



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΥΥΒΔΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ,  
ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (VEGF) ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΗ  
ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ**

**ΔΕΛΗΓΙΩΡΓΗ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα 2006-2009.

Ευχαριστώ θερμά,

- Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πασχάλη - Αδάμ Μολυβδά, για την πολύτιμη βοήθεια του και τις εμπειριστατωμένες παρατηρήσεις του.
- Τον Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πνευμονολογίας, Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, για την επιστημονική αρωγή και τις πολύτιμες συμβουλές του.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Χατζόγλου Χρυσή, για την καθοδήγηση και την καθοριστική συμβολή της στην εκπόνηση της διατριβής αυτής.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Παρασκευά Ευφροσύνη, για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική βοήθεια.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Χατζηευθυμίου Αποστολία για τις πολύ σημαντικές συμβουλές και παρατηρήσεις της.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής Θώρακα - Καρδιάς - Αγγείων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Τσιλιμίγκα Νικόλαο, για την σημαντική βοήθεια του στην παροχή του ανθρώπινου πειραματικού υλικού.
- Τον συνεργάτη κ. Ζαρογιάννη Σωτήρη για τη σημαντική βοήθεια του.
- Τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την εξαίρετη τεχνική υποστήριξη.
- Την οικογένειά μου και τον αρραβωνιαστικό μου Κόκκαλη Δημήτρη για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν προς το πρόσωπό μου το χρονικό αυτό διάστημα.

▪ **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΠΑΣΧΑΛΗΣ - ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ** (Επιβλέπων)

Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ**

Καθηγητής Πνευμονολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

▪ **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΜΟΛΥΒΔΑΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ – ΑΔΑΜ** (Επιβλέπων)

Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Καθηγητής Πνευμονολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: Δεληγιώργη  
Όνομα: Τριανταφυλλιά  
Όνομα πατρός: Νικόλαος  
Όνομα μητρός: Ελένη  
Ημερομηνία γέννησης: 01/12/1983  
Τόπος γέννησης: Κατερίνη  
Τόπος κατοικίας: Θεσσαλονίκη  
Διεύθυνση: Γρηγορίου Λαμπράκη 3, Νέα Πολιτεία, Εύοσμος  
Κινητό τηλέφωνο: 6973754677  
E-mail: filitsadeli@hotmail.com  
trdeligi@med.uth.gr

## ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2001: Αποφοίτηση από το 2<sup>ο</sup> Ενιαίο Λύκειο Λάρισας .
- 2001-2005: Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απόκτηση πτυχίου με βαθμό 7,78 «Λίαν Καλώς».
- 2006-σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Άριστη γνώση Αγγλικών : Certificate of Proficiency in English University of Cambridge  
Certificate of Proficiency in English University of Michigan

Πολύ καλή γνώση Ιταλικών: Diploma di lingua italiana Istituto Italiano di Cultura

## ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Πτυχίο ECDL (Βασικές έννοιες πληροφορικής, Windows, Word, Excel, Access, PowerPoint & Internet).

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, **Deligiorgi T**, Liakopoulos V, Kourti P, Giannopoulou M, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Stefanidis I. Rapid effect of dexamethasone on the permeability of visceral sheep peritoneum. Adv Perit Dial. 2008; 24 : 2-6.

2. Zarogiannis S, **Deligiorgi T**, Stefanidis I, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Hatzoglou C. Dexamethasone decreases the transmesothelial electrical resistance of the parietal and visceral pleura. Accepted in the Journal of Physiological Sciences, 2009.

## ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 17<sup>th</sup> ERS (European Respiratory Society), Stockholm, Sweden, September 15-19, 2007. Dexamethasone increases sheep visceral and parietal pleura permeability. **T. Deligiorgi**, C. Hatzoglou, S. Zarogiannis, A. Karioti, I. Stefanidis, K. Gourgoulianis, P.-A. Molybdas.
2. 17<sup>th</sup> ERS (European Respiratory Society), Stockholm, Sweden, September 15-19, 2007. Leptin influence the transmesothelial permeability of isolated sheep visceral and parietal pleura. E. Hanika, C. Hatzoglou, S. Zarogiannis, **T. Deligiorgi**, V. Liakopoulos, K. Gourgoulianis, P.-A. Molybdas.
3. 12<sup>th</sup> Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis, Istanbul, Turkey, June 20-24, 2008. Effect of dexamethasone on the electrophysiologic profile of visceral sheep peritoneum. A. Karioti, V. Liakopoulos, S. Zarogiannis, C. Hatzoglou, **T. Deligiorgi**, E. Oikonomidou, K. Gourgoulianis, P. Molybdas, I Stefanidis.

## ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 8<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας, Θεσσαλονίκη, 1-5 Ιουνίου 2006. Επίδραση της αλατότητας στη δραστηκότητα των πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας (*Sparus aurata*). E. Ψόχιου, **T. Δεληγιώργη**, Z. Μαμούρης, K.A. Μούτου.
2. 15<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ηράκλειο Κρήτης, 2-5 Νοεμβρίου 2006. Η αναστολή της διαμεμβρανικής μεταφοράς  $\text{Na}^+$  λόγω αδρενεργικής διέγερσης στον διαφραγματικό τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου δεν συντελείται μέσω ευαίσθητων σε αμιλορίδη διαύλων  $\text{Na}^+$ . Σ. Ζαρογιάννης, X. Χατζόγλου, I. Στεφανίδης, **T. Δεληγιώργη**, B. Λιακόπουλος, K. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς.
3. 16<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007. Η δεξαμεθαζόνη αυξάνει τη διαπερατότητα της κορυφαίας επιφάνειας του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου μέσω της αντιμεταφοράς  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ . **T. Δεληγιώργη**, X. Χατζόγλου, Σ. Ζαρογιάννης, A. Καρυώτη, I. Στεφανίδης, K. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς.
4. 28<sup>th</sup> Annual Conference on Dialysis, Orlando, Florida, March 2-4, 2008. Rapid effect of dexamethasone on the permeability of the visceral sheep peritoneum. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, **Deligiorgi T**, Kourti P, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

5. 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αλεξανδρούπολη, 20-23 Νοεμβρίου 2008. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) μειώνει τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου. Σ. Ζαρογιάννης, **T. Δεληγιώργη**, Ι. Στεφανίδης, Β Λιακόπουλος, Κ. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς, Χ. Χατζόγλου.
6. 29<sup>th</sup> Annual Dialysis Conference, Houston, Texas, March 8-10, 2009. Spironolactone increases permeability of the visceral sheep peritoneum. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, **Deligiorgi T**, Giannopoulou M, Arampatzis S, Liakopoulos V, Gourgoulis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

## ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 54<sup>ο</sup> Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Ιωάννινα, 25-27 Οκτωβρίου 2002.
2. Ιπποκράτεια 2003, Λάρισα, 17-19 Οκτωβρίου 2003
3. 56<sup>ο</sup> Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Λάρισα, 25-27 Νοεμβρίου 2004.
4. Ημέρες Πνευμονολογίας 2006, Λάρισα, 22-24 Σεπτεμβρίου 2006.
5. Ημέρες Πνευμονολογίας 2007, Βόλος, 21-23 Σεπτεμβρίου 2007.
6. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	3
<b>ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ</b> .....	4
Εμβρυολογία του υπεζωκότα.....	4
Ιστολογία του υπεζωκότα .....	5
Αιμάτωση του υπεζωκότα.....	7
Λεμφαγγεία του υπεζωκότα.....	8
Νεύρωση του υπεζωκότα.....	9
Υπεζωκοτικό υγρό .....	9
<b>ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ</b> .....	11
Τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων.....	12
Μικρολάχνες.....	12
Κυστίδια.....	13
Στόματα.....	13
Ρόλος και λειτουργία του μεσοθηλίου.....	13
Μεσοθηλιακή μεταφορά.....	14
Εκκριτικές λειτουργίες του μεσοθηλίου .....	14
Προσκόλληση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων.....	15
Επούλωση και αναγέννηση του μεσοθηλίου .....	16
Έλεγχος πήξης και ινωδολυτική δραστηριότητα.....	16
<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ</b> .....	18
Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.....	18
Ο ρόλος των πιέσεων στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού.....	19
Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού διαμέσου των πετάλων του υπεζωκότα.....	20
Ο ρόλος των λεμφαγγείων στην απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού .....	22
Ο ρόλος του σπλαχνικού υπεζωκότα στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού.....	23
Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού με ενδοκυττάρωση.....	23
<b>ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ</b> .....	25
Υπεζωκοτική συλλογή.....	25
Διιδρώματα .....	26
Εξιιδρώματα.....	27
<b>ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΚΑΙ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ</b> .....	30



Φυματίωση.....	30
Μετεμφραγματικό σύνδρομο.....	31
Ρευματοειδής αρθρίτιδα.....	31
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος.....	32
Σαρκοείδωση.....	32
<b>ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ .....</b>	<b>33</b>
Διάχυση.....	33
Ενεργητική μεταφορά.....	33
Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων.....	33
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ .....</b>	<b>35</b>
Μέθοδος Ussing.....	35
<b>ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ</b>	
<b>ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ.....</b>	<b>39</b>
Δεξαμεθαζόνη.....	39
Μιφεπριστόνη.....	42
Σπιρολακτόνη.....	43
5 - (N - αιθυλ - N - ισοπρόπυλο - αμιλορίδη) (EIPA) .....	44
Αμιλορίδη .....	45
Ουαμπαΐνη .....	45
Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF).....	45
Αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα (SU5416).....	51
Εκλεκτικός Αναστολέας του VEGFR2 υποδοχέα (SU1498) .....	51
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>52</b>
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....</b>	<b>53</b>
<b>ΜΕΡΟΣ Α: Πειράματα σε υπεζωκότα προβάτου .....</b>	<b>53</b>
Συλλογή και προετοιμασία ιστού .....	53
Πειραματική διαδικασία .....	53
Πειράματα με δεξαμεθαζόνη .....	55
Πειράματα με VEGF.....	56
Στατιστική ανάλυση.....	57
<b>ΜΕΡΟΣ Β: Πειράματα σε καλλιέργειες ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων ....</b>	<b>57</b>
Απομόνωση και καλλιέργεια μεσοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου υπεζωκότα...57	
Ταυτοποίηση των μεσοθηλιακών κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες .....	58
Πειραματική διαδικασία .....	59

Στατιστική ανάλυση.....	62
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
ΜΕΡΟΣ Α: Αποτελέσματα υπεζωκότα προβάτου.....	63
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης .....	63
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με μifeπριστόνη .....	69
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με σπιρολακτόνη .....	72
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με τον EIPA .....	76
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την αμιλορίδη .....	80
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την ουαμπαΐνη .....	84
Αποτελέσματα VEGF .....	88
Αποτελέσματα VEGF σε συνδυασμό με SU5416 .....	95
Αποτελέσματα VEGF σε συνδυασμό με SU1498 .....	98
ΜΕΡΟΣ Β: Αποτελέσματα ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα....	103
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης .....	105
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την αμιλορίδη .....	107
Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την ουαμπαΐνη .....	108
Αποτελέσματα VEGF .....	110
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	112
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	124
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	126
SUMMARY .....	128
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	130

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπεζωκοτική κοιλότητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες περιέχει μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού. Αυστηρός έλεγχος του όγκου και της σύστασης του υπεζωκοτικού υγρού είναι απαραίτητος, ώστε να εξασφαλιστεί η κίνηση των πνευμόνων εντός του θωρακικού κλωβού κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Πολλές μελέτες έχουν ως στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού και τη φυσιολογία του υπεζωκότα.

Η καθιερωμένη αντίληψη που θεωρούσε ότι το υγρό φυσιολογικά μετακινείται δια της υπεζωκοτικής κοιλότητας από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, λόγω των υψηλών πιέσεων, στον σπλαχνικό υπεζωκότα που χαρακτηρίζεται από χαμηλές πιέσεις έχει αλλάξει. Με βάση την πρόσφατη βιβλιογραφία το υπεζωκοτικό υγρό φυσιολογικά εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως από τα τριχοειδή της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η απομάκρυνσή του γίνεται μέσω τεσσάρων διαφορετικών μονοπατιών (τουλάχιστον στα είδη με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα) συμπεριλαμβανομένου της απορρόφησης από τα τριχοειδή του σπλαχνικού υπεζωκότα εξαιτίας των δυνάμεων του Starling, της λεμφαγγειακής παροχέτευσης διαμέσου των στομάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα, της μεταφοράς υγρού και ηλεκτρολυτών και της ενδοκυττάρωσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δίνεται στα ίδια τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα, τα οποία στο παρελθόν θεωρούταν ότι απλά εξασφάλιζαν έναν παθητικό «φάκελο» για τις ορογόνες κοιλότητες. Αντιθέτως, σήμερα αναγνωρίζονται ως ενεργά κύτταρα κι εμπλέκονται σε πολλές ιστολογικές και μεταβολικές λειτουργίες. Διαθέτουν άφθονα οργανίδια και εμφανίζουν ενζυματικές δραστηριότητες. Συνθέτουν μακρομόρια για τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και βιολογικά ενεργά μόρια, ανταποκρίνονται στη φλεγμονή κι εκκρίνουν κυτοκίνες, αυξητικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες. Ακόμη πολύ σημαντική είναι η ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων να μετακινούν ενεργητικά ηλεκτρολύτες άρα και νερό.

Σε διάφορες ασθένειες και σύνδρομα οι ασθενείς συχνά αναπτύσσουν υπεζωκοτική συλλογή, η οποία είναι συσσωρευση υπεζωκοτικού υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Σε ένα αριθμό τέτοιων ασθενειών και συνδρόμων και πιο συγκεκριμένα στη φυματίωση, το μετεμφραγματικό σύνδρομο, το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τη σαρκοειδωση, η χορήγηση κορτικοστεροειδών οδηγεί σε επιτάχυνση της λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής,

χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός. Επίσης τα επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) είναι υψηλότερα σε εξιδρώματα και σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές παρά σε διδρώματα.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διερευνηθεί η επίδραση των κορτικοστεροειδών και του VEGF στη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Το κορτικοστεροειδές που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δεξαμεθαζόνη. Χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η μifeπριστόνη και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, η σπιρολακτόνη. Προκειμένου να μελετηθούν κάποιοι από τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιήθηκε ο EIPA, που είναι ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+$ -  $\text{H}^+$ , η αμιλορίδη που είναι αναστολέας των διαύλων ιόντων  $\text{Na}^+$  και η ουαμπαΐνη που είναι αναστολέας της αντλίας  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$ . Ακόμη πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον VEGF, τον SU5416, που είναι αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα και τον SU1498 που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 υποδοχέα. Η μελέτη της επίδρασης των πιο πάνω ουσιών έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου Ussing, που είναι η κλασική μέθοδος μελέτης της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Μεταβολές στην αντίσταση αντικατοπτρίζουν αλλαγές στη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ακέραια τμήματα τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου αλλά και πρωτογενείς καλλιέργειες μεσοθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο υπεζωκότα.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

Ο υπεζωκότας είναι ένας ημιδιαφανής υμένας που καλύπτει τους πνεύμονες, το μεσαύλιο, το διάφραγμα και την εσωτερική επιφάνεια του θωρακικού κλωβού. Αποτελείται από δύο πέταλα, το σπλαχνικό και το τοιχωματικό. Ο σπλαχνικός υπεζωκότας καλύπτει το πνευμονικό παρέγχυμα, όχι μόνο στα σημεία επαφής του με το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα και το μεσαύλιο αλλά και στις μεσολόβιες σχισμές. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του θωρακικού κλωβού, το μεσαύλιο και το διάφραγμα και διακρίνεται αντίστοιχα σε πλευρικό, μεσοπνευμόνιο και διαφραγματικό τοιχωματικό υπεζωκότα. Ο σπλαχνικός και ο τοιχωματικός υπεζωκότας συναντώνται στην πνευμονική ρίζα. Στην πνευμονική πύλη ο μεσοπνευμόνιος υπεζωκότας βρίσκεται πλάγια και πάνω στην ρίζα του πνεύμονα, ενώ πίσω από την πνευμονική ρίζα ο υπεζωκότας πορεύεται προς τα κάτω σαν μία λεπτή διπλή πτυχή που ονομάζεται πνευμονικός σύνδεσμος [1].

Μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα σχηματίζεται ένας σχισμοειδής χώρος, η υπεζωκοτική κοιλότητα, που υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει πλάτος 18-20 μm. Αυτή η κοιλότητα περιέχει ένα λεπτό στρώμα υγρού, το υπεζωκοτικό υγρό, το οποίο λειτουργεί ως λιπαντικό κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων και επιτρέπει στον σπλαχνικό υπεζωκότα, που καλύπτει τους πνεύμονες, να γλιστρά πάνω στον τοιχωματικό υπεζωκότα, που καλύπτει τη θωρακική κοιλότητα. Στον άνθρωπο το μεσαύλιο διαχωρίζει πλήρως τη δεξιά από την αριστερή υπεζωκοτική κοιλότητα. Στην υπεζωκοτική κοιλότητα φυσιολογικά υπάρχει μόνο μία λεπτή στιβάδα υγρού, για αυτό θεωρείται ως λανθάνων χώρος [1-3].

### Εμβρυολογία του υπεζωκότα

Το κεφαλικό τμήμα της σπλαχνικής κοιλότητας του εμβρύου γίνεται περικάρδιο και επικοινωνεί αμφοτερόπλευρα με τα υπεζωκοτικά ελλείμματα τα οποία με τη σειρά τους επικοινωνούν με τα περιτοναϊκά ελλείμματα. Με την πορεία της ανάπτυξης η σπλαχνική κοιλότητα χωρίζεται στο περικάρδιο, στις υπεζωκοτικές κοιλότητες και στην περιτοναϊκή κοιλότητα διαμέσου της δημιουργίας τριών διαφραγμάτων: α) το εγκάρσιο διάφραγμα, το οποίο αποτελεί ένα πρώιμο τμήμα του διαφράγματος, β) τις πλευροπερικαρδιακές μεμβράνες, οι οποίες χωρίζουν την

περικαρδιακή και τις υπεζωκοτικές κοιλότητες και γ) τις πλευροπεριτοναϊκές μεμβράνες, οι οποίες ενώνονται με το εγκάρσιο διάφραγμα, ώστε να ολοκληρώσουν το διαχωριστικό μόρφωμα μεταξύ των υπεζωκοτικών κοιλοτήτων και της περιτοναϊκής κοιλότητας. Αυτή η νεοσχηματιζόμενη υπεζωκοτική κοιλότητα καλύπτεται πλήρως από μία μεσοθηλιακή μεμβράνη, τον υπεζωκότα [1].

Όταν εμφανίζεται το αρχέγονο βρογχικό δένδρο, αυτό και η τραχεία βρίσκονται μέσα σε μεσεγγυματική ουσία. Αυτή η μάζα του μεσεγγυματικού ιστού θα αποτελέσει το μελλοντικό μεσαύλιο, που χωρίζει πλήρως τις δύο υπεζωκοτικές κοιλότητες. Στον άνθρωπο δεν υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των δύο υπεζωκοτικών κοιλοτήτων, δεξιάς και αριστερής. Καθώς αναπτύσσεται το αρχέγονο βρογχικό δένδρο στη δεξιά και αριστερή υπεζωκοτική κοιλότητα, συμπαρασύρει μια λεπτή στιβάδα μεσοθηλίου, που θα αποτελέσει τον σπλαχνικό υπεζωκότα. Καθώς οι λοβοί εξελίσσονται χωριστά συγκρατούν και μεσοθήλιο το οποίο θα αποτελέσει τον σπλαχνικό υπεζωκότα στις μεσολόβιες σχισμές. Η στιβάδα του μεσοθηλίου στις υπεζωκοτικές κοιλότητες θα αποτελέσει τον τοιχωματικό υπεζωκότα [1].

## **Ιστολογία του υπεζωκότα**

Ο υπεζωκότας αποτελείται από μία μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων, η οποία επικαλύπτει τη στιβάδα του συνδετικού ιστού. Η στιβάδα του συνδετικού ιστού είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι δύο ειδών: τα επίπεδα ή αποπεπλατυσμένα και τα κυβοειδή. Τα επίπεδα είναι περισσότερα σε αριθμό και βρίσκονται κυρίως πάνω από σταθερές δομές όπως οι πλευρές. Τα κυβοειδή είναι λιγότερα σε αριθμό και βρίσκονται πάνω από περιοχές πιο χαλαρά δομημένες όπως οι πνεύμονες και το μεσαύλιο [4]. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με στεγανούς συνδέσμους και δεσμοσωμάτια [3]. Η διάμετρος των μεσοθηλιακών κυττάρων κυμαίνεται από 6 έως 12  $\mu\text{m}$  [5].

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους μικρολάχνες, μεταξύ των οποίων υπάρχουν γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υαλουρονικό οξύ, το οποίο συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση των τριβών μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Η διάμετρος των μικρολαχνών είναι 0,1  $\mu\text{m}$  και το μήκος τους ποικίλλει από 0,5 έως 3  $\mu\text{m}$ . Στο πρόβατο έχουν μήκος 6  $\mu\text{m}$  [3, 6]. Η πυκνότητά τους ποικίλλει

από λίγα έως 600/100  $\mu\text{m}^2$  με μέση τιμή 300/100  $\mu\text{m}^2$ . Γενικά, είναι περισσότερες και πυκνότερες στα κατώτερα τμήματα του σπλαχνικού υπεζωκότα και στο πρόσθιο και κατώτερο τμήμα του μεσοπνευμόνιου τοιχωματικού υπεζωκότα. Περισσότερες μικρολάχνες υπάρχουν στον σπλαχνικό από ότι στον τοιχωματικό υπεζωκότα [3]. Οι μικρολάχνες αυξάνουν κατά πολύ την επιφάνεια του υπεζωκότα και συμβάλλουν στην ελάττωση των τριβών ανάμεσα στους πνεύμονες και το θωρακικό τοίχωμα [7].

Τα κυτταρολογικά, κυτταροχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των μεσοθηλιακών κυττάρων φαίνεται ότι μοιάζουν σε αρκετά είδη οργανισμών όπως στον άνθρωπο, στο πρόβατο, στο χοίρο, στο σκύλο και στο κουνέλι επαληθεύοντας το ρόλο του μεσοθηλίου σαν ολοκληρωμένη οντότητα [3, 8, 9]. Στο παρελθόν, θεωρούταν ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα απλά εξασφάλιζαν έναν παθητικό «φάκελο» για τις ορογόνες κοιλότητες. Αντιθέτως, σήμερα αναγνωρίζονται ως ενεργά κύτταρα κι εμπλέκονται σε πολλές ιστολογικές και μεταβολικές λειτουργίες. Διαθέτουν άφθονα οργανίδια και εμφανίζουν ενζυματικές δραστηριότητες. Συνθέτουν μακρομόρια για τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και βιολογικά ενεργά μόρια, ανταποκρίνονται στη φλεγμονή κι εκκρίνουν κυτοκίνες, αυξητικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες. Ακόμη πολύ σημαντική είναι η ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων να μεταφέρουν ενεργητικά ουσίες [10-14].

Το πάχος του τοιχωματικού υπεζωκότα αυξάνει με το μέγεθος του ζώου (από 7,8  $\mu\text{m}$  στο ποντίκι σε 30-40  $\mu\text{m}$  στον άνθρωπο) και είναι αρκετά σταθερό [15]. Το μέσο πάχος του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου είναι 21-25  $\mu\text{m}$  ενώ η απόσταση από τα τριχοειδή ως την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 10-12  $\mu\text{m}$  [16]. Κάτω από τον τοιχωματικό υπεζωκότα βρίσκεται η ενδοθωρακική περιτονία, που αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο και ελαστίνη [1].

Το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών και των περιοχών του πνεύμονα. Με βάση το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα υπάρχουν δύο ομάδες θηλαστικών: αυτά με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα όπως ο σκύλος, η γάτα, το κουνέλι και ο αρουραίος και αυτά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα όπως ο άνθρωπος, το πρόβατο, ο χοίρος, η αγελάδα και το άλογο. Στο πρόβατο το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα είναι 15-86  $\mu\text{m}$  στους κάτω λοβούς και 9-27  $\mu\text{m}$  στους μέσους και άνω λοβούς. Η απόσταση από τα τριχοειδή ως την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 38-56  $\mu\text{m}$  και 18-19  $\mu\text{m}$  αντίστοιχα [16]. Η διάκριση μεταξύ πνευμόνων με παχύ ή λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα είναι σημαντική γιατί η παροχή αίματος εξαρτάται από το πάχος του υπεζωκότα. Στα ζώα με παχύ υπεζωκότα όπως



το πρόβατο η κύρια πηγή αίματος είναι η συστηματική (βρογχική) κυκλοφορία , ενώ σε εκείνα με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα η κύρια πηγή αίματος είναι η πνευμονική κυκλοφορία. Σε όλα τα είδη πάντως η παροχέτευση του αίματος από τον σπλαχνικό υπεζωκότα γίνεται διαμέσου των πνευμονικών φλεβών [17].

Η στιβάδα του συνδετικού ιστού στον σπλαχνικό υπεζωκότα έχει δύο σημαντικές λειτουργίες: α) συμβάλλει στην ελαστική επαναφορά των πνευμόνων, που είναι πολύ σημαντική για την αποβολή του αέρα από τους πνεύμονες, με το δίκτυο ελαστικών ινών που διαθέτει και β) περιορίζει τον όγκο έκπτυξης των πνευμόνων προστατεύοντάς τους, με τις κολλαγόνες ίνες [18].

### **Αιμάτωση του υπεζωκότα**

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αιματώνεται από τα τριχοειδή της συστηματικής κυκλοφορίας. Κλάδοι των μεσοπλευρίων αρτηριών αιματώνουν τον πλευρικό υπεζωκότα, ενώ ο μεσοπνευμόνιος υπεζωκότας αιματώνεται κυρίως από την περικαρδιοφρενική αρτηρία. Ο διαφραγματικός υπεζωκότας αιματώνεται από την άνω φρενική και τις μωφρενικές αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση του τοιχωματικού υπεζωκότα γίνεται διαμέσου των μεσοπλευρίων φλεβών που εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα ή στο βραχιονοκεφαλικό στέλεχος .

Η αιμάτωση του σπλαχνικού υπεζωκότα εξαρτάται από το αν το ζώο διαθέτει παχύ ή λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα. Γενικά, στα ζώα με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα η αιμάτωσή του προέρχεται από την πνευμονική κυκλοφορία, ενώ στα ζώα με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα η παροχή αίματος γίνεται από την συστηματική κυκλοφορία μέσω των βρογχικών αρτηριών. Η φλεβική παροχέτευση του σπλαχνικού υπεζωκότα γίνεται διαμέσου των πνευμονικών φλεβών.

Αυτές οι διαφορές της αιμάτωσης έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετική πίεση διήθησης στα δύο πέταλα. Έτσι, η πίεση διήθησης στον σπλαχνικό υπεζωκότα είναι μικρότερη από αυτή στον τοιχωματικό, γιατί οι βρογχικές αρτηρίες που τροφοδοτούν τον πνευμονικό εκβάλλουν σε πνευμονικές φλέβες χαμηλής πίεσης κι όχι στις φλέβες της συστηματικής κυκλοφορίας [1, 15, 19].

