάλη, ανθιστάμενη υποξυγοναιμία. Οι βιοχημικές και κυτταρικές ανωμαλίες οδηγούν σε ελάττωση των πνευμονικών όγκων και διαταραχή της φυσιολογικής ανταλλαγής αερίων αίματος. Οι παράγοντες αυτοί, κορυφώνονται σε οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια με επακόλουθες καρδιαγγειακές διαταραχές (Sinha T, 2021; Johnson NJ, 2018).

### 1.3.1. Παθολογοανατομικά ευρήματα του ARDS

Οι περισσότερες περιπτώσεις ARDS διαγιγνώσκονται με κλινικά ή ακτινογραφικά κριτήρια και όχι με παθολογοανατομικά. Παρόλα αυτά η ιστολογική εικόνα πνεύμονα με ALI/ARDS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μακροσκοπικά οι πνεύμονες με ALI/ARDS έχουν εξέρυθρη όψη και μεγάλο βάρος. Συχνά το ALI/ARDS εξομοιώνεται με το πνευμονικό οίδημα και την αυξημένη διαπερατότητα. Κατά την εξέλιξη της νόσου, το οίδημα επισκιάζεται από κυτταρική νέκρωση, επιθηλιακή υπερπλασία, φλεγμονή και ίνωση. Η ιστολογική εμφάνιση της βλάβης των πνευμόνων, μπορεί να χωριστεί χρονικά σε τρεις αλληλένδετες και αλληλεπικαλυπτόμενες φάσεις που σχετίζονται με την κλινική εξέλιξη της νόσου: (1) την οξεία εξιδρωματική φάση (2) τη φάση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και (3) την φάση της ίνωσης (Gattinoni L, 1994). Τα παθολογικά χαρακτηριστικά της διάχυτης κυψελιδικής βλάβης (difused alveolar damage, DAD) συσχετίζονται περισσότερο με το χρονικό πλαίσιο παρά με την έναρξη της νόσου (Matsubara, 2002; Cardinal-Fernández P, 2017).

Η εξιδρωματική φάση καταλαμβάνει περίπου την πρώτη εβδομάδα μετά την έναρξη της αναπνευστικής ανεπάρκειας (Sinha P, 2019; Tomashefski, 2000). Οι πνεύμονες των ασθενών είναι άκαμπτοι, χρώματος σκούρο κόκκινο-μπλε και βάρους που υπερβαίνει συνήθως τα 2000 g, ενώ το φυσιολογικό τους βάρος είναι πολύ μικρότερο. Η παρεγχυματική επιφάνεια είναι αιμορραγική, η ζωτική χωρητικότητα είναι μειωμένη και η λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα είναι μικρότερη της προβλεπόμενης, λόγω της σύμπτωσης των κυψελίδων και της πλήρωσής τους με εξιδρωματικό υγρό (Εικόνα 5) (Thille AW, 2013; Esteban A, 2004).

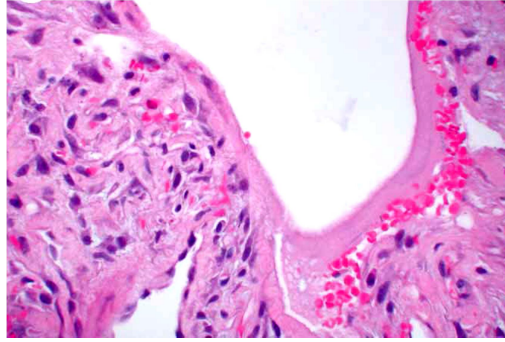


**Εικόνα 5:** Σχηματική παράσταση που δείχνει την αλληλουχία των γεγονότων κατά την ανάπτυξη του ALI/ARDS σε σχέση με τον χρόνο. Κατά τη διάρκεια της εξιδρωματικής φάσης η βλάβη χαρακτηρίζεται από τριχοειδοκυψελιδική διαρροή με διάμεσο και κυψελιδικό οίδημα και αιμορραγία, ακολουθούμενη από σχηματισμό μεμβρανών υαλίνης. Μετά από 7-10 ημέρες εμφανίζεται η φάση πολλαπλασιασμού η οποία ακολουθείται από ίνωση και διάμεση φλεγμονή. Πηγή: (Katzenstein AA, 1990).

Οι πρώτες μικροσκοπικές παρατηρήσεις συμπεριλαμβάνουν την τριχοειδική συμφόρηση, το κυψελιδικό οίδημα και την ενδοκυψελιδική αιμορραγία (Lorente JA, 2015). Στα διακριτικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της εξιδρωματικής φάσης, συμπεριλαμβάνονται και η παρουσία πυκνών ηωσινοφιλικών μεμβρανών υαλίνης που συνήθως είναι πιο εμφανείς κατά μήκος των κυψελίδων (Εικόνα 6).

Οι μεμβράνες υαλίνης αποτελούνται από συμπυκνωμένες πρωτεΐνες πλάσματος που, μετά τον τραυματισμό του ενδοεπιθηλιακού φραγμού, διαρρέουν στον κυψελιδικό χώρο. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αποδεικνύουν τον εμπλουτισμό των μεμβρανών υαλίνης με ανοσοσφαιρίνη, ινωδογόνο, επιφανειοδραστικό παράγοντα και σε μικρότερο βαθμό με συμπλήρωμα (Ward, 1996). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η εναπόθεση υαλίνης στις κυψελίδες δεν είναι γνωστός (Wagnock ML, 1980). Υποθέτετε ότι παθογενετικό ρόλο παίζει η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου στους κυψελιδικούς σάκους. Παράλληλα και σποραδικά εμφανίζεται φλεγμονώδη διήθηση από κύτταρα που αποτελούνται από υπάρχοντα λεμφοκύτταρα, κύτταρα πλάσματος και μακροφάγα.



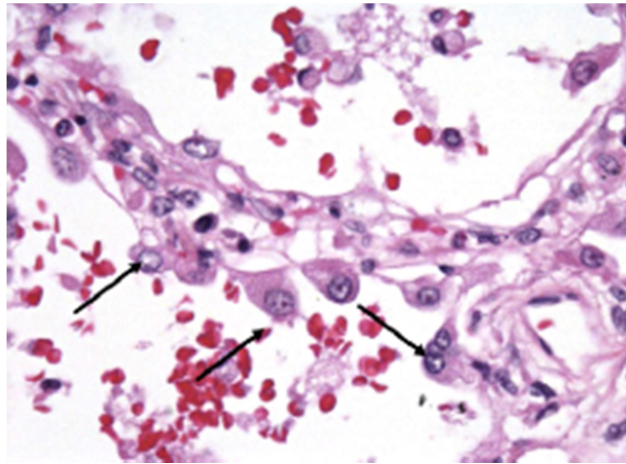


**Εικόνα 6:** Διάχυτη κυψελιδική βλάβη, εξιδρωματική φάση. φωτομικρογραφία που δείχνει διάσπαρτες μεμβράνες υαλίνης να επενδύουν τον κυψελιδικό χώρο με παρουσία ήπιας φλεγμονώδους διήθησης. Χρώση Αιματοξυλίνης -Ηωσίνης, μεγέθυνση 400×.Πηγή: (Castro, 2006).

Η φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή πολλαπλασιαστική φάση της DAD είναι το στάδιο της οργάνωσης του ενδοκυψελιδικού και διάμεσου εξιδρώματος που αποκτήθηκε στην εξιδρωματική φάση (Meduri GU, 1995). Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται στον κυψελιδικό χώρο, το αργότερο τρεις ημέρες μετά την έναρξη της κλινικής εικόνας του ARDS. ( Εικόνα 7).

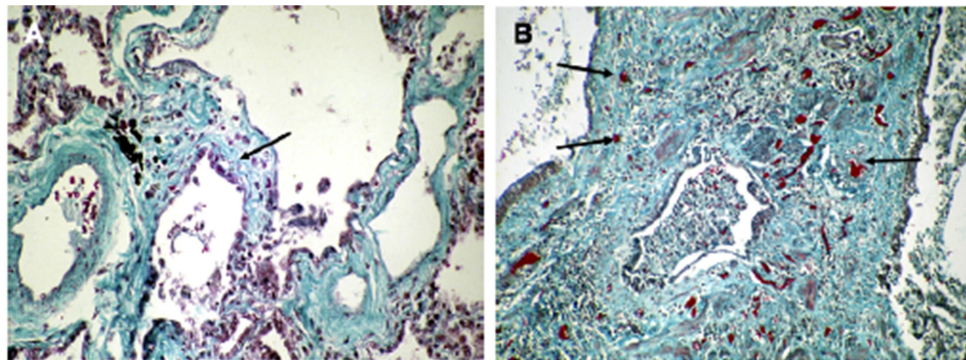
Μεταξύ της πρώτης και της τρίτης εβδομάδας της πνευμονικής βλάβης, ιστολογικά, παρατηρείται αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί την έναρξη της πολλαπλασιαστικής φάσης. Κυβοειδή κύτταρα εκτείνονται κατά μήκος του κυψελιδικού τοιχώματος και εμπεριέχουν πολλά κυτταροπλασματικά ελασματοειδή σωμάτια. Τα ευρήματα αυτά είναι ένδειξη του πολλαπλασιασμού και της μιτωτικής ενεργότητας των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Η εμφάνιση πλακώδους μεταπλασίας που μιμείται το καρκίνωμα είναι περιστασιακή. Οι πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων είναι μεγάλοι και φυσαλιδώδεις με εμφανείς πυρηνίσκους. Η κυτταρική ατυπία είναι πιο έντονη, όταν η πνευμονική βλάβη προκαλείται από κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως η βλεομυκίνη, η βουσουλφάνη, η ακτινοβολία, ή από ιογενή λοίμωξη. Η παρουσία των mast cells, κοκκιοκυττάρων και ινοβλαστών αυξάνεται. Ο πολλαπλασιασμός των πνευμονοκυττάρων τύπου II συνοδεύεται από γρήγορη μείωση του κυψελιδικού χώρου.





**Εικόνα 7:** Τομή παραφίνης πνευμονικού παρεγχύματος που δείχνει τον εκτεταμένο πολλαπλασιασμό των πνευμονοκυττάρων τύπου II (μαύρα βέλη). Ο πολλαπλασιασμός γίνεται κατά μήκος της κυψελιδικής επιφάνειας που απογυμνώνεται μετά από την νέκρωση των πνευμονοκυττάρων τύπου I. Χρώση Αιματοξυλίνης Ηωσίνης. Πηγή: (Peñuelas O, 2006)

Οι διαταραχές αυτές επιφέρουν μορφομετρικές αλλαγές της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων, και ερήμωση του τριχοειδικού δικτύου. Η ίνωση εμφανίζεται μετά την 10<sup>η</sup> ημέρα έναρξης του ARDS (Kobashi Y, 1993). Στην φάση αυτή παρατηρείται εναπόθεση κολλαγόνου και υαλίνης στα κυψελιδικά τοιχώματα (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Χαρακτηριστικές εικόνες ίνωσης στο ALI/ARDS. (Α) Παρατηρείται πάχυνση του κυψελιδικού τοιχώματος, και παρουσία αραιού συνδετικού ιστού (μαύρο βέλος). (Β) Σοβαρή ίνωση με αγγειακές βλάβες (θρομβωτικές), ινοπολλαπλασιαστικές και εξαλειπτικές αλλαγές, οι οποίες, συμβάλλουν στην ανάπτυξη της πνευμονικής υπέρτασης (μαύρα βέλη). Τομές παραφίνης, χρώση Trichrome Masson's. Πηγή: (Peñuelas O, 2006).

Η ίνωση στραγγαλίζει όλα τα συστατικά του πνευμονικού ιστού, δηλαδή αγγεία, κυψελίδες και τον διάμεσο χώρο προσδίνοντας την χαρακτηριστική εικόνα, ηπάτωσης των πνευμόνων (Consolidation). Τα στάδια εμφανίζονται σε ένα συνεχές και όχι με αυστηρό χρονολογικό τρόπο. Αυτή η ταχεία μετατροπή του πνεύμονα σε ένα τελικού σταδίου μη ενδοτικό όργανο, αποτελεί σημαντικό περιοριστικό παράγοντα επιβίωσης από το ARDS (Parazian L, 2007).

### 1.3.2. Παθοφυσιολογία του ALI/ARDS

Η πρωταρχική παθοφυσιολογική μεταβολή στην οξεία πνευμονική βλάβη και το ARDS είναι η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου των πνευμονικών τριχοειδών. Συνέπεια αυτού είναι η εξαγγείωση πλούσιου σε λεύκωμα υγρού στο διάμεσο χώρο και τις κυψελίδες. Το βάρος των πνευμόνων αυξάνεται δραματικά, ενώ ο συνολικός τους όγκος δεν διαφέρει από αυτών των φυσιολογικών πνευμόνων. Η αύξηση του βάρους προκύπτει από το οίδημα και την πύκνωση του πνευμονικού ιστού, που κατά κυριολεξία εκτοπίζουν τον αέρα.

#### Ενδοθηλιακή βλάβη και πνευμονικό οίδημα

Στις υγιείς κυψελίδες, το τριχοειδικό ενδοθήλιο σχηματίζει ένα ημιδιαπερατό φραγμό που επιτρέπει την ανταλλαγή υγρών, ενώ ο φραγμός του κυψελιδικού επιθηλίου περιορίζει τη διέλευση νερού, ηλεκτρολυτών και μικρών υδρόφιλων διαλυτών στον κυψελιδικό χώρο (Weibel, 2015). Σε ασθενείς με ARDS, το κυψελιδικό οίδημα προκύπτει από την απώλεια των κυψελιδικών ενδοθηλιακών και επιθηλιακών φραγμών, επιτρέποντας την εξαγγείωση πλούσιου σε λευκώματα υγρού αλλά και έμμορφων στοιχείων του αίματος στο διάμεσο χώρο και στις κυψελίδες (Murray, 2011). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διάσπαση του επιθηλιακού φραγμού και όχι του ενδοθηλιακού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου (Yanagi S, 2015). Επίσης ζωτικής σημασίας για την αποκατάσταση του ARDS, είναι και η επιδιόρθωση του κυψελιδικού επιθηλίου και η εκκαθάριση του λευκωματικού υγρού και των πρωτεϊνών από τους κυψελιδικούς χώρους (Ware LB, 2001). Η διαπερατότητα και η λειτουργία του

κυψελιδικού επιθηλίου εξαρτώνται από τους αποφρακτικούς συνδέσμους (tight junction, TJ) που επιτρέπουν την επαφή τόσο μεταξύ των κυττάρων όσο και μεταξύ του επιθηλίου και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

### Αποφρακτικοί σύνδεσμοι και πνευμονικό οίδημα

Οι αποφρακτικοί σύνδεσμοι (ΑΣ) είναι σύμπλοκα ετερομερών πρωτεϊνών που συνδέουν ισχυρά τις πλευρικές επιφάνειες των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων (Schneeberger EE, 2004; Denker BM, 1998). Οι ΑΣ ρυθμίζουν την παρακυττάρια διαπερατότητα, δημιουργούν ξεχωριστά διακυτταρικά διαμερίσματα, διατηρούν την κυτταρική πολικότητα, ρυθμίζουν ποικιλία ενδοκυτταρικών σημάτων, επηρεάζουν την έκφραση πρωτεϊνών, και διαύλων ιόντων μεταφοράς (Zaidman, 2017; Yanagi S, 2015). Η βλάβη των ΑΣ είναι σημαντική αιτία διάσπασης του κυψελιδικού φραγμού κατά τη διάρκεια της πνευμονικής βλάβης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό και τη διαιώνιση του πνευμονικού οιδήματος. Επιπλέον, τροποποίηση της σύστασης των ΑΣ διευκολύνει τη διέλευση μολυσματικών παραγόντων, εξωγενών τοξινών και ενδογενών προϊόντων στη συστηματική κυκλοφορία (He Y, 2020).

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των ΑΣ αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως είναι οι οκλουντίνες (occludin's), κλωντίνες (claudin's), τρισελουλίνη (tricellulin) και μόρια προσκόλλησης συνδέσμων (junction adhesion molecules, JAM). Ενδοκυττάρια ενώνονται με πρωτεΐνες σύνδεσης όπως είναι η σινγκουλίνη (cingulin) και η ζονούλα-οκλουντίνη (zonula occludens, ZO) και οι οποίες με την σειρά τους συνδέονται με τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού (González-Mariscal L, 2003; Zihni C, 2016). Τα συμπλέγματα των ΑΣ είναι δομές δυναμικά ρυθμιζόμενες (Tervonen A, 2019). Η ακεραιότητα των ΑΣ ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες όπως είναι το μηχανικό τέντωμα, παθογόνα μικρόβια και τα προϊόντα τους, φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ) (Cavanaugh KJ, 2001; Looi K, 2016). Τα ερεθίσματα αυτά ενεργοποιούν σηματοδοτικούς μηχανισμούς μεταγωγής σήματος όπως είναι η πρωτεΐνη κινάση C (PKC), MAPK, PI3K, GTPases (Sheth P, 2003; Shen CH, 2021; González-Mariscal L, 2018).

## Φλεγμονώδεις Παράγοντες και Πνευμονικό Οίδημα

Η φλεγμονή στις κυψελίδες εμφανίζεται νωρίς στην ανάπτυξη του ARDS και σχετίζεται με αλλαγές στη κυψελιδική διαπερατότητα, πλήρωση του χώρου με υγρό πλούσιο σε πρωτεΐνες και συνεπαγόμενη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος. Σε αυτό το πλαίσιο, η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από έντονη εισροή ουδετερόφιλων, ενεργοποιημένων ανοσοκυττάρων, την ενεργοποίηση κυψελιδικών μακροφάγων, την απελευθέρωση κυτοκινών (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) καθώς και χημειοκινών (IL-8, ENAP-78, MCP-1, MIP-1) στους αναπνευστικούς χώρους. Οι IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$  είναι βιολογικώς δραστικές κυτοκίνες στο πνευμονικό παρέγχυμα ασθενών με ARDS και φαίνεται να αυξάνουν την πνευμονική επιθηλιακή διαπερατότητα (Fang M, 2018). Η IL-1 $\beta$  αυξάνει την πνευμονική διαπερατότητα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των RhoA/integrins, της έκλυσης του TGF- $\beta$  με επακόλουθη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών των συνδέσμων προσκόλλησης, της ακτίνης κ.α (Ganter MT, 2008).

