

Linacre A., Lee J. C.-I.: Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int. J. Legal Med.* 1999, 113, 43-46. - 5. Jehaes E., Toprak K., Vanderheyden N., Pfeiffer H., Cassiman J.-J., Brinkmann B., Decorte R.: Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *Int. J. Legal Med.* 2001, 115, 135-141. - 6. Leonart R., Riego E., Sainz de la Pena M. V., Bacallao K., Amaro F., Santiesteban M., Blanco M., Currenti H., Puentes A., Rolo F., Herrera L., De la Fuente J.: Forensic Identification of skeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's in Bolivia based on DNA typing. *Int. J. Legal Med.* 2000, 113, 98-101. - 7. Previdere C., Micheletti P., Perossa R., Grignani P., Fattorini P.: Molecular characterisation of the nucleic acids recovered from aged forensic samples. *Int. J. Legal Med.* 2002, 116, 334-339. - 8. Schmerer W. M., Hummel S., Herrmann B.: Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as a target. *Electrophoresis* 1999, 20, 1712-1716. - 9. Takahashi M., Kato Y., Mukoyama H., Kanaya H., Kamiyama S.: Evaluation of five polymorphic microsatellite markers for typing DNA from decomposed human tissues - Correlation between the size of the alleles and that of the template DNA. *Forensic Sci. Int.* 1997, 90, 1-9.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM  
ul. M. Curie-Skłodowskiej 3a  
80-210 Gdańsk

**Ewa Wolska , Natalia Młodzik , Karol Śliwka**

## Teoretyczne podstawy zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych

### The theoretical bases of electrical processes in epithelial tissue

\*Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

\*\*Z Katedry i Zakładu Patobiochemii AM w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. T. Tyrakowski

W niniejszej pracy przedstawiono podstawowe pojęcia z zakresu elektrofizjologii i zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych organizmów żywych, związanych z przelnabłonkowym transportem jonów. Znajomość przebiegu zjawisk elektrycznych zachodzących w nabłonkach po zatrzymaniu krążenia, może w przyszłości przyczynić się do wyjaśnienia kolejnych mechanizmów towarzyszących reakcjom interletalnym.

In this study the basic electrophysiological ideas are presented and the electrical processes in epithelial tissues connected with the mechanisms of transepithelial ion transport. Knowledge of electric phenomena which takes place in epithelium after circulatory arrest, can contribute to the future explanation of the mechanisms which accompany interlethal reactions.

Słowa kluczowe: przelnabłonkowy transport jonów

**Key words: transepithelial ion transport**

W latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia Ussing i współpracownicy opracowali nowy model badawczy, zajmujący się badaniami zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych żywych organizmów (7, 13). Dzięki wykorzystywanej do dnia dzisiejszego komórce Ussinga oraz odpowiedniej aparaturze pomiarowej, udowodniono istnienie oraz opisano szereg mechanizmów działania przelnabłonkowych prądów jonowych. Zjawiska te zostały poznane między innymi w nabłonkach dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz gruczołów wydzielniczych (9, 12, 14, 30).

Metoda Ussinga polega na analizie parametrów elektrofizjologicznych w preparatach izolowanych fragmentów tkanek nabłonkowych umieszczonych

w tzw. aparacie Ussinga. Do tych badań stosowano tkanki nabłonkowe owadów, płazów oraz nabłonki dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i innych narządów ssaków, w tym człowieka. Dzięki aparatowi Ussinga zbudowanemu z dwóch symetrycznych komór, co umożliwia izolację elektryczną obu powierzchni zamocowanej w nim tkanki, oraz zestawowi elektrod chlorosrebrowych lub kalomelowych podłączonych do zestawu pomiarowego sprzężonego z komputerem dokonuje się pomiaru oraz rejestracji parametrów elektrofizjologicznych badanej tkanki, takich jak: opór elektryczny, przelnabłonkowy potencjał elektryczny w spoczynku oraz zmiany przelnabłonkowego potencjału elektrycznego po zadziałaniu bodźca np.: mechanicznego lub chemicznego. Wartości analizowanych parametrów uzależnione są od właściwości elektrofizjologicznych danej tkanki, które wpływają na charakter transportu jonów przez błonę komórkową.

Metoda Ussinga jest stosowana w badaniach podstawowych, dotyczących biochemii, fizjologii i farmakologii, a także w badaniach klinicznych w celu analizy pobranych wycinków narządów w celach diagnostycznych. Badania tkanek w aparacie Ussinga w zakresie oddziaływań fizjologicznych dotyczą bodźców wywołujących zmiany prądów jonowych (np. stymulacji mechanicznej, elektrycznej lub hormonalnej), a także mechanizmów regulujących prądy przelnabłonkowe. Badania farmakologiczne dotyczą przede wszystkim analizy receptorów wpływających na transport jonów.