## Λεμφαγγεία του υπεζωκότα

Τα λεμφαγγεία του πλευρικού υπεζωκότα παροχετεύουν τη λέμφο κοιλιακώς προς τους λεμφαδένες των έσω θωρακικών αγγείων και ραχιαίως προς τους έσω μεσοπλευρίους λεμφαδένες κοντά στις κεφαλές των πλευρών. Τα λεμφαγγεία του μεσοπνευμόνιου υπεζωκότα πορεύονται προς τους τραχειοβρογχικούς και μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες, ενώ τα λεμφαγγεία του διαφραγματικού υπεζωκότα προς τους παραστερνικούς, μέσους φρενικούς και οπίσθιους μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες.

Ο σπλαχνικός υπεζωκότας διαθέτει ένα πυκνό κι εκτεταμένο δίκτυο λεμφαγγείων που διατρέχουν ολόκληρη την επιφάνεια του πνεύμονα προς την πύλη και επίσης εισχωρούν στο πνευμονικό παρέγχυμα, διαπερνώντας τα μεσολόβια διαφράγματα ώστε να ενωθούν με τα βρογχικά λεμφαγγεία. Τελικά η λέμφος καταλήγει στην πνευμονική ρίζα. Τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα δεν επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα [1].

Αντιθέτως, τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα έχουν επικοινωνία με την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου ανοιγμάτων που ονομάζονται στόματα. Τα στόματα έχουν σχήμα στρογγυλό ή ωοειδές, διάμετρο 2-6 μm και βρίσκονται κυρίως στο μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα και στη μεσοπλευρία επιφάνεια στα κατώτερα τμήματα του θώρακα [20]. Εντοπίζονται μόνο στις περιοχές που υπάρχουν διευρυμένα λεμφικά αγγεία που ονομάζονται λεμφόκολποι και επιτρέπουν τη διέλευση μεγαλομοριακών ενώσεων αλλά και κυττάρων όπως μακροφάγα και ερυθροκύτταρα. Η πυκνότητα των στομάτων ποικίλει: 1-80/mm<sup>2</sup> στα κουνέλια και 1000-2000/mm<sup>2</sup> στα πρόβατα [21]. Στην περιοχή των στομάτων τα μεσοθηλιακά κύτταρα με τις μικρολάχνες τους είναι σε συνέχεια με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων και θεωρούνται η κύρια οδός για την απομάκρυνση κάθε ουσίας από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη στομάτων στον άνθρωπο [22]. Δεν βρέθηκαν στόματα στον σπλαχνικό υπεζωκότα και τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα χωρίζονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα από ένα στρώμα συνδετικού ιστού [3, 7].

## Νεύρωση του υπεζωκότα

Τελικές αισθητικές νευρικές απολήξεις υπάρχουν στον πλευρικό και διαφραγματικό υπεζωκότα. Τα μεσοπλεύρια νεύρα νευρώνουν τον πλευρικό υπεζωκότα και το περιφερικό τμήμα του διαφραγματικού υπεζωκότα. Όταν κάποια από αυτές τις περιοχές ερεθίζεται ο πόνος εκδηλώνεται στο προσκείμενο θωρακικό τοίχωμα. Αντιθέτως, το κεντρικό τμήμα του διαφράγματος νευρώνεται από το φρενικό νεύρο και ερεθισμός αυτού του τμήματος του υπεζωκότα προκαλεί πόνο που γίνεται αντιληπτός στο σύστοιχο ώμο. Ο σπλαχνικός υπεζωκότας δεν περιέχει νευρικές απολήξεις πόνου. Έτσι η εμφάνιση πλευριτικού πόνου στο θώρακα δείχνει φλεγμονή ή ερεθισμό στον τοιχωματικό υπεζωκότα [1].

## Υπεζωκοτικό υγρό

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η υπεζωκοτική κοιλότητα περιέχει μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού. Στον άνθρωπο, ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού έχει υπολογιστεί σε 0,26ml/kg [23] και ο ρυθμός παραγωγής του είναι 0,01ml/kg/h [24]. Στα κουνέλια οι υπεζωκοτικές κοιλότητες περιέχουν 1 ml υπεζωκοτικού υγρού, ενώ σε σκύλους 2,4 ml. Οι τιμές αυτές περιλαμβάνουν και την ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού που προσκολλάται στα τοιχώματα του υπεζωκότα [25]. Ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού ανά μονάδα μάζας σώματος ( $V_{pl}$ ) έχει βρεθεί ότι μειώνεται σε σχέση με τη μάζα σώματος ( $M$ ) σύμφωνα με την εξίσωση:  $V_{pl} = 0,39M^{-0.63}$  [26].

Η ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού είναι ομοίως κατανεμημένη εντός της κοιλότητας κι έτσι το υγρό συμπεριφέρεται σαν ένα συνεχές σύστημα. Το υπεζωκοτικό υγρό είναι διαυγές και άχρωμο και περιέχει 1500-2000 κύτταρα/mm<sup>3</sup> στα κουνέλια και στους σκύλους από τα οποία 9-30% είναι μεσοθηλιακά κύτταρα, 61-77% μονοκύτταρα, 7-11% λεμφοκύτταρα και < 2% λευκοκύτταρα [25, 27, 28]. Στον άνθρωπο βρέθηκαν περίπου 1700 κύτταρα/mm<sup>3</sup> εκ των οποίων 75% μακροφάγα, 23% λεμφοκύτταρα και 1% μεσοθηλιακά κύτταρα [23]. Τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα φθάνουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω των υποπλευρίων αγγείων, τα λεμφοκύτταρα μέσω των στομάτων ενώ τα μονοκύτταρα/μακροφάγα

εξελίσσονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα με τα οποία έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση [23].

Η σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού είναι παρόμοια αλλά όχι ίδια με τη σύσταση του διάμεσου υγρού και του πλάσματος. Επίσης, η σύσταση πολλών υπεζωκοτικών συλλογών είναι αρκετά διαφορετική από το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό. Επιπλέον, η συγκέντρωση πρωτεΐνης του υπεζωκοτικού υγρού κι ο λόγος της προς την πρωτεΐνη του πλάσματος είναι χαμηλά, υποδηλώνοντας ότι κι η διαπερατότητα του υπεζωκότα στις πρωτεΐνες είναι μικρή [29]. Σε αντίθεση όμως, η αλβουμίνη που έχει μικρό μοριακό βάρος αποτελεί το μεγαλύτερο κλάσμα της ολικής πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό σε αντίθεση με το πλάσμα [25, 30]. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης του υπεζωκοτικού υγρού και ο λόγος της προς την πρωτεΐνη πλάσματος μειώνονται με την αύξηση του μεγέθους του ζώου και με την ανάπτυξη. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του ρυθμού εισόδου του υγρού (εξαιτίας της αύξησης της συστηματικής πίεσης στα τριχοειδή και της μείωσης της υδροστατικής πίεσης του υπεζωκοτικού υγρού) και στη λεμφική παροχέτευση. Στα ποντίκια η συγκέντρωση πρωτεΐνης του υπεζωκοτικού υγρού είναι 2,5 g/dl ενώ στα πρόβατα όπου ο υπεζωκότας έχει παρόμοια ανατομία με αυτή των ανθρώπων είναι 1 g/dl [30, 31]. Σε νεογέννητα σκυλιά και πρόβατα η συγκέντρωση πρωτεΐνης του υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγαλύτερη από ότι στα ενήλικα [31-33].

Η συγκέντρωση των ιόντων στο υπεζωκοτικό υγρό διαφέρει σημαντικά από αυτή του ορού. Η συγκέντρωση νατρίου και χλωρίου στο υπεζωκοτικό υγρό είναι μικρότερη κατά 2-5 % και 6-9% αντίστοιχα σε σχέση με το πλάσμα [11]. Τα επίπεδα των διττανθρακικών είναι αυξημένα σε σχέση με το πλάσμα κατά 20-25% υποδηλώνοντας pH περισσότερο αλκαλικό (pH 7,6), ενώ τα επίπεδα γλυκόζης και καλίου παραμένουν τα ίδια [28].

Η απλή παθητική παραγωγή και απορρόφηση δεν μπορούν από μόνες τους να ερμηνεύσουν τις διαφορές στη σύσταση μεταξύ του υπεζωκοτικού και του διάμεσου υγρού. Η μεταβολική δραστηριότητα του υπεζωκοτικού και του υποκείμενου πνευμονικού ιστού ή των κυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού έχει προταθεί ως ικανή, να προκαλεί μεταβολές στη σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού, παρόμοιες με αυτές που συχνά παρατηρούνται στις υπεζωκοτικές συλλογές. Μία εναλλακτική υπόθεση γι' αυτές τις διαφορές στη σύσταση περιλαμβάνει εκλεκτικές αλλαγές στους ρυθμούς παθητικής απορρόφησης κατά πλάτος του υπεζωκότα ή και διαδικασίες ενεργητικής μεταφοράς.

## ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το 1827 ο Bichat παρατήρησε με τη χρήση ιστολογικών τεχνικών ότι οι ορογόνες κοιλότητες καλύπτονται από μία μονήρη στιβάδα αποπεπλατυσμένων κυττάρων, παρόμοια με εκείνα των λεμφαγγείων [34]. Το 1880, ο Minot αναφέρθηκε σε αυτή τη στιβάδα των κυττάρων ως «επιθηλιακή επίστρωση των μεσοδερμικών κοιλοτήτων των θηλαστικών» και στη συνέχεια εισήγαγε τον όρο «μεσοθήλιο» [35].

Εμβρυολογικά το μεσοθήλιο αναπτύσσεται από το μεσόδερμα μεταξύ της 8<sup>ης</sup> και της 18<sup>ης</sup> ημέρας από την έναρξη της κυοφορίας, ανάλογα με το είδος. Στους ανθρώπους αναπτύσσεται την 14<sup>η</sup> ημέρα, με τη σταδιακή διαφοροποίηση των σφαιρικών και κυβοειδών κυττάρων σε επιμήκη αποπεπλατυσμένα κύτταρα που καλύπτουν την εμβρυική σπλαχνική κοιλότητα [36, 37].

Ενώ το μεσοθήλιο ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε τόσο παλιά, μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισε να γίνεται γνωστός ο σημαντικός του ρόλος στη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία. Δεν πρόκειται αποκλειστικά και μόνο για μία στιβάδα που απλά καθορίζει τα όρια των οργάνων και εμποδίζει τη μεταξύ τους προσκόλληση, αλλά για μία δυναμική κυτταρική μεμβράνη με πολλές σημαντικές λειτουργίες.

Το μεσοθήλιο αποτελείται από μια μονήρη στιβάδα εξειδικευμένων κυττάρων, των μεσοθηλιακών κυττάρων, που καλύπτει όλη την επιφάνεια τριών ορογόνων κοιλοτήτων (υπεζωκοτική, περικαρδιακή και περιτοναϊκή) και τα όργανα που βρίσκονται μέσα σε αυτές τις κοιλότητες. Στα αρσενικά επίσης το μεσοθήλιο επενδύει τον σάκο που περιβάλλει τους όρχεις. Το σπλαχνικό μεσοθήλιο καλύπτει τα εσωτερικά όργανα (όπως οι πνεύμονες) ενώ το τοιχωματικό το τοίχωμα της ορογόνου κοιλότητας.

Μορφολογικές και ιστοχημικές μελέτες του μεσοθηλίου πολλών θηλαστικών (συμπεριλαμβανομένου του αρουραίου, του σκύλου, του αλόγου και του ανθρώπου) έδειξαν με ελάχιστες εξαιρέσεις ότι το μεσοθήλιο των θηλαστικών είναι όμοιο ανεξάρτητα από το είδος ή την ανατομική περιοχή. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται πάνω σε μία βασική μεμβράνη που υποστηρίζεται από ένα στρώμα συνδετικού ιστού το οποίο ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή και το είδος [38].

## Τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων

Τα πιο συχνά μεσοθηλιακά κύτταρα είναι επίπεδα (αποπεπλατυσμένα) και επιμήκη, με το κυτταρόπλασμά τους γύρω από ένα κεντρικό οβάλ πυρήνα. Τα οργανίδια τους βρίσκονται κυρίως στο κέντρο κοντά στον πυρήνα. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν μικροϊνίδια, μικροσωληνίσκους, λίγα μιτοχόνδρια, όχι καλά αναπτυγμένο σύμπλεγμα Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και λίγες και κοντές μικρολάχνες. Τα επίπεδα μεσοθηλιακά κύτταρα καταλαμβάνουν τις μεγαλύτερες περιοχές της μεσοθηλιακής επιφάνειας και είναι ο κύριος κυτταρικός τύπος του τοιχωματικού υπεζωκότα.

Πιο σπάνια είναι τα κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε διάφορες περιοχές όπως στον μεσοπνευμόνιο τοιχωματικό υπεζωκότα, την περιτοναϊκή πλευρά του διαφράγματος και στα παρεγχυματικά όργανα (πνεύμονα, ήπαρ, σπλήνα). Έχουν μεγαλύτερο πυρήνα, άφθονα μιτοχόνδρια και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, ένα καλά αναπτυγμένο σύμπλεγμα Golgi, μικροσωληνίσκους και ένα συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό μικροϊνιδίων. Επίσης διαθέτουν πολυάριθμες και μακριές μικρολάχνες. Μάλλον πρόκειται για πιο ενεργά μεταβολικά κύτταρα με αυξημένη συνθετική και εκκριτική λειτουργία.

Σε πρόσφατες μελέτες έχουν βρεθεί και ενδιάμεσες μορφές κυττάρων κάτι που υποστηρίζει την άποψη ότι τα αρχικά μεσοθηλιακά κύτταρα είναι επίπεδα τα οποία στη συνέχεια εξελίσσονται (διαφοροποιούνται) σε κυβοειδή μέσω των ενδιάμεσων μορφών και έτσι γίνονται μεταβολικά ενεργά [39].

## Μικρολάχνες

Η πιο σημαντική μεμβρανική εξειδίκευση του μεσοθηλίου είναι οι μικρολάχνες οι οποίες προεξέχουν από την επιφάνεια των κυττάρων και ποικίλουν σε μήκος, σχήμα και πυκνότητα. Όπως προαναφέρθηκε είναι πιο πλούσιες και πιο μακριές στα κυβοειδή κύτταρα άρα στο σπλαχνικό υπεζωκότα. Ο αριθμός των μικρολαχνών που εκφράζονται σε ένα κύτταρο αλλάζει κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες και έτσι αλλάζει και η λειτουργία του [7, 40]. Αυτό μπορεί να συνδέεται με αλλαγές στο επιφανειακό φορτίο, δηλαδή να αντανακλά αλλαγές στη σύνθεση του αρνητικά φορτισμένου γλυκοκάλυκα που καλύπτει την επιφάνεια του

μεσοθηλιακού κυττάρου ή μπορεί να οφείλεται στην παγίδευση από τις μικρολάχνες πρωτεϊνών και άλλων μορίων από το υγρό της κοιλότητας, που προστατεύει το μεσοθήλιο από επιφανειακές τριβές και εξασφαλίζει την ακεραιότητά του [6].

## **Κυστίδια**

Μία άλλη μεμβρανική εξειδίκευση του μεσοθηλίου είναι τα κυστίδια. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν ένα καλά αναπτυγμένο σύστημα κυστιδίων. Τα κυβοειδή κύτταρα και άρα ο σπλαχνικός υπεζωκότας έχουν πιο ανεπτυγμένο σύστημα κυστιδίων. Η συγκέντρωση τους αντιστοιχεί στον αριθμό των μικρολαχνών. Τα κυστίδια εμπλέκονται στην μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος του μεσοθηλίου [35].

## **Στόματα**

Τα στόματα είναι ανοίγματα στην συνένωση δύο ή περισσότερων μεσοθηλιακών κυττάρων. Μέχρι σήμερα η κατανομή, η δομή και η λειτουργία τους δεν έχει αποσαφηνιστεί. Τα στόματα έχουν διάμετρο 3-12 μm και βρίσκονται κυρίως σε περιοχές όπου υπάρχουν κυβοειδή κύτταρα. Αρχικά πίστευαν ότι τα στόματα περιοριζόταν κυρίως στο διάφραγμα. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν δεδομένα ότι βρίσκονται και εκτός του διαφράγματος, στον πλευρικό, μεσοπνευμόνιο και διαφραγματικό τοιχωματικό υπεζωκότα [39]. Αυτά τα ανοίγματα προσφέρουν μία απευθείας πρόσβαση στο υπομεσοθηλιακό λεμφαγγειακό σύστημα, επιτρέποντας γρήγορη απομάκρυνση υγρού, κυττάρων, βακτηρίων και μορίων από τις ορογόνες κοιλότητες. Προτάθηκε επίσης ότι τα στόματα παρέχουν επικοινωνία μεταξύ περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας μέσω του διαφράγματος [35].

## **Ρόλος και λειτουργία του μεσοθηλίου**

Οι δύο κύριες λειτουργίες που αποδίδονται στο μεσοθήλιο είναι ότι παρέχει ένα προστατευτικό φραγμό από φυσική ζημιά ή από μικροοργανισμούς που εισβάλλουν και ότι μειώνει τις τριβές για την ελεύθερη κίνηση οργάνων και ιστών. Μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων υπάρχουν στεγανές συνδέσεις και επίσης τα

κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν επιφανειακές γλυκοσαμινογλυκάνες, κυρίως υαλουρονικό, το οποίο συγκεντρώνεται πάνω στις μικρολάχνες προστατεύοντας τα κύτταρα από φυσική ζημιά ή από μολύνσεις. Επίσης η έκκριση του υαλουρονικού ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στο να προστατεύει από την ανάπτυξη όγκου. Ακόμη τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν την φωσφατιδυλοχολίνη ένα λιπαντικό που μειώνει τις τριβές μεταξύ των ορογόνων μεμβρανών. Παρόλα αυτά πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να διαλευκάνουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων όπως αυτές που αναφέρονται στη συνέχεια [38].

## **Μεσοθηλιακή μεταφορά**

Το μεσοθήλιο εμπλέκεται στη μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος των ορογόνων κοιλοτήτων. Οι πολλές μικρολάχνες αυξάνουν την επιφάνεια της κορυφαίας επιφάνειας του κυττάρου, διευκολύνοντας έτσι την απορρόφηση. Μελέτες με ανιχνευτές έχουν δείξει ότι ουσίες και μόρια μπορούν να μετακινηθούν ενεργώς μέσω πινοκυτταρικών κυστιδίων. Άλλες μελέτες επίσης χρησιμοποιώντας παρόμοιους ανιχνευτές έδειξαν ότι η μεσοθηλιακή μεταφορά μπορεί να συμβεί μέσω της παρακυττάριας οδού και των στομάτων. Τα επίπεδα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν να κάνουν κυρίως με την μεμβρανική μεταφορά ενώ τα κυβοειδή έχουν ένα ευρύτερο φάσμα λειτουργικών δραστηριοτήτων [35].

## **Εκκριτικές λειτουργίες του μεσοθηλίου**

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά κύτταρα που συμμετέχουν στην ορογόνο φλεγμονή εκκρίνοντας διάφορους μεσολαβητές όπως προσταγλαδίνες, προστακυκλίνες, χυμοκίνες, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, μόρια της εξωκυτταρικής μήτρας, ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Αυτοί οι μεσολαβητές της φλεγμονής απελευθερώνονται σαν απάντηση σε εξωκυτταρικά σήματα (αμίαντος, βακτηριακές ενδοτοξίνες και κυτοκίνες) και έχουν σκοπό την αποκατάσταση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας της ορογόνου μεμβράνης.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν χυμοκίνες με πολωμένο τρόπο προς την κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων δημιουργώντας μία χημειοτακτική κλίση από την βασική προς την κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων. Ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα



έχουν δειχθεί ότι ακολουθούν αυτή την κλίση και διασχίζουν μονοστιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων. Άρα τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνοντας χυμοκίνες με πολωμένο τρόπο προωθούν την κατευθυνόμενη διαμεσοθηλιακή μετανάστευση τόσο ουδετερόφιλων όσο και μονοκυττάρων.

Επίσης η κίνηση των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία στην περιοχή της φλεγμονής διευκολύνεται με την έκφραση ιντεγκρινών και μορίων προσκόλλησης, τα οποία εκφράζονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα μόρια προσκόλλησης εκφράζονται μόνο στις μικρολάχνες των μεσοθηλιακών κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των μικρολαχνών είχε προταθεί ότι είναι να παγιδεύει πρωτεΐνες από το ορογόνο υγρό έτσι ώστε να βοηθάει στην εξασφάλιση της ακεραιότητας του μεσοθηλιακού κυττάρου. Παρόλα αυτά είναι πιο πιθανό ότι ρυθμίζοντας την πυκνότητα των μικρολαχνών μαζί με την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν την μετακίνηση των λευκοκυττάρων μέσα και έξω από τις ορογόνες κοιλότητες.

Ακόμη τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα εκφράζοντας κάποια βοηθητικά μόρια στην επιφάνειά τους. Το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 είναι το μείζον βοηθητικό μόριο για την παρουσίαση αντιγόνου από τα μεσοθηλιακά κύτταρα [41]. Η αντιγονοπαρουσίαση και η ενεργοποίηση των T κυττάρων είναι τα πρώτα βήματα στη δημιουργία μίας συγκεκριμένης ανοσικής απάντησης [35].

## **Προσκόλληση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων**

Ο ακριβής ρόλος των μεσοθηλιακών κυττάρων στην προσκόλληση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων δεν έχει ξεκαθαριστεί. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι τραυματισμένες περιοχές του μεσοθηλίου είναι θέσεις που ευνοούν την προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων [42], πιθανότατα λόγω της πρόσδεσης των κυττάρων αυτών στο επίστρωμα υαλουρονικού οξέος των μεσοθηλιακών κυττάρων, λόγω της αυξημένης παραγωγής μορίων προσκόλλησης των μεσοθηλιακών κυττάρων σε απάντηση φλεγμονωδών παραγόντων και έκθεσης στο υποκείμενο εξωκυττάριο στρώμα. Ωστόσο, πειραματικά έχει δειχθεί ότι το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ προερχόμενο από επιφάνεια καλλιέργειας μεσοθηλιακών κυττάρων απέτρεψε την προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων στα μεσοθηλιακά κύτταρα [43],

πιθανότατα λόγω σύνδεσής του με τα μόρια CD44 των νεοπλασματικών κυττάρων που παρεμπόδισε την αλληλεπίδρασή τους με το υαλουρονικό οξύ στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων [38].

## **Επούλωση και αναγέννηση του μεσοθηλίου**

Οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μεσοθηλιακή αναγέννηση είναι αμφιλεγόμενοι. Το μεσοθήλιο είναι ένας αργά ανανεώσιμος ιστός (με 0,16 – 0,5 % των κυττάρων να βρίσκονται σε μίτωση κάθε φορά) που μπορεί να διεγερθεί από μία ποικιλία παραγόντων πολλαπλασιασμού και χημειοτακτικών παραγόντων και από φυσική βλάβη έτσι ώστε να αυξήσει το ρυθμό ανακύκλωσης του. Η επούλωση του μεσοθηλίου δεν συμβαίνει μόνο με πολλαπλασιασμό και μετανάστευση κυττάρων (στις άκρες του τραύματος) όπως στο επιθήλιο, καθώς όλα τα τραύματα του μεσοθηλίου ανεξάρτητα από το είδος και το μέγεθος τους επουλώνονται πλήρως μέσα στον ίδιο χρόνο, 7 με 10 ημέρες.

Η διαδικασία λοιπόν της επούλωσης αρχίζει μέσα σε 24 ώρες από τον τραυματισμό (με την εμφάνιση ενός πληθυσμού στρογγυλών κυττάρων κυρίως ουδετερόφιλων και μακροφάγων) και ολοκληρώνεται σε 7 με 10 ημέρες όταν η περιοχή καλύπτεται από κύτταρα που δείχνουν όλα τα χαρακτηριστικά των μεσοθηλιακών κυττάρων.

Η καταγωγή αυτών των νέων μεσοθηλιακών κυττάρων δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη αλλά ένας αριθμός πιθανοτήτων έχει προταθεί. Πιθανόν να προέρχονται από ώριμα ή πολλαπλασιαζόμενα μεσοθηλιακά κύτταρα γειτονικών ή απέναντι ορογόνων επιφανειών, από προϋπάρχοντα ελεύθερα μεσοθηλιακά κύτταρα που επέπλεαν στο ορογόνο υγρό, από μετασχηματισμό μακροφάγων, από υπομεσοθηλιακά πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα που μετατρέπονται σε μεσοθηλιακά κύτταρα και μεταναστεύουν στην επιφάνεια του τραύματος και από πολυδύναμα πρόδρομα (αρχέγονα) κύτταρα της κυκλοφορίας που προέρχονται από το μυελό των οστών [39].

## **Έλεγχος πήξης και ινωδολυτική δραστηριότητα**

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν την πήξη του αίματος μέσω του ιστικού παράγοντα με τον οποίο ξεκινάει ο καταρράκτης της πήξης. Επίσης έχουν

ινωδολυτική δραστηριότητα μέσω της έκκρισης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) που μετατρέπει το πλασμινογόνο σε ενεργό πλασμίνη η οποία διασπά τους θρόμβους. Η ινωδολυτική δραστηριότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων παίζει σπουδαίο ρόλο στην παρεμπόδιση και απομάκρυνση θρόμβων αίματος που σχηματίζονται μετά από μηχανικό τραυματισμό, αιμοθώρακα και μόλυνση των ορογόνων μεμβρανών. Εάν η ινωδολυτική δραστηριότητα δεν είναι επαρκής, ινώδεις προσκολλήσεις σχηματίζονται μεταξύ απέναντι ορογόνων επιφανειών με σοβαρές παθολογικές συνέπειες [38].

## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

### Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν ως αντικείμενο έρευνας την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανακύκλωση της μικρής αυτής ποσότητας υγρού που υπάρχει στην υπεζωκοτική κοιλότητα, του υπεζωκοτικού υγρού, και γενικότερα τη φυσιολογία του υπεζωκότα.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού προκύπτει από την ισορροπία της κίνησης του υγρού μέσα κι έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κίνηση αυτή διέπεται από τις δυνάμεις του Starling (που βασίζονται στις υδροστατικές και κολλοειδωσμοτικές πιέσεις του υπεζωκοτικού υγρού και των τριχοειδών), την απαγωγή του υγρού από τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα καθώς και από την ανταλλαγή υγρού κι ηλεκτρολυτών διαμέσου του μεσοθηλίου και των δύο πετάλων του υπεζωκότα [44]. Σύμφωνα με την κλασσική εξίσωση του Starling, η διαυπεζωκοτική κίνηση υγρού ( $J_v$ ) είναι ίση με τη συνολική διαφορά πίεσης ( $\Delta P$ ) κατά πλάτος του σπλαχνικού ή του τοιχωματικού υπεζωκότα:

$$J_v = L_p S \Delta P$$

όπου  $L_p$  είναι η σταθερά υδατικής διαπερατότητας της μεμβράνης του υπεζωκότα,  $S$  είναι το εμβαδόν της επιφάνειας της μεμβράνης, η τιμή  $L_p S$  αποτελεί τη σταθερά διήθησης ( $K_f$ ) και η  $\Delta P$  καθορίζεται από τον τύπο:

$$[(P_c - P_{liq}) - \sigma(\pi_{liq} - \pi_c)]$$

όπου  $P_c$  είναι η υδροστατική πίεση στα υπούπεζωκοτικά τριχοειδή,  $P_{liq}$  η υδροστατική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού,  $\pi_{liq}$  η κολλοειδοσμοτική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού,  $\pi_c$  η κολλοειδοσμοτική πίεση στα τριχοειδή και  $\sigma$  μία σταθερά που καθορίζεται από τη διαπερατότητα της μεμβράνης στις πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια.