Πειράματα με ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης, κατέδειξαν ότι ο TNF- $\alpha$  έχει θετική επίδραση στον καθαρισμό των κυψελίδων από εξιδρωματικό υγρό (Börgjesson A, 2000). Ο προτεινόμενος μηχανισμός ενοχοποιεί την ενεργοποίηση της αντλίας μεταφοράς Na<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup> από τον TNF- $\alpha$  (Czikora I, 2014). Όμως για την πλήρη αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού, χρειάζονται περισσότερα πειράματα. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι ο TNF- $\alpha$  διαταράσσει τις πρωτεΐνες των ΑΣ (ZO-1, claudin's) και  $\beta$ -catenin *in vitro* (Al-Sadi R, 2009). Μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μηχανισμών των PKC, MAPK, RhoA/ROCK, myosin-light-chain (MLC) τροποποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού, συμβάλλοντας στην ενδοεπιθηλιακή διαπερατότητα (McKenzie JA, 2007).

Μια υπερβολικά ενεργοποιημένη φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να συμβάλει στη καταστροφή του κυψελιδικού φραγμού από μηχανισμούς που εξαρτώνται από τα μακροφάγα που βρίσκονται στον πνεύμονα και αυτών που προέρχονται από το μυελό των οστών (Frank JA, 2006). Τα μακροφάγα προσκολλώνται και αλληλεπιδρούν με το πνευμονικό επιθήλιο, παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> και κονεξίνης 43 (connexin 43, Cx43). Αυξημένα επίπεδα Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί έμμεσα μηχανισμούς απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων και απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων όπως είναι ο TNF- $\alpha$  (Bhattacharya J, 2016). Η δράση των μακροφάγων δεν περιορίζεται μόνο στην φλεγμονώδη ανταπόκριση. Κάτω από διαφορετικούς

μηχανισμούς μπορούν να πυροδοτήσουν και αντι φλεγμονώδεις διαδικασίες. Με πρώτη την φαινοτυπική μετατροπή τους από φλεγμονώδη M1 μακροφάγα σε M2 αντι-φλεγμονώδη μακροφάγα. Τα M2 μακροφάγα επάγουν την ετεροκυττάρωση (φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων), την κάθαρση των ουδετερόφιλων, την έκκριση κυτοκινών όπως IL-10, IL-4 και IL13 και επιθηλιακών αυξητικών παραγόντων (PDGF, FGFs, HGF, TGF-β και VEGF) που συμβάλλουν στον πνευμονικό επιθηλιακό και ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό και επιδιόρθωση (Aggarwal NR, 2014; Herold S, 2011).

Σε καταστάσεις πνευμονικής βλάβης παρατηρείται μετανάστευση των ουδετερόφιλων από την κυκλοφορία στις κυψελίδες. Την μετανάστευση διευκολύνει η καταστροφή των ΑΣ μεταξύ των ενδοθηλιακών και πνευμονοκυττάρων. Στον κυψελιδικό χώρο, τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται με μόρια προσκόλλησης στην κορυφαία επιφάνεια των πνευμονοκυττάρων (Williams AE, 2014). Μετά την προσκόλληση ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων (ελαστάση και MMPs), κατιονικών πεπτιδίων και γενικά κυτταροτοξικών ουσιών στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Kellner M, 2017). Τα προϊόντα αυτά οδηγούν και ενισχύουν την πνευμονική βλάβη, την διαπερατότητα του φραγμού και την αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Η δράση των ουδετεροφίλων είναι σημαντική για τον σχηματισμό του οιδήματος και την βαρύτητα της πνευμονικής βλάβης (Potey PM, 2019; Okrent DG, 1990).

### 1.3.3. Επιδημιολογία

Συστηματική καταγραφή και μελέτη της επιδημιολογικής εικόνας του ALI/ARDS στον δυτικό κόσμο, γίνεται συστηματικά, από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Εντατικής Θεραπείας (European Society of Intensive Care Medicine, ESICM). Η ESICM, από το 2014 και μετά προχώρησε σε πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης (LUNG SAFE- cohort study), που διεξάγεται σε 50 χώρες (Ευρωπαϊκές και Ηνωμένων Πολιτειών), και αποσκοπεί στην αξιολόγηση δεδομένων που αφορούν τον αριθμό των περιστατικών, την θεραπευτική προσέγγιση και θνησιμότητα από το ALI/ARDS, την γεωγραφική και πολιτικοοικονομική κατανομή των ασθενών (Bellani G, et al., 2016). Οι ασθενείς αξιολογούνται σύμφωνα με

τα κριτήρια της συνθήκης του Βερολίνου για το ALI/ARDS. Η μελέτη έδειξε ότι στις Ευρωπαϊκές χώρες με υψηλό εισόδημα καθώς και στις χώρες με μεσαίο εισόδημα, τα περιστατικά με βαρύ ALI/ARDS ήταν περισσότερα από ότι στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες. Όμως οι ασθενείς χρειαζόντουσαν λιγότερες μέρες νοσηλείας και η θνησιμότητα ήταν μικρότερη (Laffey JG, 2017). Οι παρατηρήσεις της LUNG SAFE μελέτης καταδεικνύουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ κοινωνικοοικονομικού στάτους και επιβίωσης, που είναι ανεξάρτητο από την γεωγραφική κατανομή (Chebib N, 2018). Πιθανολογείται ότι η ευρέως διαδεδομένη χρήση της προστατευτικής πνευμονικής διασωλήνωσης (lung –protective ventilation) και της μείωσης των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων μειώνουν τον κίνδυνο θανάτου.

Ηλικιακά παρατηρείται ότι από τα 100.000 περιστατικά ετησίως 16 από αυτά αφορούν ασθενείς ηλικίας μεταξύ 15-19 ετών, ενώ 306 από αυτά αφορούν ασθενείς ηλικίας 75-84 ετών (Matthay, et al., 2012). Πολυκεντρικές μελέτες στις Ηνωμένες Πολιτείες έδειξαν ότι οι άντρες είναι πιο επιρρεπείς στο ARDS σε σχέση με τις γυναίκες. Μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παρουσιάζεται στους μαύρους και ισπανόφωνους ασθενείς, από ότι στους λευκούς (Ryb, 2010). Οι αιτιολογία πίσω από αυτή την ανισότητα παραμένει άγνωστη. Η θνησιμότητα στο ALI/ARDS είναι άμεσα συνδεδεμένη με το αίτιο που πυροδότησε την εμφάνιση του συνδρόμου. Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρείται σε ασθενείς με ALI/ARDS λόγω σήψης (43%), το ποσοστό λόγω πνευμονίας ή εισρόφησης είναι 37 με 36%, ενώ λόγω τραυματισμού το ποσοστό είναι το μικρότερο και μόλις 11% (Johnson & Matthay, 2010).

Τα τελευταία χρόνια η εντατική ιατρική σημείωσε ιδιαίτερη πρόοδο, καθώς επίσης και η βιοτεχνολογία του μηχανικού αερισμού. Τα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας επέτρεψαν την διευκρίνιση πολλών παθογενετικών και παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Όμως η πρόοδος των τελευταίων ετών δεν κατάφερε να μειώσει ουσιαστικά την θνησιμότητα του εν λόγω συνδρόμου. Γενικά, στις περισσότερες ΜΕΘ, η θνησιμότητα εξακολουθεί να ανέρχεται στο 50%-70% των ασθενών που εισέρχονται στις ΜΕΘ. Πρέπει να τονιστεί ότι σε χώρες που το σύστημα υγείας στερείται βιοτεχνικού εξοπλισμού και υποδομών, η θνησιμότητα αγγίζει το 90%. Στις ανεπτυγμένες χώρες, παρατηρείται καλύτερη διαχείριση των ασθενών, δυνατότητα εφαρμογής διαφορετικών στρατηγικών μηχανικής υποστήριξης της αναπνοής και διαχείριση των λοιμώξεων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του ποσοστού της θνησιμότητας που αγγίζει το 50%.

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ακριβή στοιχεία για την θνησιμότητα του συνδρόμου σε παγκόσμιο επίπεδο (Oh TK, 2020).

#### 1.3.4. Θεραπεία

Ιστορικά η κεντρική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ALI/ARDS είναι ο μηχανικός αερισμός ο οποίος επιτυγχάνει οξυγόνωση του πνεύμονα και αποβολή του διοξειδίου του άνθρακα (Pan C, 2018). Έρευνες των τελευταίων δεκαετιών έχουν δείξει ότι ο μηχανικός αερισμός, εκτός από ευεργετική δράση, μπορεί να προκαλέσει ή να επιδεινώσει τη βλάβη στον πνεύμονα, φαινόμενο γνωστό ως πνευμονική βλάβη προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα (Ventilator Induced Lung Injury, VILI) (Cruz FF, 2018). Το VILI είναι, στην ουσία, η συνέπεια της δράσης των μηχανικών δυνάμεων που αναπτύσσονται κατά τον μηχανικό αερισμό στις δομές του πνεύμονα. Η οξυγονοθεραπεία, δηλαδή η συμπληρωματική χορήγηση οξυγόνου χρησιμοποιείται σαν θεραπευτική προσέγγιση (El-Khatib MF, 2020). Εν τούτοις πρέπει να χορηγείται με προσοχή διότι η αυξημένη περιεκτικότητα οξυγόνου στον εισπνεόμενο αέρα αφαιρεί το άζωτο από τους πνεύμονες, και οδηγεί σε ατελεκτασίες. Αυτές οι ατελεκτασίες εξαιτίας της απορρόφησης δεν αποτρέπονται με την εφαρμογή PEEP.

Όπως έχει προαναφερθεί η ανταλλαγή των αερίων παρεμποδίζεται όταν ο κυψελιδικός χώρος είναι γεμάτος από υγρό. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η διατήρηση της διαβατότητας των κυψελίδων. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (positive end-expiratory pressure, PEEP). Η PEEP, αναφέρεται στην πίεση των αεραγωγών, συγκριτικά με την ατμοσφαιρική πίεση, στο τέλος της αναπνοής. Η PEEP μπορεί να εφαρμοστεί στους περισσότερους τύπους μηχανικού αερισμού, βελτιώνει την οξυγόνωση και διατηρεί ανοικτές τις κυψελίδες κατά την εκπνοή (Sahetya SK, 2020). Η χρήση μη επεμβατικού μηχανικού αερισμού (NPPV) σε ασθενείς με ARDS αφορά αιμοδυναμικά σταθερούς ασθενείς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα διατήρησης του αεραγωγού τους. Δεν υπάρχουν, ακόμη, επαρκή κλινικά στοιχεία τα οποία να εξηγούν τον ακριβή ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει ο NPPV στη θεραπεία των ασθενών (Antonelli M, 2007).

Η υποστηρικτική αγωγή περιλαμβάνει τη χρήση κατασταλτικών και αναλγητικών και έχει σαν σκοπό την καλύτερη συνεργασία του ασθενή με τον αναπνευστήρα και τη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου. Προτιμώνται κατασταλτικά μακράς δράσης, όπως είναι οι βενζοδιαζεπίνες σε συνδυασμό με οπιοειδή (Verkerk BS, 2020). Στις περιπτώσεις όπου η γαστρεντερική οδός είναι ακέραια, συνιστάται η εντερική σίτιση με μικρούς όγκους. Η πρακτική αυτή σχετίζεται με λιγότερες ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως είναι η γαστρεντερική αιμορραγία, η διάσπαση του εντερικού βλεννογόνου και η υπερβολική παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Γενικά οι ασθενείς με ARDS είναι έντονα καταβολικοί και η διατροφική υποστήριξη θα πρέπει να αντισταθμίζει τις καταβολικές τους απώλειες (Krzak A, 2011). Η πρηνής θέση βελτιώνει την οξυγόνωση στην πλειονότητα των ασθενών με ARDS. Η μελέτη PROSEVA τυχαιοποίησε 466 ασθενείς με μέσο όρο  $PaO_2/FiO_2 \sim 100$ , χρησιμοποίησε χαμηλούς αναπνεόμενους όγκους και στα δύο σκέλη της μελέτης και πέτυχε μεγάλες περιόδους εφαρμογής της πρηνούς θέσης στο σκέλος της παρέμβασης. Η μελέτη έδειξε απόλυτη μείωση της θνητότητας κατά 16,7 % την 28η ημέρα (Ayaz L, 2016).

Η φαρμακευτική αντιμετώπιση του ALI/ARDS περιορίζεται στην χορήγηση αντιφλεγμονωδών για την καταστολή της φλεγμονής. Οι αντι-TNFα αναστολείς δεν απέδωσαν αξιόλογα αποτελέσματα (Malaniya R, 2017). Η χορήγηση κορτικοστεροειδών, όπως αποδείχθηκε, δεν ανατρέπουν την παθολογική διαδικασία του ALI/ARDS, δεν βελτιώνουν την αναπνευστική λειτουργία και δεν αυξάνουν την επιβίωση (Thompson, 2010). Η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα σε ασθενείς με ARDS έχει ως σκοπό τον περιορισμό της ατελεκτασίας που προκαλείται είτε από την έλλειψη παραγωγής του ενδογενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα είτε από την αδρανοποίηση και την καταστροφή του (Raghavendran K, 2011). Αν και η χορήγησή του φαίνεται να ωφελεί τους παιδιατρικούς πληθυσμούς, δεν υπάρχουν δεδομένα που να δικαιολογούν τη χορήγησή του ως θεραπεία ρουτίνας σε ενήλικους ασθενείς. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου, η μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας και το οξειδωτικό stress παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του συνδρόμου. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, σε συνδυασμό με διαιτητικά συμπληρώματα ελαίων, δεν έδωσαν σαφή αποτελέσματα, στις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, γι' αυτό και η χορήγησή τους σε ασθενείς με ARDS δεν συνιστάται (Patel VJ, 2018).



Τα εισπνεόμενα αγγειοδιασταλτικά (μονοξείδιο του αζώτου, προστακυκλίνη) διαστέλλουν επιλεκτικά τα αγγεία που αιματώνουν τις καλά αεριζόμενες ζώνες του πνεύμονα, με συνέπεια τη βελτίωση της οξυγόνωσης και της πνευμονικής υπέρτασης σε ασθενείς με ARDS. Η χορήγηση εισπνεόμενου NO χρησιμοποιείται σε ασθενείς με πολύ βαριά υποξυγοναιμία, η οποία ανθίσταται στη συμβατική θεραπεία (Dzierba AL, 2014). Το NO φαίνεται να βελτιώνει την οξυγόνωση των ασθενών, αλλά δεν μειώνει τη νοσηρότητα ή τη θνησιμότητά τους (Adhikari NK, 2014). Οι ασθενείς με ARDS χωρίς σήψη ή σηπτικό shock απαντούν καλύτερα από εκείνους που αναπτύσσουν σηπτικό shock στην πορεία της νόσου.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**  
**ΚΛΩΝΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΟΙ ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ**

## 2.1. Διακυτταρικές Συνδέσεις

Τα κύτταρα των επιθηλίων συνδέονται τόσο μεταξύ τους, όσο και με την βασική μεμβράνη με εξειδικευμένες διακυτταρικές συνδέσεις. Οι συνδέσεις αυτές, ανάλογα με το είδος τους, εξυπηρετούν διαφορετική λειτουργία (Mescher, 2015). Αναγνωρίζονται τρία είδη συνδέσμων (Πίνακας 2):

1. Οι **στερεές ή αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions)** αποφράσσουν το χώρο μεταξύ παρακειμένων κυττάρων.
2. Οι **συνδέσεις πρόσφυσης ή αγκυροβολίας (adherence junctions)** αποτελούν θέσεις ζωνοειδούς κυτταρικής συγκόλλησης. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται το **δεσμοσωμάτιο ή κηλίδα συγκόλλησης**, που δεν περιβάλλει το κύτταρο.
3. Οι **χασματικές συνδέσεις (gap junctions)** είναι διάυλοι επικοινωνίας μεταξύ παρακειμένων κυττάρων (Mescher, 2015)

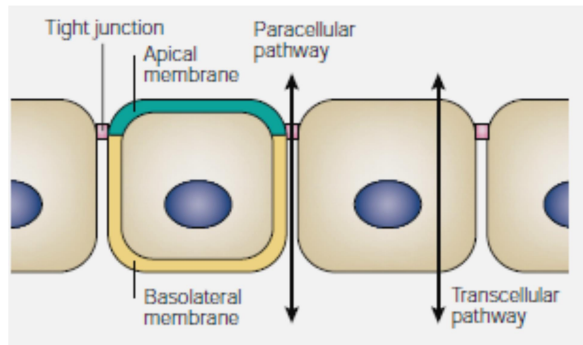
**Πίνακας 2:** Οι διακυτταρικές συνδέσεις, οι λειτουργίες και οι βασικές πρωτεΐνες τους. Πηγή: Anthony L. Mescher, Junqueira's Basic Histology, 6<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις Πασχαλίδης, ISBN:978-9963-716-89-0, Κεφάλαιο 4 Επιθηλιακός Ιστός, σελίδα 122.

Σύνδεση	Στερεή Σύνδεση	Σύνδεση πρόσφυσης	Δεσμοσωμάτιο	Ημιδεσμόςωμα	Χασματική σύνδεση
<b>Κύριες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες</b>	Οκκλουτίνες Κλωντίνες ZO Πρωτεΐνες	Ε-καδχερίνη Συμπλέγματα Κατενίνης	Οικογένεια καδχερινών (Δεσμογλεΐνες Δεσμοκολλίνες)	Ιντεγκρίνες	Κοννεξίνες
<b>Κυτταροσκελετικά συστατικά</b>	Νημάτια ακτίνης	Νημάτια ακτίνης	Ενδιάμεσα νημάτια (κερατίνες)	Ενδιάμεσα νημάτια	Όχι
<b>Κύριες λειτουργίες</b>	Αποφράσσει τον μεσοκυττάριο χώρο και ελεγχει την διόδο μορίων. Διαχωρίζει το κορυφαίο από το πλαγιοβασικό κυτταρικό διαμέρισμα.	Παρέχει σημεία σύνδεσης του κυτταροσκελετού παρακειμένων κυττάρων. Σταθεροποιεί τις γειτονικές στερεές συνδέσεις.	Παρέχει σημεία ισχυρής σύνδεσης ενδιάμεσων μεταξύ παρακειμένων κυττάρων. Ισχυροποιεί τον ιστό.	Συνδέει τον κυτταρικό σκελετό με τον βασικό υμένα.	Επιτρέπει την άμεση μεταφορά μικρομοριακών ουσιών και ιόντων από το ένα κύτταρο στο άλλο.