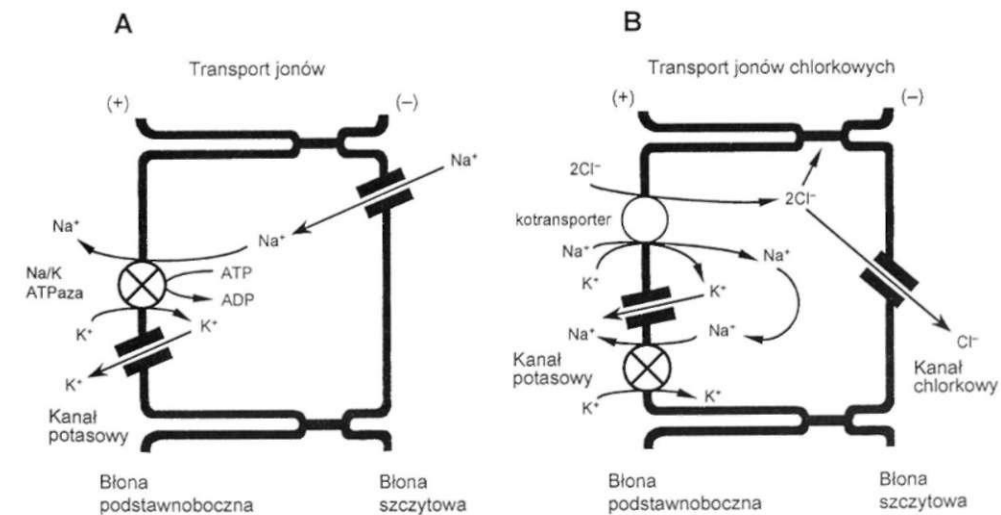
Transport jonów w komórkach nabłonka jest możliwy dzięki złożonemu systemowi białek transportowych, wśród których zasadniczą rolę odgrywają pompy i kanały jonowe zlokalizowane na szczytowej i podstawno-bocznej powierzchni błony komórkowej (15). System ten odpowiada za zmiany rozkładu jonów po obu stronach tkanki nabłonkowej i tym samym za wytwarzanie i utrzymanie przelnabłonkowej różnicy potencjałów (5, 12, 18). Wartości przelnabłonkowej różnicy potencjału elektrycznego stanowią ważny parametr fizjologiczny i wskazują, że pole elektrostatyczne na powierzchni nabłonka spełnia rolę ochronną wspomagając czynnościową barierę oddzielającą środowisko zewnętrzne od środowiska wewnętrznego organizmu. Bariera ta w drogach oddechowych tworzona jest przez tzw. „płynną wyściółkę”, w przewodzie pokarmowym natomiast przez „śluzową warstwę ochronną” i bierze ona udział w oczyszczaniu drzewa oskrzelowego oraz wspomaga pasaż treści pokarmowej w jelitach (9, 30).

Wytwarzanie i wchłanianie płynnej wyściółki przez nabłonki wydzielnicze zdeterminowane jest przez stan równowagi pomiędzy procesami absorpcji i sekrecji jonów sodowych i chlorkowych (19).

Faza absorpcyjna jonów sodowych zachodzi dwustopniowo. Po zadziałaniu bodźca, początkowo jony sodowe poprzez selektywne dla nich kanały jonowe przechodzą do wnętrza komórki. Następnie przez błonę komórkową podstawno-boczną, dzięki pompie sodowo-potasowej przechodzą do przestrzeni podśluzowej. W tym samym czasie jony potasowe przez swoje kanały jonowe przedostają się z wnętrza komórki na stronę podstawną. Jony chlorkowe natomiast transportowane są wspólnie z jonami sodowymi, dzięki gradientowi elektrycznemu zależnemu od jonów sodowych. Źródłem energii tych procesów

jest rozpad adenozyntroójfosforanu, który w organizmach żywych regenerowany jest w cyklu Krebsa (2, 20, 23, 32).