## Ο ρόλος των πιέσεων στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού

Τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία και έχουν, όπως όλα τα τριχοειδή, υδροστατική πίεση 30 cm H<sub>2</sub>O. Οι δυνάμεις ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων καθιστούν την ενδοϋπεζωκοτική πίεση μικρότερη της ατμοσφαιρικής κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της αναπνοής. Η πίεση αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το βάθος και ο τύπος της αναπνοής. Η μέση τιμή της είναι -5 cm H<sub>2</sub>O. Επομένως, υπάρχει μία διαφορά πίεσης 35 cm H<sub>2</sub>O που προκαλεί κίνηση υγρού από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τα τριχοειδή του σπλαχνικού υπεζωκότα προέρχονται κυρίως από την συστηματική κυκλοφορία, αλλά η φλεβική παροχέτευση του σπλαχνικού υπεζωκότα γίνεται στην πνευμονική κυκλοφορία, με αποτέλεσμα η υδροστατική τους πίεση να είναι χαμηλότερη και ίση με 24 cm H<sub>2</sub>O. Η διαφορά μεταξύ της υδροστατικής πίεσης του πνευμονικού υπεζωκότα και της πίεσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 29 cm H<sub>2</sub>O και συντελεί στη ροή υγρού από τον πνευμονικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κολλοειδοσμοτική πίεση και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα είναι 34 cm H<sub>2</sub>O, ενώ μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι χαμηλότερη, μόνο 5 cm H<sub>2</sub>O, αφού μόνο μικρό ποσοστό μεγαλομοριακών ενώσεων μπορεί να περάσει το ενδοθήλιο των τριχοειδών και να εισέλθει στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κολλοειδοσμοτική πίεση είναι αυτή που τείνει να συγκρατεί το υγρό είτε στην υπεζωκοτική κοιλότητα είτε στα αγγεία, σε αντίθεση με την υδροστατική πίεση η οποία απωθεί το υγρό από αυτούς τους χώρους. Έτσι η διαφορά κολλοειδοσμοτικής πίεσης μεταξύ του τοιχωματικού υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι 29 cm H<sub>2</sub>O και έλκει υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα στον τοιχωματικό υπεζωκότα. Η ίδια διαφορά υπάρχει μεταξύ σπλαχνικού υπεζωκότα και υπεζωκοτικής κοιλότητας (29 cm H<sub>2</sub>O) που έλκει υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα στον σπλαχνικό υπεζωκότα. Τελικά προκύπτει μια διαφορά πιέσεων 6 cm H<sub>2</sub>O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και μηδενική διαφορά (αν και αυτό δεν έχει αποδειχτεί πειραματικά) στο επίπεδο του σπλαχνικού υπεζωκότα [44].

Επομένως, η καθιερωμένη αντίληψη που θεωρούσε ότι το υγρό φυσιολογικά μετακινείται δια της υπεζωκοτικής κοιλότητας από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, λόγω

των υψηλών πιέσεων, στον σπλαχνικό υπεζωκότα που χαρακτηρίζεται από χαμηλές πιέσεις έχει αλλάξει. Η νέα θεωρία που επικρατεί κι αναγράφεται σε έγκυρα συγγράμματα, υποστηρίζει ότι το υγρό φυσιολογικά εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα αλλά και από τα αγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα. Η απομάκρυνση του υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα.

### **Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού διαμέσου των πετάλων του υπεζωκότα**

Η διακίνηση υγρού διαμέσου των πετάλων του υπεζωκότα δεν ερμηνεύεται μόνο με τη διαφορά πιέσεων μεταξύ αυτών των πετάλων και της υπεζωκοτικής κοιλότητας αλλά και με μηχανισμούς που σχετίζονται με τη μεταφορά ιόντων και μορίων μέσα από κάποια ημιδιαπερατή μεμβράνη. Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται αυτή η μεταφορά είναι η παθητική διάχυση και η ενεργητική μεταφορά. Η παθητική διάχυση συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή μορίων διαμέσου ημιδιαπερατής μεμβράνης ανάλογα με την ηλεκτροχημική κλίση και χωρίς επιπρόσθετη κατανάλωση ενέργειας. Αντίθετα, η ενεργητική μεταφορά συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή μορίων μέσα από ημιδιαπερατές μεμβράνες με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών που λειτουργούν ως φορείς, μεταφέροντας ουσίες αντίθετα στο ενεργειακό πρηνές, δηλαδή από χαμηλή συγκέντρωση σε υψηλή συγκέντρωση. Η ενεργητική μεταφορά απαιτεί κατανάλωση επιπρόσθετης ενέργειας εκτός της κινητικής ενέργειας των μορίων.

Η μεταφορά διαμέσου των επιθηλίων γίνεται με δύο τρόπους: α) διακυττάρια, μέσα από τα κύτταρα, με ενεργητική μεταφορά και παθητική διάχυση και β) παρακυττάρια, ανάμεσα από τα κύτταρα. Η διακίνηση ιόντων ή μορίων από τις παρακυττάρια οδούς περιορίζεται από τους στεγανούς συνδέσμους μεταξύ των κυττάρων [45, 46]. Η μεταφορά μέσω των παρακυττάρια οδών θεωρούνταν παθητική, κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά. Σήμερα όμως πιστεύεται ότι μπορεί να ρυθμίζεται ενεργά [47-49].

Με βάση πρόσφατα πειράματα *in vivo* και *in vitro* το μεσοθήλιο αποδείχθηκε ότι είναι λιγότερο διαπερατό από ότι πίστευαν παλαιότερα, έχοντας χαρακτηριστικά διαπερατότητας όμοια με εκείνα του επιθηλίου [44, 50]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που παρουσιάζουν έμμεσες αποδείξεις ενεργητικής μεταφοράς ηλεκτρολυτών στον υπεζωκότα. Έχει δειχθεί σε αρουραίο η ύπαρξη διαφοράς δυναμικού (- 4mV) μεταξύ πνευμονικού αγγείου και σπλαχνικού υπεζωκότα, ενώ με αναστολείς διαύλων ηλεκτρολυτών έδειξαν ότι η διαφορά αυτή μπορεί να αποτελέσει δύναμη ενεργητικής μεταφοράς ιόντων [51]. Σε τοιχωματικό υπεζωκότα σκύλου έχει δειχθεί μικρή μεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+$  [52]. Μείωση του ρυθμού απορρόφησης προκλητού υδροθώρακα παρατηρήθηκε σε κουνέλια όταν στο υγρό εμπεριέχονταν ουσίες που εμπόδιζαν τη μεταφορά ιόντων. Στις μελέτες αυτές προτάθηκε η ύπαρξη διπλού αντιμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{H}^+ - \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  και  $\text{Na}^+$ -γλυκόζη συμμεταφορέα που δρα σε συνέργια με αντλία  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  από την αντίθετη πλευρά των μεσοθηλιακών κυττάρων [10-12]. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η ελάττωση του ρυθμού απορρόφησης με την προσθήκη αναστολέων σε αυξανόμενου μεγέθους προκλητούς υδροθώρακες σε κουνέλια, ήταν ανεξάρτητη από τον όγκο του υπεζωκοτικού υγρού, με βάση την αναστολή της ενεργητικής μεταφοράς [13], ενώ η λεμφαγγειακή παροχέτευση αυξήθηκε ανάλογα με την αύξηση του όγκου του υγρού [53].

Αλλά και σε πιο πρόσφατες μελέτες [54] έμμεσες ενδείξεις ενεργητικής μεταφοράς ιόντων δόθηκαν σε υπεζωκότα ανθρώπου και προβάτου όπου υπήρξε μεταβολή ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων μετά από χρήση αναστολέων διαύλων  $\text{Na}^+$  [55, 56]. Μάλιστα πρόσφατα ανιχνεύτηκε η έκφραση των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - και  $\delta$ -υπομονάδων των επιθηλιακών διαύλων  $\text{Na}^+$  (ENaC) σε επίπεδο mRNA και σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε μία κυτταρική σειρά ανθρώπινων υπεζωκοτικών μεσοθηλιακών κυττάρων [57]. Μελέτες έχουν δείξει μείωση της διαπερατότητας του σπλαχνικού και του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου, μετά την προσθήκη ουαμπαΐνης που αναστέλλει την αντλία  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  [58], ενώ επίσης ανταλλαγή ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  παρατηρήθηκε σε μεσοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου υπεζωκότα [59]. Τασεοεξαρτούμενοι διάλυτοι  $\text{Ca}^+$  βρέθηκαν σε υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα αρουραίου [60] αλλά και υδατοπορίνες εκφράστηκαν σε σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα [61]. Τέλος ανιχνεύτηκε μοριακά η έκφραση του  $\text{Na}^+$ -γλυκόζη συμμεταφορέα σε σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα κουνελιού [62].

Ενώ λοιπόν μέχρι τώρα η συμμετοχή της ανταλλαγής υγρού και ηλεκτρολυτών, διαμέσου του μεσοθηλίου και των δύο πετάλων του υπεζωκότα, στην

ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού είχε παραμεληθεί, όλο και αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στην άποψη ότι η ενεργητική διαμεσοθηλιακή μεταφορά ιόντων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

## **Ο ρόλος των λεμφαγγείων στην απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού**

Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα έχουν επικοινωνία με την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου των στομάτων τα οποία φαίνεται ότι απομακρύνουν πρωτεΐνες, κύτταρα και άλλα σωματίδια. Στο σπλαχνικό υπεζωκότα δεν υπάρχουν στόματα. Υπολογίζεται ότι ένας φυσιολογικός άνθρωπος βάρους 60 Kg θα έχει λεμφαγγειακή παροχέτευση από κάθε υπεζωκοτική κοιλότητα 20 ml/ώρα ή 500 ml/ημέρα [63]. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο ρυθμός απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού διαμέσου των λεμφαγγείων έχει υπολογιστεί σε 0,02 ml/Kg/ώρα στα σκυλιά και σε 0,07 ml/Kg/ώρα στα κουνέλια [64, 65]. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι αυτός αντιπροσωπεύει τη συνολική λεμφαγγειακή ροή από την υπεζωκοτική κοιλότητα που συμπεριλαμβάνει και τη ροή μέσω των λεμφαγγείων του διαμέσου ιστού τα οποία απομακρύνουν κάποια ποσότητα αλβουμίνης (και υγρού) ανεξάρτητα από τα στόματα των λεμφαγγείων. Επομένως η απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού διαμέσου των στομάτων των λεμφαγγείων αποτελεί ένα μέρος από τη συνολική λεμφική παροχέτευση. Η συμμετοχή κι άλλων μηχανισμών, όπως είναι η ενδοκυττάρωση και η διάχυση, στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από την υπεζωκοτική κοιλότητα θα πρέπει να προσδιοριστεί, για να καθοριστεί με ακρίβεια η λεμφική απομάκρυνση υγρού διαμέσου των στομάτων. Η λεμφαγγειακή ροή μέσω των στομάτων είναι αναγκαία για την απομάκρυνση από την υπεζωκοτική κοιλότητα κυττάρων, μορίων και μακρομορίων, ιδιαίτερα των μεγάλων όπως το υαλουρονικό οξύ τα οποία δεν μπορούν να απομακρυνθούν μέσω της ενδοκυττάρωσης [66]. Αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό [67, 68] και κυρίως με την αύξηση του όγκου του υπεζωκοτικού υγρού [67, 69], φαίνεται όμως ότι φθάνει σε επίπεδο κορεσμού όταν αυξάνεται πάνω από 20 φορές σχετικά με τις φυσιολογικές συνθήκες [70]. Υπό από αυτές τις συνθήκες λοιπόν, η λεμφαγγειακή παροχέτευση διαμέσου των στομάτων αντιπροσωπεύει τον πιο αποτελεσματικό τρόπο περιορισμού της επιπλέον συσσώρευσης υγρού και γίνεται ο



κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα σε παθολογικές καταστάσεις [71].

Η ενδαγγειακή πίεση των λεμφαγγείων μπορεί να μειώνεται από τη δράση εξωγενών διατακτικών δυνάμεων, που προέρχονται από τον ιστό στον οποίο εμπεριέχονται (π.χ. το τοίχωμα των διαφραγματικών λεμφαγγείων έλκεται από τις ίνες του διαφράγματος [72] ενώ τα λεμφαγγεία των πνευμόνων από τις δυνάμεις ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων [73]). Το υγρό σε υποατμοσφαιρικές πιέσεις γεμίζει τον αυλό των λεμφαγγείων όταν δρουν οι συμπιεστικές δυνάμεις, ενώ με τη δράση των διατακτικών δυνάμεων συμβαίνει επανέκπτυξη των λεμφαγγείων. Οι συμπιεστικές δυνάμεις, που μπορεί να είναι εξωγενείς (όπως η σύσπαση των αναπνευστικών μυών ή η μεταβίβαση των καρδιογεννητικών ώσεων), ή ενδογενείς (όπως η σύσπαση των λείων μυών των λεμφαγγείων), αυξάνουν την υδροστατική πίεση των λεμφαγγείων, προωθώντας τη λέμφο προς μία κατεύθυνση, λειτουργώντας σαν βαλβίδα [44].

## **Ο ρόλος του σπλαχνικού υπεζωκότα στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού**

Ο ρόλος του σπλαχνικού υπεζωκότα στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού έχει υποβαθμιστεί εξαιτίας των διαφορετικών απόψεων. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι διαπερατό, άλλοι ότι είναι σχεδόν στεγανό και άλλοι ότι δεν υπάρχει κλίση πιέσεων για την απορρόφηση υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα. Άμεσες και έμμεσες αποδείξεις υποστηρίζουν ότι το μεσοθήλιο δεν είναι τόσο διαπερατό όσο πίστευαν παλαιότερα. Η διαπερατότητα του σε νερό και σε διαλυμένες ουσίες μοιάζει με αυτή του ενδοθηλίου των τριχοειδών και παρουσιάζει ενεργητική μεταφορά ουσιών και υγρού [3, 12, 13]. Από την άλλη πλευρά σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί κλίση πιέσεων κατά πλάτος του σπλαχνικού υπεζωκότα που οδηγεί σε απορρόφηση υγρού [73-75].

## **Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού με ενδοκυττάρωση**

Μελέτες έδειξαν έναν επιπρόσθετο δρόμο για την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού. Πρόκειται για τη μεταφορά του σε κυστίδια σε συνδυασμό με

την ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών. Ενδοκυττάρωση μακρομορίων έχει βρεθεί *in vitro* στο μεσοθήλιο του τοιχωματικού πετάλου του περικαρδίου κουνελιού και υπολογίστηκε ότι με την ενδοκυττάρωση απομακρύνθηκαν περίπου 3,5 μl/cm<sup>2</sup>/ώρα υπεζωκοτικού υγρού [76]. Επίσης σε *in vivo* πειράματα σε κουνέλια όταν χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της ενδοκυττάρωσης, η νοκοδαζόλη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της απορρόφησης της ραδιοσημασμένης αλβουμίνης που εγχύθηκε στην υπεζωκοτική κοιλότητα και της εμφάνισής της στο πλάσμα. Υπολογίστηκε ότι με την ενδοκυττάρωση απομακρύνθηκαν περίπου 0,36 μl/cm<sup>2</sup>/ώρα υπεζωκοτικού υγρού [77]. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ένα σχετικό ρόλο της ενδοκυττάρωσης των πρωτεϊνών στον έλεγχο της κολλοειδοσμοτικής πίεσης του υπεζωκοτικού υγρού καθώς και της διακίνησής του. Φαίνεται λοιπόν, πως η λεμφαγγειακή ροή δια των στομάτων δεν είναι ο μοναδικός δρόμος απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από την υπεζωκοτική κοιλότητα και ότι ο ρόλος της στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού ίσως να έχει υπερεκτιμηθεί. Όμως, από τις παραπάνω μελέτες, η απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού με ενδοκυττάρωση στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα φαίνεται να είναι περίπου 10 φορές μικρότερη από εκείνη στο μεσοθήλιο του περικαρδίου, το οποίο συμφωνεί με μορφολογικά ευρήματα που δείχνουν μικρότερη συγκέντρωση κυστιδίων στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα σε σχέση με το μεσοθήλιο του περικαρδίου [66].

Ανακεφαλαιώνοντας, το υπεζωκοτικό υγρό φυσιολογικά εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως από τα τριχοειδή της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η απομάκρυνσή του γίνεται μέσω τεσσάρων διαφορετικών μονοπατιών (τουλάχιστον στα είδη με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα) συμπεριλαμβανομένου της απορρόφησης από τα τριχοειδή του σπλαχνικού υπεζωκότα εξαιτίας των δυνάμεων του Starling, της λεμφαγγειακής παροχέτευσης διαμέσου των στομάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα, της μεταφοράς υγρού και ηλεκτρολυτών και της ενδοκυττάρωσης [66].

## ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Η αύξηση του όγκου του υπεζωκοτικού υγρού αποτελεί έναν παράγοντα περιορισμού της συσσώρευσης επιπλέον υγρού, προκαλώντας αλλαγές στη ισορροπία των ενδοϋπεζωκοτικών πιέσεων κι αυξάνοντας τη λεμφαγγειακή απορρόφηση. Έτσι, μετατοπίζεται η ισορροπία ροής του υγρού σε καθαρή απορρόφηση. Προκαλείται έτσι, ένα είδος αρνητικού ελέγχου ανατροφοδότησης και αυτό μπορεί να παρατηρηθεί σε πειραματόζωα στα οποία έχει προκληθεί τεχνητά υδροθώρακας χωρίς να προϋπάρχουν αλλαγές στους παράγοντες που εμπλέκονται στην διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού. Η αύξηση επομένως του υπεζωκοτικού υγρού προκαλεί: 1) αύξηση της υδροστατικής πίεσης του υγρού η οποία μειώνει τη συνολική διαφορά πίεσης κατά μήκος του τοιχωματικού υπεζωκότα και την αυξάνει κατά μήκος του σπλαχνικού υπεζωκότα, 2) αν ο υδροθώρακας προκληθεί με υγρό χωρίς πρωτεΐνη, τότε η μειωμένη κολλοειδοσμητική πίεση του υγρού επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα, 3) η αύξηση του όγκου και της υδροστατικής πίεσης του υγρού (ευνοώντας την πλήρωση των λεμφαγγείων και αυξάνοντας τη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών των λεμφαγγείων) προκαλεί αύξηση της απορρόφησης του υγρού διαμέσου των στομάτων των λεμφαγγείων [44].

### Υπεζωκοτική συλλογή

Η συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα χαρακτηρίζεται ως υπεζωκοτική συλλογή. Πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ισορροπία των δυνάμεων που εμπλέκονται στη διακίνηση υγρού στα πέταλα του υπεζωκότα οδηγώντας σε ανισορροπία μεταξύ των ρυθμών παραγωγής και απορρόφησης του υγρού. Οι αιτίες πρόκλησης υπεζωκοτικής συλλογής μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Παράγοντες που μεταβάλλουν την ισορροπία των ενδοϋπεζωκοτικών πιέσεων.
2. Παράγοντες που μειώνουν τη λεμφαγγειακή παροχέτευση.
3. Παράγοντες που αυξάνουν τη διαπερατότητα του μεσοθηλίου και του ενδοθήλιου των τριχοειδών.

Οι παράγοντες που μεταβάλλουν την ισορροπία των δυνάμεων Starling είναι κυρίως εξωϋπεζωκοτικοί, αυτοί που μειώνουν την λεμφαγγειακή παροχέτευση αφορούν κυρίως τα υπεζωκοτικά και εξωϋπεζωκοτικά λεμφαγγεία, ενώ αυτοί που προκαλούν απώλεια της εκλεκτικότητας της μεμβράνης σχετίζονται υποχρεωτικά με το μεσοθήλιο του υπεζωκότα. Εκτός από την πρώτη περίπτωση, στις άλλες υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του υγρού πάνω από το φυσιολογικό. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό χωρίζονται οι υπεζωκοτικές συλλογές σε διδρώματα (με φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υγρό) και εξιδρώματα [44].

Στην κλινική πράξη ο διαχωρισμός των διδρωμάτων από τα εξιδρώματα γίνεται με τα κριτήρια του Light [78]. Τα εξιδρώματα έχουν τουλάχιστον ένα και τα διδρώματα κανένα από τα παρακάτω τρία κριτήρια:

1. Η σχέση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του ορού είναι  $>0,5$ .
2. Η σχέση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) του υπεζωκοτικού υγρού προς την LDH του ορού είναι  $>0,6$ .
3. Τα επίπεδα της LDH του υπεζωκοτικού υγρού είναι  $>2/3$  των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών του ορού.

## **Διδρώματα**

Τα διδρώματα δημιουργούνται ως αποτέλεσμα αύξησης της υδροστατικής πίεσης στα τριχοειδή του πνεύμονα και του υπεζωκότα. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού είναι μειωμένη όπως σε φυσιολογικά επίπεδα, αν η διαπερατότητα του μεσοθηλίου και του ενδοθηλίου δεν επηρεαστεί. Αύξηση της πίεσης στα συστηματικά τριχοειδή αυξάνει το ρυθμό διήθησης υγρού στον τοιχωματικό υπεζωκότα. Η συστηματική φλεβική υπέρταση επίσης επηρεάζει τη λεμφαγγειακή παροχέτευση, η οποία παρεμποδίζεται λόγω αύξησης της πίεσης ροής στον θωρακικό πόρο. Αύξηση στην πίεση των πνευμονικών τριχοειδών παρεμποδίζει την απορρόφηση υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα και προκαλεί διήθηση υγρού από την επιφάνεια των πνευμόνων. Η πνευμονική φλεβική υπέρταση φαίνεται να είναι η κύρια αιτία της υπεζωκοτικής συλλογής σε καρδιακές παθήσεις (συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια). Υπεζωκοτική συλλογή προκαλείται σε αυξημένης υδροστατικής πίεσης και αυξημένης διαπερατότητας πνευμονικό οίδημα. Η διαφυγή

του υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα αντιπροσωπεύει μια σημαντική οδό κάθαρσης του διαμέσου οιδήματος, δρώντας προστατευτικά για τις κυψελίδες. Οι παράγοντες που προκαλούν υψηλής διαπερατότητας οίδημα πιθανώς επηρεάζουν και τη διαπερατότητα του υπεζωκότα, όμως σε πνευμονικό οίδημα αυξημένης υδροστατικής πίεσης ο μεσοθηλιακός φραγμός διατηρείται και σπάνια οι υπεζωκοτικές συλλογές έχουν αυξημένη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Άλλα λιγότερα συχνά αίτια διδρωμάτων είναι η συμπιεστική περικαρδίτιδα, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και η υπολευκωματιναιμία. Επίσης σε ατελεκτασία η μειωμένη υδροστατική πίεση στο υπεζωκοτικό υγρό ευνοεί τη διήθηση υγρού προς την κοιλότητα. Περιτοναϊκή συλλογή μπορεί να επιπλακεί με διδρωματική υπεζωκοτική συλλογή. Πιθανός μηχανισμός είναι η μετακίνηση υγρού από την περιτοναϊκή στην υπεζωκοτική κοιλότητα με τα διαφραγματικά λεμφαγγεία ή από διαφραγματικά ελλείμματα λόγω της υφιστάμενης διαφοράς πίεσης μεταξύ των δύο κοιλοτήτων [44].

## **Εξιδρώματα**

Τα εξιδρώματα σχηματίζονται όταν ελαττώνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυττάρων από την υπεζωκοτική κοιλότητα ή όταν πρωτεΐνες και κύτταρα εισέρχονται στην κοιλότητα διαμέσου μίας διαπερατής μεσοθηλιακής μεμβράνης. Η μείωση της λεμφαγγειακής παροχέτευσης μπορεί να είναι η πρωταρχική αιτία ενός εξιδρώματος. Πραγματικά, η φυσιολογική λεμφαγγειακή ροή διαμέσου των στομάτων, εκτός από τη συμβολή της στην απομάκρυνση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα, παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της κολλοειδοσμοτικής πίεσης του υγρού σε χαμηλά επίπεδα, από τη στιγμή που συνεισφέρει στην απομάκρυνση πρωτεϊνών από το υγρό. Όταν κολλοειδοσμοτική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού αυξάνει, αλλάζει η ισορροπία των πιέσεων στα πέταλα του υπεζωκότα ευνοώντας τη διήθηση και εμποδίζοντας την απορρόφηση του υγρού. Έτσι μία συλλογή υγρού που συχνά ξεκινά σαν διίδρωμα γρήγορα μετατρέπεται σε εξίδρωμα ακόμη και όταν δεν μεταβάλλονται τα χαρακτηριστικά της διαπερατότητας του μεσοθηλιακού φραγμού. Μείωση της λεμφαγγειακής ροής μπορεί να οφείλεται σε βλάβη των λεμφαγγείων, όπως σε φλεγμονώδη ή νεοπλασματική προσβολή του υπεζωκότα, σε απόφραξη των στομάτων των λεμφαγγείων από εναπόθεση ινικής στα τελικά στάδια των παραπνευμονικών συλλογών, ή να είναι αποτέλεσμα διαταραχών του εξωυπεζωκοτικού λεμφαγγειακού

δικτύου, όπως είναι η υποπλασία του λεμφαγγειακού συστήματος και η απόφραξη των μεσοπνευμόνιων λεμφαγγείων ή του θωρακικού πόρου. Επίσης αύξηση της συστηματικής φλεβικής πίεσης μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μείωση της λεμφαγγειακής ροής με την αύξηση της πίεσης που προκαλεί στον θωρακικό πόρο [44].

Η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών και του μεσοθηλίου αποτελεί τη βάση των περισσότερων εξιδρωμάτων. Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνει με δύο μηχανισμούς: με τη δημιουργία νέων ανοιγμάτων μεταξύ των κυττάρων, πιθανών ως επακόλουθο της συστολής των κυττάρων και με τη δημιουργία διακυττάρων μονοπατιών, πιθανών από τη σύντηξη των κυτταροπλασματικών κυστιδίων με την κυτταρική μεμβράνη. Στην πρώτη περίπτωση, αυξάνει ο αριθμός των ανοιγμάτων μεταξύ των κυττάρων χωρίς μεταβολή της ακτίνας τους, έτσι είναι μεγαλύτερη η διαπερατότητα στο νερό και σε μικρά μόρια, ενώ η απώλεια μακρομορίων εμποδίζεται. Στη δεύτερη περίπτωση η διαπερατότητα για τα μακρομόρια επίσης αυξάνεται. Πολλές ουσίες έχουν βρεθεί που προκαλούν αυτές τις αλλαγές στο ενδοθήλιο. Το μεσοθήλιο μπορεί να μοιράζεται κάποιους από αυτούς τους μηχανισμούς, αφού ουσίες που είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου έχουν βρεθεί σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές. Η προέλευση αυτών των ουσιών μπορεί να είναι είτε εξωυπεζωκοτική, είτε από το ίδιο το μεσοθήλιο, αφού τα ενεργοποιημένα μεσοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν ποικιλία κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα. Αυτό με τη σειρά του επηρεάζει την είσοδο στην υπεζωκοτική κοιλότητα φλεγμονωδών κυττάρων, τα οποία επίσης παράγουν διαμεσολαβητές της φλεγμονής και μεταβάλλουν επιπρόσθετα το μεσοθηλιακό φραγμό. Κυτταρικοί μηχανισμοί θεωρείται ότι εμπλέκονται στη δημιουργία των εξιδρωμάτων που σχετίζονται με όλες τις μορφές τοπικής φλεγμονής (πνευμονία, εμβολή, νοσήματα κολλαγόνου), εξωυπεζωκοτικής φλεγμονής (παγκρεατίδα) και με κακοήθειες. Συχνά σχετίζονται με μείωση της λεμφαγγειακής ροής, που οφείλεται σε άμεση εμπλοκή των λεμφαγγείων του υπεζωκότα ή του μεσοθωρακίου.