## 2.2. Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι (Tight Junctions)

Οι στερεές συνδέσεις ή αποφρακτικές ζώνες εντοπίζονται στο πλαγιο-κορυφαίο τμήμα του κυττάρου. Ο όρος «ζώνη» υποδηλώνει ότι οι σύνδεσμοι σχηματίζουν μια ταινία ή αλλιώς ζώνη που περιβάλλει πλήρως το κύτταρο (Mescher, 2015). Οι αποφρακτικοί σύνδεσμοι (ΑΣ) εντοπίζονται σε σημεία με άμεση επαφή των κυτταρικών μεμβρανών γειτονικών κυττάρων. Ως εκ τούτου η θέση αυτή επιφέρει την επιμέρους διαμερισματοποίηση της κορυφιάς από την πλάγια πλευρά του κυττάρου, ενώ λειτουργούν σαν ένα είδος «φράκτη».

Οι ΑΣ ελέγχουν την παρακυττάρια διαπερατότητα επιτρέποντας την επιλεκτική παθητική διέλευση υγρών, λιπιδίων, πρωτεϊνών και ιόντων διαμέσου των κυτταρικών διαμερισμάτων (Εικόνα 9). Με τον τρόπο αυτό ελέγχουν έμμεσα το μικροπεριβάλλον των επιθηλιακών κυττάρων.



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση αποφρακτικής σύνδεσης και τον τρόπο παρακυτταρικής και διακυτταρικής διαπερατότητας. Πηγή: (Tsukita S, 2001).

Εκτενείς μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και μελέτες φυσιολογίας, έδειξαν ότι οι ΑΣ είναι υπεύθυνοι για την διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων. Καθορίζουν τα κυτταρικά όρια και συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η μεταγραφή γονιδίων και η διαφοροποίηση (Otani T, 2020).

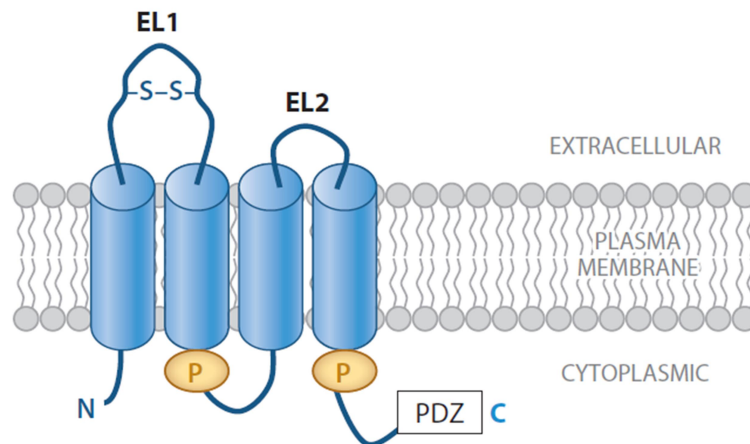
Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το λεπτό έντερο, όπου ο έλεγχος της παρακυτταρικής ιοντικής διαπερατότητας από τους ΑΣ, ρυθμίζει την φυσιολογία του εντέρου και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Suzuki, 2013). Ομοίως στα νεφρά, η παρακυττάρια επαναρρόφηση των ιόντων είναι πολύ σημαντική για τη ρύθμιση της ιοντικής ομοιόστασης του σώματος (Szasz K, 2014). Οι μη ιονικές διαλυτές ουσίες πιστεύεται ότι διαπερνούν μέσω παρακυττάρων και διακυτταρικών οδών (Kirschner N, 2013), ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των ιόντων διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (Goddard LM, 2013; Van Itallie CM, 2004). Φαίνεται ότι η δυνατότητα διαπερατότητας εξαρτάται και από το μέγεθος της ουσίας, την διαλυτότητα αυτής, την χωρητικότητα και το ιοντικό φορτίο αυτής. Οι όποιες διαφοροποιήσεις στην σύνθεση και σύσταση των ανωτέρω διαφοροποιούνται από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό (Pearce SC, 2018).

Εκτενείς μελέτες απέδειξαν ότι οι ΑΣ αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα διαμεμβρανικών, περιφερικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ανήκουν στις οικογένειες των κλωντινών (Claudins, CLDN), της οκλουντίνης (Occludin, OCLN), και τα συνδετικά μόρια προσκόλλησης (junctional adhesion molecule, JAM). Οι περιφερειακές πρωτεΐνες αποτελείται από μία μεγάλη και συνεχώς αυξανόμενη λίστα πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των Ζονούλα-οκλουντίνης (Zonula occludens, ZO-1, ZO-2, ZO-3), Membrane-associated guanylate kinase inverted., Cingulin, Rab13, ενώ κύρια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού είναι η ακτίνη. (Kierszenbaum & Tres, 2013). Πειράματα με knock out πειραματικά μοντέλα απέδειξαν ότι η οικογένεια των κλωντινών είναι απαραίτητη για την δημιουργία ενός δικτύου συνδέσμων.

Μελέτες που αποκρυσταλλώνουν την τρισδιάστατη δομή των ΑΣ, έδειξαν ότι η συχνότητα και ο αριθμός των συνδέσμων διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο, διαφοροποιώντας τον βαθμό και το μέγεθος της παρακυττάριας διαπερατότητας (Krause G, 2015). Εξυπακούεται ότι και η έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην δημιουργία των ΑΣ διαφέρει από ιστό σε ιστό. Για παράδειγμα η CLDN5 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η CLDN11 στα κύτταρα sertoli και στα ολιγοδεντροκύτταρα (Morita, 1999). Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν πάνω από δύο είδη κλωντινών σε διαφορετικούς συνδυασμούς που συνδέονται μονομερώς σχηματίζοντας ομοφυλικούς ή ετεροφυλικούς δεσμούς μεταξύ των γειτονικών κυττάρων.

### 2.3. Οι Κλωντίνες

Οι κλωντίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που απαριθμεί τουλάχιστον 24 μέλη με μοριακό βάρος 22 με 27 kDa (Oliveira & Morgado-Díaz, 2007). Δομικά ανήκουν στην πρωτεϊνική οικογένεια των τετρασπανινών, καθώς τέσσερα υδρόφοβα τμήματα κάθε πρωτεΐνης διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου (Kierszenbaum & Tres, 2013). Έχουν δύο εξωκυττάριας θηλιές ή βρόχους και μία ενδοκυττάρια θηλιά (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Σχηματική απεικόνιση μίας κλωντίνης. Εικονίζονται οι εξωκυττάριας θηλιές (Extracellular Loop, EL1 και EL2), το αμινοτελικό (N) και καρβοξυτελικό (C) άκρο και η περιοχή PDZ. Πηγή: (Koval, 2013).

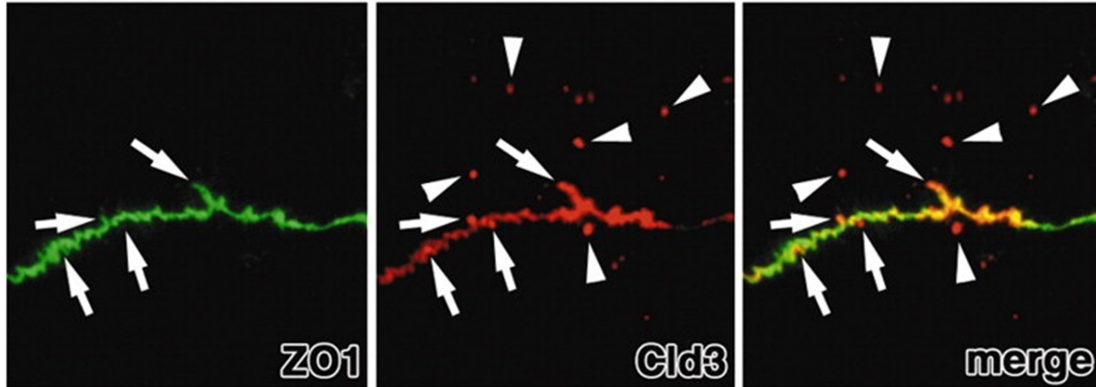
Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται ενδοκυττάρια (Oliveira & Morgado-Díaz, 2007). Στο καρβοξυλικό άκρο απαντάται το PDZ μοτίφ δέσμησης των κλωντινών με το αντίστοιχο PDZ μοτίφ δέσμησης των περιφερειακών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Poliak S, 2002). Οι εξωκυττάριας θηλιές συμμετέχουν στις ομοφιλικές ή ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις των ΑΣ. Η πρώτη θηλιά (ECS1) με μήκος περίπου 50 αμινοξέων είναι μεγαλύτερη της δεύτερης μήκους περίπου 16 αμινοξέων (ECS2). Η δεύτερη θηλιά ορισμένων κλωντινών λειτουργεί και σαν υποδοχέας για την εντεροτοξίνη του *Clostridium perfringens* (Oliveira & Morgado-Díaz, 2007), και έχει δομή έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix structure) (Koval, 2013). Οι εξωκυττάριας θηλιές δεν είναι κινητές, αλλά δυναμικές, έχοντας την ικανότητα να σπάνε

και να συμπύσσονται (anneal). Οι θηλιές ECS1 και ECS2 ενώνονται με τις αντίστοιχες των γειτονικών κυττάρων σχηματίζοντας πόρους. Οι πόροι μπορεί να αποτελούνται από τον ίδιο ή διαφορετικό τύπο κλωντίνης (Schulzke JD, 2009). Η ετερογένεια στην σύσταση των κλωντινών, η υπερέκφραση ή υποέκφραση της μιας εκ των δύο κλωντινών που απαρτίζουν την σύνδεση, επιφέρει επιλεκτικότητα στην παρακυττάρια μεταφορά υγρών.

Η κυτταροπλασματική ουρά αν και έχει σταθερό μήκος, έχει αλληλουχίες που μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στα είδη κλωντινών (Suzuki H, 2017). Στην κυτταροπλασματική ουρά περιέχονται επίσης αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την μετα-μεταφραστική ρύθμιση του μορίου της κλωντίνης. Το καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρά με ενδοκυττάρια πρωτεΐνες των ΑΣ όπως οι ZO-1, ZO-2, ZO-3, MUPP-1 και PATJ (PALS-1-associated TJ protein) μέσω του μοτιφ PDZ (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007; Koval, 2013). Η ικανότητα του καρβοξυτελικού άκρου να δεσμεύεται με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού επηρεάζει την σταθερότητα της κλωντίνης, αλλάζοντας την αναδίπλωση της (turnover) και την δυναμική μεταφορά της από την κυτταρική μεμβράνη σε ενδοκυτταρικές συσσωρεύσεις (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007). Ενδοκυττάρια, οι κλωντίνες, μέσω ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών ικριώματος, μπορούν να συνδεθούν τόσο με την τομπουλίνη των μικροσωληνίσκων όσο και με την ακτίνη του κυτταροσκελετού.

Από τα προαναφερόμενα γίνεται κατανοητό ότι οι κλωντίνες δεν δημιουργούν στατικούς ΑΣ αλλά δυναμικές δομές. Οι δομές αυτές έχουν την δυνατότητα να ενδοκυττώνονται τόσο σε παθολογικές καταστάσεις, όσο και σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική απόπτωση, η μετανάστευση κυττάρων του επιθηλίου και η διαφοροποίηση (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007). Έχουν προταθεί δύο μοντέλα που εξηγούν την ενδοκύττωση των ΑΣ. Το πρώτο μοντέλο υποστηρίζει πως πρώτα οι μεμβράνες του κάθε κυττάρου αποκολλούνται και στη συνέχεια ενδοκυττώνονται στο κύτταρο τους. Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει πως δεν γίνεται αποκόλληση των δύο μεμβρανών αλλά συν-ενδοκυττώνονται σε ένα από τα δύο κύτταρα του ΑΣ (Matsuda, et al., 2004). Κατά την μετανάστευση επιθηλιακών κυττάρων, οι πρωτεΐνες ZO-1, JAM και OCLN παρέμειναν στα όρια του συνδέσμου, ενώ η CLDN3 αποκόπηκε από τον σύνδεσμο και ενδοκυττώθηκε ξεχωριστά, δημιουργώντας ενδοκυττάρια συσσωματώματα πλούσια σε κλωντίνη (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007; Stamatovic SM, 2017). Τα σωμάτια αυτά δεν

ανακυκλώνονται ούτε στην πλασματική μεμβράνη, ούτε στον ΑΣ, αντίθετα σχηματίζουν τελικά ενδοσώματα (Matsuda, et al., 2004) (Εικόνα 11).

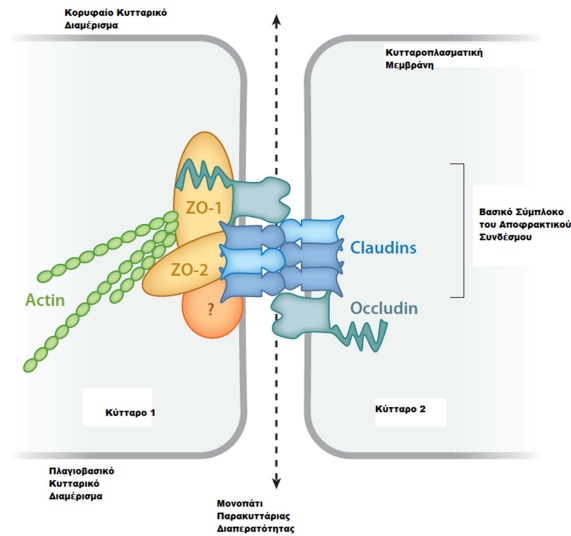


**Εικόνα 11.** Η ενδοκύττωση των αποφρακτικών συνδέσμων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Η CLDN3 (κόκκινο χρώμα) απομακρύνεται από την ZO-1 (πράσινο χρώμα) και δημιουργεί σωμάτια (βέλη). Πηγή: (Matsuda, et al., 2004).

#### 2.4. Αλληλεπιδράσεις και ρύθμιση της έκφρασης των Κλωντινών

Για την δημιουργία των ΑΣ, οι κλωντίνες αλληλεπιδρούν με τις κλωντίνες γειτονικών κυττάρων (trans interactions) ή με κλωντίνες του ίδιου κυττάρου (cis interactions). Οι τελευταίες αποτελούν μία ολιγομερή, δυναμική αλλά ασταθή σύνδεση, (Oliveira & Morgado-Díaz, 2007; Piontek A, 2017). Οι συνδέσεις των κλωντινών μπορεί να είναι ομοτυπικές (μεταξύ του ίδιου είδους) ή ετεροτυπικές (μεταξύ διαφορετικών ειδών). Μόνο η CLDN3 έχει ταυτοποιηθεί να δημιουργεί ετεροτυπικούς δεσμούς με άλλα είδη κλωντινών (όπως την CLDN -1, -2 και -5) (Koval, 2009). Οι κλωντίνες αλληλεπιδρούν επίσης με την οκκλουντίνη, μία άλλη πρωτεΐνη των ΑΣ (Εικόνα 12).





**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που σχηματίζουν τους αποφρακτικούς συνδέσμους. Διακρίνεται η σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες του ικριώματος και αυτές του κυτταροσκελετού. Πηγή: (Koval, 2013).

Μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικά είδη κλωνινών εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς. Ο συνδυασμός και η αναλογία των κλωνινών σε ένα κύτταρο είναι ενδεικτικά για την εκλεκτικότητα και την αποφρακτική ισχύ του συνδέσμου (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007; Lynn KS, 2020). Η κάθε κλωνίνη μπορεί να προάγει διαφορετική ιδιότητα φραγμού, και αυτό οφείλεται στην εκλογή φορτίου. Οι εξωκυττάριας θηλιές των κλωνινών διαθέτουν ένα σταθερό φορτίο, επηρεάζοντας ηλεκτροστατικά την εκλογή ιόντων. Σαν αποτέλεσμα, φορτισμένες και μη φορτισμένες διαλυτές ουσίες έχουν διαφορετική διαπερατότητα. Υπάρχει διαχωρισμός ανάμεσα στα ιόντα, που περνούν από τους φορτισμένους πόρους, και από τα μη φορτισμένα μόρια που περνάνε από παροδικά κενά στο δίκτυο του αποφρακτικού συνδέσμου. Οι κλωντίνες λοιπόν δεν ρυθμίζουν απλά την παρακυττάρια διαπερατότητα, αλλά δρουν ως παρακυττάρια πόροι (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007).

Η οκκλουντίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 64 kDa. Εντοπίζεται στους ΑΣ ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων. Δομικά, οι οκκλουντίνες διαθέτουν δύο εξωκυττάριας θηλιές, μία ενδοκυττάρια θηλιά, τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές και ενδοκυττάριας αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Το

καρβοξυτελικό τους άκρο είναι εκτεταμένο, και έχει την ικανότητα να συνδέεται με την ZO-1, ενώ διαθέτει ένα μόριο δέσμησης MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) (Cummins, 2011; Feldman GJ, 2005). Η οκκλουντίνη είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και την ακεραιότητα της λειτουργίας φραγμού των ΑΣ (Cummins, 2011). Η αλληλεπίδραση κλωντινών και οκκλουντίνης είναι εμφανής στον μηχανισμό ενεργοποίησης της εντεροτοξίνης του *C.perfringens*. Η εντεροτοξίνη δεσμεύεται στην δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά πολλών κλωντινών. Μετά την δέσμηση, η εντεροτοξίνη και η κλωντίνη δημιουργεί ολιγομερή που αλληλεπιδρούν με την οκκλουντίνη (Koval, 2013). Άλλο ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης εντοπίζεται στην πρώτη εξωκυττάρια θηλιά της CLDN1, που διαθέτει περιοχή δέσμησης για τις CLDN1, CLDN3 και OCLN. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να αποσυντάσει τον ΑΣ (Koval, 2013).

## 2.5. Ρύθμιση της Έκφρασης Κλωντινών

Η ρύθμιση της έκφρασης των κλωντινών γίνεται από μεταγραφικούς παράγοντες, αυξητικές ορμόνες και κινάσες. Ο μεταγραφικός αναστολέας SNAIL ρυθμίζει την μετάβαση επιθηλιακών-μεσεγχυματικών κυττάρων και καταστέλλει την έκφραση των CLDN3, -4, -7 καθώς και της OCLN (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007; Ikenouchi J, 2003). Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) επάγει την έκφραση των CLDN3 και -4 και καταστέλλει την έκφραση της CLDN2 σε επιθηλιακά κύτταρα (Singh AB, 2004). Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) επίσης μειώνει την έκφραση της CLDN1 και μειώνει την παρακυττάρια διαπερατότητα (Kojima T, 2008). Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein Kinase C, PKC) συσχετίζεται με την δημιουργία των ΑΣ (Harhaj & Antonetti, 2003). Τέλος, η ενεργοποίηση του βιοχημικού μονοπατιού MAPK οδηγεί στην υποέκφραση της CLDN2 (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007).