W fazie sekrecyjnej wydzielanie jonów chlorkowych do światła dróg oddechowych lub przewodu pokarmowego możliwe jest dzięki jednoczesnemu działaniu pompy sodowo-potasowej i kanałów potasowych w błonie podstawno-bocznej, kanałów chlorkowych w części szczytowej błony komórkowej oraz specyficznym białkom transportującym jony chlorkowe, głównie tzw. kotransporterowi na powierzchni podstawno-bocznej (9). Kotransporter jest białkiem występującym w błonach komórkowych wielu tkanek np.: nabłonkowej, mięśniowej, w komórkach tkanki łącznej. Umożliwia on przenoszenie jonów chlorkowych do wnętrza komórki w mechanizmie elektroobojętnego współtransportu polegającego na wymianie jednego jonu sodowego i potasowego naładowanych dodatnio, na dwa jony chlorkowe naładowane ujemnie ( $\text{Na}^+\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ ). Kotransport ten hamowany jest przez diuretyki pętlowe np. furosemid (4, 9, 10, 28, 29, 30). Schemat przelnabłonkowych dróg transportu jonów przedstawiono na rycinie 1. (6)

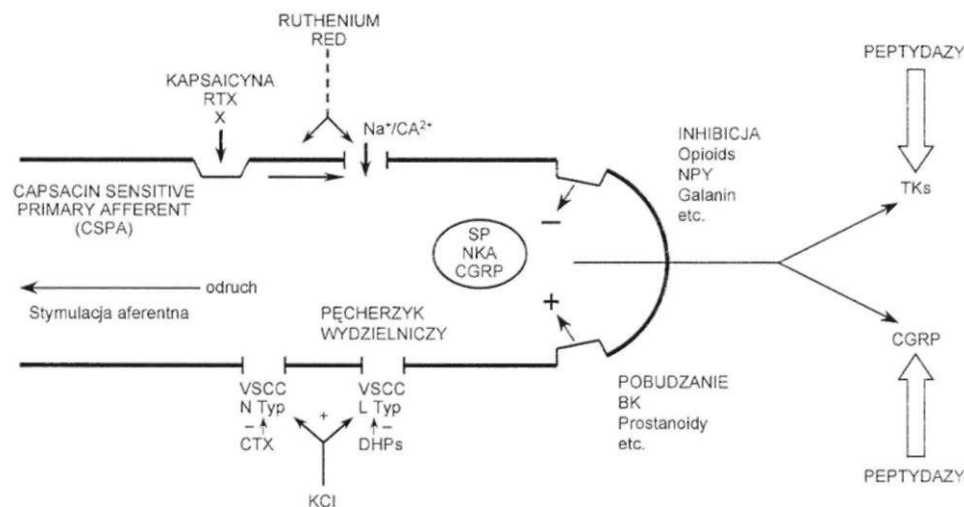


Ryc. 1. Model przelnabłonkowych dróg transportu jonów.  
Fig. 1. The model of transepithelial ion transport pathways.

Jednym z ważniejszych kanałów chlorkowych, jest zlokalizowany w błonie szczytowej tzw. kanał CFTR (Cystic Fibrosis Transport Receptor). Udowodniono, że mutacje genetyczne powodujące zaburzenia funkcjonowania białek kanału CFTR, odpowiedzialne są za powstawanie objawów klinicznych mukowiscydozy (21, 25, 31).

Czynność nabłonków wydzielniczych regulowana jest przez tzw. wewnętrzścienny układ regulujący, który współcześnie wyróżnia się jako część autonomicznego układu nerwowego. W tym układzie zasadniczą rolę odgrywają

bezmielinowe zakończenia czuciowe nerwu błędnego wrażliwe na kapsaicynę, zwane włóknami C (CSPA - Capsaicin Sensitive Primary Afferent) (3, 11, 16, 17, 22). Schemat budowy włókna C przedstawiono na rycinie 2 (16).



Ryc. 2. Włókno C- lokalizacja receptorów biochemicznych i kanałów jonowych.  
Fig. 2. The fibrę C - localisation of biochemical receptors and ion channels.

Włókna C pełnią podwójną rolę: z jednej strony uwalniają neuropeptydy, z drugiej zaś strony generują aferentne sygnały nerwowe. Pobudzenia zakończeń czuciowych powodują wystąpienie zjawiska elektrofizjologicznego zwanego reakcją hiperpolaryzacji, która związana jest z opisanymi powyżej zmianami transportu jonów w nabłonku, a tym samym ze zmianami w strukturze płynnej wyściółki.