Στον πίνακα 1, φαίνονται τα αίτια των υπεζωκοτικών συλλογών ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν. Η πιο συχνή αιτία ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής είναι η καρδιακή ανεπάρκεια, οι πνευμονίες και τα νεοπλάσματα.

*Πίνακας 1. Αίτια υπεζωκοτικών συλλογών.*

---

<b>ΔΙΑΡΩΜΑΤΑ</b>	
Καρδιακή ανεπάρκεια	Υποθυρεοειδισμός
Νεφρική ανεπάρκεια	Πνευμονική εμβολή
Κίρρωση	Υπολευκωματιναιμία
Περιτοναϊκή κάθαρση	Ουρινοθώρακας
Συμπιεστική περικαρδίτιδα	Σύνδρομο Meigs
Νεφρωσικό σύνδρομο	Σαρκοείδωση

---

<b>ΕΞΙΔΡΩΜΑΤΑ</b>	
<b>Νεοπλάσματα</b>	<b>Νοσήματα ΓΣ</b>
Κακοήθες μεσοθηλίωμα	Ρήξη οισοφάγου
Μεταστατικό καρκίνωμα	Παγκρεατίτιδα
Λέμφωμα	Ενδοκοιλιακό απόστημα
<b>Λοιμώδη νοσήματα</b>	<b>Μετά από χειρουργικές επεμβάσεις</b>
Φυματίωση	Μετά από αορτοστεφανιαία
Βακτηριακές λοιμώξεις	παράκαμψη
Ιογενείς λοιμώξεις	Χειρουργική επέμβαση κοιλίας
Μυκητιασικές λοιμώξεις	Μεταμόσχευση πνεύμονα
Παρασιτικές λοιμώξεις	<b>Άλλα</b>
<b>Νοσήματα κολλαγόνου</b>	Πνευμονική εμβολή
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	Έκθεση σε αμιάντο
Ερυθηματώδης λύκος	Σαρκοείδωση
Σύνδρομο Churg-Strauss	Φάρμακα
Μικτή νόσος του συνδετικού ιστού	Ουραιμική πλευρίτιδα
Ανοσοβλαστική λεμφαδενοπάθεια	Σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών
Σύνδρομο Sjogren	Χυλοθώρακας
Κοκκιωμάτωση Wegener	Αιμοθώρακας

---

## ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΚΑΙ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Υπεζωκοτικές συλλογές διαφόρων αιτιολογιών, που αναφέρονται στη συνέχεια, φαίνεται ότι ανταποκρίνονται θετικά στη χορήγηση κορτικοστεροειδών. Ο μηχανισμός της επιτάχυνσης του χρόνου λύσης των υπεζωκοτικών συλλογών από τα κορτικοστεροειδή δεν είναι πλήρως γνωστός, πιστεύεται όμως ότι οφείλεται στην αντιφλεγμονώδη δράση τους.

### Φυματίωση

Στις μέρες μας η φυματίωση συνεχίζει να είναι μία σημαντική αιτία υπεζωκοτικών συλλογών σε όλο τον κόσμο και ιδιαίτερα στις υποανάπτυκτες χώρες. Η συχνότητα της φυματιώδους υπεζωκοτικής συλλογής ποικίλει από χώρα σε χώρα, με ποσοστό 4% σε όλες τις περιπτώσεις φυματίωσης στις ΗΠΑ και 23% στην Ισπανία.

Η φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή συνήθως αναπτύσσεται σαν αποτέλεσμα μίας αντίδρασης επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*) που απελευθερώνεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή έχει αυτόματο χρόνο λύσης σε 2 με 4 μήνες. Παρόλα αυτά εάν δεν θεραπευτεί 65% των ασθενών θα αναπτύξουν πνευμονική ή εξωπνευμονική φυματίωση μέσα σε 5 χρόνια. Επομένως, οι ασθενείς με φυματιώδη υπεζωκοτική συλλογή θα πρέπει να λαμβάνουν αντιφυματική αγωγή όπως οι ασθενείς με φυματίωση. Η φαρμακευτική αγωγή περιλαμβάνει εξάμηνο θεραπευτικό σχήμα με ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη και πυραζιναμίδα στους πρώτους δύο μήνες και ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη στους επόμενους τέσσερις μήνες [79].

Η χορήγηση κορτικοστεροειδών σε συνδυασμό με την αντιφυματική αγωγή προσφέρει μία γρήγορη ανακούφιση από τα συμπτώματα (όπως γρήγορη μείωση του πυρετού) και μειώνει τον χρόνο λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής, όμως δεν φαίνεται να αλλάζει την μακροχρόνια εξέλιξη του ασθενούς. Πραγματοποιήθηκαν κλινικές δοκιμές οι οποίες είχαν μεθοδολογικές διαφορές επομένως δεν μπορούν να αξιολογηθούν τα διαφορετικά ευρήματά τους. Με βάση αυτά τα δεδομένα, η χρήση των κορτικοστεροειδών δεν συνιστάται σαν θεραπεία ρουτίνας στη φυματιώδη



υπεζωκοτική συλλογή, παρά μόνο αν υπάρχουν οξέα συμπτώματα, όπως πυρετός, θωρακικό άλγος ή δύσπνοια που επιβαρύνουν τον ασθενή [80].

## **Μετεμφραγματικό σύνδρομο**

Εμφανίζεται σε 1-7% των περιπτώσεων μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (σύνδρομο Dressler) και πιστεύεται ότι προκαλείται από αυτοάνοση αντίδραση. Από αυτούς τους ασθενείς περίπου 40-60% αναπτύσσουν υπεζωκοτική συλλογή. Το μετεμφραγματικό σύνδρομο εμφανίζεται πιο συχνά μετά από χειρουργείο καρδιάς, με μία συχνότητα 17-31%, με την εμφάνιση υπεζωκοτικών συλλογών σε 47-68% από αυτές τις περιπτώσεις. Στους περισσότερους ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου χορηγούνται μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) ή πρεδνιζόνη (κορτικοστεροειδές) και η συλλογή λύεται σε 1 έως 5 εβδομάδες. Οι υπεζωκοτικές συλλογές τείνουν να λύνονται αυθόρμητα μέσα σε 2 μήνες μετά από χειρουργείο καρδιάς. Στην περίπτωση όμως που οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα ή έχουν μεγάλες έως μέτριες συμπτωματικές υπεζωκοτικές συλλογές τότε πρέπει να χρησιμοποιηθούν NSAIDs ή κορτικοστεροειδή [80].

## **Ρευματοειδής αρθρίτιδα**

Πρόκειται για μία χρόνια αυτοάνοση πάθηση η οποία έχει ως κύριο χαρακτηριστικό ότι προσβάλλει τις περιφερικές αρθρώσεις (χεριών και ποδιών). Περίπου 5% ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα αναπτύσσουν υπεζωκοτική συλλογή. Η ρευματοειδής πλευρίτιδα είναι συχνότερη στους άνδρες, σε ηλικία πάνω από 45 ετών με δερματικά οζίδια. Δεν υπάρχουν ελεγχόμενες μελέτες που κρίνουν την αποτελεσματικότητα των κορτικοστεροειδών στην θεραπεία της υπεζωκοτικής συλλογής στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. Έχει δειχθεί ότι ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ανταποκριθούν στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Στα αρχικά στάδια της ασθένειας μπορεί να γίνει θεραπεία με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs, όπως η ασπιρίνη) ή με κορτικοστεροειδή (πρεδνιζόνη). Εάν σε 8 με 12 εβδομάδες η υπεζωκοτική συλλογή λυθεί, η θεραπεία μπορεί να διακοπεί. Εάν δεν λυθεί η υπεζωκοτική συλλογή ακολουθεί θεραπευτική θωρακοκέντηση και ενδοπλεύρια χορήγηση κορτικοστεροειδών [80].

## Συστηματικός ερυθματώδης λύκος

Είναι μία πάθηση του ανοσοποιητικού συστήματος που προσβάλλει διάφορα όργανα (κυρίως τα νεφρά). Η πλευρίτιδα (υπεζωκοτική φλεγμονή) συνοδευόμενη ή όχι από υπεζωκοτική συλλογή εμφανίζεται στο 45-56% των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Οι ακτινολογικές ενδείξεις της υπεζωκοτικής συλλογής είναι λιγότερο συχνές με ποσοστό 16-37%. Οι υπεζωκοτικές συλλογές είναι συχνότερες στις γυναίκες και συνήθως η τελευταία εκδήλωση της ασθένειας αλλά σε μερικές περιπτώσεις (5%) μπορεί να είναι και η πρώτη εκδήλωση της ασθένειας. Η πλειοψηφία των υπεζωκοτικών συλλογών του συστηματικού ερυθματώδη λύκου λύνονται πολύ γρήγορα με θεραπεία κορτικοστεροειδών. Η υπεζωκοτική συλλογή των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο μπορεί να οφείλεται και σε άλλους λόγους όπως νεφρωσικό σύνδρομο, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονική εμβολή, παραπνευμονική συλλογή ή φαρμακευτικό συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Όταν αποκλειστούν οι υπόλοιπες αιτίες της υπεζωκοτικής συλλογής πρέπει να ξεκινήσει θεραπεία με πρεδνιζόνη (60-80 mg/ημέρα) και να σταματήσει μόλις υποχωρήσει η οξεία πλευρίτιδα [80].

## Σαρκοείδωση

Πρόκειται για μία αυτοάνοση διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλεί κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα. Περίπου 0-5% των ασθενών με σαρκοείδωση θα αναπτύξουν υπεζωκοτική συλλογή. Η υπεζωκοτική συλλογή στη σαρκοείδωση μπορεί να υποχωρήσει αυθόρμητα ή να απαιτεί χορήγηση κορτικοστεροειδών. Ο χρόνος της αυθόρμητης λύσης ποικίλλει, συνήθως όμως είναι 1 με 3 μήνες. Παρόλα αυτά υπάρχουν αναφορές λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής σε 2 εβδομάδες με θεραπεία κορτικοστεροειδών αλλά και ως 6 μήνες με ή χωρίς χορήγηση κορτικοστεροειδών. Επομένως ο χειρισμός της υπεζωκοτικής συλλογής στην σαρκοείδωση πρέπει να είναι ανάλογος με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Απουσία συμπτωμάτων η συλλογή συνήθως λύεται αυθόρμητα. Εάν η συλλογή είναι συμπτωματική και επαναλαμβανόμενη, συστήνεται η θεραπεία με κορτικοστεροειδή για την ανακούφιση των συμπτωμάτων και για την επιτάχυνση της λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής [80].

## ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η κυτταρική (ή πλασματική) μεμβράνη ξεχωρίζει τον ενδοκυττάριο από τον εξωκυττάριο χώρο, λειτουργώντας ως φραγμός και ρυθμίζοντας με τη διαπερατότητα της την είσοδο και έξοδο ουσιών από και προς το κύτταρο, έτσι ώστε το κυτταρόπλασμα να διατηρεί διαφορετική σύσταση από εκείνη του εξωκυτταρίου χώρου. Αποτελείται από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, μέσα στην οποία υπάρχουν διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η μεταφορά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά.

### Διάχυση

Διάχυση ή παθητική μεταφορά είναι η τυχαία διακίνηση ιόντων ή μορίων μέσα από χώρους που παρεμβάλλονται μεταξύ μορίων στη μεμβράνη είτε σε συνδυασμό με πρωτεΐνη φορέα. Η διάχυση επιτελείται με μόνη κινητήρια δύναμη την κινητική ενέργεια των μορίων (χωρίς επιπρόσθετη κατανάλωση ενέργειας) ανάλογα με την ηλεκτροχημική βαθμίδωση του μορίου.

### Ενεργητική μεταφορά

Η ενεργητική μεταφορά συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή μορίων διαμέσου της μεμβράνης με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών φορέων. Μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πραινός, δηλαδή από χαμηλή συγκέντρωση σε υψηλή συγκέντρωση. Η ενεργητική μεταφορά απαιτεί κατανάλωση επιπρόσθετης ενέργειας εκτός της κινητικής ενέργειας των μορίων.

### Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων

Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολικότητα στις μεταφορικές ιδιότητες τους. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταφορικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης που βλέπει προς τη μια πλευρά της στιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από εκείνες της μεμβράνης που βλέπει προς την άλλη πλευρά.

Για παράδειγμα, στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, οι πρωτεΐνες μεταφοράς που συμμετέχουν στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών από το έντερο, πρέπει να περιορίζονται στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων (η επιφάνεια που είναι σε επαφή με το περιεχόμενο του εντέρου), ενώ άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά διαλυτών ουσιών έξω από τα επιθηλιακά κύτταρα, προς τους ιστούς και την κυκλοφορία του αίματος, πρέπει να περιορίζονται στη βασεοπλευρική επιφάνεια. Η ασύμμετρη αυτή κατανομή των μεμβρανικών πρωτεϊνών διατηρείται από ένα φραγμό ο οποίος σχηματίζεται στο σημείο όπου το κύτταρο εφάπτεται με γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα και ο οποίος ονομάζεται στεγανή σύνδεση. Οι στεγανές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν τη μίξη των μεμβρανικών μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της κορυφαίας, διατηρώντας έτσι την πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν τη δίοδο ύδατος και μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι, υπάρχουν δύο τύποι οδών μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: α) οι διακυτταρικές οδοί, μέσα από τα κύτταρα και β) οι παρακυττάρια οδοί ανάμεσα από τα κύτταρα [81].

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν τη διάχυση και την ενεργητική μεταφορά. Η διακίνηση μέσω των παρακυττάρια οδών περιορίζεται από τους στεγανούς συνδέσμους που βρίσκονται συνήθως στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων [45, 46]. Η μεταφορά μέσω των παρακυττάρια οδών θεωρούνταν παθητική κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων, που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά ιόντων. Σήμερα όμως πιστεύεται ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται και ενεργητικά [47-49].

# ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

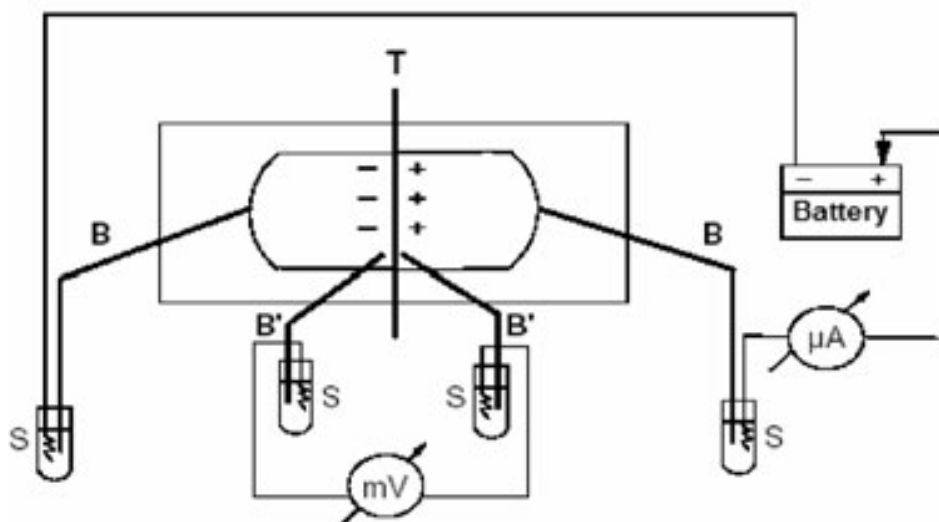
## Μέθοδος Ussing

Η κλασσική μέθοδος μελέτης της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών είναι η μέθοδος Ussing. Η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε και πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Δανό φυσιολόγο Hans Ussing, από τον οποίο πήρε και το όνομά της. Ο Hans Ussing απέδειξε την λειτουργία της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  και την ύπαρξη ενεργητικής μεταφοράς σε τμήματα δέρματος βατράχου [82]. Έκτοτε το πειραματικό αυτό μοντέλο βρήκε εφαρμογή στη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών πλήθους βιολογικών μεμβρανών και επιθηλίων. Η μέθοδος Ussing έχει αναδειχθεί σε ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα και ακριβή συστήματα μελέτης της συμπεριφοράς των ζωντανών επιθηλίων [83].

Η αρχή λειτουργίας της συσκευής Ussing φαίνεται στην εικόνα 1. Ο υπό μελέτη ιστός (T) τοποθετείται σαν επίπεδο στρώμα σε μία αντλία και εκατέρωθεν αυτού υπάρχει διάλυμα Krebs-Ringer. Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού μετράται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων ( $B'$ ,  $B''$ ) που το καθένα απέχει 3mm από την επιφάνεια του ιστού. Το δυναμικό καταγράφεται σε ένα μιλιβολτόμετρο (mV). Με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) κι ενός διαιρέτη τάσης ( $\mu\text{A}$ ) ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (B, B) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm από την επιφάνεια του ιστού. Η δημιουργούμενη ένταση του κυκλοφορούντος ρεύματος επίσης μπορεί να καταγραφεί, ενώ με τη βοήθεια του νόμου του Ohm μπορεί να υπολογισθεί η ηλεκτρική αντίσταση του ιστού. Σύμφωνα με τον νόμο του Ohm η αντίσταση ενός αγωγού ισούται με το λόγο της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται στα άκρα του αγωγού προς το ρεύμα που τον διαρρέει, δηλαδή:

$$R = V / I$$

όπου στην περίπτωση του Ussing, V είναι η μετρούμενη από τα ηλεκτρόδια διαφορά δυναμικού στην άκρη της μεμβράνης, I είναι το ρεύμα που χορηγούμε κάθε φορά στον ιστό και είναι γνωστής έντασης και R η αντίσταση της μεμβράνης που αναζητούμε.



**Εικόνα 1:** Σχηματικό διάγραμμα της συσκευής Ussing System. B: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (S) για τη χορήγηση ρεύματος. B': Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (S) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. mV: μιλιβολτόμετρο.  $\mu$ A: μικροαμπερόμετρο. Battery: Μπαταρία. T: ιστός [84].

Το Ussing System στην βασική του μορφή αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη. Το ένα είναι ο θάλαμος αυτός κάθε αυτός και το άλλο το ηλεκτρικό κύκλωμα που προσαρμόζεται επάνω του. Με την πάροδο του χρόνου έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της συσκευής ώστε πέραν της μέτρησης της διαφοράς δυναμικού, της έντασης του ρεύματος και της αντίστασης του δείγματος να είναι επιπλέον δυνατή η μέτρηση πιο περίπλοκων παραμέτρων όπως η εμπέδιση και η χωρητικότητα του συστήματος. Έχουν αναπτυχθεί θάλαμοι του Ussing σε ποικίλα μεγέθη και σχήματα. Έτσι δημιουργήθηκαν θάλαμοι που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ακόμη και τα μικρότερα κομμάτια ζωντανού ιστού (όπως επιθήλια αεραγωγών ή δείγματα από βιοψίες εντέρου με διάμετρο  $< 1$  mm) μέσω εφαρμογής μικροχειρουργικών τεχνικών [85]. Επίσης έχουν αναπτυχθεί ειδικοί θάλαμοι του Ussing στους οποίους μπορούν να μεταφερθούν πορώδεις μεμβράνες πάνω στις οποίες έχουν προηγουμένως αναπτυχθεί κύτταρα [86]. Έτσι μπορούν να μελετηθούν οι ηλεκτροφυσιολογικές παράμετροι όχι μόνο μεμβρανών αλλά και κυττάρων. Στην πραγματικότητα, στις μέρες μας αυτή φαίνεται να είναι η πιο διαδεδομένη εφαρμογή της μεθόδου Ussing [83].

Οι επιθηλιακές μεμβράνες εμφανίζουν δύο χαρακτηριστικά που τις ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους ιστούς, την πολικότητα και την ιστική συνοχή. Ο όρος πολικότητα αναφέρεται στη μετρούμενη διαφορά δυναμικού που δημιουργείται λόγω της ασύμμετρης κατανομής των πρωτεϊνών μεταξύ της κορυφαίας και της βασεοπλευρικής επιφάνειας του επιθηλίου. Ο όρος συνοχή αναφέρεται στην ακεραιότητα και την αντίσταση του ιστού σε ηλεκτρικές και μηχανικές καταπονήσεις όπως αυτό προκύπτει από το σχηματισμό πρωτεϊνικών διασυνδέσεων που ονομάζονται στεγανές συνδέσεις. Οι συνδέσεις αυτές διαχωρίζουν τις δύο επιφάνειες του επιθηλίου (κορυφαία και βασεοπλευρική) και «σφραγίζουν», συγκολλούν δηλαδή μεταξύ τους τα γειτονικά κύτταρα.

Η συνοχή ενός ιστού μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια του μετρήσιμου μεγέθους της ηλεκτρικής αντίστασής του ( $R$ ). Την αρχή αυτή διατύπωσε ο ίδιος ο Hans Ussing. Η αντίσταση ενός υλικού δίνεται από την εξίσωση:

$$R = \rho l / A$$

όπου  $R$  είναι η ωμική αντίσταση του υλικού,  $\rho$  η ειδική αντίσταση του υλικού που οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή,  $l$  το πάχος του υλικού και  $A$  το εμβαδόν της επιφάνειάς του. Όταν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του υλικού  $l$  και  $A$  παραμένουν σταθερά, η αντίσταση του υλικού οφείλεται στη μοριακή του δομή και αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής [83].

Για να μετρηθεί η τιμή της συνολικής αντίστασης της μεμβράνης μέσω της συσκευής Ussing, θα πρέπει να εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος σε αυτή. Καθώς δημιουργείται το ηλεκτρικό πεδίο, οι ηλεκτρολύτες και τα διάφορα ιοντικά στοιχεία των μεμβρανικών κυττάρων συμμετέχουν στην παραγωγή του ρεύματος που διατρέχει τη μεμβράνη καθώς και στην εμφάνιση της αντίστασης στη ροή του ρεύματος κατά τη φορά που καθορίζει το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Σύνδεση Δυναμικού (Voltage Clamp) [83].

Η τεχνική αυτή όμως έχει ένα μειονέκτημα. Παρατηρείται μετακίνηση διαλυμένων ηλεκτρολυτών στο κυτταρόπλασμα και το φαινόμενο αυτό μπορεί να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα καθώς δεν ανταποκρίνεται στην φυσιολογική κατάσταση που επικρατεί στο κύτταρο, υπό κανονικές συνθήκες. Επίσης, η ένταση

του ρεύματος που διαπερνά τη μεμβράνη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής συνοχής ή απλά την βλάβη στις πρωτεΐνες που είναι πιο ευαίσθητες στις μεταβολές της κυτταρικής ιοντικής ισορροπίας, με αποτέλεσμα οι μετρήσεις που προκύπτουν να μην αντιστοιχούν σε αυτές ενός ζωντανού επιθηλιακού κυττάρου *in vivo* [83].

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, προτάθηκε και χρησιμοποιείται η μέτρηση με Σύνδεση Ρεύματος (Current Clamp). Αντίθετα με την τεχνική της Σύνδεσης Δυναμικού, τον ιστό διαπερνούν παλμοί συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος μικρής διάρκειας και καθορισμένης έντασης. Παρόλο που αρχικά δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στις δύο μεθόδους, με την τεχνική αυτή αποφεύγεται το φαινόμενο της ιοντικής ενδοκυττάριας μετανάστευσης. Επίσης, σημαντική είναι και η διαφορά στον τρόπο μέτρησης. Με τη σύνδεση τάσης, η μέτρηση γίνεται με τη βοήθεια ενός βολτομέτρου μεγάλης εμπέδισης που μετρά τις αλλαγές στην εφαρμοζόμενη τάση. Αντίθετα στη σύνδεση ρεύματος η γεννήτρια ηλεκτρικών παλμών είναι συνδεδεμένη με αμπερόμετρο που μεταφράζει την μεταβαλλόμενη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος σε διαφορά δυναμικού. Η διαφορά δυναμικού οφείλεται στην ενεργητική μεταφορά ιόντων μέσω πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών μεταφορέων [83].



## ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

### Δεξαμεθαζόνη

Τα γλυκοκορτικοειδή (ή κορτικοστεροειδή) παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων και έχουν σημαντικές φυσιολογικές δράσεις στην αύξηση, την ανάπτυξη, στο ανοσοποιητικό σύστημα και στις διαδικασίες της φλεγμονής. Ως θεραπευτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή και κυρίως η κορτιζόλη καθώς και τα συνθετικά όπως η δεξαμεθαζόνη. Όλα τα συνθετικά παράγωγα έχουν τις ίδιες βιολογικές ιδιότητες, είναι όμως περισσότερο ισχυροί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες σε σύγκριση με τα φυσικά. Η δεξαμεθαζόνη είναι συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που έχει 30 φορές πιο ισχυρή δράση συγκριτικά με την κορτιζόλη. Η δεξαμεθαζόνη και άλλα ισχυρά συνθετικά γλυκοκορτικοειδή έχουν ένα ευρύ φάσμα κλινικής χρήσης για να θεραπεύσουν διάφορες ασθένειες [87]. Χορηγούνται είτε ως θεραπεία υποκατάστασης σε καταστάσεις έλλειψης ή ανεπάρκειάς τους είτε σε ποικίλες άλλες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος όπως στο άσθμα. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι οι πιο ισχυροί και αποτελεσματικοί παράγοντες ελέγχου χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών. Εδώ και μισό αιώνα τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών, αλλεργικών καταστάσεων και πιο πρόσφατα σε καταστάσεις που απαιτείται καταστολή της ανοσολογικής απάντησης όπως για παράδειγμα σε μεταμοσχεύσεις οργάνων [88].

Οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να δράσουν μέσω δύο οδών: της γνωστής κλασσικής γενομικής και της μη γενομικής οδού. Τις τελευταίες δεκαετίες οι γενομικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών έχουν μελετηθεί εκτενέστατα. Αυτές λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις στεροειδών της τάξης των nM όπως συμβαίνει κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Σύμφωνα με το κλασσικό μοντέλο δράσης των στεροειδών ορμονών αρχικά οι στεροειδείς ορμόνες μπαίνουν στο κύτταρο είτε παθητικά με διάχυση μέσω της μεμβράνης ή με τη βοήθεια κάποιου μεταφορέα και συνδέονται σε υποδοχείς που βρίσκονται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Οι τελευταίοι υφίστανται μία αλλαγή της διαμόρφωσης τους που οδηγεί σε αποσύνδεση των βοηθητικών πρωτεϊνών που προηγουμένως είχαν

διατηρήσει τον υποδοχέα σε ενεργό φάση και σε μία αύξηση στη συγγένεια DNA της περιοχής πρόσδεσης DNA. Στη συνέχεια το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μεταναστεύει στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί ή καταστέλλει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων και τη σύνθεση πρωτεϊνών [89] [90]. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται στην καταστολή της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν για μόρια της φλεγμονής [91]. Ο χρόνος που απαιτείται για αυτή τη διαδικασία είναι μεγαλύτερος των 30 λεπτών και μπορεί να χρειαστούν μέχρι και αρκετές ώρες ώστε να εμφανιστούν οι γενομικές δράσεις των στεροειδών [92].