Οι μετά-μεταφραστικές διεργασίες επηρεάζουν την ενεργό δράση, την αλληλεπίδραση και τον εντοπισμό των κλωντινών. Σε αυτές τις διεργασίες αναφέρονται οι: φωσφορυλίωση, παλμιτοϋλίωση, ουμπικουιλίνωση, ακετυλίωση, Νιτροζυλίωση, Γλυκοζυλίωση των κλωντινών (Osanai M, 2007; Li J, 2015). Η φωσφορυλίωση των κλωντινών είναι μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση και είναι ο βασικός μηχανισμός με

τον οποίο επιτυγχάνεται η ρύθμιση της έκφρασης των κλωντινών. Η φωσφορυλίωση των κλωντινών επάγει αλλαγές στην διαπερατότητα, τόσο φορτισμένων όσο και μη φορτισμένων μορίων (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007). Η φωσφορυλίωση συμβαίνει στο καρβοξυτελικό άκρο των κλωντινών (Koval, 2013). Είναι γνωστό ότι πολλές κλωντίνες φωσφορυλιώνονται από κινάσες. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση των CLDN3 και CLDN4 από την PKA (Protein kinase A) και την PKC οδηγεί στην αύξηση της παρακυττάριας διαπερατότητας (French AD, 2009). Επιπλέον το βιοχημικό μονοπάτι MAPK/ERK συμμετέχει στη φωσφορυλίωση των κλωντινών. Το μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK αποτελείται από μία μικρή πρωτεΐνη G (RAS) και τρεις κινάσες (RAF, ERK, MEK) (Ikari A, 2012). Η ενεργοποίηση του από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα RTK (Receptor Tyrosine Kinase) επιφέρει μετατόπιση του ERK στον πυρήνα του κυττάρου και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων έκφρασης γονιδίων (McCain, 2013). Παράδειγμα αποτελεί η φωσφορυλίωση της CLDN1 στα κύτταρα του ενδοθηλίου, από το μονοπάτι MAPK, ενισχύει την λειτουργία φραγμού, πιθανώς μέσω της έκφρασης της κλωντίνης στους ΑΣ (Oliveira & Morgado-Diaz, 2007). Ο μηχανισμός με τον οποίο η φωσφορυλίωση των κλωντινών μεταβάλλει την διαπερατότητα πιθανώς εντοπίζεται στις αλλαγές των αλληλεπιδράσεων της κλωντίνης με τις πρωτεΐνες του ικριώματος (Koval, 2013). Επίσης η παλμιτοϋλίωση ενισχύει την σύνδεση των κλωντινών με τη κυτταρική μεμβράνη. Εφόσον οι ΑΣ θεωρούνται περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, με την παλμιτοϋλίωση οι κλωντίνες μπορούν να αυξήσουν την διακυτταρική αντίσταση (Rajagopal N, 2019)

## **2. 6. ALI/ARDS και Αποφρακτικοί Σύνδεσμοι**

Η διαταραχή της ακεραιότητας των αποφρακτικών συνδέσμων είναι χαρακτηριστική στο ALI/ARDS με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα του κυψελιδικού φραγμού και τη μειωμένη κάθαρση των υγρών στους αεραγωγούς (Overgaard CE, 2012). Οι αλλαγές στην διαπερατότητα τόσο των ιόντων, όσο και των μακρομορίων στο κυψελιδικό επιθήλιο έχουν άμεση σχέση με την παθογένεια του συνδρόμου (Frank, 2012). Στο πνευμονικό επιθήλιο εκφράζονται 14 διαφορετικά είδη κλωντινών, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο RNA (Soini, 2011).

Οι κυρίαρχες κλωντίνες που εκφράζονται από το κυψελιδικό επιθήλιο είναι η CLDN3, η CLDN4 και η CLDN18 (LaFemina MJ, 2010). Ωστόσο, οι λειτουργίες τους μπορούν να επηρεαστούν από την παρουσία και άλλων μελών της οικογένειας των κλωντινών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η έκφραση της CLDN5 και CLDN7 σχετίζονται με μειωμένη και αυξημένη λειτουργία κυψελιδικού φραγμού, αντίστοιχα (Wang F, 2003). Η έκφραση των κλωντινών δεν είναι ομοιόμορφη σε όλους τους τύπους κυττάρων του πνευμονικού παρεγχύματος. Απεναντίας τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και II εμφανίζουν ξεχωριστά μοτίβα έκφρασης των κλωντινών, με πιο εμφανή διαφορά την υπερέκφραση της CLDN3 στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Αντίθετα, η CLDN4 υπερεκφράζεται κατά τη διάρκεια οξείας πνευμονικής βλάβης. Η CLDN18 εκφράζεται και στους δύο τύπους πνευμονοκυττάρων και απουσιάζει από το άνω αναπνευστικό επιθήλιο. Το καρβοξυλικό άκρο της CLDN18 είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτό των άλλων κλωντινών, υποδηλώνοντας καλύτερη σύνδεση με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, συμβάλλοντας έτσι στην δημιουργία κυψελιδικού φραγμού.

Το οξειδωτικό stress επάγει την παραγωγή του παράγοντα TGF- $\beta$  ο οποίος επιδρά στην λειτουργία των κυψελιδικών φραγμών προάγοντας την επιθηλιακή-μεσεγχυματική εξαλλαγή, κατά την διάρκεια της πνευμονικής βλάβης (Pittet JF, 2001; Kasai H, 2005). Σε πειραματικά μοντέλα με πνευμονική βλάβη λόγω VILI, η CLDN4 υπερεκφράζεται και συσχετίζεται με υποχώρηση της βλάβης. Αντίθετα η έκφραση των CLDN3 και CLDN18 παραμένει αμετάβλητη ως απόκριση στο VILI (Wray C, 2009). Αντίθετα στην σήψη η CLDN4 υποεκφράζεται και συσχετίζεται με την βαρύτητα της πνευμονικής βλάβης. Όλα αυτά μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε ότι η έκφραση της CLDN4 εξαρτάται από τον φαινότυπο ή το μικροπεριβάλλον, ενώ αντίθετα άλλες κλωντίνες, όπως η CLDN18, εκφράζονται και ρυθμίζονται ομοιόμορφα (Wang F, 2003; Koval M, 2010). Επιπλέον η CLDN4 δημιουργεί συνδέσμους βασιζόμενους σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις με άλλη CLDN4. Αντίθετα οι A $\Sigma$  που δημιουργούνται από την CLDN3, στηρίζονται σε ένα ευρύ φάσμα ετεροτυπικών αλληλεπιδράσεων με άλλες κλωντίνες (Daugherty BL, 2007).

Η CLDN7 εκφράζεται σε όλη την αναπνευστική οδό τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όσο και στον ενήλικο πνεύμονα. Η συμμετοχή της στην διαπερατότητα του επιθηλίου είναι δύσκολο να αποδειχτεί, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της CLDN7 είναι σε μεγάλο βαθμό ευαίσθητη στο περιβάλλον (Günzel D, 2013). Η CLDN5 εκφράζεται

κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και της πνευμονικής μικροκυκλοφορίας. Η CLDN5 εκφράζεται επίσης σαφώς από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών. Τα υψηλά επίπεδα της CLDN5 στο ενδοθήλιο, τείνουν να αποκρύπτουν την ικανότητα ανίχνευσης της έκφρασης της CLDN5 από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα σε ιστολογικές τομές. Όμως τα επίπεδά της είναι ανιχνεύσιμα τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνών (Wang F, 2003). Αντιφατικά είναι και τα δεδομένα που σχετίζονται με την δράση της CLDN5 στην διαπερατότητα του κυψελιδικού φραγμού. Είναι πιθανό ότι η CLDN5 έχει προστατευτικό ρόλο αυξάνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού, ενώ η υπερέκφρασή της μειώνει τη λειτουργία των κυψελιδικών επιθηλιακών φραγμών (Jang AS, 2011),

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**  
**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης τη πρωτεΐνης των αποφρακτικών συνδέσμων CLDN3, υπό την επίδραση της ιντερλευκίνης IL-1β σε πειραματικό μοντέλο πνευμονικής βλάβης.

#### 3.1 Υλικά και Μέθοδοι

##### 3.1.1. Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου πνευμονικής βλάβης

Στα πλαίσια της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες μύες (8-10 εβδομάδων) C57/BL6 και IL-1β -/- strain C57/BL6, βάρους 24±2 gr. Η πνευμονική βλάβη προκλήθηκε με ενδοτραχειακή χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη βακτηριακής προέλευσης (LPS) σε συγκέντρωση 3mg/Kgr διαλυμένο σε φυσιολογικό ορό. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από μύες στους οποίους χορηγήθηκε ενδοτραχειακά phosphate buffered saline (PBS). Μετά την χορήγηση LPS ή PBS εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά χρονικά σημεία των 6 και 24 ωρών (Gustavo Matute-Bello). Ο διαχωρισμός των ζώων στις ομάδες περιγράφεται στον Πίνακα 3

**Πίνακας 3:** συγκεντρωτικός πίνακας των πειραματόζων ανά είδος, χωρισμένα σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το είδος της ενδοτραχειακής χορήγησης και το χρονικό σημείο επώασης

Ομάδα	Τύπος μυών	χορήγηση	Χρονικό σημείο	Αριθμός μυών
A	C57BL / 6	PBS	6 ώρες	n = 4
B	C57BL / 6	LPS	6 ώρες	n = 6
Γ	C57BL / 6	PBS	24 ώρες	n = 4
Δ	C57BL / 6	LPS	24 ώρες	n = 6
E	IL-1β -/-	PBS	6 ώρες	n = 4
ΣΤ	IL-1β -/-	LPS	6 ώρες	n = 6
Z	IL-1β -/-	PBS	24 ώρες	n = 4
H	IL-1β -/-	LPS	24 ώρες	n = 6

Τα πειραματόζωα παρέμειναν σε ειδικό χώρο του πειραματικού χειρουργείου του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός», που διαθέτει δωδεκάωρη εναλλαγή φωτός-σκότους και ελεύθερη πρόσβαση των ζώων σε τροφή και νερό. Οι IL-1β <sup>-/-</sup> strain C57/BL6 μύες ήταν δωρεά του καθηγητή Γεώργιου Σταθόπουλου, τμήμα «Μοριακή Καρκινογένεση Αναπνευστικού», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα. Όλοι οι μύες εκτράφηκαν στην Ερευνητική Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός». Το πρωτόκολλο διεκπεραιώθηκε μετά από άδεια, από την αρμόδια Εθνική Επιτροπή για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

### 3.1.2. Ενδοτραχειακή Χορήγηση LPS

Για την δημιουργία του πειραματικού μοντέλου χρησιμοποιήθηκε λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide ή LPS) βακτηριακής προέλευσης. Το LPS είναι ένα γλυκολιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης Gram αρνητικών βακτηρίων. Στον ορό, το LPS δεσμεύεται με την πρωτεΐνη πρόσδεσης λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide Binding Protein ή LPB). Το σύμπλοκο LPB/LPS ενεργοποιεί τους υποδοχείς CD14/TLR-4 που βρίσκονται στα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα, ενεργοποιώντας την παραγωγή διαμεσολαβητών φλεγμονής, τον εγκλωβισμό πολυμορφοπύρηνων στα πνευμονικά τριχοειδή, με μετέπειτα μετανάστευση τους στους αεραγωγούς. Το LPS σαν σημαντικός μεσολαβητής πνευμονικής βλάβης και αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος, χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικά μοντέλα (Matute-Bello & Matthay).

Η ενδοτραχειακή έκχυση LPS έγινε κατόπιν χορήγησης ολικής αναισθησίας (μείγμα Κεταμίνη/Ξυλαζίνη, με αναλογία 0,9:0,2 mg/ml) ενδοπεριτοναϊκά και σε αναλογία 1/10 του βάρους του ζώου. Το αναισθητοποιημένο πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε κατάλληλη θέση και έγινε μικρή τομή στην τραχηλική χώρα. Η τραχεία αποκαλύφθηκε και με την χρήση βελόνας ινσουλίνης εγχύθηκε απευθείας σε αυτή ποσότητα LPS ίση με 50μl και συγκέντρωσης 3mg/kg (Matute-Bello G & Group.). Ακολούθησε άμεσος ευθειασμός της τραχείας, με την τοποθέτηση του πειραματόζωου σε όρθια θέση, ώστε να εξασφαλισθεί η κάθοδος του LPS στους πνεύμονες λόγω της βαρύτητας. Έγινε συρραφή των ιστών και του δέρματος με ράμμα και ακολούθησε ανάνηψη των μυών (η



πλήρης ανάνηψη συνήθως επιτυγχάνεται σε 30 λεπτά), κατά την οποία πραγματοποιείται οφθαλμική ενστάλλαξη φυσιολογικού ορού για να αποφευχθεί η ξήρανση των κερατοειδών, και συνεχής παροχή οξυγόνου. Κατόπιν οι μύες επέστρεψαν στους κλωβούς και κάτω από σταθερές συνθήκες πειραματισμού παρέμεινα για 6 ή 24 ώρες. Με το πέρας των χρονικών ορίων και κάτω από γενική αναισθησία, έγινε συλλογή:

1. βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) από τον δεξιό πνεύμονα
2. πνευμονικού ιστού από τον αριστερό και δεξιό πνεύμονα.

Ακολούθησε ευθανασία των πειραματόζων με διατομή της κάτω κοίλης φλέβας και της κοιλιακής αορτής (Hill).

## **3.2. Συλλογή Βιολογικών Δειγμάτων**

### **3.2.1. Συλλογή BAL**

Η συλλογή BAL πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενδοτραχειακού καθετήρα 20G. Ο καθετήρας τοποθετήθηκε στην τραχεία μετά από μικρή διάνοιξη και σταθεροποιήθηκε με την χρήση ράμματος. Έπειτα, ο αεραγωγός του αριστερού πνεύμονα έκλεισε με clip. Στον δεξιό πνεύμονα πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλήσεις με φυσιολογικό ορό 0,9% (natural saline), όγκου 400 μl κάθε φορά. Κάθε έκπλυση BALF αποθηκεύτηκε σε ξεχωριστά σωληνάκια των 1,5 ml για περαιτέρω ανάλυση.

### **3.2.2. Συλλογή Πνευμονικού Ιστού**

Μετά την συλλογή του BALF ακολούθησε η αφαίρεση των λοβών του δεξιού πνεύμονα, αφού έγινε φραγή του αεραγωγού με τη χρήση ράμματος και η μονιμοποίηση του σε υγρό άζωτο. Στον αριστερό πνεύμονα, μέσω καθετήρα έγινε έγχυση φορμόλης, ο λοβός αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο των 2ml με μονιμοποιητικό φορμόλη buffer για περαιτέρω ιστολογική επεξεργασία.

### 3.3 Ιστολογική Επεξεργασία

Ο αριστερός πνεύμονας επεξεργάστηκε κάτω από κλασικές ιστολογικές τεχνικές προκειμένου να εγκλειστεί σε παραφίνη. Για τον λόγο αυτό αφυδατώθηκε με τη χρήση αλκοολών με βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης. Η διαδικασία αφυδάτωσης έγινε ως εξής:

1. 80% αιθανόλη για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου X2
2. 95% αιθανόλη για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου X2
3. 100% αιθανόλη για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου X2

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαύγαση του ιστού με τη χρήση ξυλόλης για 45min σε θερμοκρασία δωματίου x2

Ακολούθησε ο διαποτισμός των ιστών με υγρή παραφίνη για 2h στους 60 °C X2

Τέλος, έγινε έγκλιση των ιστών σε κύβους παραφίνης. Με τη χρήση μικροτόμου παραφίνης, λήφθηκαν τομές πάχους 5μm και τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι τομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν για χρώση ανοσοϊστοχημείας τοποθετήθηκαν σε ηλεκτρικά φορτισμένα πλακάκια.

#### 3.3.1. Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της πνευμονικής βλάβης. Οι τομές του αριστερού πνεύμονα πάχους 5μm τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ολονύχτια στους 58°C. Με την παραμονή στον κλίβανο η τομή μονιμοποιήθηκε στο πλακάκι. Για την αποπαραφίνωση χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της Diarath (Diarath S.p.A.). Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ακολούθησε το κλασικό εργαστηριακό πρωτόκολλο:

1. Αποπαραφίνωση των τομών με:
  - Ottix Plus 8min X2
  - Ottix Shaper 5min X2

2. Ενυδάτωση με νερό βρύσης για λίγα λεπτά
3. Χρώση Αιματοξυλίνης 6min
4. Ξέπλυμα σε νερό βρύσης
5. Χρώση Ηωσίνης 2min
6. Αφυδάτωση των τομών
  - Εμβαπτίσεις σε Ottix Shaper X2
  - Εμβαπτίσεις σε Ottix Plus X2
7. Κάλυψη και μικροσκόπηση

### 3.3.2. Χρώση Ανοσοϊστοχημείας

Η χρώση ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στην *in situ* δέσμευση αντιγόνου-αντισώματος. Στην παρούσα μελέτη για την ιστοχημική ανίχνευση της CLDN3, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης EnVision FLEX (DAKO Agilent Technologies) με την χρήση του ενζύμου υπεροξειδάσης και χρωμογόνο διαμινοβενζιδίνη (DAB). Ως εκ τούτου τομές παραφίνης από τον αριστερό πνεύμονα πάχους 5μm τοποθετήθηκαν σε κλίβανο ολονύχτια στους 58°C. Ακολούθησε αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση αυτών σε Ottix Plus για 10min X2 (Diapath), η αφυδάτωση των τομών έγινε με εμβάπτιση αυτών σε Ottix Shaper (Diapath), για 5min X2 και τέλος η ενυδάτωση έγινε με παραμονή των τομών σε νερό βρύσης μέχρι να διαυγάσει ο ιστός.