Jednym z bodźców działających na zakończenia czuciowe jest drażnienie mechaniczne prowadzące do wydzielania neurotransmiterów z grupy NANC (Nonadrenergic Noncholinergic - nieadrenergiczne, niecholinergiczne) takich jak: tachykininy (substancja P, neurokinina A) oraz peptydy (np. peptyd związany z genem dla kalcytoniny - CGRP). Uwolnione neuropeptydy regulują napięcie mięśni gładkich, przepływ krwi i czynność nabłonek, a w szczególności przez nabłonkową różnicę potencjału elektrycznego (1). Wydzielanie neuropeptydów regulowane jest przez szereg substancji. Kapsaicyna i rezerpinatoksyna (RTX) działając na wymiennik jonowy  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  stymulują włókna C, a ich działanie hamowane jest między innymi przez czerwień rutenową (Ruthenium Red). W przypadku stymulacji zakończenia czuciowego bodźcami elektrycznymi, o wydzielaniu neurotransmiterów decydują, kanały wapniowe zależne od potencjału (Voltage Sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  Channel -VSCC) typu L i N. Kanały wapniowe typu N hamowane są przez konotoksynę (CTX), natomiast kanały typu L przez

dihydropirydynę (DPH). Uwalnianie neuropeptydów hamowane jest przez opiaty, neuropeptyd Y oraz galaninę, stymulowane jest natomiast przez prostanoidy i bradykininy. Za regulację wewnątrzkomórkowego stężenia neurotransmiterów odpowiadają peptydazy.

W toku wieloletnich doświadczeń badano mechanizmy działania prądów jonowych oraz udział poszczególnych jonów w reakcji hiperpolaryzacji. (26, 27, 28, 29, 30).

Badania przez nabłonkowych prądów jonowych z zastosowaniem metod elektrofizjologicznych, izotopowych i immunologicznych, znajdują zastosowanie w badaniach klinicznych, fizjologicznych, farmakologicznych i toksykologicznych (8, 24). Badania te dotyczą głównie zjawisk elektrycznych zachodzących w żywych organizmach. Zmiany w przez nabłonkowych drogach przepływu jonów zachodzące po śmierci nie zostały jak dotąd poznane. Spodziewać się można, że wraz z ustaniem krążenia krwi dochodzi do zanikania zjawisk elektrycznych w nabłonkach. Ocena pośmiertnej charakterystyki tych procesów, z uwagi na brak doniesień na ten temat w dostępnej literaturze medycznej, będzie przedmiotem projektu badawczego planowanego w tutejszym laboratorium.

Podsumowując, można przyjąć, że preparat nabłonkowy może stać się kolejnym interesującym materiałem do badań reakcji interlatalnych. Niewykluczone również, że znajomość pośmiertnej charakterystyki przepływu przez nabłonkowych prądów jonowych może zostać w przyszłości wykorzystana również w medycynie sądowej, w aspekcie ustalania czasu zgonu.

*Autorzy pracy składają serdeczne podziękowania  
Panu Profesorowi Tomaszowi Tyrakowskiemu  
za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy*

## PIŚMIENNICTWO:

1. Barnes P. J.: Airway neuropeptides and asthma, *TiPS*, 1987, 8, 24-27; -2. Benos D. J., Awayda M. S., Ismailov I. I., Johnson J. P.: Structure and function of amiloride sensitive  $\text{Na}^+$  channels, *J. Membr. Biol.*, 1995, 143, 1-18; -3. Cazzola M., Matera M. G., Damato G., Rossi F.: Effects of serotonin on airways; recent developments, *Allergy*, 1995, 50, 1-10; -4. Fong P., Chao A. C., Widdicombe J. H.: Potassium dependence of  $\text{Na}-\text{Cl}$  cotransport in dog tracheal epithelium, *Am. J. Physiol.*, 1991, 261 (4Pt 1), (L290-L295); -5. Frieling T., Dobreva G., Weber E., Becker K., Rupprecht C., Neunlist M., Schemann M.: Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in the distal colon through activation of submucosal neurons, *Naunyn-Schmedebergs Arch. Pharmacol.*, 1999, 359:71-79; -6. Frizzell R. A.: Role of absorptive and secretory processes in hydration of the airway surface, *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1988, 138: S3-S6; -7. Greger R.: Epithelial transport. In.: *Comprehensive Human Physiology*, Ed. Greger R., Windhorst U. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1996, 2, 1217-1237; -8. Guo Y., Schneider L. A., Wangen-Stein O. D. D.:  $\text{HOCl}$  effects on tracheal

epithelium: conductance and permeability measurements, *J. Appl. Physiol.*, 1995, 78, 1330-1338; -9. Haas M.: The Na-K-Cl cotransporters, *Am. J. Physiol.*, 1994, 267, 869-885; -10. Heitzmann D., Warth R., Bleich M., Henger A., Nitschke R., Greger R.: Regulation of the Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>K<sup>+</sup> cotransporter in isolated rat colon crypts, *Pflugers Arch-Eur J. Physiol.*, 2000, 439:378-384;