Ο μη γενομικός μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών χαρακτηρίζεται από άμεση επίδραση της ορμόνης, με εμφάνιση αποτελέσματος μέσα σε δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά και δεν απαιτεί τη συμμετοχή γονιδιώματος [88]. Άμεσες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών παρατηρήθηκαν ήδη από το 1974 σε απομονωμένες νευρικές καταλήξεις του υποθαλάμου [93]. Τέτοιες άμεσες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα κύτταρα-στόχους όπως σε νευρώνες [94], σε κύτταρα του ενδομητρίου [95], σε κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων [96], σε μεμβράνες λυσοσωμάτων ηπατικών κυττάρων [97] και στον υποθάλαμο [98].

Καθώς ο αριθμός των αναφορών μη γενομικής δράσης των στεροειδών έχει αυξηθεί πάρα πολύ τις δύο τελευταίες δεκαετίες είναι πιθανόν η δράση των στεροειδών στα ζωντανά κύτταρα να μην μεσολαβείτε από έναν ομοιόμορφο μηχανισμό αλλά από διαφορετικά μονοπάτια. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να προκαλέσουν άμεσο αποτέλεσμα. Το 1998, έγινε μία πρώτη ταξινόμηση του τρόπου δράσης.

Σύμφωνα με αυτή την κατάταξη (Mannheim Classification), η στεροειδής ορμόνη μπορεί να δράσει μόνη της (άμεση δράση) ή με τη βοήθεια ενός συναγωνιστή (έμμεση δράση). Όταν η ορμόνη δρα μόνη της μπορεί να μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων στόχων, όπως τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και το μικροπεριβάλλον, χωρίς να δεσμεύεται σε κάποιον υποδοχέα (μη εξειδικευμένη δράση) ή να δεσμεύεται είτε σε ένα κλασσικό, ειδικό ενδοκυτταρικό υποδοχέα είτε σε έναν μη κλασσικό υποδοχέα (εξειδικευμένη δράση). Η μη εξειδικευμένη δράση συμβαίνει σε υψηλές συγκεντρώσεις στεροειδών. Όταν η δράση είναι έμμεση μπορεί να μη χρειάζεται την παρουσία υποδοχέα (μη εξειδικευμένη

δράση) ή πάλι μπορεί να εμπλέκεται κλασσικός ή μη υποδοχέας μαζί με το συναγωνιστή (εξειδικευμένη δράση) [99].

Η εξειδικευμένη λοιπόν μη γενομική δράση των γλυκοκορτικοειδών μεσολαβεί με μέσω υποδοχέων που συνδέονται στη μεμβράνη ενώ η μη εξειδικευμένη γενομική δράση πιστεύεται ότι συμβαίνει μέσω άμεσων επιδράσεων στις φυσικοχημικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης και επακόλουθων αλλαγών στην ιοντική μεταφορά. Μεμβρανικές περιοχές πρόσδεσης για διάφορα γλυκοκορτικοειδή έχουν περιγραφεί σε διάφορους ιστούς και κύτταρα. Για παράδειγμα σε μεμβράνες νευρώνων αμφιβίων έχουν βρεθεί περιοχές πρόσδεσης της κορτικοστερόνης και της δεξαμεθαζόνης και δεν πρόκειται για τους κλασσικούς υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών [100].

Από την άλλη, υπάρχει ένδειξη ότι μία εξειδικευμένη μορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη [101]. Μεμβρανικοί υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών έχουν βρεθεί σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου [102] και σε κύτταρα από ασθενείς με λευχαιμία [103]. Σε αυτά τα κύτταρα ο μεμβρανικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών διέφερε σε μέγεθος από τον κλασσικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών εξαιτίας μεταμεταφραστικής τροποποίησης του πρώτου. Επίσης βρέθηκε ότι ο μεμβρανικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες θερμικού shock (*heat shock*) αν και ο ρόλος τους παραμένει άγνωστος [104]. Ακόμη υπάρχουν ενδείξεις ότι όχι μόνο η λειτουργία, αλλά και ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι διαφορετικός από εκείνο του κλασσικού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [105]. Συνεπώς από τα πιο πάνω ευρήματα προκύπτει ότι η μη γενομική δράση των γλυκοκορτικοειδών περιλαμβάνει τη δράση μη κλασσικών υποδοχέων καθώς και μια μεμβρανική μορφή του κλασσικού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA.

Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει ενεργοποίηση ενός μεμβρανικού υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός δεύτερου ενδοκυτταρικού μεταβιβαστή, όπως το cAMP, οι πρωτεϊνικές κινάσες (PKA, PKC) ή τα ιόντα ασβεστίου. Η ενεργοποίηση των δεύτερων μεταβιβαστών οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων, μεταβάλλοντας τη λειτουργία του κυττάρου [106] [107].

Παρά τις πολλές διαφορές μεταξύ γενομικών και μη γενομικών μονοπατιών υπάρχουν πολλά σημεία όπου μπορεί να συμβεί αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Έχει

προταθεί λοιπόν ότι οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να δράσουν και με τους δύο τρόπους στο ίδιο κύτταρο-στόχο, οδηγώντας στην ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυττάρων μηχανισμών, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Έτσι, έχουμε ένα σύνθετο μοντέλο δυο βημάτων για τη δράση των ορμονών αυτών, με πρώτη εμφανιζόμενη τη μη γενομική δράση και στη συνέχεια την κλασσική γενομική δράση [88].

Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών έχουν αναγνωριστεί με ανοσοϊστοχημεία σε μεσοθηλιακά κύτταρα τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου [108]. Οι πληροφορίες για τα επίπεδα των ορμονών σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές ιδιαίτερα στον άνθρωπο και για τις τοπικές δράσεις των ορμονών στην υπεζωκοτική μεμβράνη είναι περιορισμένες. Στεροειδείς ορμόνες όπως η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη και η κορτιζόλη έχουν βρεθεί στο υπεζωκοτικό υγρό ασθενών με εξίδρωμα ή όγκο στον πνεύμονα σε συγκεντρώσεις όμοιες με εκείνες του πλάσματος [109]. Έχει δείχθει ακόμη σε αρουραίους ότι τα γλυκοκορτικοειδή μείωσαν τον όγκο φλεγμονωδών εξιδρωμάτων κατά τη διάρκεια επαγόμενης από καραγινίνη υπεζωκοτικής συλλογής [110]. Ακόμη μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας σε υπεζωκότα από υγιή πρόβατα έδειξαν ότι τα στεροειδή όπως η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη έχουν μία άμεση γρήγορη δράση στον υπεζωκότα μειώνοντας την ιοντική διαπερατότητα, προτείνοντας εμπλοκή στη λύση των συλλογών που συνοδεύονται με αυξημένα επίπεδα αυτών των ορμονών, πιθανώς εξαιτίας της παρεμπόδισης της ανταλλαγής υγρού και ηλεκτρολυτών [111].

## **Μιφεπριστόνη**

Η μιφεπριστόνη (RU486) είναι ένα συνθετικό στεροειδές που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η συγγένεια του για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη της δεξαμεθαζόνης. Επίσης η μιφεπριστόνη έχει αντιπρογεστερονική δράση με συγγένεια για τον υποδοχέα της προγεστερόνης πέντε φορές υψηλότερη από εκείνη της προγεστερόνης. Ακόμη έχει χαμηλή συγγένεια για τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Στην κλινική πράξη η μιφεπριστόνη χρησιμοποιείται ως αντισυλληπτικός παράγοντας (καθώς δρα ως ανταγωνιστής της προγεστερόνης). Επίσης εξαιτίας της αντιγλυκοκορτικοειδικής δράσης της χρησιμοποιήθηκε ή

προτάθηκε η χρήση της ως φάρμακο σε καταστάσεις αυξημένης παραγωγής κορτικοστεροειδών (όπως στο σύνδρομο Cushing). Έχει δειχθεί ότι εμποδίζει την αύξηση *in vitro* σε κύτταρα από ανθρώπινο καρκίνο του στήθους αλλά και *in vivo* σε αρουραίους [112].

## Σπιρολακτόνη

Πρόκειται για ένα συνθετικό στεροειδές που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών. Επιπλέον, η σπιρολακτόνη εμφανίζει μερική ανταγωνιστική δράση στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όμως η συγγένειά της για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι δύο φορές χαμηλότερη συγκριτικά με εκείνη για τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών [113]. Είναι ένα διουρητικό που συντέθηκε για να ανταγωνιστεί την αλδοστερόνη, μία ενδογενή στεροειδή ορμόνη που επηρεάζει την ομοιόσταση ιόντων νατρίου, καλίου και υδρογόνου [114]. Εδώ και 30 χρόνια χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία καταστάσεων κατακράτησης νατρίου, για την αντιμετώπιση της υπέρτασης [115], του πρωτοπαθούς υπεραλδοστερονισμού, της καρδιακής ανεπάρκειας και της οίδηματώδους ασθένειας [116]. Η παρατεταμένη χρήση της συνδέεται συχνά με ανεπιθύμητες ενδοκρινείς παρενέργειες. Η αντιανδρογόνος δράση της εξηγεί την εμφάνιση γυναικομαστίας και μυϊκής αδυναμίας στους άνδρες. Έχει βρεθεί ότι η σπιρολακτόνη δρα ως αγωνιστής στον υποδοχέα της προγεστερόνης και προστατεύει ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της φλέβας του ομφάλιου λώρου από απόπτωση αναστέλλοντας τη δράση της κασπάσης 3 [113]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η σπιρολακτόνη εμφανίζει μερική αγωνιστική δράση σε πολλές κυτταρικές σειρές όπως σε κυτταρική σειρά από ανθρώπινο ηπάτωμα και σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα. Αυτή η δράση εξαρτάται από την παρουσία του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών [117]. Ακόμη, η σπιρολακτόνη εμφάνισε ταχεία θετική ινοτροπική δράση στο μυοκάρδιο αρουραίου παρόμοια με εκείνη της αλδοστερόνης [118]. Σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου έχει αναφερθεί μερική αγωνιστική δράση της σπιρολακτόνης, καθώς η σπιρολακτόνη προκάλεσε διέγερση του συμμεταφορέα Na - K - 2Cl [119].

## 5 - (N - αιθυλ - N - ισοπρόπυλο - αμιλορίδη) (EIPA)

Ο EIPA (5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride) είναι ανάλογο της αμιλορίδης και είναι ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ . Τα ανάλογα της αμιλορίδης βρέθηκε ότι είναι έως 100 φορές πιο ισχυρά από ότι η αμιλορίδη στο να αναστέλλουν την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  [120]. Η αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  συναντάται στην πλασματική μεμβράνη όλων σχεδόν των κυττάρων των σπονδυλωτών. Πρώτη φορά ανακαλύφθηκε σε εντερικά και νεφρικά κυστίδια το 1976 [121]. Παρόλα αυτά το πρώτο γονίδιο που κωδικοποιούσε έναν αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  (NHE) αναγνωρίστηκε και κλωνοποιήθηκε το 1989 [122]. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί έξι ισομορφές του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  στα θηλαστικά (NHE1 έως NHE6). Κάθε ισομορφή αποτελείται από μία υδρόφοβη διαμεμβρανική αμινοτελική περιοχή που καταλύει την ανταλλαγή ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{H}^+$  και μία πιο μεταβλητή υδρόφιλη καρβοξυτελική περιοχή που ρυθμίζει τη δράση και την υποκυτταρική κατανομή του αντιμεταφορέα. Ο NHE1 εκφράζεται πάντα στην βασεοπλευρική μεμβράνη και έχει ένα θεμελιώδη (housekeeping) ρόλο στη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού pH και του κυτταρικού όγκου. Αντιθέτως οι ισομορφές NHE2 έως NHE6 έχουν πιο περιορισμένη ιστική κατανομή και εξειδικευμένες λειτουργίες. Οι NHE2 έως NHE4 είναι άφθονες σε επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών, του εντέρου και του στομάχου. Οι NHE2 και NHE3 βρίσκονται στην κορυφαία επιφάνεια ενώ η ισομορφή NHE4 βρίσκεται κυρίως βασεοπλευρικά. Η ισομορφή NHE5 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, στη σπλήνα και στους όρχεις. Η πιο πρόσφατα αναγνωρισμένη ισομορφή, η NHE6, βρίσκεται μόνο στα μιτοχόνδρια. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο αντιμεταφορέας ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  καταλύει την ηλεκτρικά ουδέτερη ανταλλαγή ενός εξωκυττάριου ιόντος  $\text{Na}^+$  με ένα ενδοκυττάριο ιόν  $\text{H}^+$  με στοιχειομετρία 1:1 [107]. Η αντιμεταφορά δεν εξαρτάται άμεσα από την υδρόλυση του ATP. Η αντλία  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  δημιουργεί μία κλίση ιόντων  $\text{Na}^+$  και έτσι ο αντιμεταφορέας ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  αποκτά την ενέργεια για να μεταφέρει ένα ιόν  $\text{H}^+$  έξω από το κύτταρο. Πρόκειται δηλαδή για μία δευτερογενή ενεργητική μεταφορά [123]. Η αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH, για να ρυθμιστεί ο κυτταρικός όγκος, η διαεπιθηλιακή μεταφορά ιόντων και νερού και επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την προσκόλλησή [107].

## Αμιλορίδη

Στους περισσότερους ιστούς η απορρόφηση ιόντων  $\text{Na}^+$  εξαρτάται από επιθηλιακούς διαύλους ιόντων  $\text{Na}^+$  (ENaC). Έως σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί πέντε υπομονάδες ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - και  $\epsilon$ -ENaC). Οι βιοφυσικές ιδιότητες των διαφόρων διαύλων  $\text{Na}^+$  εξαρτώνται από τη σύνθεση των υπομονάδων τους. Όταν οι  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - ENaC υπομονάδες ενώνονται μαζί σχηματίζουν ένα διάυλο που είναι πολύ εκλεκτικός για ιόντα  $\text{Na}^+$  σε σχέση με ιόντα  $\text{K}^+$ . Ο ENaC εκφράζεται στα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται στην απορρόφηση ιόντων νερού και άλατος. Η αμιλορίδη είναι ένα διουρητικό που αναστέλλει τους διαύλους  $\text{Na}^+$ . Επίσης μπορεί να αναστείλει την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ , όμως είναι 10-100 φορές ισχυρότερος αναστολέας των διαύλων  $\text{Na}^+$  [124].

## Ουαμπαΐνη

Η αντλία  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση) είναι ένα διαμεμβρανικό ετεροδιμερές ένζυμο που αποτελείται από την  $\alpha$ - και την  $\beta$ -υπομονάδα. Η  $\alpha$ -υπομονάδα είναι η καταλυτική υπομονάδα με μία ενδοκυτταρική περιοχή πρόσδεσης του ATP, μια περιοχή φωσφορύλιωσης και μία περιοχή πρόσδεσης της ουαμπαΐνης. Η  $\beta$ -υπομονάδα είναι μία μικρότερη γλυκοσυλιωμένη υπομονάδα που ίσως παίζει ρόλο στην πρόσδεση του ενζύμου στην πλασματική μεμβράνη [125, 126]. Η αντλία  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οσμωτικής και ηλεκτροχημικής κλίσης των κυττάρων [127]. Για κάθε μόριο ATP που υδρολύεται 2 ιόντα  $\text{K}^+$  μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο και 3 ιόντα  $\text{Na}^+$  έξω από αυτό, ενάντια στην ηλεκτροχημική κλίση συγκέντρωσης. Η αντλία  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  αναστέλλεται από καρδιακά γλυκοσίδια όπως η ουαμπαΐνη [128].

## Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor) VEGF ή VEGF-A είναι το ιδρυτικό μέλος μιας οικογένειας αυξητικών παραγόντων που περιλαμβάνει εκτός από τον VEGF τους εξής παράγοντες: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και PlGF (αυξητικός

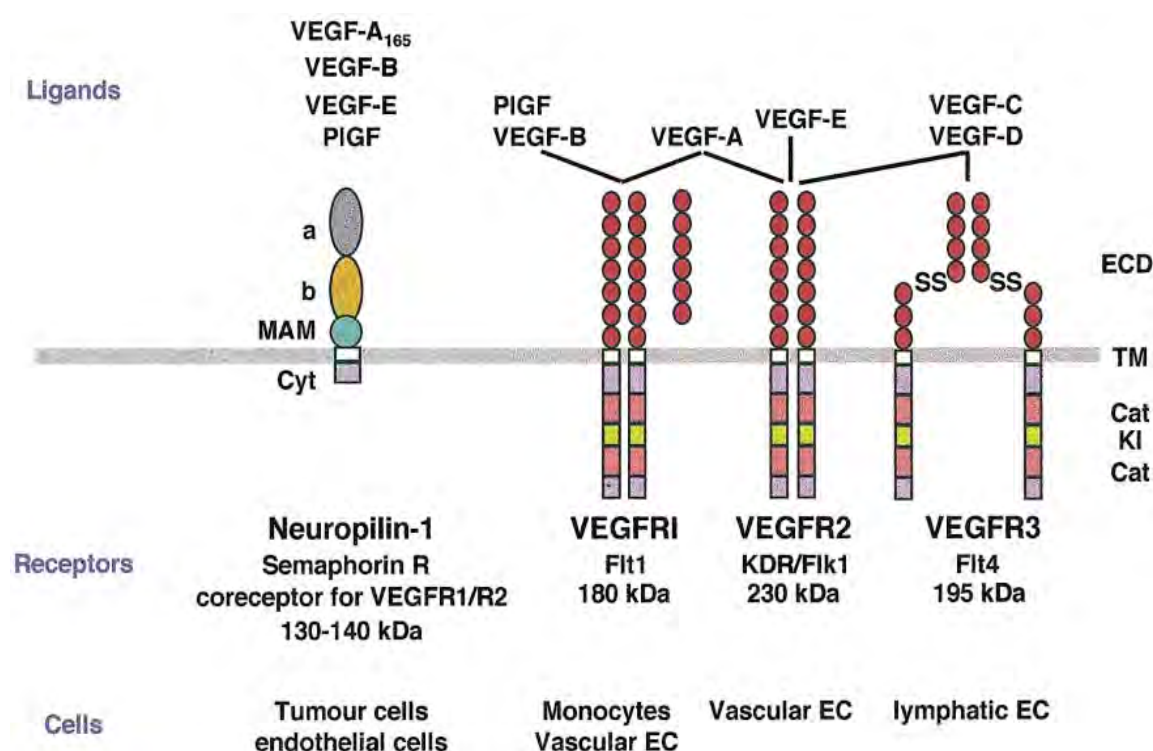
παράγοντας του πλακούντα), οι οποίοι έχουν 8 κατάλοιπα κυστεΐνης συντηρημένα. Πρόκειται για μία ομοδιμερή γλυκοπρωτεΐνη με δυσουλφιδικούς δεσμούς. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο 6q21.3 χρωμόσωμα [129], το οποίο περιέχει 8 εξόνια που διαχωρίζονται από 7 ιντρόνια [130, 131] και συναντάται σε 5 ισομορφές (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA [132, 133] και έχουν μοριακό βάρος από 34- 45kd. Οι διαφορετικές ισομορφές έχουν όμοια βιολογική δράση, διαφέρουν όμως ως προς την πρόσδεσή τους στην ηπαρίνη και στην εξωκυτταρική μήτρα. Οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι παράγουν διάφορες ισομορφές ταυτόχρονα. Οι μικρότερες ισομορφές εκκρίνονται σε διαλυτή μορφή, ενώ οι μεγαλύτερες παραμένουν συνδεδεμένες στο κύτταρο και η βιοδιαθεσιμότητά τους ρυθμίζεται από την πρωτεόλυση [134]. Η κυρίαρχη ισομορφή στον πνεύμονα και στο μεσοθήλιο είναι ο VEGF<sub>165</sub>, ο οποίος εκκρίνεται σε διαλυτή μορφή και είναι η πιο βιολογικά ενεργός ισομορφή σε *in vitro* μελέτες [135].

Έχουν βρεθεί 2 υποδοχείς κινάσης τυροσίνης για τον VEGF, ο VEGFR1 (γνωστός ως Flt-1, fms-like tyrosine kinase) και ο VEGFR2 (KDR/ Flk-1) που έχουν 44% ομολογία αμινοξέων [136]. Οι δύο αυτοί υποδοχείς πιθανόν μεσολαβούν σε διαφορετικές λειτουργίες [137, 138]. Παρόλο που ο Flt-1 ήταν ο πρώτος υποδοχέας του VEGF που ανακαλύφθηκε [139], δεν είναι γνωστή ως σήμερα ακριβώς η λειτουργία του. Φαίνεται ότι ο Flt-1 ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του VEGF εμποδίζοντας την πρόσδεσή του στον VEGFR2 [140]. Επίσης ο Flt-1 διεγείρει τη μετανάστευση μονοκυττάρων [141] και ακόμη επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών σε λεία μυϊκά κύτταρα [142]. Οι περισσότερες βιολογικές δράσεις του VEGF γίνονται μέσω του VEGFR2 υποδοχέα γι' αυτό και θεωρείται πιο σημαντικός.

Υπάρχει και ένας τρίτος υποδοχέας κινάσης τυροσίνης ο VEGFR3 (Flt-4) ο οποίος δεν αναγνωρίζει τον VEGF-A. Στον υποδοχέα αυτόν συνδέονται ο VEGF-C και ο VEGF-D (Εικόνα 2). Και οι τρεις υποδοχείς έχουν όμοια δομή. Αποτελούνται από: 1) μία μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή που αποτελείται από μία καταλυτική περιοχή κινάσης τυροσίνης, που διακόπτεται από μία μη καταλυτική περιοχή, 2) μία διαμεμβρανική υδρόφοβη περιοχή και από 3) μία εξωκυτταρική περιοχή που αποτελείται από 7 περιοχές που μοιάζουν στην ανοσοσφαιρίνη. Επίσης εκτός από αυτούς τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς έχει βρεθεί και μία διαλυτή μορφή του VEGFR1, ο sVEGFR1 που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA και ο



ο οποίος συνδέεται στον VEGF με υψηλή συγγένεια και ουδετεροποιεί τη δράση του VEGF (είναι δηλαδή ένας ενδογενής αναστολέας του). Ο sVEGFR1 έχει αναφερθεί στον ορό και στο αμνιακό υγρό εγκύων γυναικών και πρόσφατα βρέθηκε ότι τα επίπεδά του είναι αυξημένα σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές [143]. Τέλος η νευροπιλίνη-1 (NP-1) αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας της ισομορφής VEGF<sub>165</sub>. Η νευροπιλίνη-1 δεν είναι λειτουργική από μόνη της αλλά λειτουργεί ως βοηθητικός συνυποδοχέας. Δεν είναι υποδοχέας κινάσης τυροσίνης και έχει μία μικρή κυτταροπλασματική περιοχή χωρίς γνωστή λειτουργία. Όταν εκφράζεται μαζί με τον VEGFR2 η πρόσδεση του VEGF στον VEGFR2 τετραπλασιάζεται [136].



**Εικόνα 2:** Τα μέλη της οικογένειας VEGF και οι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται.

Ο VEGF όπως υποδηλώνει και το όνομά του δρα κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο. Επάγει την αγγειακή διαπερατότητα για αυτό αρχικά ονομάστηκε ως παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας (VPF, Vascular Permeability Factor) [144] και συγκεκριμένα είναι 50.000 φορές πιο ισχυρός από την ισταμίνη στο να επάγει την αγγειακή διαπερατότητα [145]. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και εμποδίζει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [136]. Επίσης ρυθμίζει την

αγγειογένεση υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες (σε όγκους) [140, 146].

Έχουν αναγνωριστεί πολλοί διεγέρτες της σύνθεσης του VEGF. Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από την υποξία η οποία επάγει την πρόσδεση του παράγοντα που επάγεται από την υποξία, του HIF-1 στον υποκινητή του γονιδίου του VEGF [147, 148]. Η υποξία όμως δεν φαίνεται να διεγείρει σημαντικά την παραγωγή του VEGF στο υπεζωκοτικό διάστημα. Έχει δειχθεί ότι ο αυξητικός παράγοντας της μεταμόρφωσης TGFβ επάγει τη σύνθεση του VEGF σε καλλιέργειες μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα αλλά και *in vivo* σε πειράματα με κουνέλια [149]. Ακόμη τα επίπεδα του VEGF στις υπεζωκοτικές συλλογές συσχετίζονται σημαντικά με τα επίπεδα του TGFβ [150]. Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*), ένα κοινό μικρόβιο που προκαλεί εμπύημα μπορεί να διεγείρει την απελευθέρωση του VEGF από φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα και να αλλάξει τη διαπερατότητα του μεσοθηλίου, οδηγώντας σε πρωτεϊνικό εξίδρωμα [151]. Επίσης η υπογλυκαιμία [152] και η οξέωση [153] επάγουν τη σύνθεση του VEGF. Αυτό ενδεχομένως εξηγεί γιατί μολυσμένο υπεζωκοτικό υγρό (εμπύημα), που χαρακτηρίζεται από χαμηλό pH και γλυκόζη, περιέχει υψηλά επίπεδα VEGF. Το μονοξειδίο του αζώτου NO αυξάνει την έκφραση του VEGF [132] και αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα. Αυτό είναι σημαντικό καθώς τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχει δειχθεί ότι παράγουν NO [154]. Και άλλες κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNFα), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων ((PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-2) έχει δειχθεί *in vitro* ότι διεγείρουν την παραγωγή του VEGF [155-159]. Η δράση αυτών των μορίων στη σύνθεση του VEGF στον υπεζωκότα είναι άγνωστη.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ακολουθούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα του VEGF είναι περίπλοκα. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAP κινασών, της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και της κινάσης Akt εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες του VEGF όπως στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση. Επίσης ο VEGF διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών, ενεργοποιώντας την κινάση εστιακής προσκόλλησης FAK και μέσω της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους υποδοχείς του και τις ιντεγκρίνες. Ο VEGF επάγει την αγγειακή διαπερατότητα, δεν είναι γνωστό όμως μέσω ποιών σηματοδοτικών μονοπατιών [136, 160]. Ο σχηματισμός «παραθύρων»,

εξειδικευμένων περιοχών στην πλασματική μεμβράνη που είναι ιδιαίτερα διαπερατές σε μικρά μόρια, ίσως είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο ο VEGF επάγει την αγγειακή διαπερατότητα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολαβούν στην επαγόμενη από τον VEGF δημιουργία «παραθύρων» δεν είναι γνωστά, πιστεύεται όμως ότι απαιτούνται αλλαγές στην σύσταση εξωκυτταρικής μήτρας και μικρές εγκοιλώσεις στην πλασματική μεμβράνη [161-163]. Έχει υποστηριχθεί ότι ο NO και η προστακυκλίνη ( $PGI_2$ ) διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην επαγόμενη από το VEGF αγγειακή διαπερατότητα [164]. Άλλες μελέτες εμπλέκουν την PLC- $\gamma$  φωσφορυλίωση, την κινητοποίηση ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$  και ενεργοποίηση της PKC [165]. Φωσφορυλίωση των συστατικών των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης και των στεγανών συνδέσμων οδηγεί σε χαλάρωση των συνδέσμων των ενδοθηλιακών κυττάρων και σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα [166]. Ο VEGF αύξησε τη φωσφορυλίωση συστατικών των συνδέσμων προσκόλλησης, της VE-καντερίνης [167] και της  $\beta$ -κατενίνης [168]. Επίσης ο VEGF διέγειρε την φωσφορυλίωση τυροσίνης των πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσμων οκκλουδίνη και ZO-1 [169].