Η αποκάλυψη των ιστικών αντιγόνων έγινε με την χρήση κοινού ατμομάγειρα, σε θερμό και υγρό περιβάλλον. Οι τομές εμβαπτίστηκαν σε 1X EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (DAKO Agilent Technologies) για 30 min. Μετά το πέρας της διαδικασίας οι τομές τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 25 min. Ακολούθησε ξέπλυμα των τομών σε νερό βρύσης και μετά σε αποσταγμένο νερό για 3min. Το σκέπασμα των μη ειδικών υποδοχέων, που μπορεί να δώσουν ψευδή αποτελέσματα, έγινε με επώαση των τομών σε υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)σε συγκέντρωση 3% για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό

διάλυμα Tris/HCl/Tween 20, pH 7.6 για 3min (DAKO Wash buffer 10x, DAKO Agilent Technologies).

Οι τομές επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της CLDN3 (Claudin 3 Polyclonal Antibody, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), αραιωμένο 1:150 σε διάλυμα Dako Ab Diluent (DAKO Agilent Technologies) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης οι τομές ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl/Tween 20, pH 7.6 για 10min X2. Η σύνδεση του ιστικού αντιγόνου με το CLDN3 αντίσωμα, επώαστηκε με το EnVision™+ System, HRP (DAKO Agilent Technologies) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το EnVision™+ System, HRP αποτελείται από ένα πολυμερές το οποίο περιέχει μία πληθώρα δευτερογενών αντισωμάτων (αντι-ποντικού ή αντι-κουνελιού), συνδεδεμένα απευθείας με ραχοκοκαλιά δεξτράνης που περιέχει ένζυμο HRP. Ένα πολυμερές σύζευξης περιέχει έως και 100 μόρια ενζύμου HRP, προσδίδοντας ευαισθησία στην μέθοδο. Ακολούθησε ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl/Tween 20, pH 7.6 για 10min X2. Το ανοσοσύμπλεγμα έγινε ορατό με την προσθήκη Liquid DAB+ Substrate-Chromogen (DAKO Agilent Technologies) το οποίο περιέχει χρωμογόνο 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Οι τομές επώαστηκαν με το χρωμογόνο για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταματάτησε με το ξέπλυμα των τομών σε νερό βρύσης. Οι πυρήνες των κυττάρων βάφτηκαν με Gill hematoxylin (Sigma-Aldrich) για 3 min. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών με εμβαπτίσεις σε Ottix Shaper X2, διαύγαση των τομών με εμβαπτίσεις σε Ottix Plus X2 και τέλος κάλυψη των τομών.

### 3.3.3. Κυτταρολογική Επεξεργασία του BALF

Το BALF φυγοκεντρήθηκε στις 250 rpm στους 4°C για 10min. Το υπερκείμενο αποθηκεύθηκε στους -80°C ενώ το ίζημα (pellet) αραιώθηκε σε φυσιολογικό ορό, με όγκο ίσο με τον αρχικό (1ml). Από το εναιώρημα, 20ml αναμίχθηκαν με 20ml Tripton Blue. Το Tripton Blue διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη νεκρών κυττάρων, δίνοντας τους μπλε χρώση, ενώ αφήνει τα ζωντανά κύτταρα άχρωμα. Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων υπολογίστηκε με καταμέτρηση σε πλάκα Neubauer. Από το εναιώρημα, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 50,000 κύτταρα χρησιμοποιήθηκε για cytospin. Συγκεκριμένα, με τη χρήση

ειδικού υποδοχέα και διηθητικού χαρτιού, περίπου 100μl ελαιωρήματος, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ενώ ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ειδική φυγόκεντρο Cytospin 3 (Thermo Shandon Cytospin 3), στις 450 rpm για 6 min. Ακολούθησε η χρώση των cytospin με τροποποιημένη May Grunwald - Giemsa για BALF:

#### Πρωτόκολλο May Grunwald - Giemsa

1. Μεθανόλη για 5min
2. May Grunwald για 20min
3. Giemsa για 30min
4. Ρυθμιστικό διάλυμα sorensen pH 6,8 (Na/K phosphate 0,005M) για 5min
5. Πλύση με αποσταγμένο νερό
6. Στέγνωμα και κάλυψη με καλυπτρίδα.

Τα πλακάκια μικροσκοπήθηκαν και μετρήθηκε το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων, μεγάλων μονοπύρηνων, μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων σε 300 συνολικά κύτταρα.

### **3.4. Πρωτεϊνική Ανάλυση**

#### **3.4.1. Εκχύλιση Πρωτεϊνών**

Ολικές πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν από τον δεξιό πνεύμονα του πειραματόζωου. Για τον λόγο αυτό, σε 10 μg ιστού προστέθηκαν 300μl RIPA buffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer, Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού ραδιοανοσοκατακρήμνισης) και ομογενοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρικού ομογενοποιητή (Tissue-Tearor - Thomas Scientific), πάνω σε πάγο. Το ομογενοποιημένο διάλυμα επώαστηκε για 20min σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10,000xg στους 4°C. Το υπερκείμενο, που αντιπροσωπεύει την ολική πρωτεΐνη του πνευμονικού ιστού, συλλέχθηκε σε σωληνάρια των 1,5ml. Η ολική πρωτεΐνη φυλάχθηκε στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

### **3.4.2. Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στον ιστό**

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο πνευμονικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε το DC Protein Assay σύστημα της Bio-Rad (BIO - RAD LABORATORIES). Η μέθοδος βασίζεται στην χρωμογόνο δοκιμή κατά Lowry (Lowry Assay). Η καμπύλη αναφοράς έγινε με την χρήση διαλύματος BSA (Bovine Serum Albumin) σταθερής συγκέντρωσης. Κατά την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 5μl εκχυλίσματος και η μέθοδος διεκπεραιώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, σε 96well plate. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 750nm χρησιμοποιώντας Tecan Microplate Reader (Tecan Group Ltd). Η τελική συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης έγινε με την γραμμική συσχέτιση των μεγεθών απορρόφησης και της αντίστοιχης συγκέντρωσης του προτύπου, με χρήση του software Excell.

### **3.5. Στύπωμα κατά Western (Western Blot)**

#### **3.5.1. Αρχή Μεθόδου**

Το Western Blot είναι μια ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδος απεικόνισης των πρωτεϊνών, κατά την οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης και με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η τελευταία, καθορίζεται από παράγοντες όπως το μοριακό τους βάρος, τη δευτεροταγή δομή τους, καθώς και οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται. Κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετικό μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο (Scopes & Smith).

#### **3.5.2. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS, DTT). Για την πρωτεΐνη CLDN3 χρησιμοποιήθηκε SDS-PAGE 15%, για την ERK1/2, SDS-PAGE 12% και για την IKKα/β, SDS-PAGE 6%. Για τα πηκτώματα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης της Bio-Rad (mini protean, BioRad). Η σύσταση των πηκτωμάτων διαχωρισμού (resolving gel) παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων όπως χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αναφέρονται επίσης και τα συστατικά του πηκτώματος.

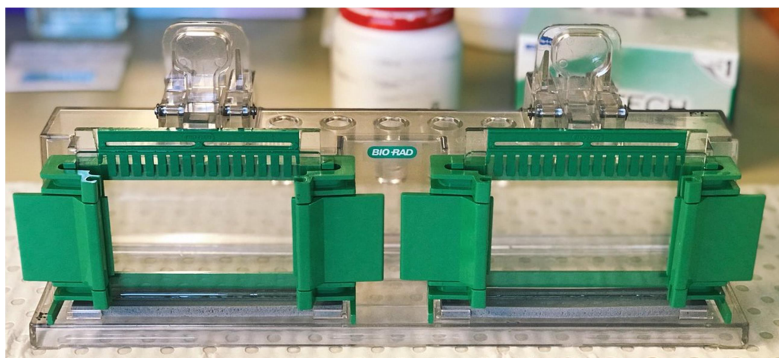
Πυκνότητα πηκτώματος	15%	12%	6%
<b>Απεσταγμένο H<sub>2</sub>O</b>	3,75	5,25 ml	4.7 ml
<b>30% ακρυλαμιδίου /δισ-ακρυλαμιδίου</b>	7,50 ml	6,00 ml	2.7 ml
<b>Tris-HCl 1.5M pH 8,8</b>	3,75ml	3,75ml	3,75ml
<b>10% SDS</b>	100 μl	100 μl	100 μl
<b>20% AMPS</b>	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
<b>TEMED</b>	0,01ml	0,01ml	0,01ml

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συναρμολογήθηκε και το πήκτωμα διαχωρισμού προστέθηκε στην συσκευή, με πολύ προσοχή, προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα, καλύφθηκε με αποσταγμένο νερό και αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο νερό διευκολύνει τη συμπαγή δομή του πηκτώματος και σταθεροποιεί την επάνω επιφάνειά του, ενώ μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος το νερό απομακρύνθηκε. Στην παρούσα μελέτη το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι μη συνεχές και εκτός από το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving), περιελάμβανε στο επάνω μέρος και το πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking) Πίνακας 5.

**Πίνακας 5:** Σύσταση πηκτώματος συμπύκνωσης περιεκτικότητας 5% σε ακρυλαμίδιο

Πυκνότητα πηκτώματος	5%
Απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	3,4 ml
30% ακρυλαμιδίου /δις-ακρυλαμιδίου	0,83 ml
4xTris-Cl (1,0M, pH 6,8)	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
20% AMPS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Το πήκτωμα συμπύκνωσης προστέθηκε στην συσκευή μαζί με χτένι (comb) των 15 εσοχών (wells) πάχους 1,5mm και χωρητικότητας 35μl. Η δημιουργία εσοχών επιτρέπει την προσθήκη των δειγμάτων στο πήκτωμα. Το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 13). Σε αυτό το χρονικό διάστημα έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων. Με την ολοκλήρωση του χρόνου πολυμερισμού του πηκτώματος συμπύκνωσης, το χτένι απομακρύνθηκε και η συσκευή προσαρμόστηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στις εσοχές του πηκτώματος συμπύκνωσης, καθώς και στο δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης αναφέρεται στο παράρτημα.



**Εικόνα 13:** Συναρμολόγηση της συσκευής και τοποθέτηση των πηκτωμάτων προκειμένου να γίνει ο πολυμερισμός τους. Τα χτένια επιτρέπουν την δημιουργία θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων. Τα πηκτώματα πολυμερίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.



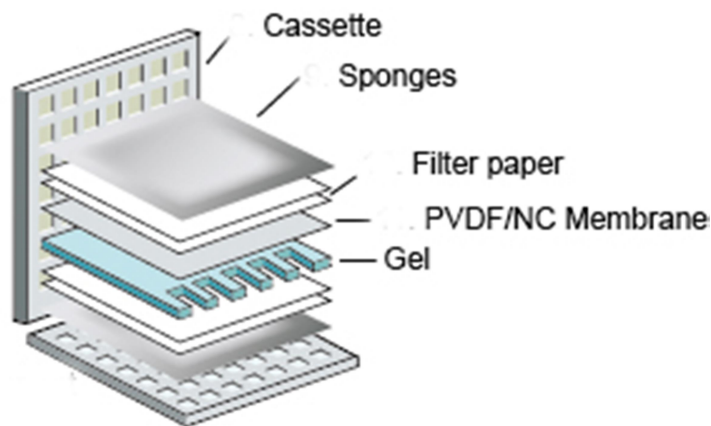
Στην πρώτη εσοχή του πήκτωματος προστέθηκε πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακού βάρους 10-250 KDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Στις υπόλοιπες εσοχές τοποθετήθηκαν 30μl πρωτεΐνης συγκέντρωσης 30μg από κάθε δείγμα. Η συσκευή συνδέθηκε με ηλεκτρικό τροφοδοτικό, εφαρμόστηκε σταθερή τάση 100 Volt με αποτέλεσμα τη μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό στο θετικό πόλο του συστήματος. Η απόσταση που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στο πήκτωμα διαχωρισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της μοριακής μάζας της.

### **3.5.3. Προετοιμασία δειγμάτων**

Με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίστηκε ποσότητα πρωτεΐνης 30μg. Η ποσότητα αυτή τοποθετήθηκε σε 1,5 ml σωληνάριο και συνδυάστηκε με 5× ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος αναφέρεται στο παράρτημα. Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 10 min. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 3 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (spin down) για τουλάχιστον 1 sec σε μικροφυγόκεντρο. Κατόπιν τοποθετήθηκαν στις εσοχές του πήκτωματος προς ηλεκτροφόρηση.

### **3.6. Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) προκειμένου να γίνει η ανίχνευση αυτών με συγκεκριμένα αντισώματα. Για τον λόγο αυτό το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κασέτα με στερεό υπόστρωμα που περιλαμβάνει ένα σφουγγάρι Scotch-Brite (Scotch-Brite Pad) και δύο φύλλα διηθητικό χαρτί Whatman. Η μεμβράνη PVDF (millipore immobilon-P transfer membrane, Millipore Corp) ενεργοποιήθηκε σε μεθανόλη 100%, ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε με προσοχή πάνω από το πήκτωμα, προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα. Ακολούθησε η τοποθέτηση στερεού υποστρώματος, δηλαδή, δύο φύλλα διηθητικό χαρτί Whatman και τέλος ένα σφουγγάρι Scotch-Brite (Scotch-Brite Pad) (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Σχηματική παράσταση της δημιουργίας σάντουιτς προκειμένου να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην μεμβράνη PVDF.

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας όλα τα υλικά ήταν διαποτισμένα με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς αναφέρεται στο παράρτημα. Η κασέτα τοποθετήθηκε στο ειδικό δοχείο μεταφοράς με τρόπο ώστε η μεμβράνη PVDF να βρίσκεται από την πλευρά του θετικού πόλου. Στην συσκευή προστέθηκε επιπλέον ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς και συνδέθηκε με ηλεκτρικό τροφοδοτικό. Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε με την εφαρμογή σταθερή τάσης 100 Volt για 1 ¼ ώρες. Ο χρόνος και η τάση εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα (Gallagher, Winston, Fulle, & Hurrell). Δόθηκε προσοχή στην υπερθέρμανση της συσκευής και γιαυτό τοποθετήθηκε εξωτερικά πάγος.

### 3.7. Ανίχνευση πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με διάλυμα 5% γάλακτος-διαλύματος έκπλυσης (Blocking Buffer, 2.5g σκόνη γάλακτος σε 50mL TBS) υπό συνεχή ανάδευση. Με τον τρόπο αυτό γίνεται δέσμευση μη ειδικών θέσεων που δυνητικά θα μπορούσε το πρωτογενές αντίσωμα να συνδεθεί και να δώσει μη ειδικό σήμα. Ακολούθησε εκτενές πλύσιμο της μεμβράνης με Tris Buffer Saline-Tween 20 0,2% (TBS-T) υπό συνεχή ανάδευση, συχνές αλλαγές του TBS-T και σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύσταση του διαλύματος TBS-T δίνεται στο παράρτημα. Στη συνέχεια έγινε επώαση

της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα, ολονύκτια, στους 4<sup>0</sup>C, υπό συνεχή ανάδευση. Σαν πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Ακτίνη. Τα αντισώματα αραιώθηκαν 1:100 σε TBS-T, εκτός της ακτίνης που αραιώθηκε 1:10000.

Μετά το πέρας της επώασης ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης με συνεχείς αλλαγές TBS-T και σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με δευτερογενές αντίσωμα Anti-Rabbit IgG HRP-linked αραιωμένο 1:2000 σε TBS-T. Για την Ακτίνη χρησιμοποιήθηκε Anti-Mouse IgG HRP-linked αραιωμένο 1:5000 σε TBS-T. Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της διαδικασίας ακολούθησε ξέπλυμα με συνεχείς αλλαγές TBS-T και σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την ανοσοαποτύπωση του συμπλέγματος Ab-Ag χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL Super Signal West Femto (Pierce, Thermo Scientific). Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα Luminol: Peroxide Solution και σε αναλογία 1:1, για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η αντίδραση παράγει παρατεταμένη χημειοφωταύγεια που μπορεί να εμφανιστεί σε ακτινογραφικό φιλμ ή σε σύστημα απεικόνισης. Η περίσσεια του ECL Super Signal West Femto απορρίφτηκε και η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα. Η εμφάνιση έγινε σε σκοτεινό δωμάτιο, με φωτοευαίσθητο φιλμ αυτοραδιογραφίας AGFA (AGFA film GmbH). Η εμφάνιση του φιλμ έγινε σε ειδικό μηχάνημα εκτύπωσης της AGFA.

Οι σκουρόχρωμες ζωνώσεις (μπάντες) που εμφανίστηκαν στο φιλμ, αντιστοιχούν στις ζώνες της πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα. Ακολούθησε ημιποσοτική μέτρηση των ζωνώσεων με την χρήση κατάλληλου λογισμικού (Gel-pro analyzer 3.0).

### **3.8. Διαδοχικές ανοσοανιχνεύσεις πρωτεϊνών**

Ο όρος stripping χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απομάκρυνση του συζεύγματος πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος από την μεμβράνη. Το stripping χρησιμοποιείται κυρίως όταν μετρούνται περισσότερες από μία πρωτεΐνες στην ίδια μεμβράνη. Πρέπει να σημειωθεί πως επανειλημμένα stripping αφαιρούν ποσότητα πρωτεϊνών από την μεμβράνη. Στην παρούσα μελέτη η διαδικασία του stripping έγινε ως εξής: Η μεμβράνη επώαστηκε σε mild stripping buffer (βλέπε παράρτημα) για 1 ώρα, με

συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε εκτενή έκπλυση της μεμβράνης, με TBS-T και συνεχείς αλλαγές αυτού, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, προκειμένου να γίνει διαδοχική ανοσοανίχνευση άλλης πρωτεΐνης, ακολουθείτε το πρωτόκολλο όπως περιγράφηκε πιο πάνω.