11. Karlsson I. A., Sant Ambrogia G., Widicombe J.: Afferent neural pathways in cough and reflex bronchoconstriction, *J. Appl. Physiol.*, 1988, 65, 1007-1023; -12. Kato T., Owen R. L.: Structure and function of intestinal mucosal epithelium, *Handbook of Mucosal Immunology*, 1994, 11-25; -13. Koefoed-Johnsen V., Ussing H. H.: The nature of the frog skin potential, *Acta Physiol. Scand.*, 1958, 42, 298-308; -14. Lamont; Mucus J. T.: The front line of intestinal mucosal defense, *Annals New York academy of Sciences*, 190-201; -15. Liedke C. M.: Electrolyte transport in the epithelium of pulmonary segments of normal and cystic fibrosis lung, *FASED. J.*, 1992, 6, 30-76; -16. Maggi C. A., Giachetti A., Dey R. D., Said S. I.: Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and tachykinins, *Physiol. Rev.*, 1995a, 75, 277-322; -17. Maggi C. A.: Capsaicin and primary afferent neurons: from basic science to human therapy, *J. Autonomie. Nerv. Sys.*, 1991, 33; -18. Mail M., Bleich M., Schurlein M., Kuhr J., Seydewitz H. H., Brandis M., Greger R., Kunzelmann K.: Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP, *Am. J. Physiol.*, 1998, 275:G1274-G1281; -19. Nedergaard S., Larsen E. H., Ussing H. H.: Sodium recirculation and isotonic transport in toad small intestine, *J. Membrane Biol.*, 1999, 168: 241-251; -20. Palmer L. G.: Epithelial Na channels: function and diversity, *Ann. Rev. Physiol.*, 1992, 54, 51-66;

21. Southern K. W., Noon P. G., Bosworth D. G., LeGrys V. A., Knowels M. R., Barker P. M.: A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants, *J. Pediatr.*, 2001, 139(3), 353-358; -22. Scheuermann D. W., Adriaensen D., Timmermans J. P., De Groodt-Lasseel M. H. A.: Comparative histological overview of the chemical coding of the pulmonary neuroepithelial endocrine system health and disease, *Eur. J. Morphol.*, 1992, 30, 101-112; -23. Smith P. R., Benos D. J.: Epithelial Na channels, *Ann Rev. Physiol.*, 1991, 53, 509-530; -24. Tamaoki J., Takemura H., Kondo M., Chiyotani A., Sakai A., Konno K.: Effect of TJ-96 and antiallergic herbal medicine on tracheal transepithelial potential difference in vivo, *Res. Commun. Molecul. Pathol. P.*, 1995, 88, 39-50; -25. Trzebski A.: Odruchy wychodzące z układu oddechowego. W: *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, Traczyk W. Z., Trzebski A.: Wyd. PZWL, Warszawa, 1989, (2), 247-250; -26. Tyrakowski T., Wojciechowska I., Banach B., Mościbroda A., Greczko I.: Elektrofizjologiczne badania miejscowych zmian transportu jonów w ścianie tchawicy in vitro. *Ann. Acad. Med. Stetin.*, 1997, 43, 99-111; -27. Tyrakowski T., Wojciechowska I., Banach B., Mościbroda A., Bartłomowicz M.: Reappraisal of amiloride action on transepithelial electrical potential difference of isolated tracheal wall. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1998, 46, 45-50; -28. Tyrakowski T., Sedlaczek A., Greczko I., Bartłomowicz M., Wojciechowska I.: Ambroxol effect on transepithelial electrical potential difference of isolated tracheal wall. *Pol. J. Pharmacol.*, 1997, 49, 53-58; -29.

Tyrakowski T., Wojciechowska I., Banach B., Mościbroda A.: Changes in potential difference of isolated tracheal wall after cough receptor stimulation. *pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 1995, 430 Suppl., R159; -30. Tyrakowski T., Kosik-Bogacka D., Bartłomowicz M., Wojciechowska M.: Hyperpolarisation of transepithelial electrical potential difference after stimulation of tactile receptors of frog skin in vitro, *Zoologica Poloniae*, 1997, 42/1-4:67-77;

31. Tyrakowski T.: Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego QP7R - biochemiczna analiza mukowiscydozy, *Post. Biochemii*, 1993, 39(1), 25-31; -32. Widicombe J. H., Ueki I. F., Bruderman I., Nadel J. A.: The effects of sodium substitution and ouabain on ion transport by dog tracheal epithelium, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1979, 120, 385-392;

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM  
ul. Marii Curie-Skłodowskiej 9  
85-094 Bydgoszcz