Η ανακάλυψη του VEGF και ο ρόλος του στο σχηματισμό υπεζωκοτικών συλλογών έχει προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η παθοφυσιολογία των υπεζωκοτικών συλλογών. Οι υποδοχείς του VEGF εκφράζονται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν βρεθεί όμως και σε υγιή και ασθενή υπεζωκότα, επιβεβαιώνοντας ότι ο VEGF διαδραματίζει ένα σημαντικό λειτουργικό ρόλο στον υπεζωκότα [170]. Αν και όλοι σχεδόν οι κυτταρικοί τύποι εκφράζουν τον VEGF η κύρια πηγή του στα εξιδρώματα είναι η τοπική παραγωγή παρά η διάχυση από τη συστηματική κυκλοφορία. Σε αυτό συνηγορούν ευρήματα ότι ο μέσος όρος των επιπέδων του VEGF σε εξιδρώματα ήταν σημαντικά υψηλότερος από τον μέσο όρο των επιπέδων του VEGF στον ορό [171]. Μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα ο VEGF προέρχεται κυρίως από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα, αλλά και από τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούνται μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα [135]. Επίσης ο VEGF υπερεκφράζεται από τους περισσότερους τύπους καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των κακοηθειών που συχνά προσβάλλουν τον υπεζωκότα, όπως καρκίνος του πνεύμονα [172], του μαστού [173] και το μεσοθηλίωμα [174]. Έτσι σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές καρκινικά κύτταρα στην επιφάνεια του υπεζωκότα είναι πιθανόν να συνεισφέρουν σημαντικά στην ποσότητα του VEGF στις υπεζωκοτικές συλλογές.

Ο VEGF είναι παρών σε σημαντικές ποσότητες σε υπεζωκοτικές συλλογές διαφόρων αιτιολογιών. Τα επίπεδα του είναι υψηλότερα σε εξιδρώματα παρά σε διυδώματα [150, 175, 176]. Επίσης βρέθηκε ότι τα επίπεδα του VEGF είναι υψηλότερα σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές από διάφορους καρκίνους (συμπεριλαμβανομένου καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και μεσοθηλίωμα [150]) παρά σε καλοήθεις [170, 175-178]. Σε εμπύημα τα επίπεδα του VEGF είναι 5 φορές υψηλότερα από εκείνα σε μη επιπλεγμένη παραπνευμονική συλλογή [135]. Στο σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS) δημιουργείται υπεζωκοτική συλλογή με υψηλά επίπεδα VEGF, ο οποίος πιστεύεται ότι ευθύνεται για την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και οδηγεί στη συσσώρευση υγρού [179]. Υψηλά επίπεδα VEGF στο υπεζωκοτικό και περιτοναϊκό υγρό έχουν αναφερθεί στο σύνδρομο Meigs [180].

Ο VEGF μας βοηθάει στη διάγνωση της προέλευσης της υπεζωκοτικής συλλογής σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους όπως κυτοκίνες ή πρωτεΐνάσες. Στον ορό η συγκέντρωση του VEGF προτείνει την ύπαρξη ασθένειας στον πνεύμονα, εκτός από φυματίωση. Στο υπεζωκοτικό υγρό ο VEGF δείχνει ξεκάθαρα φλεγμονή ή κακοήθεια [171].

Η έκφραση του VEGF συνδέεται με φτωχή πρόγνωση σε μία ποικιλία νεοπλασμάτων [181-183]. Υψηλά επίπεδα VEGF στον ορό πριν τη χημειοθεραπεία συνδέονται με φτωχή έκβαση στον καρκίνο του πνεύμονα [184] και με μετάσταση και δυσμενή πρόγνωση στο πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα [185]. Ο VEGF καθορίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στο κακοήθες μεσοθηλίωμα και συσχετίστηκε αντιστρόφως με την επιβίωση του ασθενούς [186]. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο σημαντικό ρόλο του VEGF στη ρύθμιση μηχανισμών που οδηγούν στην αύξηση του όγκου, όπως ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων και πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων με αυτοκρινή τρόπο [187].

Υπάρχει μία εργαστηριακή μελέτη που παρείχε σημαντικά πειραματικά δεδομένα ότι ο VEGF έχει σπουδαία σημασία για την παραγωγή κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών. Καρκινικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος ενέθηκαν σε ποντίκια, προσέβαλλαν τον υπεζωκότα, εξέφρασαν υψηλά επίπεδα VEGF και προκάλεσαν κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή. Τα επίπεδα της έκφρασης του VEGF συσχετίστηκαν με το μέγεθος της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής. Όταν τα καρκινικά κύτταρα μετασηματίστηκαν με αντινοσηματικό VEGF<sub>165</sub> γονίδιο που καταστέλλει τη σύνθεση του VEGF, μειώθηκε η αγγειακή διαπερατότητα και ο

σχηματισμός κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών που επάγονται από τα καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς ο σχηματισμός κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών απαιτεί καρκινικά κύτταρα που προσβάλλουν τον υπεζωκότα και εκφράζουν υψηλά επίπεδα VEGF [188].

### **Αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα (SU5416)**

Ο SU5416 είναι ένα μικρό μόριο αναστολέας κινάσης τυροσίνης για τον VEGFR1 και τον VEGFR2 υποδοχέα. Είναι συνθετικό μόριο που αναστέλλει την αγγειογένεση και αρχικά ανακαλύφθηκε για να στοχεύσει τον VEGFR2 και εμφάνισε αντικαρκινική δράση σε πειραματικά μοντέλα ζώων, όμως στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι αναστέλλει και τον VEGFR1 [189]. Είναι ο πρώτος συνθετικός αναστολέας του υποδοχέα του VEGF που μπήκε σε κλινικές μελέτες [190].

### **Εκλεκτικός Αναστολέας του VEGFR2 υποδοχέα (SU1498)**

Ο SU1498 (tyrphostin) είναι ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 (KDR/ Flk-1). Ο VEGFR2 αυτοφωσφορυλιώνεται μέσα σε λίγα λεπτά από τη διέγερση του από τον VEGF. Ο SU1498 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του VEGFR2 και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων [191].

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### ΜΕΡΟΣ Α: Πειράματα σε υπεζωκότα προβάτου

#### Συλλογή και προετοιμασία ιστού

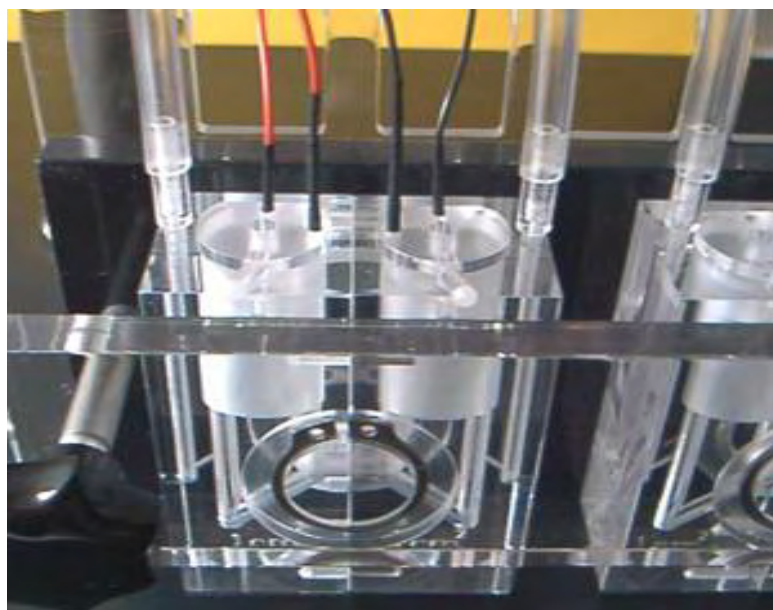
Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα από ενήλικα πρόβατα, αρσενικά και θηλυκά. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο σφαγείο αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων. Τα τμήματα του ιστού μετά την απομόνωσή τους τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) στους 4°C και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 30 min από το θάνατο των ζώων. Δόθηκε προσοχή ώστε η επιφάνεια των ιστικών τεμαχίων να υποστεί όσο το δυνατόν λιγότερη καταπόνηση. Τα τμήματα του σπλαχνικού υπεζωκότα αποκολλήθηκαν προσεκτικά από τον υποκείμενο ιστό και εξετάστηκαν προσεκτικά για την ύπαρξη οπών ή εναπομείναντος προσκολλημένου πνευμονικού ιστού. Η λήψη των ιστικών τεμαχίων έγινε από τους άνω, μέσω και κάτω λοβούς των πνευμόνων. Τα ιστικά τεμάχια του τοιχωματικού υπεζωκότα προέρχονταν από το θώρακα κι η απομόνωσή τους έγινε άμεσα από τα ζώα στα σφαγεία.

#### Πειραματική διαδικασία

Ο υπεζωκότας τοποθετήθηκε ως επίπεδο στρώμα μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing, (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) οι οποίοι περιείχαν διάλυμα Krebs-Ringer (Εικόνα 3). Η σύσταση του Krebs-Ringer σε mM ήταν: 117,5 NaCl, 1,15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24,99 NaHCO<sub>3</sub>, 5,65 KCl, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 2,52 CaCl<sub>2</sub> και 5,55 γλυκόζη και το pH του ήταν 7,4. Σε κάθε ημιθάλαμο πραγματοποιούταν η προσθήκη 4ml διαλύματος, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης. Παράλληλα υπήρχε συνεχής διοχέτευση αερίου σύστασης 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> σε κάθε ημιθάλαμο. Η επιφάνεια του ιστού, η οποία εκτίθεντο στο διάλυμα ήταν 1cm<sup>2</sup>. Επίσης λόγω του ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων επηρεάζεται από τη

θερμοκρασία, οι μετρήσεις της διαμεσοθηλιακής αντίστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37°C.

Η διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$  Transmesothelial Resistance) του υπεζωκότα η οποία εκφράζεται σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl το καθένα εκ των οποίων ήταν τοποθετημένο σε απόσταση 3 mm εκατέρωθεν της μεμβράνης, σε συνθήκες κλειστού κυκλώματος. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, γινόταν νέα μέτρηση της  $R_{TM}$  κάθε έξι δευτερόλεπτα. Διεξάγονταν παράλληλα μέχρι κι έξι πειράματα στους θαλάμους και η καταγραφή γινόταν μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά την τοποθέτηση των ιστικών τεμαχίων, ακολουθούσε μία περίοδος ηρεμίας του ιστού 30-40 λεπτών, ώστε να επέλθει η ισορροπία του. Πριν την τοποθέτηση του ιστού είχε υπολογιστεί από το σύστημα η αντίσταση του υγρού η οποία αφαιρούνταν κατά τη μέτρηση της  $R_{TM}$  του ιστού.



*Εικόνα 3: Αντλία τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.*

Για τη μέτρηση της  $R_{TM}$  σε συνθήκες σύνδεσης ρεύματος χορηγήθηκε συνεχές ρεύμα έντασης 50 $\mu$ A και διάρκειας 200ms ανά έξι δευτερόλεπτα από μία συσκευή Voltage/Current Clamp (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany), με τη βοήθεια ζεύγους ηλεκτροδίων Ag/AgCl που βρίσκονταν



τοποθετημένα σε απόσταση 3 cm, εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι μετρήσεις που αφορούσαν στην  $R_{TM}$  μετά την προσθήκη ουσιών πραγματοποιούνταν σε συνθήκες σύνδεσης ρεύματος. Μετά την προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών, σε κάθε επιφάνεια του τοιχωματικού ή σπλαχνικού υπεζωκότα, καταγράφονταν οι τιμές της  $R_{TM}$  για χρονικό διάστημα μίας ώρας και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (1°, 3°, 5°, 10°, 15°, 20°, 30°, 40°, 50° και 60° λεπτό).

Η μεσοθηλιακή επιφάνεια του υπεζωκότα που *in vivo* αντικρίζει την υπεζωκοτική κοιλότητα στο εξής θα αναφέρεται ως κορυφαία επιφάνεια ενώ η επιφάνεια που *in vivo* αντικρίζει το διάμεσο ιστό θα αναφέρεται ως βασεοπλευρική.

Πραγματοποιήθηκαν 6 έως 10 πειράματα για κάθε συγκέντρωση ουσίας (ή για κάθε συνδυασμό ουσιών), για κάθε επιφάνεια και για κάθε πέταλο του υπεζωκότα και στη στατιστική ανάλυση υπολογίστηκαν τα αποτελέσματα 6 πειραμάτων για κάθε περίπτωση (N=6).

## Πειράματα με δεξαμεθαζόνη

Στην πρώτη ομάδα των πειραμάτων προστέθηκε δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού. Η ίδια διαδικασία ακολούθησε με δεξαμεθαζόνη σε συγκεντρώσεις  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M και  $10^{-9}$  M.

Η μφεπριστόνη, που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, προστέθηκε μόνη της σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M αλλά και σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.

Στη συνέχεια διεξήχθησαν πειράματα κατά τα οποία ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών σπιρολακτόνη  $10^{-5}$  M και δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M προστέθηκαν στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Επίσης πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη σπιρολακτόνη μόνη της σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία και στη βασεοπλευρική επιφάνεια και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.

Προκειμένου να μελετηθούν κάποιοι από τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιήθηκαν ο EIPA, η αμιλορίδη και η ουαμπαΐνη. Ο

ΕΙΡΑ, που είναι ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  προστέθηκε μόνος του σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M αλλά και σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.

Σε μία άλλη σειρά πειραμάτων η αμιλορίδη που είναι αναστολέας των διαύλων  $\text{Na}^+$  προστέθηκε σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά ιστικά τεμάχια .

Το ίδιο έγινε και με την ουαμπαΐνη που είναι αναστολέας της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία έγινε προσθήκη ουαμπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.

## Πειράματα με VEGF

Κατά το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η επίδραση του VEGF στην διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα. Ο VEGF προστέθηκε σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού. Η ίδια διαδικασία ακολούθησε με VEGF σε συγκεντρώσεις 5ng/ml, 10ng/ml και 20ng/ml.

Ο SU5416 είναι αναστολέας και για τους δύο υποδοχείς του VEGF. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατά τα οποία ο SU5416 σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M προστέθηκε σε συνδυασμό με τον VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Ακόμη για να διαπιστωθεί αν ο SU5416 σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M είχε κάποια επίδραση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα, προστέθηκε η ουσία αυτή στην κορυφαία καθώς επίσης και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού.

Τέλος χρησιμοποιήθηκε ο SU1498 ο οποίος είναι ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 (KDR/ Flk-1). Διεξήχθησαν πειράματα στα οποία έγινε προσθήκη SU1498  $10^{-6}$  M αλλά και SU1498  $10^{-6}$  M μαζί με VEGF 1ng/ml στην

κορυφαία καθώς επίσης και στη βασειοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.

## **Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad InStat έκδοση 3.05 για Windows 95 (GraphPad Software, San Diego). Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων εκφράστηκαν ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) (Standard Error Mean, SE) έξι διαφορετικών πειραμάτων σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με two-way ANOVA και Bonferroni post-test. Οι τιμές που ανταποκρίθηκαν σε  $P < 0,05$  έγιναν αποδεκτές ως στατιστικά σημαντικές. Τέλος, τα διαγράμματα έγιναν με το στατιστικό πακέτο Sigma Plot 2001.

## **ΜΕΡΟΣ Β: Πειράματα σε καλλιέργειες ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων**

### **Απομόνωση και καλλιέργεια μεσοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου υπεζωκότα**

Η απομόνωση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο της Stylianou και των συνεργατών της, για την απομόνωση ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων περιτοναίου, με μικρές τροποποιήσεις [192]. Συγκεκριμένα, μικρά τμήματα ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα (επιφάνειας  $6 \text{ cm}^2$ ) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο από την καρδιοχειρουργική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας μέσα σε θρεπτικό διάλυμα DMEM στους  $4^\circ \text{ C}$  και η απομόνωση έγινε μέσα στις επόμενες ώρες σε αποστειρωμένες συνθήκες. Τα τμήματα του ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα αφού ξεπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα PBS 1x που είχε pH 7,3, στη συνέχεια επώαστηκαν σε 15 ml διαλύματος που περιείχε 0,125% (wt/vol) τρυψίνη, 0,01% (wt/vol) EDTA και 0,1% (wt/vol) γλυκόζη για 20 λεπτά στους  $37^\circ \text{ C}$  με συνεχή ανάδευση, ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυμική πέψη της μεμβράνης του υπεζωκότα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του εναιωρήματος που

προέκυψε από την επώαση (χωρίς την μεμβράνη) σε 1000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκε πλύση του ιζήματος με θρεπτικό M199 που περιέχει 10% FBS (ορό εμβρυϊκού μόσχου), 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 5 µg/ml τρανσφερίνη, 5 µg/ml ινσουλίνη, 2 mM γλουταμίνη και 0,4 µg/ml υδροκορτιζόνη. Ακολούθησε επαναιώρηση στο ίδιο θρεπτικό (5 ml όγκος), τοποθέτηση σε φλάσκα καλλιέργειας εμβαδού 25 cm<sup>2</sup> και επώαση στους 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και 95% O<sub>2</sub>. Για να αποφευχθεί η μόλυνση της καλλιέργειας από ινοβλάστες πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού ύστερα από 36-48 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό αλλάζονταν κάθε 2-3 μέρες.

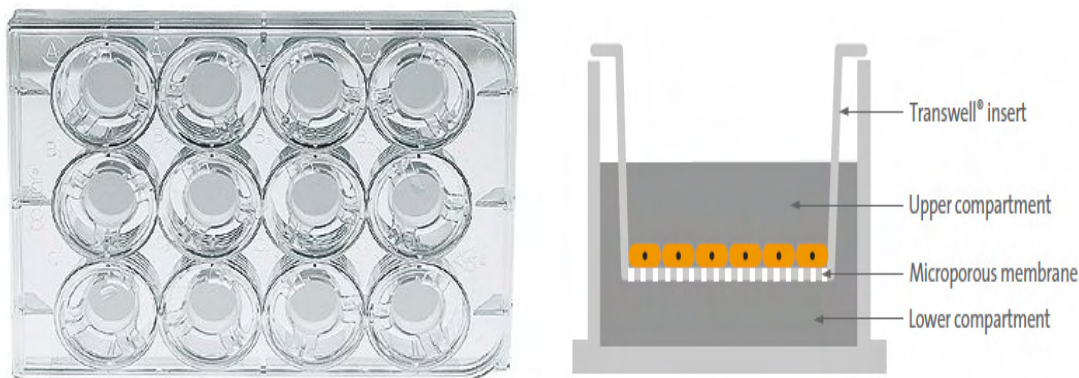
### **Ταυτοποίηση των μεσοθηλιακών κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες**

Η καθαρότητα και η ομοιογένεια των πρωτογενών καλλιεργειών μεσοθηλιακών κυττάρων ελέγχθηκε με τη χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού. Η «ταυτότητα» των κυττάρων αναλύθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος κατά της κυτοκερατίνης 19, η παρουσία της οποίας αποτελεί χαρακτηριστικό του μεσοθηλίου. Οι ινοβλάστες είναι αρνητικοί σε αντίσωμα κατά της κυτοκερατίνης [192]. Συγκεκριμένα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 1x PBS - 3 % φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα 1x PBS - 1 % Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4° C, ώστε η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή και επώαση με διάλυμα 1x PBS - 0,1% Tween 20 - 3 % BSA όλη τη νύχτα στους 4° C. Μεταξύ των επώασεων παρεμβάλλονταν ξεπλύματα των 5 λεπτών με 1x PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 30 µl από το πρώτο αντίσωμα (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 4.62 (Sigma) κατά της κυτοκερατίνης 19) αραιωμένο 1:40 σε διάλυμα 1x PBS - 0,1% Tween 20 - 1 % BSA για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε υγρό περιβάλλον. Αφού τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές σε διάλυμα 1x PBS - 0,1% Tween 20 - 1 % BSA ακολούθησε επώαση με 25 µl από το δεύτερο αντίσωμα (αντίσωμα κατά της ανοσοσφαιρίνης ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα ομάδα) αραιωμένο 1:50 σε διάλυμα 1x PBS - 0,1 % Tween 20 - 1 % BSA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον. Ακολούθησε πλύσιμο 3

φορές σε διάλυμα 1x PBS - 0,1 % Tween 20 - 1 % BSA, στη συνέχεια σε απεσταγμένο νερό, στέγνωμα των καλυπτρίδων και τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρο πάνω σε μία σταγόνα (2 µl) Vectashield, το οποίο περιέχει DAPI (20 µg/ml) για χρώση του DNA. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού.

## Πειραματική διαδικασία

Μετά από 10 περίπου μέρες (εξαρτάται από τον αρχικό αριθμό των μεσοθηλιακών κυττάρων που θα προκύψει από την απομόνωση) η φλάσκα ήταν σχεδόν κορεσμένη. Το σπάσιμο των κυττάρων έγινε αφού τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS 1x και επώστηκαν με 2 ml διαλύματος PBS 1x που περιείχε 0,125% (wt/vol) τρυψίνη, 0,01% (wt/vol) EDTA και 0,1% (wt/vol) γλυκόζη σε θερμοκρασία δωματίου για 4-5 δευτερόλεπτα. Το περισσότερο διάλυμα αφαιρέθηκε αφήνοντας μια λεπτή στρώση πάνω από τα κύτταρα και η καλλιέργεια επώστηκε για 10-15 λεπτά στους 37<sup>0</sup> C, μέχρις ότου τα κύτταρα να αποκολληθούν όπως φάνηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε θρεπτικό M199 που περιέχει 10% FBS (ορό εμβρυϊκού μόσχου), 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 5 µg/ml τρανσφερίνη, 5 µg/ml ινσουλίνη, 2 mM γλουταμίνη και 0,4 µg/ml υδροκορτιζόνη και φυγοκεντρώνταν σε 1000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup> C. Τα κύτταρα επαναιωρούνταν στο ίδιο θρεπτικό και τοποθετούνταν σε πυκνότητα 10<sup>5</sup> κύτταρα/cm<sup>2</sup> σε Snapwell φίλτρα πολυεστέρα (Corning Life Sciences) (Εικόνα 4). Τα φίλτρα αυτά έχουν την πορώδη μεμβράνη που αναπτύσσονται τα κύτταρα σε ένα αποσπώμενο δαχτυλίδι το οποίο μπορεί να μεταφερθεί για πείραμα σε ειδικές αντλίες τύπου Ussing και χρησιμοποιούνται σε μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας. Το μέγεθος των πόρων των φίλτρων πολυεστέρα είναι 0.4 µm και η επιφάνεια ανάπτυξης 1.12 cm<sup>2</sup>. Τα θρεπτικό που προαναφέρθηκε προστέθηκε στο επάνω (0,5 ml) και στο κάτω (2,5 ml) μέρος του φίλτρου και αλλάζονταν μέρα παρά μέρα. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν όμοιες όπως και στη φλάσκα, επώαση στους 37<sup>0</sup> C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και 95% O<sub>2</sub>.



**Εικόνα 4:** Snapwell φίλτρα πολυεστέρα στα οποία καλλιεργήθηκαν τα μεσοθηλιακά κύτταρα.

Η ηλεκτρική αντίσταση της μονοστιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων μετριούνταν σε διάφορες μέρες μετά την τοποθέτησή τους στα φίλτρα πολυεστέρα χρησιμοποιώντας τη συσκευή EVOMX (World Precision Instruments, WPI) (Εικόνα 5) μέχρι τα φίλτρα να γίνουν πλήρως κορεσμένα. Με τη συσκευή αυτή γίνεται συνεχής μέτρηση της αντίστασης με ένα ζεύγος διπλών ηλεκτροδίων, το STX2 (World Precision Instruments, WPI), το καθένα από τα οποία αποτελείται από ένα εσωτερικό ηλεκτρόδιο Ag/AgCl που μετράει την διαφορά δυναμικού και ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο Ag που περνάει ρεύμα. Για ομοιομορφία στις μετρήσεις το θρεπτικό και τα κύτταρα αφήνονταν να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και έπειτα μετριούνταν η αντίσταση. Η τιμή που μετρήθηκε για το φίλτρο χωρίς κύτταρα αφαιρούνταν από την τιμή που μετρούνταν για το φίλτρο με κύτταρα. Περίπου 13 ημέρες μετά τα φίλτρα ήταν πλήρως κορεσμένα με κύτταρα και η μονοστιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων ελέγχονταν σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

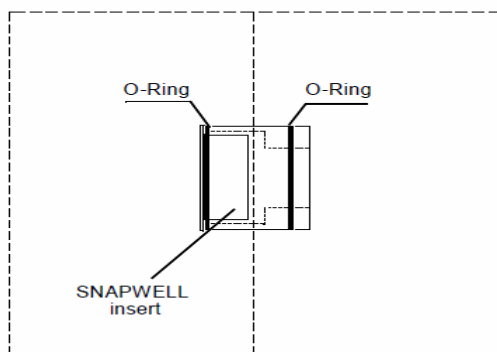
Μετά τον κορεσμό αφαιρέθηκε από το φίλτρο το αποσπώμενο δαχτυλίδι στο οποίο βρισκόταν η μεμβράνη πολυεστέρα πάνω στην οποία αναπτύχθηκαν τα κύτταρα και στη συνέχεια μεταφέρθηκε και προσαρμόστηκε μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing, (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) (Εικόνα 6) σε καθένα από τους οποίους προστέθηκε 5 ml διαλύματος Ringer. Η σύσταση του διαλύματος Ringer σε mM ήταν: 112 NaCl, 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4,56 KCl, 0,6 MgSO<sub>4</sub>, 1,4 CaCl<sub>2</sub>, 1 γλουταθειόνη και 5,55 γλυκόζη και το pH του ήταν 7,4 [193].



*Εικόνα 5: Η συσκευή EVOMX με την οποία μετρούνταν η αντίσταση των μεσοθηλιακών απευθείας από την καλλιέργεια.*

## USSING CHAMBER

### Demo of Snapwell insert



*Εικόνα 6: Σχηματικό διάγραμμα της αντλίας τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της αντίστασης των μεσοθηλιακών κυττάρων.*

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση της αντίστασης των μεσοθηλιακών κυττάρων ( $R_{TM}$  Transmesothelial Resistance) ήταν η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε πιο πάνω για τα ιστικά τεμάχια του υπεζωκότα (ακέραιη μεμβράνη). Η διαφορά είναι ότι πριν από κάθε μέτρηση ένα κενό φίλτρο χωρίς μεσοθηλιακά κύτταρα τοποθετούνταν στην αντλία τύπου Ussing και έτσι υπολογίζονταν από το σύστημα η αντίσταση του υγρού και του κενού φίλτρου η οποία στη συνέχεια αφαιρούνταν κατά τη μέτρηση της  $R_{TM}$  των κυττάρων [193].

Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ουσίες και στις ίδιες συγκεντρώσεις όπως και στην μεμβράνη του υπεζωκότα. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της δεξαμεθαζόνης, 24 ώρες πριν την μέτρηση της αντίστασης αφαιρούνταν τα στεροειδή (υδροκορτιζόνη) από το θρεπτικό των κυττάρων [194]. Πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα για κάθε συγκέντρωση ουσίας (ή για κάθε συνδυασμό ουσιών) για κάθε επιφάνεια (κορυφαία και βασηοπλευρική) των μεσοθηλιακών κυττάρων.