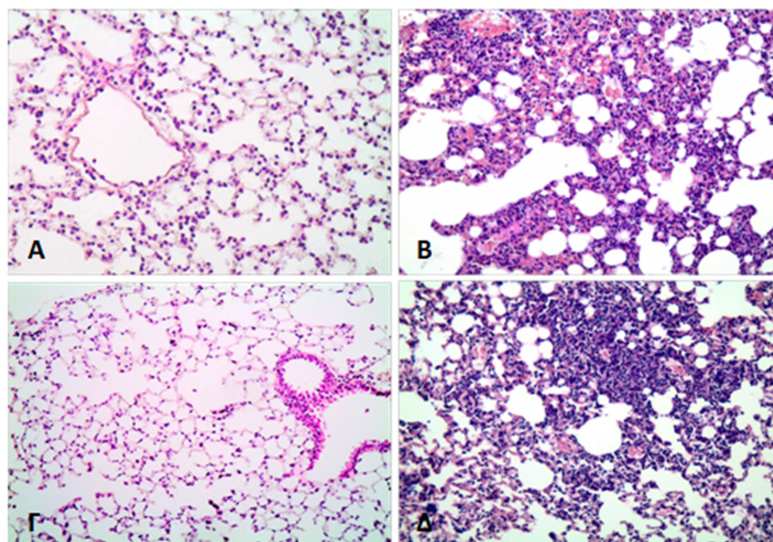
### 3.9. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση λογισμικού προγράμματος SPSS (αριθμός έκδοσης 20). Για την σύγκριση των μέσων τιμών ανάμεσα στις ομάδες χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA) και το μη παραμετρικό test Kruskal-Wallis. Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των τιμών μεταξύ των ομάδων έγινε με το Mann-Whitney test. Ο έλεγχος της συσχέτισης (συντελεστής Spearman) μεταξύ ομάδων έγινε με έλεγχο του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficients). Διαφορές  $p < 0.005$  θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### 4.1. Εκτίμηση της Πνευμονικής βλάβης

Ο δεξιός πνεύμονας των πειραματόζων συλλέχθηκε και επεξεργάστηκε σύμφωνα με το πρότυπο παθολογοανατομικό πρωτόκολλο. Τομές παραφίνης χρωματίστηκαν με Αιματοξυλίνη Ηωσίνη, μικροσκοπήθηκαν και πάρθηκαν φωτογραφίες με ψηφιακή κάμερα (Olympus BX53M, OLYMPUS CORPORATION)

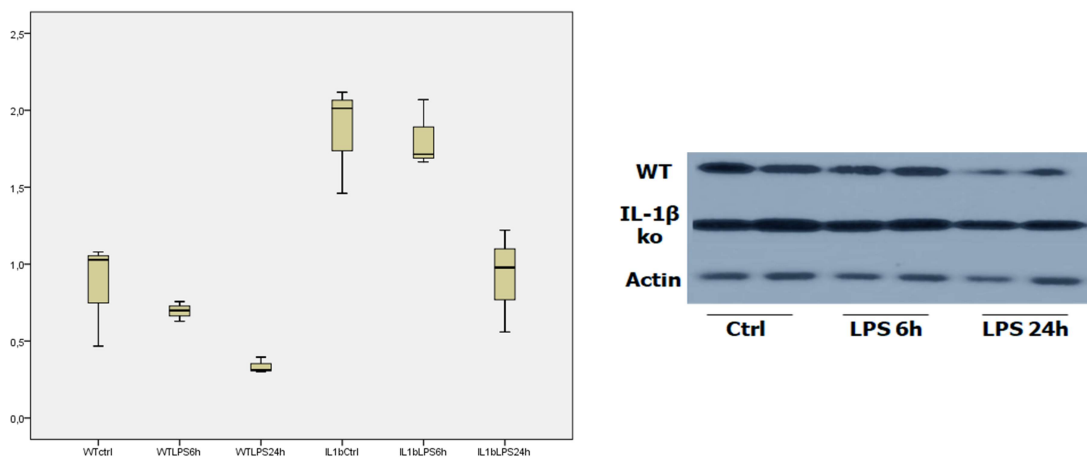


**Εικόνα 15:** Τομές παραφίνης πνευμονικού παρεγχύματος με χρώση Αιματοξυλίνης Ηωσίνης. Α: Τομή από την WT-ομάδα ελέγχου. Β: Τομή από την ομάδα WT/LPS 24 ώρες. Παρατηρείται σύμπτυξη των κυψελίδων λόγω πνευμονικής βλάβης καθώς και ενδοκυψελιδική αιμορραγία. Γ: Τομή από την ομάδα ελέγχου των IL1β κο μυών. Δ: Τομή από την ομάδα IL1β κο /LPS 24 ώρες. Παρατηρείται διαπήδηση φλεγμονωδών κυττάρων και έκπτωση του πνευμονικού παρεγχύματος. Μεγέθυνση Χ40.

Μικροσκοπική παρατήρηση των τομών έδειξε ότι η χορήγηση LPS για 6 ώρες επιφέρει πάχυνση της κυψελιδικής μεμβράνης και διαπήδηση φλεγμονωδών κυττάρων κυρίως μακροφάγων στο πνευμονικό παρέγχυμα. Στις 24 ώρες χορήγησης LPS, οι βλάβες επεκτείνονται με έκπτωση των κυψελίδων, έντονη παρουσία πολυμορφοπύρηνων κυττάρων, ενδοκυψελιδική αιμορραγία και πάχυνση του τοιχώματος των κυψελίδων. Όλα τα ευρήματα συνηγορούν στην μετρίου βαθμού έως βαριά πνευμονική βλάβη.

## 4.2. Έκφραση της CLDN3

Η CLDN3 εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των κλωντινών, όμως εμφανίζει ιδιαιτερότητες όσον αφορά την έκφραση της. Η παρουσία και ο ρόλος της CLDN3 στην πνευμονική βλάβη παραμένει άγνωστη. Για τον λόγο αυτό, σε WT και IL1β ko μύες προκλήθηκε πνευμονική βλάβη με ενδοτραχειακή χορήγηση LPS. Η έκφραση της CLDN3 αναλύθηκε με στύπωμα κατά Western. Ημιοσοτική ανάλυση έγινε με την χρήση λογισμικού Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics). Η Ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σαν πρωτεΐνη αναφοράς. Στις ομάδες ελέγχου (Ctrl) των WT και IL1β, η CLDN3 δεν παρουσίασε αυξομειώσεις στην έκφρασή της. Για τον λόγο αυτό όλες οι τιμές ανεξάρτητα από τα χρονικά σημεία, παρουσιάζονται σε όλη την μελέτη μαζί και αντιπροσωπεύει την μέση τιμή αυτών. Στους WT μύες η CLDN3 εμφανίζει μειωμένη έκφραση μετά από 6 ώρες και μειώνεται στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,0035$ ) περαιτέρω, κατά 27 φορές μετά από 24 ώρες χορήγησης LPS σε σχέση με αυτή του Ctrl (Εικόνα 16).



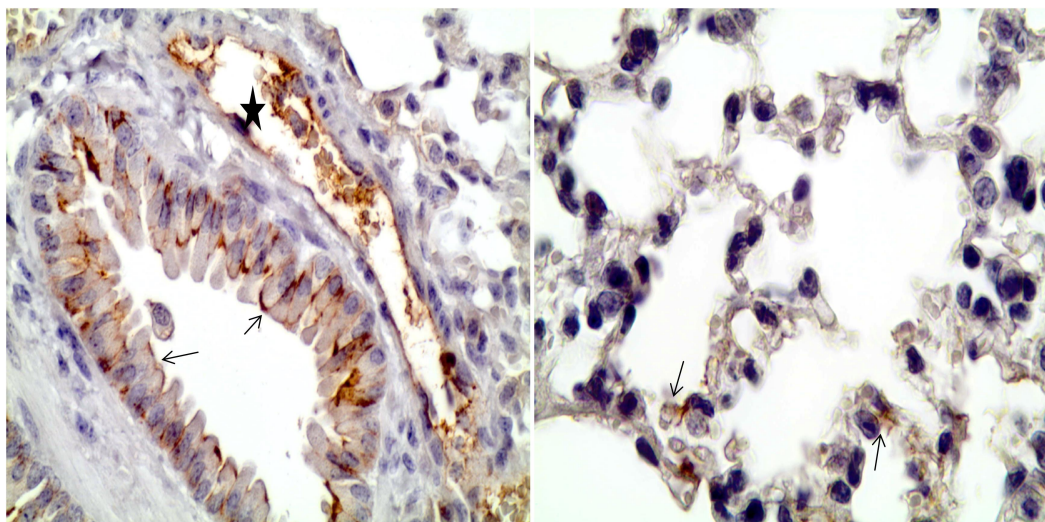
**Εικόνα 16:** Θηκόγραμμα (Boxplot) που παρουσιάζει την έκφραση της CLDN3 στις υπό εξέταση ομάδες πειραματόζων μετά από χορήγηση LPS, για 6 και 24 ώρες, όπως παράχθηκε από το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Δεξιά παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές λωρίδες (bands) μετά από την ανοσοαποτύπωση της CLDN3 που εμφανίζεται στα 23 KDa. Η Ακτίνη (43 kDa) χρησιμοποιήθηκε σαν πρωτεΐνη αναφοράς.



Στην ομάδα ελέγχου (Ctrl) των IL1β ko η CLDN3 υπερεκφράζεται κατά 2 φορές, σε σχέση με αυτή των WT-Ctrl. Αυτό είναι μια ένδειξη ότι η IL1β επιδρά στην ρύθμιση της CLDN3. Όμως η χορήγηση LPS μειώνει σταδιακά την έκφραση της και ιδιαίτερα μετά από επώαση για 24 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική και δεν φτάνει στα επίπεδα της ομάδας WT-LPS/24h. Είναι γνωστό ότι η πνευμονική βλάβη, χαρακτηρίζεται από έναν καταρράκτη φλεγμονωδών παραγόντων, μεταξύ των οποίων η παραγωγή TNFα και IL6. Υποθέτει ότι εκτός από την IL1β και οι υπόλοιποι παραγόμενοι παράγοντες φλεγμονής καταστέλλουν την έκφραση της CLDN3.

### 4.3. Ιστική Ανοσοεντόπιση της CLDN3

Η ιστική ανοσοεντόπιση της CLDN3 αναλύθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε τομές πνευμονικού παρεγχύματος. Όπως φαίνεται και στις εικόνες η CLDN3 εντοπίζεται στις παρυφές των επιθηλιακών κυττάρων των βρόγχων καθώς και στην πλάγια- πλαγιοβασική επιφάνεια.



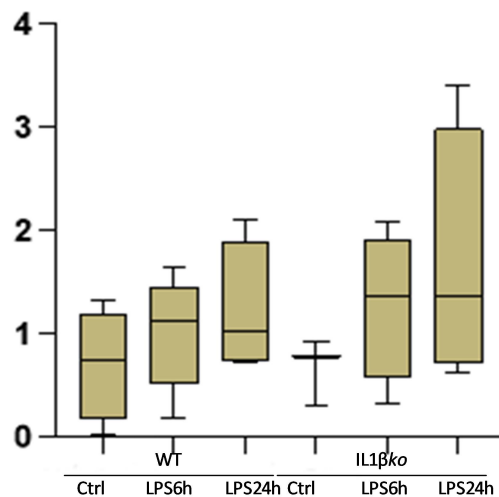
**Εικόνα 17:** Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης πνευμονικού παρεγχύματος μυών. Η CLDN3 εντοπίζεται στις παρυφές, στην πλάγια και βασική επιφάνεια των κυττάρων βρογχικού επιθηλίου (Αριστερή εικόνα, βέλη). Ανοσοεντόπιση παρατηρήθηκε επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μεγάλων αγγείων (Αριστερή εικόνα, αστέρι). Στο πνευμονικό παρέγχυμα παρατηρήθηκε αντίδραση μόνο στα τριχοειδή (Δεξιά, βέλη) ενώ τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και II είναι αρνητικά.



Ανοσοεντόπιση παρατηρείται και στο ενδοθήλιο μεγάλων αγγείων και τριχοειδικών. Δεν παρατηρείται θετικότητα στα πνευμονοκύτταρα τύπου I και II. Στα IL1β ko πειραματόζωα, η έκφρασή της μειώνεται αλλά δεν μεταβάλλεται η ιστική εντόπιση της. Τα παραπάνω ευρήματα μας επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι η CLDN3 πιθανόν να συνηγορεί στην διαμόρφωση συνδέσμων τόσο με τις χασματικές συνδέσεις όσο και με τις συνδέσεις πρόσφυσης. Έχει αποδειχτεί ότι η πολυπλοκότητα των ΑΣ έχει μία δυναμική, που είναι επιρρεπείς στις αλλαγές της σύστασης των ΑΣ. Πιθανόν η μείωση της έκφρασης της CLDN3 να επηρεάζει την διαμόρφωση των ΑΣ που συμμετέχει.

#### 4.4. Έκφραση της Οκλουντίνης

Η οκλουντίνη (OCLN) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που συμμετέχει στον σχηματισμό των ΑΣ. Το καρβοξυλικό άκρο της OCLN, αλληλεπιδρά με τις περιφερικές πρωτεΐνες ZO-1, ZO-2 και ZO-3. Η αλληλεπίδραση αυτή, είναι απαραίτητη για την σύνδεση της με τους ΑΣ. Σε πολλά κύτταρα, κυρίως επιθηλιακά, αλληλεπιδρά με τις κλωντίνες για τον σχηματισμό των ΑΣ. Η πνευμονική φλεγμονή προκαλούμενη από την χορήγηση του LPS, επιφέρει στατιστικά σημαντική ( $p < 0,0005$ ) αύξηση στην έκφραση της OCLN η οποία σχεδόν διπλασιάζεται μετά από τις 24 ώρες επώασης με LPS (Εικόνα 18).

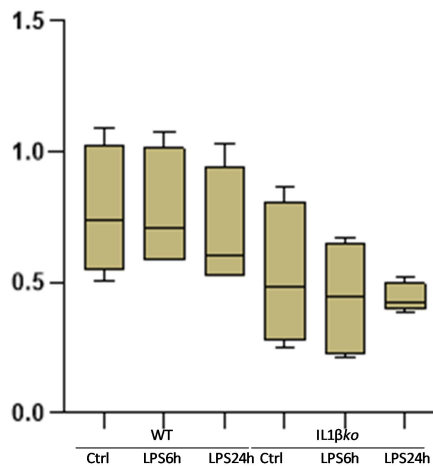


**Εικόνα 18:** Θηκόγραμμα (Boxplot) που παρουσιάζει την έκφραση της OCLN στις υπό εξέταση ομάδες πειραματόζωων μετά από χορήγηση LPS. Είναι εμφανές ότι παρουσιάζει αύξηση στις ομάδες που έχουν πνευμονική βλάβη.

Το ίδιο παρατηρείται και στα IL1β ko πειραματόζωα. Στατιστική ανάλυση της συσχέτισης έκφρασης της OCLN με την CLDN3, έδειξε ότι μεταξύ τους έχουν συσχέτιση (Spearman  $r=-1$ ). Το αποτέλεσμα αυτό επιτρέπει τη διαπίστωση ότι η αύξηση της OCLN συσχετίζεται με την μείωση της CLDN3. Υποθέτει ότι το κύτταρο, στην προσπάθεια να ανταπεξέλθει στην μείωση και διάσπαση των ΑΣ που δημιουργούνται από την CLDN3, αυξάνει την έκφραση της OCLN.

#### 4.5. Έκφραση της ZO-1

Είναι γνωστό ότι οι κλωνίνες ενώνονται ενδοκυττάρια με ένα πλέγμα πρωτεϊνών ικριώματος που τους επιτρέπουν την σύνδεση με τον κυτταροσκελετό ενώ σταθεροποιείται η δομή τους στους ΑΣ. Στα πλαίσια αυτά εξετάστηκε η έκφραση της ZO-1, που είναι κύριος εκπρόσωπος των πρωτεϊνών ικριώματος. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η έκφραση της ZO-1 πρωτεΐνης με στύπωμα κατά Western. Η επιμέρους ανάλυση των αποτελεσμάτων αποτυπώνεται στην Εικόνα 19.



**Εικόνα 19:** Θηκόγραμμα (Boxplot) που παρουσιάζει την έκφραση της ZO-1 στις υπό εξέταση ομάδες πειραματόζωων. Είναι εμφανές ότι η έκφρασή της παρουσιάζει σταδιακή μείωση. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ένδειξη ότι η IL1β επάγει την έκφραση της ZO-1.

Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 19, στις ομάδες των WT πειραματόζωων, η χορήγηση LPS επιφέρει σταδιακή μείωση της παραγόμενης από το κύτταρο ZO-1. Η

μείωση αυτή είναι πιο εμφανής στις ομάδες των IL1β πειραματόζωνων. Το αποτέλεσμα αυτό, παρόλο που δεν φέρει στατιστικά σημαντική διαφορά, επιτρέπει την υπόθεση ότι η IL1β αποτελεί ρυθμιστής της έκφρασης της. Δεδομένου του γεγονότος ότι η δημιουργία των ΑΣ χαρακτηρίζεται από μια πολύπλοκη δομή. Είναι πιθανό οι παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση των συμβαλλόμενων πρωτεϊνών, δηλαδή των CLDN3, OCLN και ZO-1, να επιδρούν καταλυτικά την διαπερατότητα των συνδέσμων.

#### 4.6. Διερεύνηση του μονοπατιού MAPK/ERK1/2

Είναι γνωστό ότι πολλοί και διαφορετικοί βιοχημικοί δίαυλοι επηρεάζουν την έκφραση των κλωντινών. Στην φλεγμονή, η παραγωγή IL1β από φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιεί το καθοδικό μονοπάτι των MAPK/ERK1/2. Η μεταγωγή του ενδοκυττάριου σήματος από την κινάση ERK1/2, οδηγεί σε μία πληθώρα ενδοκυττάριων φυσιολογικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένου της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Για να απαντηθεί το ερώτημα εάν η έκφραση της CLDN3 συσχετίζεται με αυτή της ERK1/2, ελέγχθηκε με σύπωμα κατά Western η πρωτεϊνική παρουσία της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους WT μύες η έκφρασή της μεταβάλλεται με την χορήγηση LPS, παρουσιάζοντας μία μείωση η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στους IL1β κο μύες, η μείωση της έκφρασης είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,0197$ ) μετά από 24 ώρες χορήγησης LPS. Επιπλέον στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η πιθανότητα συσχέτισης της έκφρασής της με αυτή της CLDN3 είναι πολύ μικρή. Αυτό επιτρέπει τη διαπίστωση ότι στην πνευμονική βλάβη, η IL1β επιδρά στην μείωση της CLDN3 με μηχανισμό ανεξάρτητο από το μονοπάτι MAPK/ERK1/2.