## **Στατιστική ανάλυση**

Έγινε με παρόμοιο τρόπο όπως αναφέρθηκε στον υπεζωκότα προβάτου.



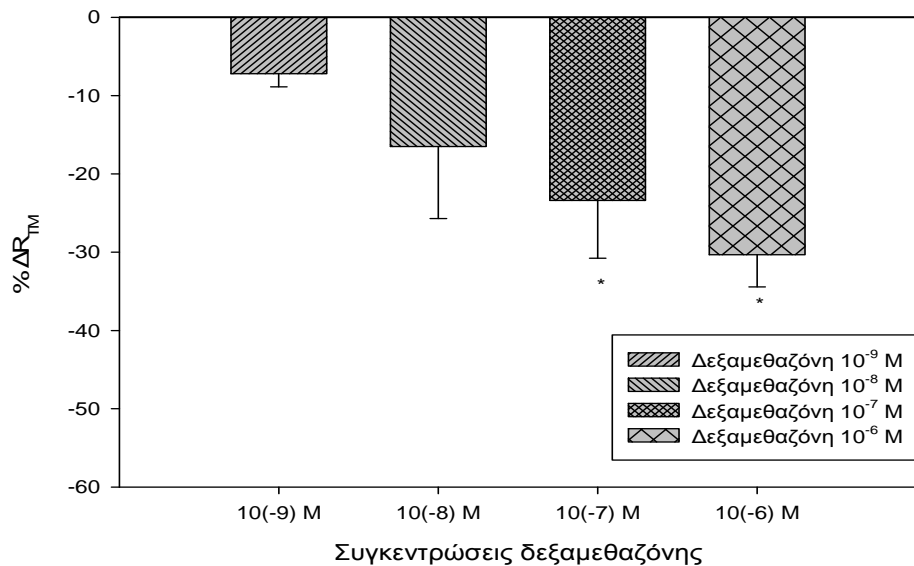
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΜΕΡΟΣ Α: Αποτελέσματα υπεζωκότα προβάτου

#### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης

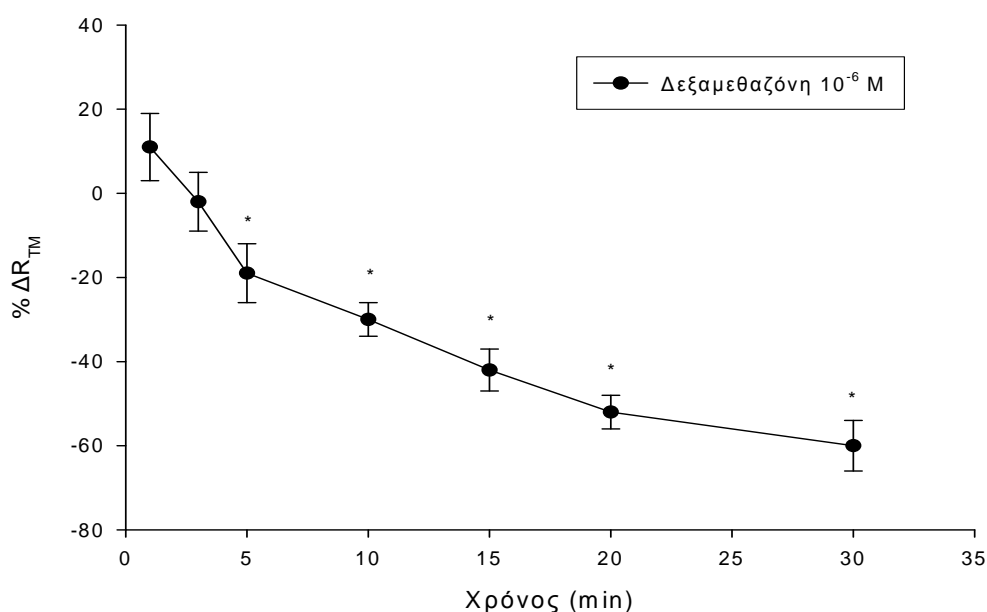
Χρησιμοποιήθηκε δεξαμεθαζόνη σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από  $10^{-9}$  M έως  $10^{-6}$  M και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) από το τρίτο ή πέμπτο λεπτό για όλες τις συγκεντρώσεις. Η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M.

Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο  $10^0$  λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 1. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-6}$  M όπου  $\% \Delta R_{TM} = -30,33 \% \pm 4,1 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση  $10^{-9}$  M όπου  $\% \Delta R_{TM} = -7,2 \% \pm 1,69 \%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  στις συγκεντρώσεις  $10^{-6}$  M και  $10^{-7}$  M.



**Διάγραμμα 1.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου στο  $10^0$  λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από  $10^{-9}$  έως  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα (T.Σ.) 6 πειραμάτων ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

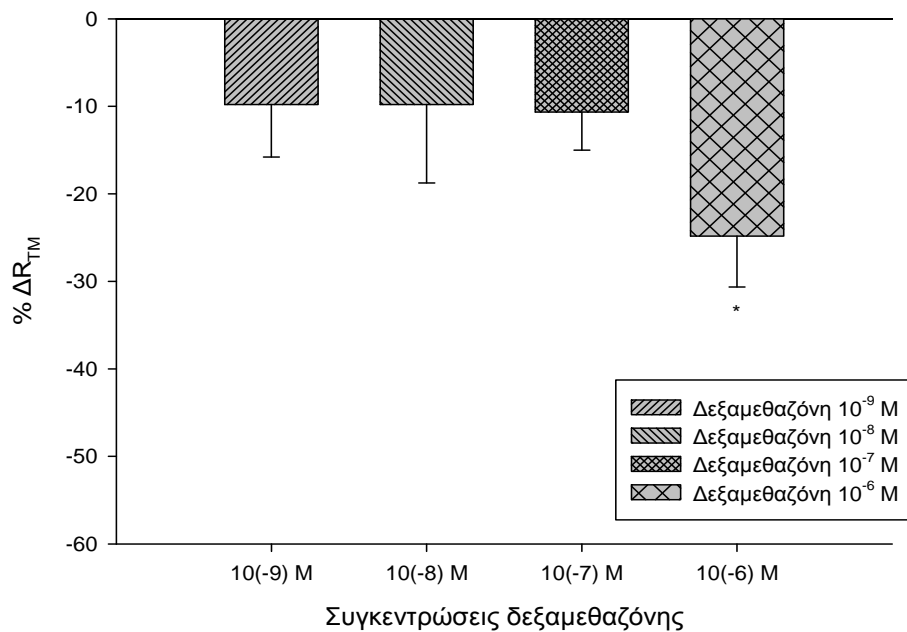
Πιο συγκεκριμένα, όταν η δεξαμεθαζόνη προστέθηκε σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -18,67 \% \pm 6,75 \%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 2).



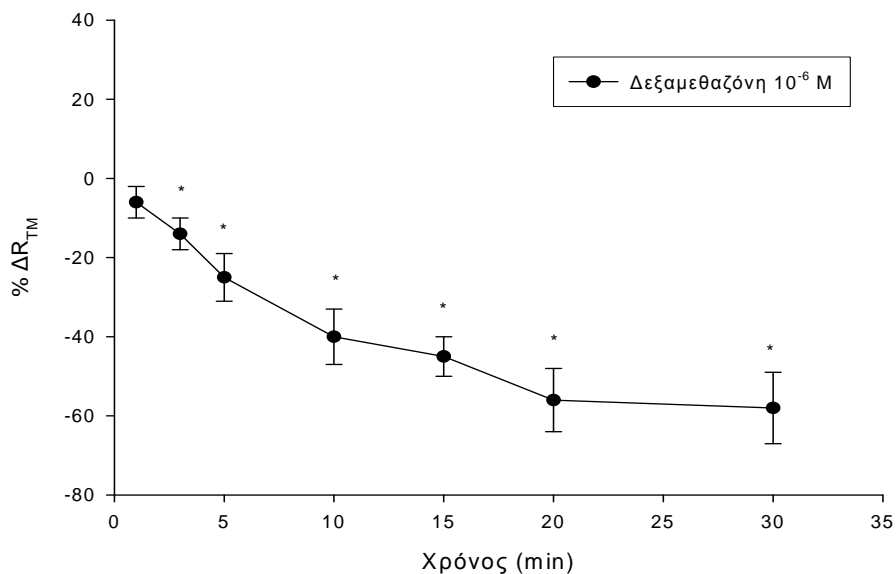
**Διάγραμμα 2.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων ( $N=6$ ). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 3. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-6}$  M όπου  $\% \Delta R_{TM} = -24,83 \% \pm 5,82 \%$  η οποία ήταν και στατιστικώς σημαντική, ενώ μικρότερη στη συγκέντρωση  $10^{-9}$  M όπου  $\% \Delta R_{TM} = -9,8 \% \pm 6 \%$ .

Στο διάγραμμα 4 φαίνεται η σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$  μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα και αυτή η πτώση στην τιμή της αντίστασης ήταν στατιστικώς σημαντική από το 3<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -14,17 \% \pm 3,55 \%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος.

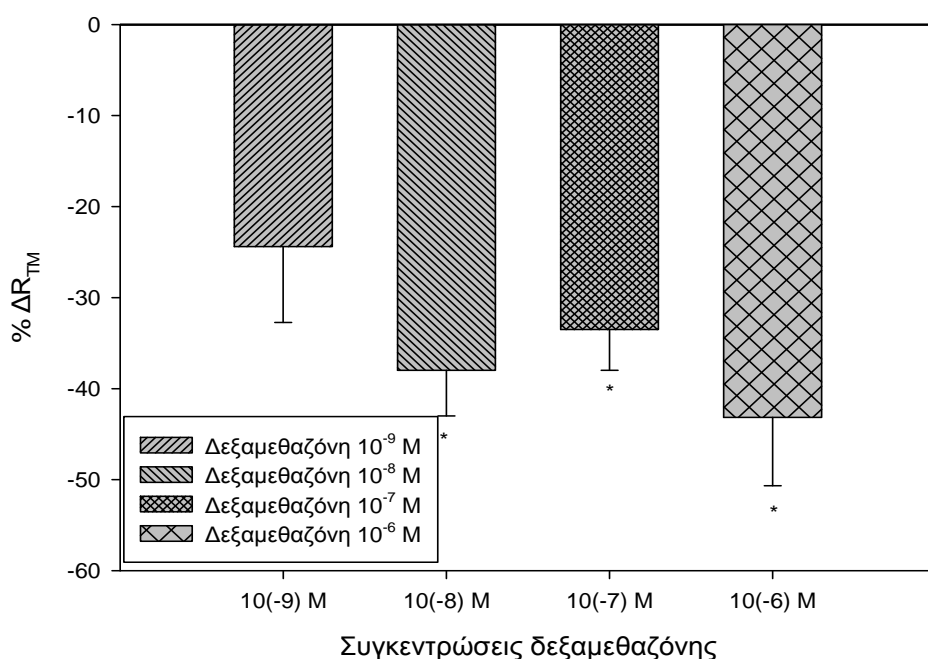


**Διάγραμμα 3.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από  $10^{-9}$  έως  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



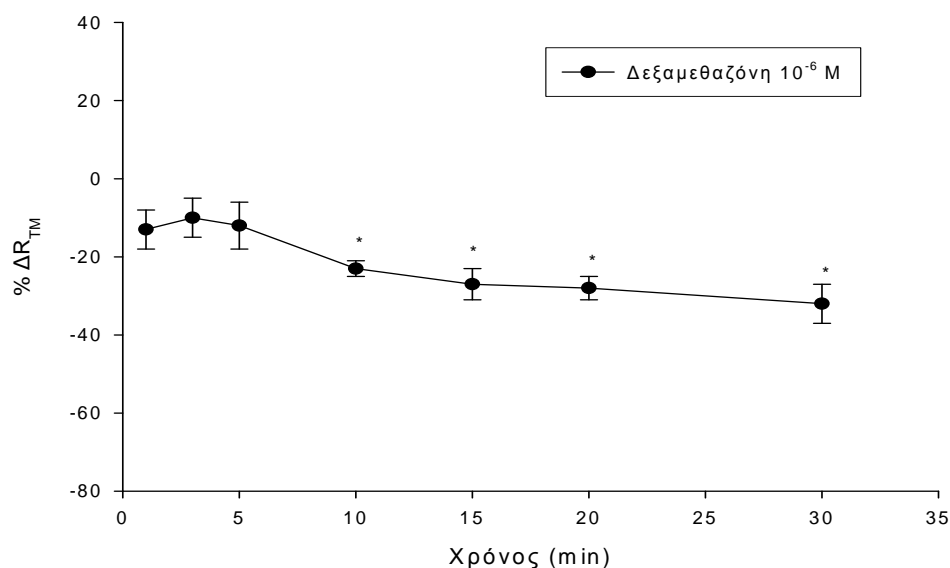
**Διάγραμμα 4.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα στο 50<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 5. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M όπου %  $\Delta R_{TM}$  = -43,16 %  $\pm$  7,5 %, ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση 10<sup>-9</sup> M όπου %  $\Delta R_{TM}$  = -24,4 %  $\pm$  8,32 %. Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός της συγκέντρωσης 10<sup>-9</sup> M.



**Διάγραμμα 5.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου στο 50<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από 10<sup>-9</sup> έως 10<sup>-6</sup> M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

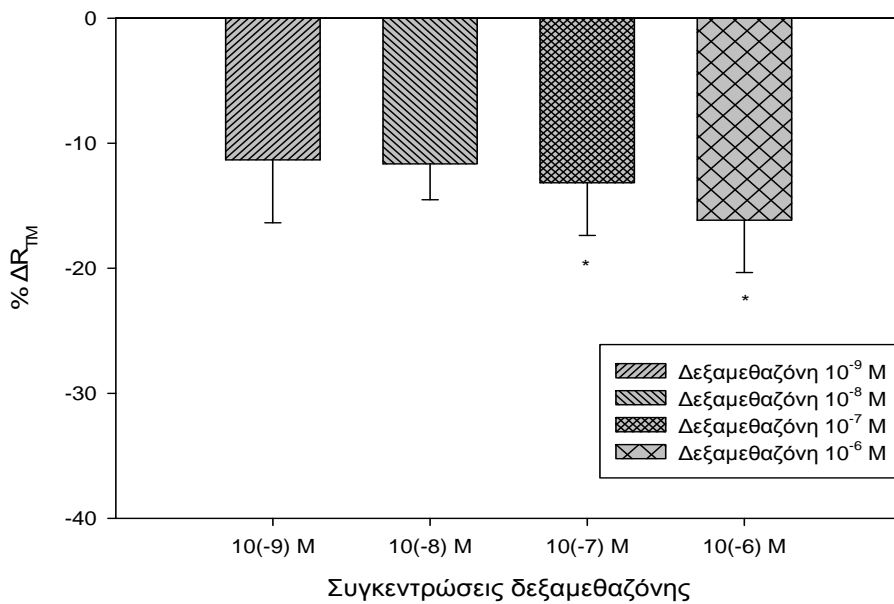
Προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό όπου %  $\Delta R_{TM}$  = -22,5 %  $\pm$  2,29 % και συνεχίστηκε έως το 30<sup>ο</sup> λεπτό (Διάγραμμα 6).



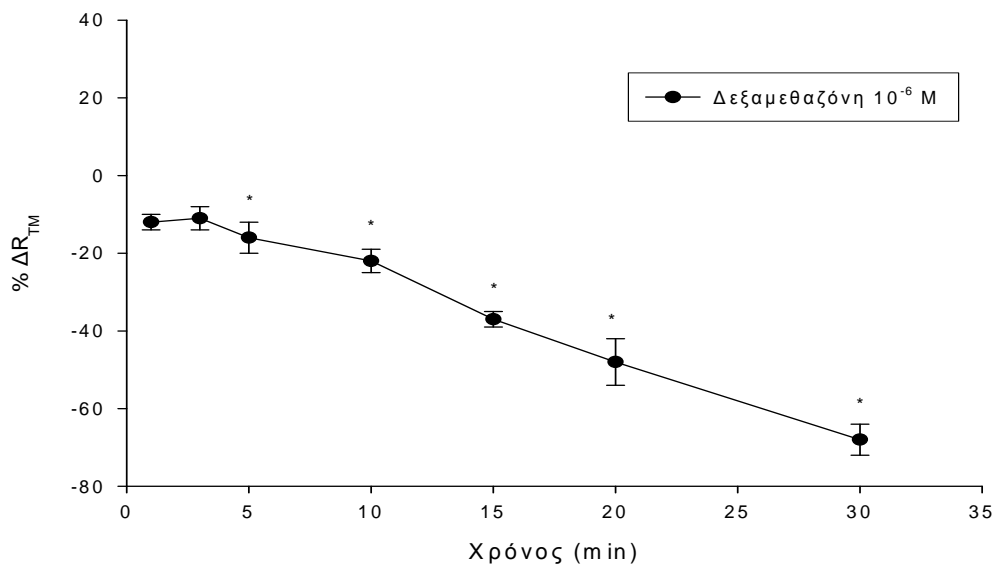
**Διάγραμμα 6.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 7. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-6}$  M όπου %  $\Delta R_{TM} = -16,16 \% \pm 4,19 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση  $10^{-9}$  M όπου %  $\Delta R_{TM} = -11,33 \% \pm 5,04 \%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  στις συγκεντρώσεις  $10^{-6}$  M και  $10^{-7}$  M.

Μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα, παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση της  $R_{TM}$  η οποία συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 8). Η πτώση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -16,16 \% \pm 4,19 \%$ .



**Διάγραμμα 7.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασειπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από  $10^{-9}$  έως  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

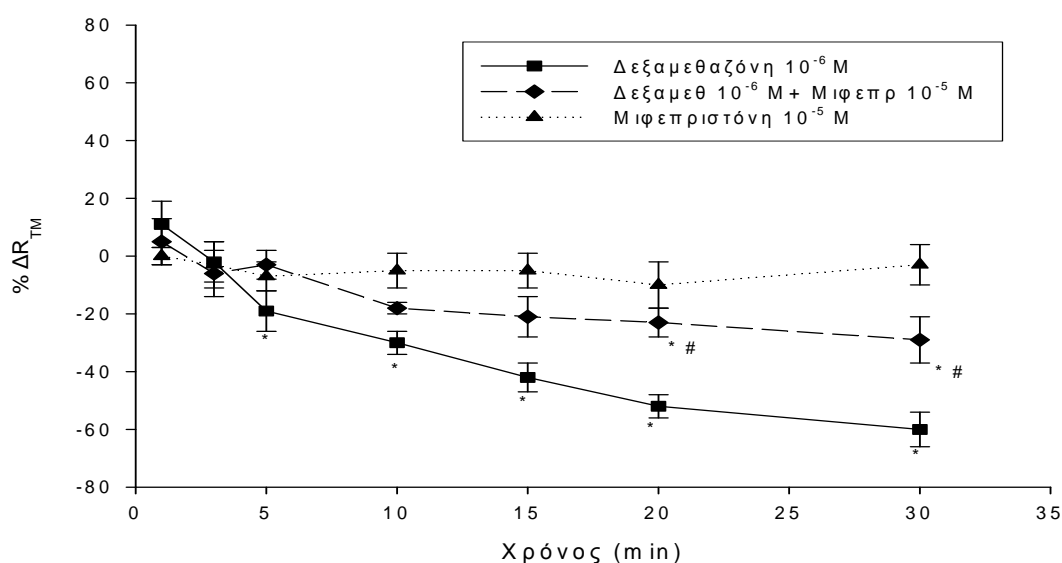


**Διάγραμμα 8.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασειπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

## Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με μιφεπριστόνη

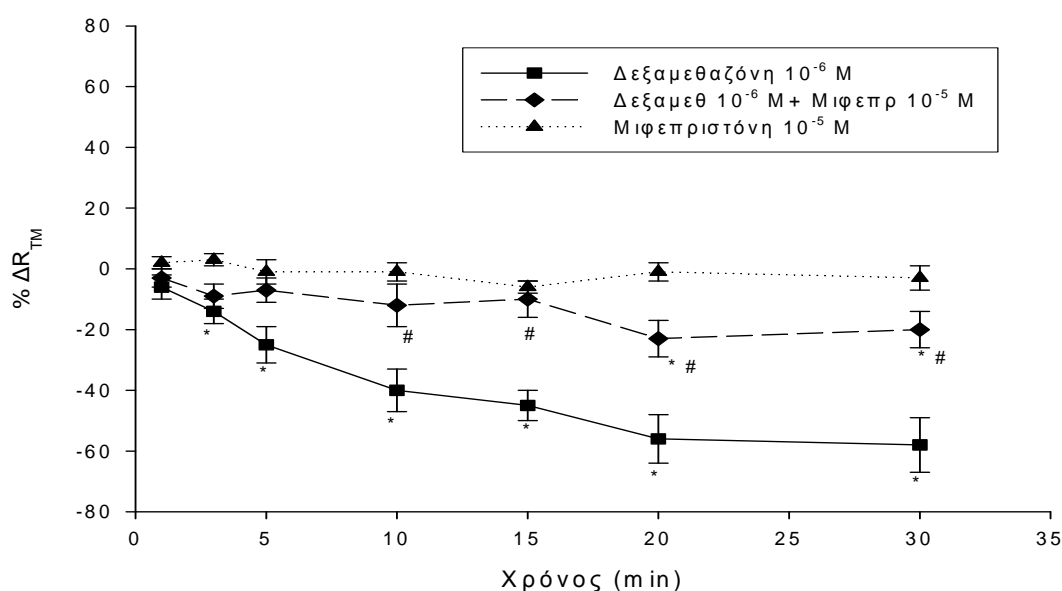
Η μιφεπριστόνη είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και μελετήθηκε η δράση της στον τοιχωματικό και στον σπλαχνικό υπεζωκότα μόνη της και σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη. Δεν υπήρξε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα της μιφεπριστόνης σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία και στη βασειπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα (Διαγράμματα 9 και 10).

Προσθήκη μιφεπριστόνης μαζί με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 20<sup>ο</sup> λεπτό, όπου  $\% \Delta R_{TM} = -22,66 \% \pm 5,35 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της όπου  $\% \Delta R_{TM} = -51,66 \% \pm 3,74 \%$  (Διάγραμμα 9).



**Διάγραμμα 9.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, μιφεπριστόνης  $10^{-5}$  M και μιφεπριστόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

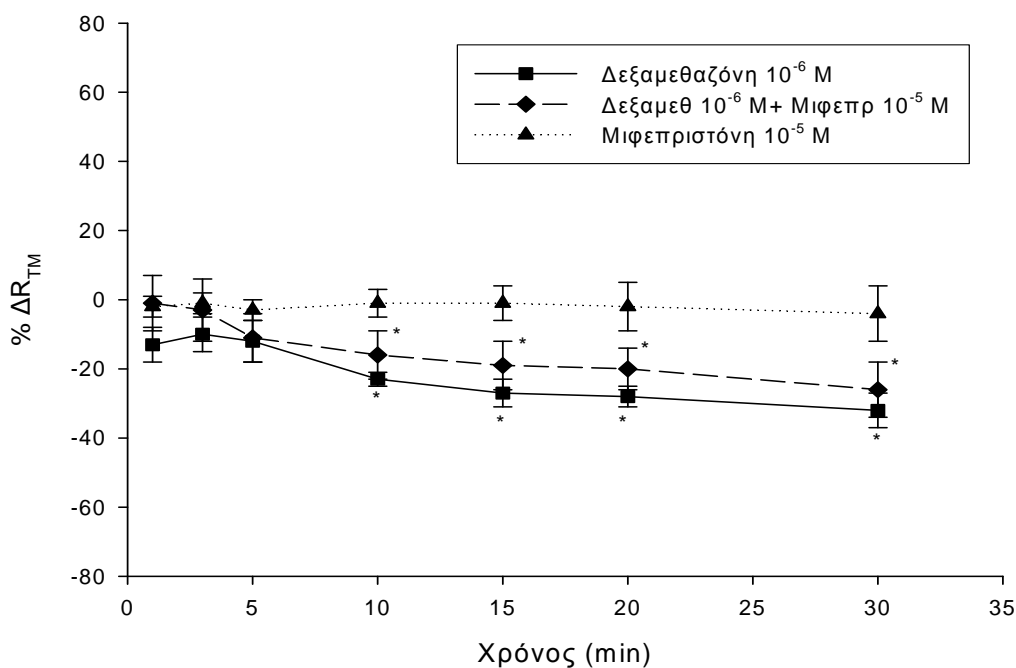
Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η μιφεπριστόνη ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της R<sub>TM</sub> ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -11,5 % ± 6,69 % σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -40,17 % ± 6,71 % (Διάγραμμα 10).



**Διάγραμμα 10.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR<sub>TM</sub> στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10<sup>-6</sup> M, μιφεπριστόνης 10<sup>-5</sup> M και μιφεπριστόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

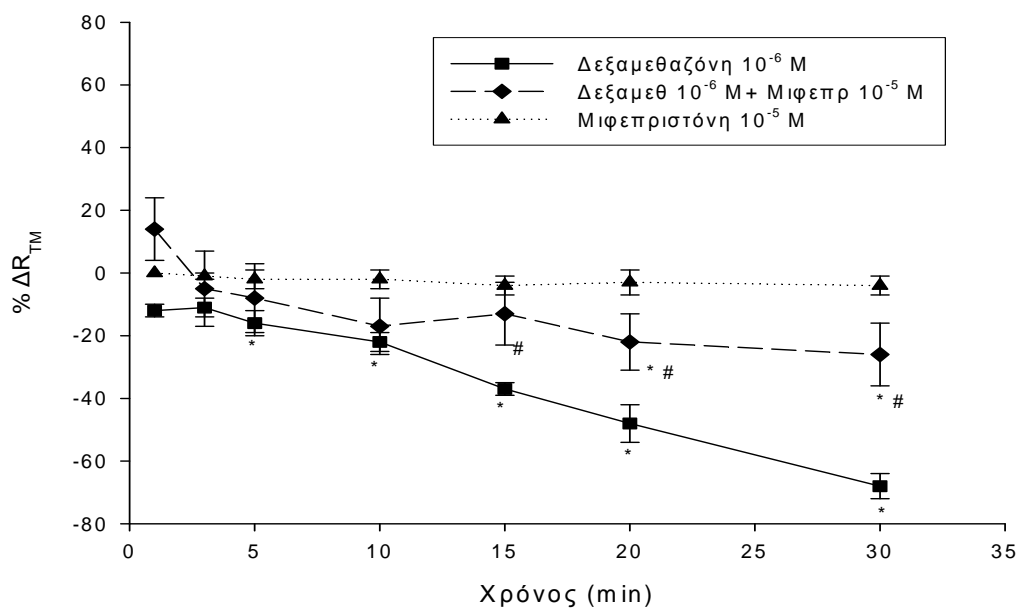
Και στις δυο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα δεν υπήρξε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα της μιφεπριστόνης μόνη της (Διαγράμματα 11 και 12). Όταν η μιφεπριστόνη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα παρατηρήθηκε πολύ μικρή αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης, η οποία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (Διάγραμμα 11).





**Διάγραμμα 11.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, μιφεπριστόνης  $10^{-5}$  M και μιφεπριστόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 12 στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα η μιφεπριστόνη ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -13,16 \% \pm 10,26 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -37,16 \% \pm 2,39 \%$ .