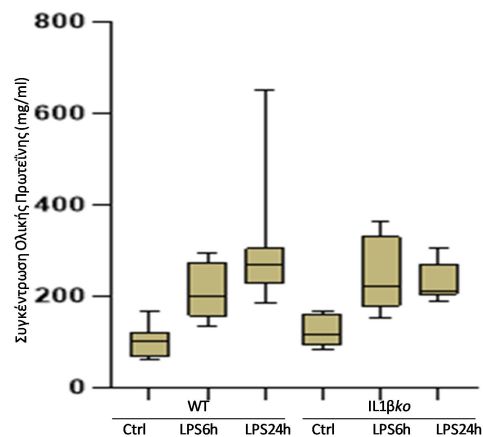
#### 4.7. Έκφραση του IKKα/β

Ο NFκB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενέχεται σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών. Στην πνευμονική βλάβη είναι κύριος υπεύθυνος για την ανοσολογική απάντηση στην φλεγμονή. Σε φυσιολογικές καταστάσεις ο NFκB βρίσκεται σαν διμερές στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή από τον φυσικό του αναστολέα IKK. Ο IKK είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων οι υπομονάδες IκBa και ο IκBβ, είναι κύριοι υπεύθυνοι για την αναστολή του NFκB. Προκειμένου να διαπιστωθεί

εάν το μονοπάτι του NFκB εμπλέκετε στην έκφραση της CLDN3, ελέγξαμε την πρωτεϊνική έκφραση του IκBa και IκBβ (σύμπλοκο IKKα/β). Παρατηρήθηκε ότι στους WT μύες, η έκφραση τόσο της IKKα όσο και της IKKβ σταδιακά μειώνεται. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με την φυσιοπαθολογία της πνευμονικής βλάβης. Δεδομένου του γεγονότος ότι η παρατηρούμενη φλεγμονή, αυξάνει την έκφραση του NFκB και άρα ο φυσικός αναστολέας του μειώνεται. Στους IL1β ko μύες και οι δύο υπομονάδες του IKKα/β, στατιστικά αυξάνονται σταδιακά μετά από 24 ώρες χορήγησης LPS ( $p < 0,0287$ ). Αυτό είναι μία ένδειξη ότι η IL1β αποτελεί βασικό διαμεσολαβητή στην ενεργοποίηση του NFκB.

#### 4.8. Διαπερατότητα του ενδοεπιθηλιακού φραγμού

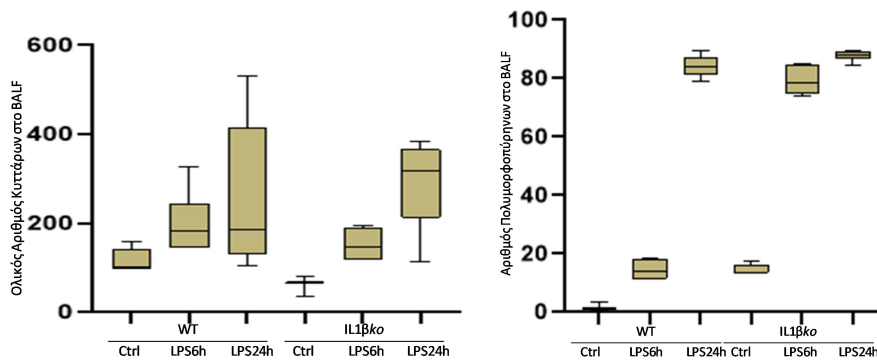
Η διαταραχή των ΑΣ, επιτρέπει την παρακυττάρια διαφυγή ιόντων, μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών, διαλυτών ουσιών συμβάλλοντας στην δημιουργία πνευμονικού οιδήματος. Στην παρούσα μελέτη, στο BALF των πειραματόζων μετρήθηκε η ολική πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 20, παρουσιάζεται μία στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,0001$ ) της ολικής πρωτεΐνης, η οποία κορυφώνεται μετά από 24 ώρες χορήγησης LPS.



**Εικόνα 20:** Θηκόγραμμα (Boxplot) που δείχνει την αύξηση της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης στο BALF των πειραματοζών σε όλες τις πειραματικές ομάδες.

Η αύξηση παρατηρείται τόσο τα WT όσο και τα IL1β πειραματόζωα. Το αποτέλεσμα αυτό επιτρέπει να υποθέσουμε ότι, η μείωση στην έκφραση της CLDN3, με ταυτόχρονη αύξηση της OCLN, επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην σύσταση και λειτουργία του φραγμού των ΑΣ στην πνευμονική βλάβη. Οι αλλαγές αυτές επιφέρουν αύξηση στην διαπερατότητα του κυψελιδοτριχοειδικού φραγμού σε ολική πρωτεΐνη στο BALF των πειραματόζωων.

Επιπροσθέτως η καταμέτρηση των κυττάρων του BALF, έδειξε ότι η χορήγηση LPS, επιφέρει αύξηση του συνολικού αριθμού κυττάρων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0.0028$ ).



**Εικόνα 21:** Θηκόγραμμα (Boxplot) του αριθμού των κυττάρων στο BALF (Αριστερά). Παρατηρείται δραματική αύξηση τόσο στα WT όσο και στα IL1β πειραματόζωα μετά την χορήγηση LPS. Η αύξηση αυτή επιφέρει και στατιστικά σημαντική αύξηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων στο BALF (Δεξιά).

Τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι διαπηδούν στο πνευμονικό παρέγχυμα μετά την καταστροφή των ΑΣ, που δημιουργείται από τις αλλαγές στην έκφραση της CLDN3. Επιπλέον ανάλυση της σύστασης των κυττάρων παρατηρήθηκε αύξηση τόσο στα μακροφάγα όσο και στα πολυμορφοπύρηννα κύτταρα ( $p < 0.0001$ ) (Εικόνα 21). Είναι γεγονός ότι τα πολυμορφοπύρηννα ενεργοποιούν φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, εντείνοντας την πνευμονική βλάβη.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης CLDN3 σε πειραματικό μοντέλο πνευμονικής βλάβης. Αυτό έγινε με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της συμμετοχής της στο σύνδρομο της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Το ARDS είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που επάγεται από μεγάλο αριθμό κλινικών παθήσεων. Κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η φλεγμονώδης απάντηση που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παρακυττάριας διαπερατότητας, καταλήγοντας σε πνευμονικό οίδημα. Όπως αναφέρθηκε, οι αποφρακτικοί σύνδεσμοι (ΑΣ) είναι οι ρυθμιστές της παρακυττάριας διαπερατότητας και η διαταραχή της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής τους συντελεί στην αθρόα διαπίδυση φλεγμονωδών κυττάρων στο πνευμονικό παρέγχυμα. Η έκβαση της νόσου είναι άμεσα σχετιζόμενη με την βαρύτητα του οιδήματος. Έτσι τίθεται αναγκαία η κατανόηση των μηχανισμών αποδιάταξης των ΑΣ από τους φλεγμονώδεις παράγοντες για την καλύτερη αντιμετώπιση και θεραπεία της νόσου.

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των ΑΣ έχουν δυναμική αρχιτεκτονική και η ακεραιότητα τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η πρωτεΐνη των ΑΣ, CLDN3 είναι μέλος της οικογένειας των κλωντινών με άγνωστη δράση στην φυσιοπαθολογία του ARDS. Η CLDN3 αλληλοεπιδρά με την OCLN στην σφράγιση της παρακυττάριας οδού. Ενδοκυττάρια, η σύνδεσή της με το σύμπλοκο ζονούλα-οκλουντίνης 1 (ZO1) προάγει την σταθερότητα του κυτταροσκελετού της Ακτίνης. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επαγωγής της CLDN3 από την προ-φλεγμονώδη κυττοκίνη IL1β. Διαπιστώθηκε με έκπληξη μία στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των CLDN3. Συγχρόνως και κάτω από τις ίδιες συνθήκες, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της OCLN. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει την δυναμική ανταπόκριση του αντιστάθμισης της βλάβης με σκοπό την διαφύλαξη των συνδέσμων. Όμως η αυξημένη διαπίδυση φλεγμονωδών κυττάρων στο BALF των πειραματόζων, στοιχειοθετεί την ανεπάρκεια του μηχανισμού.

Ανοσοϊστοχημικά η CLDN3 εντοπίστηκε στην κορυφαία, πλάγια και βασική επιφάνεια των κυττάρων. Η εντόπιση της στα σημεία αυτά επιτρέπει την υπόθεση ότι συμμετέχει στην δημιουργία ή ενίσχυση και άλλων κυτταρικών συνδέσμων όπως είναι οι σύνδεσμοι πρόσφυσης ή επικοινωνίας. Βιβλιογραφικά, σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, έχει αναφερθεί η αλληλεπίδραση των κλωντινών με τους συνδέσμους

πρόσφυσης. Άρα η μείωση της CLDN3 κάτω από την επίδραση της IL1β, διαταράσσει ποικιλοτρόπως τους άλλους συνδέσμους. Οι σύνδεσμοι αυτοί είναι απαραίτητοι για την διατήρηση της αρχιτεκτονικής και πολικότητας του κυττάρου. Λόγω της αρχιτεκτονικής πολυπλοκότητας των συνδέσμων, μικρές μεταβολές μπορούν εν δυνάμει να επιφέρουν αλλαγές στην μεταγωγή σήματος, την έκφραση γονιδίων, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων.

Ενδοκυττάρια οι κλωνίνες μέσω ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου των ZO1 ενώνονται με τον κυτταροσκελετό. Ταυτόχρονη αλλά σε διαφορετικό βαθμό, μείωση και των δύο πρωτεϊνών σαφώς σηματοδοτεί αλλαγές της αρχιτεκτονικής του κυττάρου. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να συνδέονται με διαταραχή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης διαύλων. Δεδομένου του γεγονότος ότι στο πνευμονικό παρέγχυμα η CLDN3 εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, πιθανολογείται ότι η μείωση των CLDN3/ ZO1 επιφέρει αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλιακού φραγμού.

Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των μηχανισμών μέσω των οποίων η IL1β πυροδοτεί την διάσπαση της CLDN3, εξετάστηκαν οι διαύλοι των MAPK/ERK και IKKα/NFκB. Αποδείχθηκε ότι το καθοδικό μονοπάτι IL1β/MAPK/ERK μένει ανεπηρέαστο από τις παρατηρούμενες αλλαγές. Αντίθετα ο καθοδικός δίαυλος των IL1β/IKKα/NFκB δημιουργεί αρνητική ανατροφοδότηση στην έκφραση της CLDN3. Είναι δεδομένο το γεγονός ότι το ARDS χαρακτηρίζεται από αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση. Είναι πιθανόν και άλλοι φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές όπως είναι ο TNF και η IL6, να συνηγορούν στην παρατηρούμενη στο BALF αύξηση της ολικής πρωτεΐνης. Όμως ο μηχανισμός χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Η κατανόηση των μεταβολών της παρακυττάριας διαπερατότητας είναι κομβική για την κατανόηση του ARDS. Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια διερεύνησης πιθανών μηχανισμών και μεταβολών των ΑΣ που ελέγχουν την διαπερατότητα. Εκτός από την CLDN3 είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν εκτενείς μελέτες και στα υπόλοιπα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των ΑΣ του πνευμονικού ιστού. Απαιτείται επομένως, επιπλέον διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, των περιφερειακών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού με στόχο την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που δρουν στην παρακυττάρια διαπερατότητα.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adhikari NK, D. R. L. S. P. D. V. B. G. H. P. K. M. S. S. A. F. J., 2014. Inhaled nitric oxide does not reduce mortality in patients with acute respiratory distress syndrome regardless of severity: systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.*, pp. Feb;42(2):404-12.
- Aggarwal NR, K. L. D. F., 2014. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. 306:L709-25.
- Al-Sadi R, B. M. M. T., 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*, pp. 14:2765-78..
- Antonelli M, C. G. E. A. M. L. M. S. B. G. R. M. M. R. P. M. G.-D. G. M. G., 2007. A multiple-center survey on the use in clinical practice of noninvasive ventilation as a first-line intervention for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, pp. Jan;35(1):18-25..
- Apostolova E, U. A. G. J. K. I. T. T. W. T. V. T., 2020. Towards Reliable ARDS Clinical Decision Support: ARDS Patient Analytics with Free-text and Structured EMR Data. *AMIA Annu Symp Proc*, pp. Mar 4;2019:228-237..
- ARDS Definition Task Force, R. V. R. G. e. a., 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *JAMA*, p. 307(23):2526–2533..
- Ashbaugh DG, B. D. P. T. L. B., 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, p. 2(7511):319–323..
- Ayzac L, G. R. B. L. B. P. R. M. R. J. G. C., 2016. Ventilator-associated pneumonia in ARDS patients: the impact of prone positioning. A secondary analysis of the PROSEVA trial. *Intensive Care Med.* , pp. May;42(5):871-878.
- Bachofen H, S. S., 2001. Alveolar surface forces and lung architecture.. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* , pp. May;129(1):183-93..
- Bellani G, L. J. P. T. F. E. B. L. E. A. G. L. v. H. F. L. A. M. D. R. M. R. G. T. B. W. H. S. A. P. A., Investigators, L. S. & Group., E. T., 2016. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*, pp. Feb 23;315(8):788-800.
- Bernard GR, A. A. B. K. e. a., 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.. *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 149(3, pt 1):818–824..

- Bhattacharya J, W. K., 2016. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin Immunopathol* , pp. 38:461-9.
- Börjesson A, N. A. W. X. A. R. F. H., 2000. TNF-alpha stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. Jan;278(1):L3-12..
- Bowden, D., 1983. Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis*, pp. 128: S46-S48..
- Branchfield K, N. L. V. J. S. P. W. M. S. X., 2016 . Branchfield K, Nantie L, Verheyden Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science*, Feb 12;351(6274), pp. 707-10.
- Brand-Saberi BEM, S. T., 2014. Trachea: anatomy and physiology. *Thorac Surg Clin*, Feb;24(1), pp. 1-5.
- Cardinal-Fernández P, L. J. B.-B. A. M.-B. G., 2017. Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex Relationship. *Ann Am Thorac Soc*, pp. Jun;14(6):844-850.
- Castro, C., 2006. ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, pp. 18(1):13-9.
- Cavanaugh KJ, O. J. M. S., 2001. Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, pp. 25:584-91..
- Chebib N, K. L. a. G. C., 2018. Acute respiratory distress syndrome—a worldwide economic perspective. *J Thorac Dis*, p. Feb;10(2): 570–575..
- Chiumello D, F. S. B. B. C. L. C. S., 2013. Clinical review: Lung imaging in acute respiratory distress syndrome patients--an update. *Crit Care*, p. Nov 18;17(6):243.
- Cruz FF, B. L. R. P. P. P., 2018. Ventilator-induced lung injury during controlled ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome: less is probably better. *Expert Rev Respir Med*, pp. May;12(5):403-414..
- Cummins, P. M., 2011. OccludinQ One Protein, Many Forms. *Molecular and Cellular Biology*.
- Czikora I, A. A. B. H. K. D. S. S. A. H. G. B. W. R. Z. A. W. A. P.-E. M. H. J. G.-G. I. F. B. V. A. B. Z. P. J. S. W. L.-G. R. C. T. L. A. M. M. E., 2014. A novel tumor necrosis factor-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation. *Am J Respir Crit Care Med*, pp. Sep 1;190(5):522-32..

Dallas M, H. D. H. Q. I. C., 2009 . DaAnatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol.*, Dec;124(6 Suppl), pp. S72-7..

Dallas MH, H. Q. I. C., 2009. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol*, Dec;124 (6 Suppl), pp. S72-7.

Daugherty BL, W. C. S. T. R. J. K. M., 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility.. *J Biol Chem*, pp. Oct 12; 282(41):30005-13..

Davis JD, W. T., 2021 . Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal Immunol*, Feb 19, pp. 1-13.

Denker BM, N. S., 1998. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol*, pp. 274:F1-9..

Dzierba AL, A. E. B. M. L. I., 2014. A review of inhaled nitric oxide and aerosolized epoprostenol in acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Pharmacotherapy*, pp. Mar;34(3):279-90.

Echaide M, A. C. A. R. P.-G., 2017. Restoring pulmonary surfactant membranes and films at the respiratory surface.. *J.Biochim Biophys Acta Biomembr.* , pp. Sep;1859(9 Pt B):1725-1739.

El-Khatib MF, B. I. A. C. C. R. F. H. M. M. F. M. H. A., 2020. Comparison of the Oxygenation Factor and the Oxygenation Ratio in Subjects With ARDS. *Respir Care.*, pp. Dec;65(12):1874-1882.

Esteban A, F.-S. P. F.-V. F. e. a., 2004. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Annals of Internal Medicine*, pp. 141, 440–5.

Eworuke E, M. J. G. M. L., 2018. National incidence rates for Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and ARDS cause-specific factors in the United States (2006-2014). *J Crit Care*, pp. Oct;47:192-197.

Fan E, B. D. S. A., 2018. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*, pp. Feb 20;319(7):698-710.

Fang M, Z. W. S. W. D. Y. Y. D. X. B. Z. H. W. H., 2018. Ulinastatin Ameliorates Pulmonary Capillary Endothelial Permeability Induced by Sepsis Through Protection of Tight Junctions via Inhibition of TNF- $\alpha$  and Related Pathways. *Front Pharmacol*, p. Aug 13;9:823.

Feldman GJ, M. J. R. M., 2005. Occludin: structure, function and regulation.. *Adv Drug Deliv Rev.* , pp. Apr 25;57(6):883-917.

- Frank JA, W. C. M. D. S. R. M. M., 2006. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. 291:L1191-8..
- Frank, J. A., 2012. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- French AD, F. J. C. T. L. P. O. M. F. B. S. S. I. F. T. D. W. A., 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* , pp. 6(2):93-101.
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fulle, S. A. & Hurrell, J. G., n.d. *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 10.8, Detection of Proteins on Blot Transfer Membranes*. s.l.:s.n.
- Ganter MT, R. J. M. B. e. a., 2008. . Interleukin-1beta causes acute lung injury via alphavbeta5 and alphavbeta6 integrin-dependent mechanisms. *Circ Res*, pp. 102:804-12..
- Gattinoni L, B. M. P. P. e. a., 1994. Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. *Journal of the American Medical Association*, pp. 271, 1772–9.
- Gattinoni L, M. J. C. F. M. G. R. F. T. T. V. F. Q. M., 2017. The future of mechanical ventilation: lessons from the present and the past. *Crit Care*, p. Jul 12;21(1):183.
- Goddard LM, I.-A. M., 2013. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb Haemost*, pp. Mar;109(3):407-15.
- González-Mariscal L, B. A. N. P. J. B., 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* , pp. 81:1-44.
- González-Mariscal L, R.-S. A. G.-G. L. H.-G. C., 2018. Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions. *Tissue Barriers*, p. Jan 2;6(1):e1414015.
- Griese, M., 1999 . Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art.. *Eur Respir J* , pp. Jun;13(6):1455-76..
- Guillot L, N. N. T. O. T. G. L. R. P. C. H. A. S. C. A., 2013. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, pp. Nov;45(11):2568-73.
- Günzel D, Y. A., 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability.. *Physiol Rev*, pp. Apr; 93(2):525-69..
- Gustavo Matute-Bello, M. A. M., n.d. *Animal Models of Acute Lung Injury*. [Ηλεκτρονικό].
- Harhaj, N. S. & Antonetti, D. A., 2003. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.

- He Y, S. N. U.-F. Y. G. J. W. Y. I. M. W. Z. O. K. K. H. T. Y. S. A. Y. K. O. H., 2020. Outer membrane vesicles derived from *Porphyromonas gingivalis* induced cell death with disruption of tight junctions in human lung epithelial cells. *Arch Oral Biol*, , p. Oct;118:104841. .
- Herold S, M. K. L. J., 2011. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol* , p. 2:65..
- Hill, U. C., n.d. Mice: Basic Handling and Technique Workshop University of North Carolina.
- Ikari A, S. T. W. R. Y. Y. S. J., 2012. Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta* . , pp. Jun;1823(6):1110-8..
- Ikenouchi J, M. M. F. M. T. S., 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*, pp. May 15;116(Pt 10):1959-67..
- Jang AS, C. V. B. K. B. K. L. S. P.-V. H. D. J. R. P. D. Y. K. D. B. A. L. G., 2011. Endothelial dysfunction and claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* . , p. 44:483–490..
- Johnson NJ, C. D. G. D., 2018. Ventilator Management and Respiratory Care After Cardiac Arrest: Oxygenation, Ventilation, Infection, and Injury. *Chest*, Johnson NJ, Carlbom DJ, Gaieski DF., pp. Jun;153(6):1466-1477.
- Johnson, E. & M. M., 2010. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* , pp. Aug;23(4):243-52.
- Johnson, E. R. & Matthay, M. A., 2010. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment.
- Kasai H, A. J. M. R. K. T. Z. Z., 2005. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT).. *Respir Res* . , p. Jun 9; 6:56..
- Katzenstein AA, A. F., 1990. *Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Diseases*. 2nd ed επιμ. Philadelphia: PA: Saunders.
- Kellner M, N. S. L. Q. S. A. Z. E. B. S., 2017. ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Adv Exp Med Biol*., pp. 967:105-137.
- Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L., 2013. Αναπνευστικό Σύστημα. Στο: *Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας*. s.l.:Εκδόσεις Πασχαλίδης.

- Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L., 2013. Κεφάλαιο 1: Επιθήλιο. Στο: *Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας*. σ.λ.:Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Kirschner N, R. R. F. M. M. I. F. M. B. J., 2013. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol.*, pp. May;133(5):1161-9. .
- Kobashi Y, M. T., 1993. The fibrosing process in so-called organized diffuse alveolar damage. An immunohistochemical study of the change from hyaline membrane to membranous fibrosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, pp. 422(1):47-52..
- Kojima T, T. K. Y. T. M. M. S. S. I. M. Y. H. O. M. C. H. H. T. S. N., 2008. Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. *Liver Int.*, pp. Apr;28(4):534-45.
- Koval M, W. C. F. M. R.-P. S. H. M. R. J., 2010. Extracellular matrix influences alveolar epithelial claudin expression and barrier function.. *Am J Respir Cell Mol Biol*, pp. Feb; 42(2):172-80..
- Koval, M., 2009. Tight Junctions, but not too tight: Fine control of lung permeability by claudins. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*.
- Koval, M., 2013. Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. *Annual Review of Physiology*.
- Krause G, P. J. P. J., 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol.*, pp. Jun;42:3-12..
- Krzak A, P. M. N. L., 2011. Nutrition therapy for ALI and ARDS. *Crit Care Clin*, pp. Jul;27(3):647-59.
- LaFemina MJ, R. D. C. A. P. J. B. A. J. M. F. J., 2010. Keratinocyte growth factor enhances barrier function without altering claudin expression in primary alveolar epithelial cells.. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, pp. Dec; 299(6):L724-34..
- Laffey JG, M. F. B. G. P. T. F. E. B. L. A. P. A. Y. B. E. B. A. C. V. C. K. H. L. K. K. L. J. L. J. M. L. N. N. P. J. P. L. Q. H. J. J. E. A. M. D. v. H., 2017. Geo-economic variations in epidemiology, patterns of care, and outcomes in patients with acute respiratory distress syndrome: insights from the LUNG SAFE prospective cohort study. *Lancet Respir Med*, pp. Aug;5(8):627-638..
- Li J, L. Y. C. M. L. J. D. J. S. B. X. X., 2015. Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. *Int J Clin Exp Pathol*, pp. Oct 1;8(10):12225-33.

- Looi K, T. N. G. L. I. T. B. A. B. A. K.-M. L. M. K. K.-S. E. S. N. S. E. Z. G. R. P. L. A. K. D. K. A. S. S., 2016. Effect of human rhinovirus infection on airway epithelium tight junction protein disassembly and transepithelial permeability. *Exp Lung Res*, pp. 42(7):380-395..
- Lorente JA, C.-F. P. M. D. F.-V. F. T. A. J. C. B.-B. A. R. J. P. O. O. G. B. J. P. B. N. N. d. C. M. M. E. A. T. T., 2015. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Med*, pp. Nov;41(11):1921-30.
- Lynn KS, P. R. K. M., 2020. Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, p. Sep 1;1862(9):183339..
- Malaviya R, L. J. L. D., 2017. Anti-TNF $\alpha$  therapy in inflammatory lung diseases. *Pharmacol Ther.*, pp. Dec;180:90-98..
- Mason RJ, W. M., 1977. Type II alveolar cell: defender of the alveolus. *Am Rev Respir Dis*, pp. 115: 81-91.
- Matsubara, O., 2002. Pathogenesis of diffuse alveolar damage. *Histopathology*, p. 41:438–441.
- Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M. & Tsukita, S., 2004. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during intercellular movement of epithelial cells. *The Journal of Cell Science*.
- Matthay, M. A., Ware, L. B. & Zimmerman, G. A., 2012. The acute respiratory distress syndrome.
- Matute-Bello G, D. G. M. B. G. S. M. M. S. A. K. W. & Group., A. L. I. i. A. S., n.d. *An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals.*, s.l.: s.n.
- Matute-Bello, G. & Matthay, M. A., n.d. *Animal Models of Acute Lung Injury*. [Ηλεκτρονικό] Available at: <https://www.thoracic.org/professionals/clinical-resources/critical-care/critical-care-research/animal-models-of-acute-lung-injury.php>
- McCain, J., 2013. The MAPK (ERK) Pathway. *P&T Vol 38*.
- McKenzie JA, R. A., 2007. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol* , pp. 213:221-8..
- Meduri GU, E. M. W.-M. H., 1995. The fibroproliferative phase of late adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Infect*, pp. Sep;10(3):154-75.

- Mescher, A., 2015. Κεφάλαιο 17. Στο: 6. Έκδοση, επιμ. *Junqueira's Basic Histology*. s.l.:Πασχαλίδης, p. 481.
- Mescher, A. L., 2015. Το Αναπνευστικό Σύστημα. Στο: *Junqueira's Βασική Ιστολογία*. s.l.:Πασχαλίδης..
- Mescher, A. L., 2015. Επιθηλιακός Ιστός. Στο: *Junqueira's Βασική Ιστολογία*. s.l.:Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Mescher, A. L., 2015. Το Αναπνευστικό Σύστημα. Στο: *Junqueira's Βασική Ιστολογία*. s.l.:Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Moore, K. L., Dalley, A. F. & Agur, A. M., 2012. Κλινική Ανατομία, Κεφάλαιο 2 "Θώρακας". Στο: s.l.:Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Morita, K. S. H. F. K. F. M. & T. S., 1999. Claudin-11/OSP-based tight junctions in myelinated sheaths of oligodendrocytes and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol*, pp. 145, 579–588.
- Murray JF, M. M. L. J. F. M., 1988. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.*, pp. Sep;138(3):720-3.
- Murray, J., 2010. The structure and function of the lung. *Int J Tuberc Lung Dis*, Apr;14(4), pp. 391-6..
- Murray, J., 2011. Pulmonary edema: pathophysiology and diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, pp. 15:155-60..
- Netter, F., 1980. Respiratory system. Στο: *The CIBA collection of medical illustrations*. s.l.:Saunders, p. vol 7.
- Oh TK, S. I. L. A., 2020. Association of Economic Status and Mortality in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Int J Environ Res Public Health.*, p. Mar 11;17(6):1815..
- Okrent DG, L. A. G. T., 1990. Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am Rev Respir Dis* , pp. 141:179-85..
- Oliveira, S. & Morgado-Diaz, J., 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Osanai M, M. M. C. H. K. T. S. N., 2007. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer Sci.*, pp. Oct;98(10):1557-62..



- Otani T, F. M., 2020. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol.*, pp. Oct;30(10):805-817.
- Overgaard CE, M. L. K. M., 2012. Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function.. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. Jun;1257(1):167-74.
- Pan C, L. L. X. J. Q. H., 2018. Acute Respiratory Distress Syndrome: Challenge for Diagnosis and Therapy. *Chin Med J (Engl).*, pp. May 20;131(10):1220-1224..
- Papazian L, D. C. C. B. G. Y. T. X. R. A. D. Y. B. M. Z. C. T. P., 2007. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients.. *Crit Care Med*, pp. Mar;35(3):755-62..
- Patel VJ, B. R. S. M. H. J. M. S. R., 2018. Alternative and Natural Therapies for Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Biomed Res Int.* , p. May 16;2018:2476824.
- Pattle, R., 1955. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*, pp. 175: 1125-1126..
- Pearce SC, A.-J. A. K. K. Y. S. H. M. F. L. E. K. G. N. F. R., 2018. Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biol*, p. Feb 1;16(1):19..
- Peñuelas O, A. J. F.-V. F. E. A., 2006. Pathology of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Clinical–Pathological Correlation. *Clin Chest Med*, p. 27:571–578.
- Piontek A, R. J. P. J. W. H. H. C. G. D. K. G. P. J., 2017. Polar and charged extracellular residues conserved among barrier-forming claudins contribute to tight junction strand formation. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. Jun;1397(1):143-156.
- Pittet JF, G. M. G. T. K. N. D. S. H. X. B. L. G. P. K. V. M. M. S. D., 2001. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury.. *J Clin Invest.*, pp. Jun; 107(12):1537-44..
- Poliak S, M. S. U. C. S. S. P. E., 2002. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol*, pp. Oct 28;159(2):361-72..
- Potey PM, R. A. L. C. D. D., 2019. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J Pathol.* , pp. Apr;247(5):672-685..
- Price LC, M. D. M. P. F. S. G. M. W. S., 2012. Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* , pp. May 1;302(9):L803-15. .

- Raghavendran K, W. D. N. R., 2011. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin*, pp. Jul;27(3):525-59..
- Rajagopal N, I. F. N. S., 2019. Palmitoylation of Claudin-5 Proteins Influences Their Lipid Domain Affinity and Tight Junction Assembly at the Blood-Brain Barrier Interface. *J Phys Chem B.*, pp. Feb 7;123(5):983-993..
- Rawal G, Y. S. K. R., 2018. Acute Respiratory Distress Syndrome: An Update and Review. *Transl Int Med*, pp. Jun 26;6(2):74-77.
- Reilly JP, C. C. C. J., 2019. Acute Respiratory Distress Syndrome Phenotypes. *Semin Respir Crit Care Med*, pp. Feb;40(1):19-30.
- Ryb, G. E. & C. C., 2010. Race/ethnicity and acute respiratory distress syndrome: a National Trauma Data Bank study. *J. Natl Med. Assoc*, pp. 102, 865–869.
- Sahetya SK, H. D. S. R. N. D. B. R., 2020. PEEP Titration to Minimize Driving Pressure in Subjects With ARDS: A Prospective Physiological Study. *Respir Care*, pp. May;65(5):583-589.
- Schneeberger EE, L. R., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, pp. 286:C1213-28..
- Schulzke JD, F. M., 2009. Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. May;1165:1-6.
- Scopes, R. & Smith, J. A., n.d. *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 10.2A, Electrophoretic Separation of Proteins*. s.l.:s.n.
- Shen CH, L. J. L. C. Y. S. P. C. H. K., 2021. SPAK-p38 MAPK signal pathway modulates claudin-18 and barrier function of alveolar epithelium after hyperoxic exposure. *BMC Pulm Med*, p. Feb 15;21(1):58.
- Sheth P, B. S. L. C. N. A. R. R., 2003. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem.*, pp. Dec 5;278(49):49239-45.
- Singh AB, H. R., 2004. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, pp. Jan 30;279(5):3543-52.
- Sinha P, C. C., 2019. Phenotypes in acute respiratory distress syndrome: moving towards precision medicine. *Curr Opin Crit Care*, pp. Feb;25(1):12-20.

- Sinha T, S. K. M. C. S. C., 2021. Cardiopulmonary Arrest and Resuscitation in the Prone Patient: An Adult Simulation Case for Internal Medicine Residents. *MedEdPORTA*, Sinha T, Stinehart K, Moorer C, Spitzer C. , p. Feb 11;17:11081.
- Soini, Y., 2011. Claudins in lung diseases. *Respir Res*, p. May 27; 12:70..
- Stamatovic SM, J. A. S. N. K. R. A. A., 2017. Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. Jun;1397(1):54-65..
- Suzuki H, T. K. F. Y., 2017. Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. Jun;1397(1):25-34.
- Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions.. *Cell Mol Life Sci.*, pp. Feb;70(4):631-59.
- Szaszi K, A. Y., 2014. New insights into functions, regulation, and pathological roles of tight junctions in kidney tubular epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol*, pp. 308:205-71.
- Tervonen A, I. T. N. S. H. J., 2019. Structural dynamics of tight junctions modulate the properties of the epithelial barrier. *PLoS One*, p. Apr 9;14(4):e0214876..
- Thille AW, E. A. F.-S. P. R. J. A. J. V.-E. P. M.-P. A. L. J. F.-V. F., 2013. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies.. *Lancet Respir Med*, pp. Jul;1(5):395-401. .
- Thompson, B., 2010. Corticosteroids for ARDS.. *Minerva Anesthesiol.*, pp. Jun;76(6):441-7..
- Tomashefski, J., 2000. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*, pp. Sep;21(3):435-66..
- Townsley, M., 2012. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physio*, pp. Jan;2(1):675-709..
- Tsukita S, F. M. I. M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. Apr;2(4):285-93.
- Van Itallie CM, A. J., 2004. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc*, pp. 1(1):38-41..
- Vergani G, C. M. C. F. L. C. S. E. G. M. L. A. A. A. C. G. C. D., 2020. A Morphological and Quantitative Analysis of Lung CT Scan in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome and in Cardiogenic Pulmonary Edema. *J Intensive Care Med*, pp. Mar;35(3):284-292..

- Verkerk BS, D. A. M. J. D.-N. C. B. D. B. M. R. W. B. J., 2020. Opioid and Benzodiazepine Requirements in Obese Adult Patients Receiving Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann Pharmacother.*, pp. Feb;54(2):144-150..
- Wang F, D. B. K. L. W. Z. F. J. S. R. K. M., 2003. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells.. *Am J Respir Cell Mol Biol*, pp. Jul; 29(1):62-70..
- Ward, P., 1996. Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann N Y Acad Sci.*, pp. 796:104-12..
- Ware LB, M. M., 2001. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 163:1376-83.
- Warnock ML, P. M. C. A., 1980. Further observations on cytoplasmic hyaline in the lung. *Hum Pathol*, p. 11:59–65.
- Weibel, E., 2015. On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 191:504-13..
- Williams AE, C. R., 2014. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. Feb;306(3):L217-30..
- Wray C, M. Y. P. J. C. A. P. F. F. J., 2009. Claudin 4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury.. *American journal of physiology*, p. 297:L219–227.
- Yanagi S, T. H. M. A. M. N. N. M., 2015. Breakdown of Epithelial Barrier Integrity and Overdrive Activation of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome and Lung Fibrosis.. *BioMed Res Int.*, p. 2015:573210..
- Yang J, B. J. H. D. M. A. O. N. d. P. L. V.-E. H. A. S. E. E. J. O. J. C., 2016. Yang J, Belinda J. Hernandez, Denise Martinez Alanis, Odemaris Narvaez del Pilar, Lisandra Vila-Ellis, Haruhiko Akiyama, Scott E. EvaThe development and plasticity of alveolar type 1 cells. *Development*, p. 143:54–65..
- Zaidman, N. O. K. P. N. M. F. M. P. K. H. O. S., 2017. Airway epithelial anion secretion and barrier function following exposure to fungal aeroallergens: role of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, pp. Jul 1;313(1):C68-C79..
- Zihni C, M. C. M. K. B. M., 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* , pp. Sep;17(9):564-80. .

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O).

#### 1. RIPA- Protein Lysis Buffer

- 150mM NaCl
- 1mM EDTA
- 0,1mM EGTA
- 1% SDS
- 1% triton x-100
- 50mM NAF
- 0,5% Deoxycholic Na
- 1mM PMSF
- Inhibitors phospho-proteases

#### 2. 4x Tris-Cl (0,5M) resolving gel, pH=8,8

- 4x Tris-Cl (0,5M) resolving gel, pH=8,8
- 91g Tris Base
- Ρύθμιση pH στο 8,8
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 500 ml

#### 3. 4x Tris-Cl (0,5M) stacking gel, pH=6,8

- 6,05g Tris Base
- Ρύθμιση pH στο 6,8
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 100ml

#### 4. 6x Sample Buffer

- 7ml 4x Tris HCl/SDS pH=6,8
- 3,6ml glycerol
- 1g SDS
- 600ml 2-Mercaptoethanol (2-ME)
- 4mg Bromophenol Blue
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 12ml

#### 5. 5x Running Buffer

- 15,1g Tris Base
- 72g Glycine
- 5g SDS
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000ml

#### 6. 10x Transfer Buffer

- 1,52g Tris Base
- 7,2g Glycine
- 100ml MeOH (methanol)
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι 1000ml

#### 7. 10x TBS

- 80g NaCl
- 30g Tris Base
- Ρύθμιση pH στο 7,4
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000ml

#### 8. TBS-T 0,2%

- 100ml 10x TBS
- 900ml ddH<sub>2</sub>O
- 2ml Tween 20

#### 9. Blocking Buffer

- 2,5g Regilait (Non Fat Milk σε σκόνη)
- 50ml TBS-T 0,2%

#### 10. Mild Stripping Buffer

- 9ml Glycine 25mM
- 1ml 10% SDS
- 2 σταγόνες Tween 20