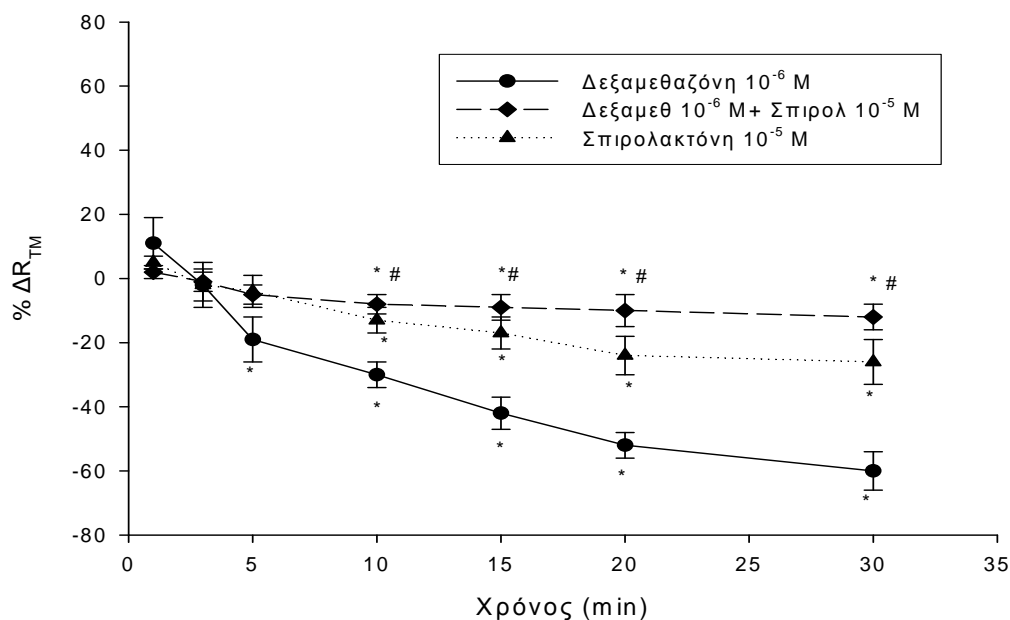
**Διάγραμμα 12.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, μιφεπριστόνης  $10^{-5}$  M και μιφεπριστόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με σπιρολακτόνη

Προσθήκη σπιρολακτόνης, που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 4,18 \%$  και συνεχίστηκε έως το 30<sup>ο</sup> λεπτό (Διάγραμμα 13). Ομοίως και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση από το 5<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -20,17 \% \pm 5,56 \%$  (Διάγραμμα 14).

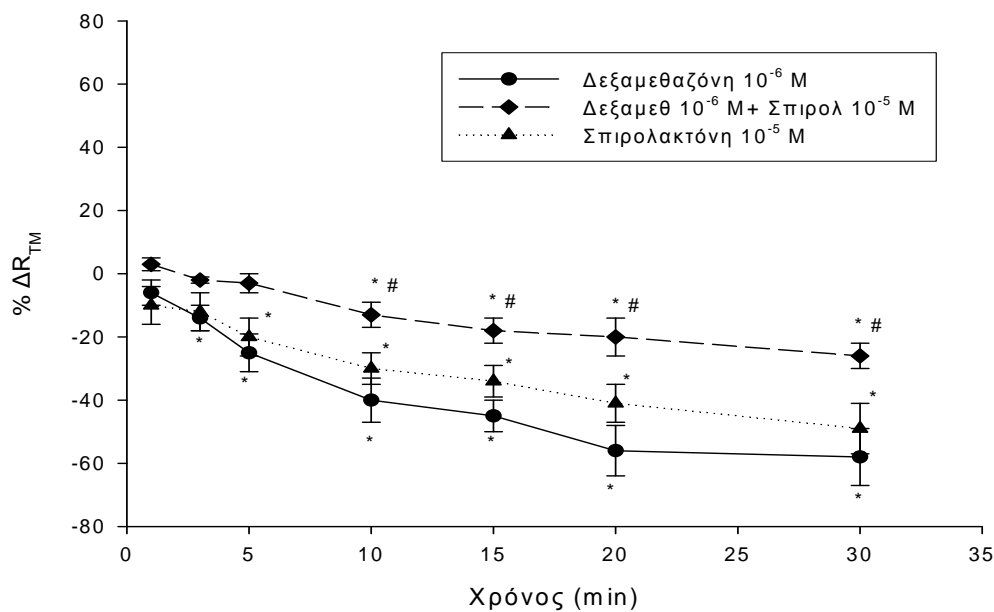
Όταν η σπιρολακτόνη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, ανέστειλε σχεδόν πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το

10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της R<sub>TM</sub> ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -8 % ± 3,29 % σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -30,33 % ± 4,10 % (Διάγραμμα 13).



**Διάγραμμα 13.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR<sub>TM</sub> στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10<sup>-6</sup> M, σπιρολακτόνης 10<sup>-5</sup> M και σπιρολακτόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

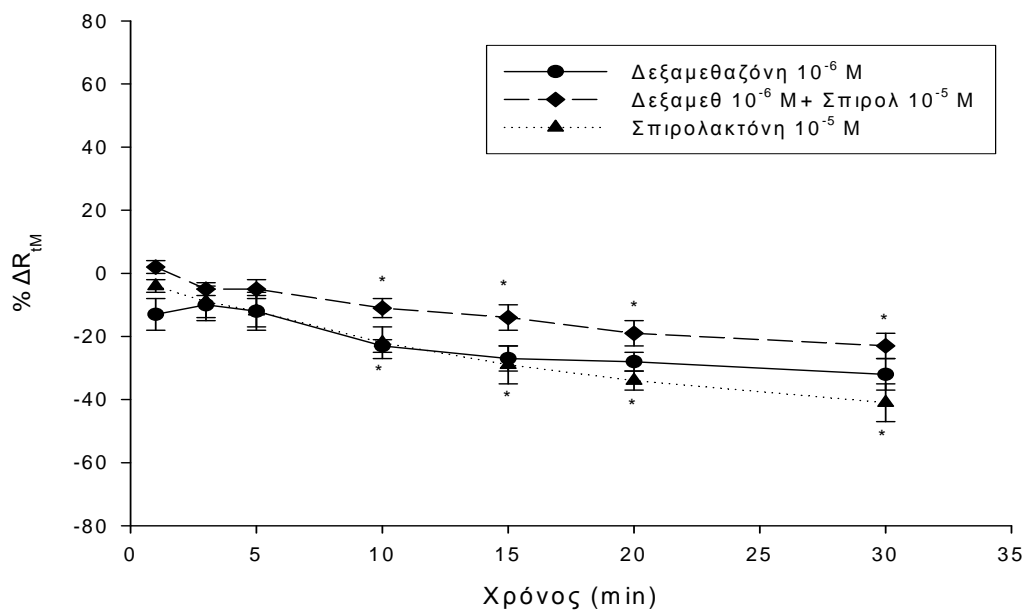
Παρομοίως, σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης από τη σπιρολακτόνη παρατηρήθηκε στη βασειοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της R<sub>TM</sub> ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -13,17 % ± 4,07 % σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν % ΔR<sub>TM</sub> = -40,17 % ± 6,71 % (Διάγραμμα 14).



**Διάγραμμα 14.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, σπιρολακτόνης  $10^{-5}$  M και σπιρολακτόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

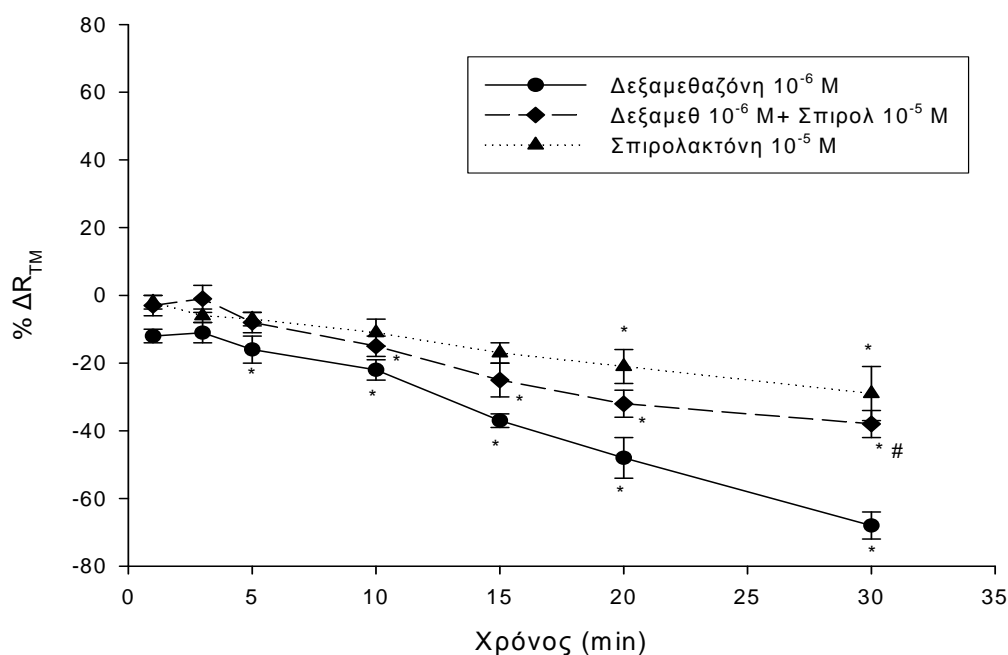
Στο σπλαχνικό υπεζωκότα, η σπιρολακτόνη οδήγησε σε μία μείωση της  $R_{TM}$  η οποία στην κορυφαία επιφάνεια ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου  $\% \Delta R_{TM} = -29,17 \% \pm 5,9 \%$  (Διάγραμμα 15) και στη βασεοπλευρική επιφάνεια από το 20<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -21,33 \% \pm 5,49 \%$  (Διάγραμμα 16). Και στις δύο πλευρές η μείωση της  $R_{TM}$  ήταν προοδευτική και συνεχίστηκε έως το 30<sup>ο</sup> λεπτό.

Όταν η σπιρολακτόνη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα υπήρξε μικρή, όχι στατιστικώς σημαντική, αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης (Διάγραμμα 15).



**Διάγραμμα 15.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, σπιρολακτόνης  $10^{-5}$  M και σπιρολακτόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 16 στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα η σπιρολακτόνη ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στο 30<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -38\% \pm 3,69\%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -68,33\% \pm 3,63\%$ .



**Διάγραμμα 16.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, σπιρολακτόνης  $10^{-5}$  M και σπιρολακτόνης μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

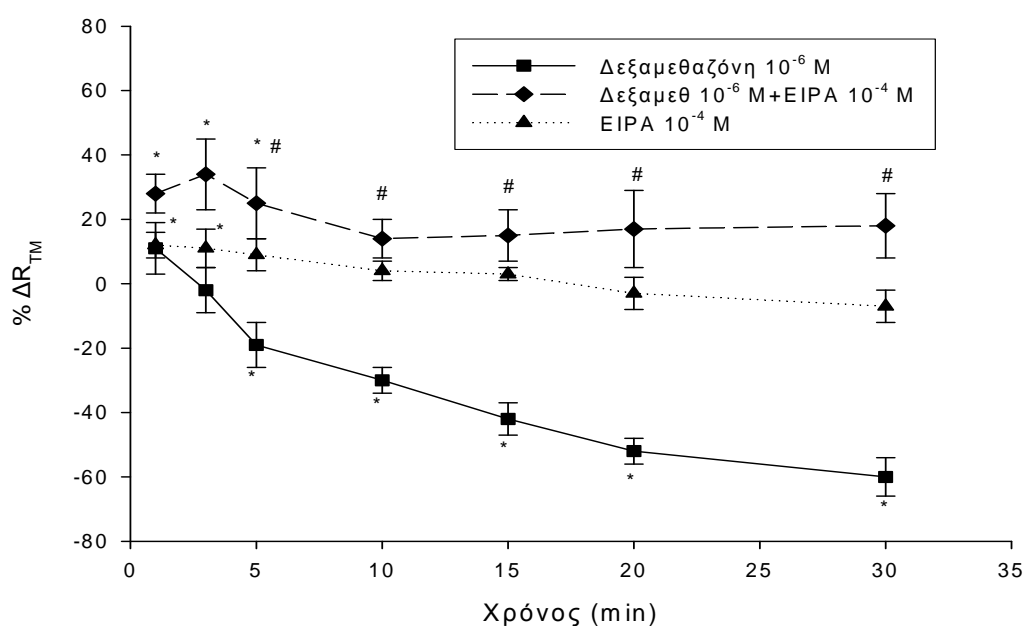
### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με τον ΕΙΡΑ

Η προσθήκη ΕΙΡΑ, που είναι ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+$ -  $\text{H}^+$ , σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε μία γρήγορη αύξηση της  $R_{TM}$ , που διήρκησε για 3 λεπτά. Αυτή η αύξηση στην τιμή της αντίστασης ήταν στατιστικώς σημαντική από το 1<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = 12,33 \% \pm 3,58 \%$  (Διάγραμμα 17). Αντιθέτως στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ο ΕΙΡΑ δεν είχε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα (Διάγραμμα 18).

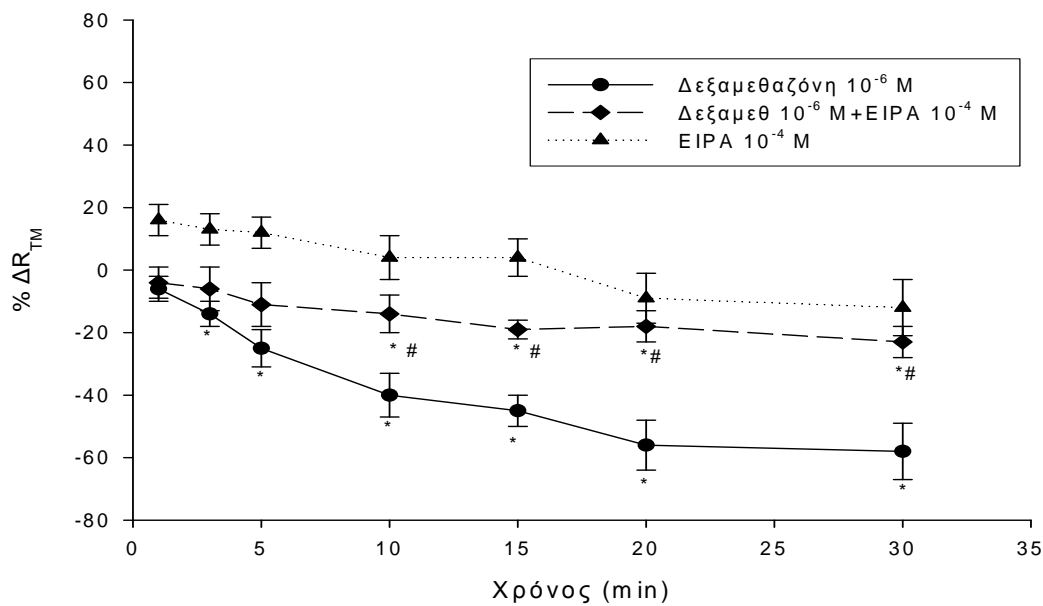
Όταν προστέθηκε ο ΕΙΡΑ μαζί με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη επίδραση της δεξαμεθαζόνης.

Μάλιστα υπήρξε μία πλήρης αναστροφή της δράσης της δεξαμεθαζόνης 5 λεπτά μετά την προσθήκη, όπου  $\% \Delta R_{TM} = 25 \% \pm 10,61 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της όπου  $\% \Delta R_{TM} = -18,67 \% \pm 6,75 \%$  (Διάγραμμα 17).

Αντιθέτως, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 18 στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ο ΕΙΡΑ ανέστειλε μόνο μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -14 \% \pm 6,22 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -40,17 \% \pm 6,71 \%$ .



**Διάγραμμα 17.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10<sup>-6</sup> M, ΕΙΡΑ 10<sup>-4</sup> M και ΕΙΡΑ μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm T.Σ.$  6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

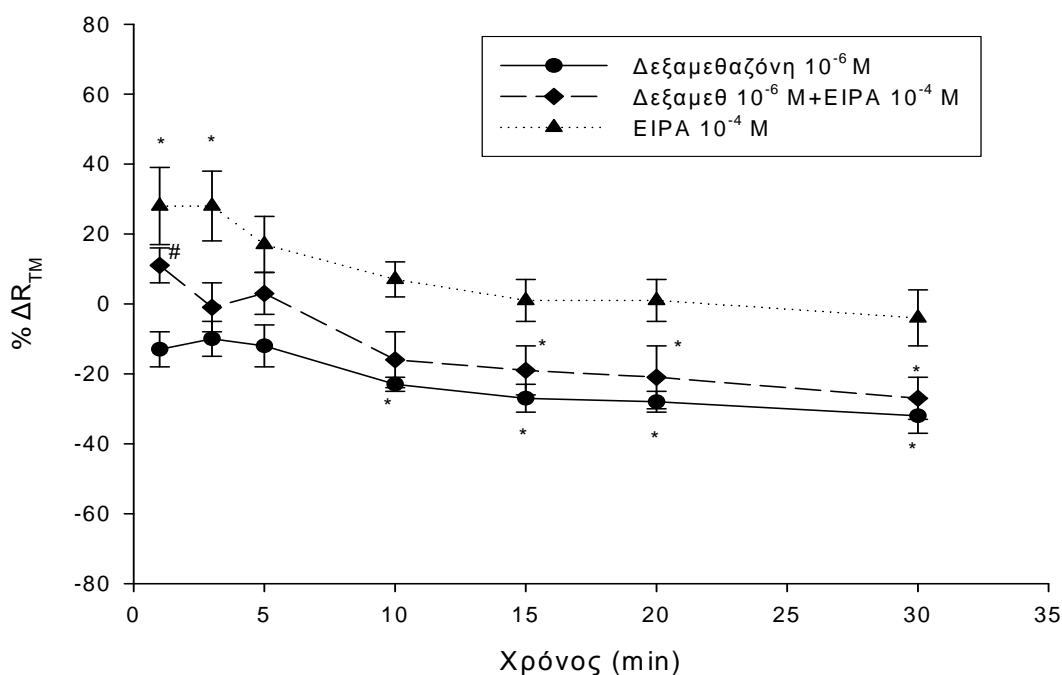


**Διάγραμμα 18.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην βασειπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, EIPA  $10^{-4}$  M και EIPA μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

Όταν προστέθηκε ο EIPA στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προκάλεσε μία γρήγορη αύξηση της  $R_{TM}$ , που διήρκησε για 3 λεπτά και προοδευτικά επέστρεψε στην τιμή αναφοράς μετά από 30 λεπτά. Αυτή η αύξηση στην τιμή της αντίστασης ήταν στατιστικώς σημαντική από το 1<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = 27,5 \% \pm 10,69 \%$  (Διάγραμμα 19). Αντιθέτως στη βασειπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ο EIPA δεν είχε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα (Διάγραμμα 20).

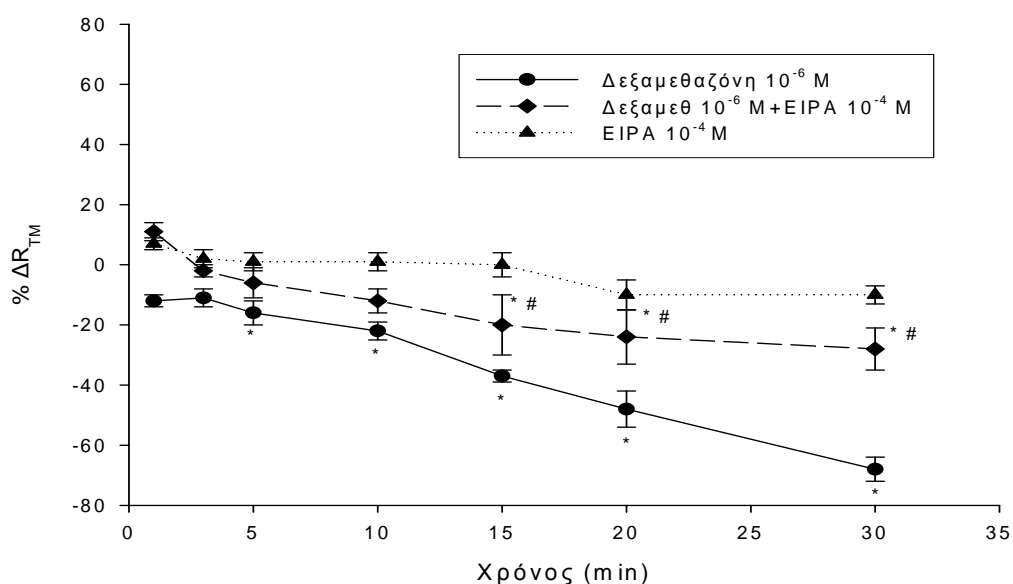
Στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ο συνδυασμός EIPA και δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μικρή αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο στο 1<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 10,5 \% \pm 5,11 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 4,95 \%$  (Διάγραμμα 19).





**Διάγραμμα 19.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, EIPA  $10^{-4}$  M και EIPA μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

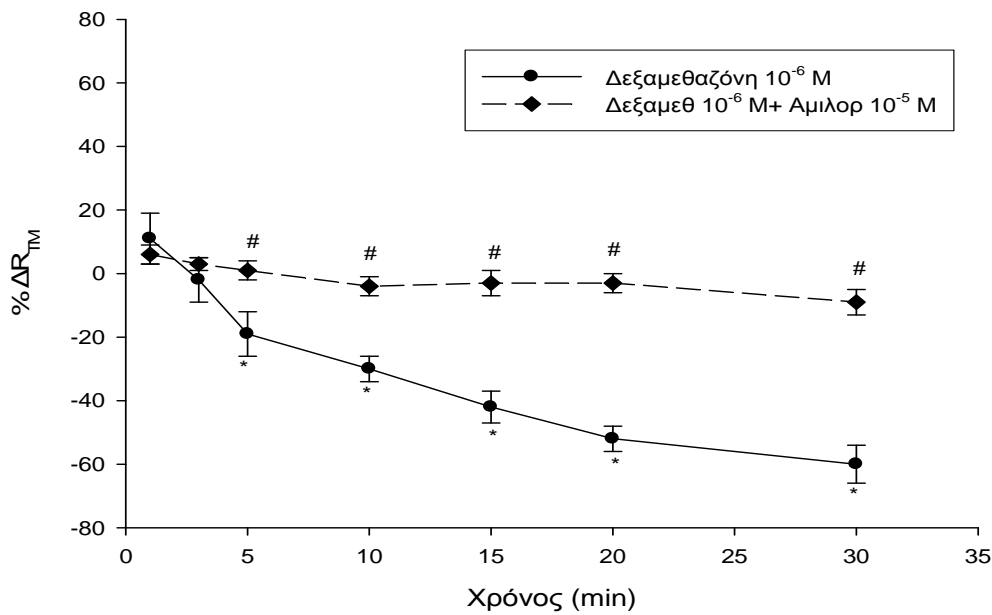
Στο διάγραμμα 20 φαίνεται ότι όταν ο EIPA προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα, ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = -20,33 \% \pm 9,57 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -37,17 \% \pm 2,39 \%$ .



**Διάγραμμα 20.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M, EIPA  $10^{-4}$  M και EIPA μαζί με δεξαμεθαζόνη στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

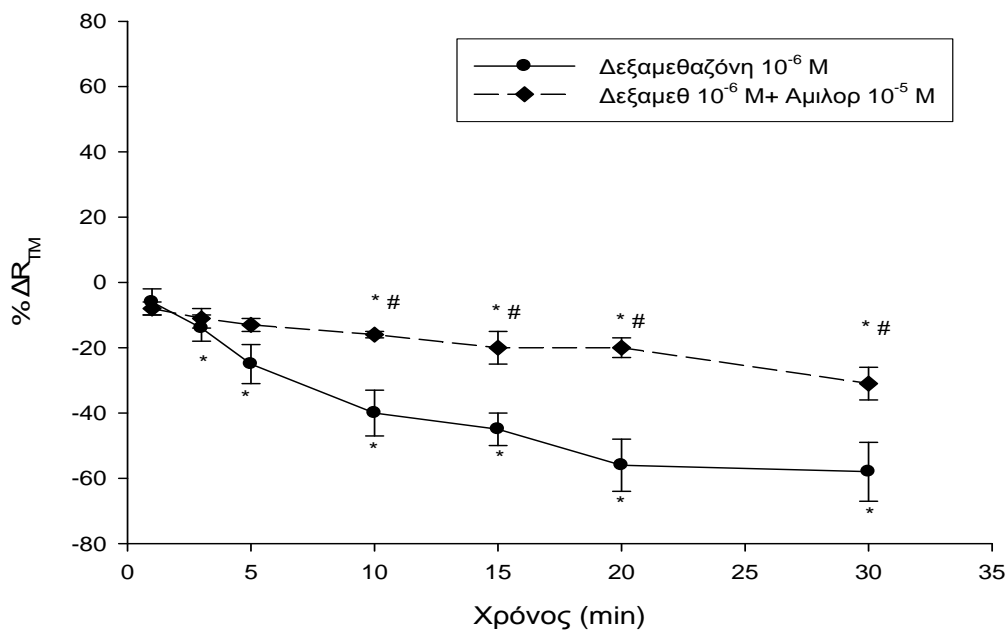
### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την αμιλορίδη

Όταν προστέθηκε η αμιλορίδη, που είναι αναστολέας των διαύλων  $\text{Na}^+$ , σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 1,17 \% \pm 3,12 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -18,67 \% \pm 6,75 \%$  (Διάγραμμα 21).



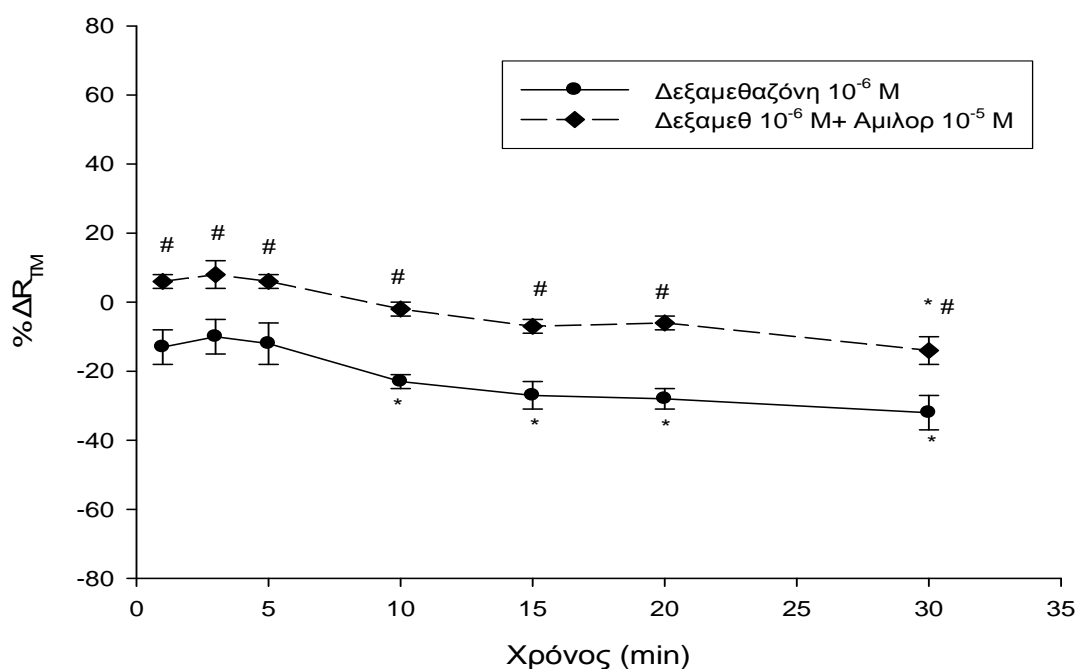
**Διάγραμμα 21.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η αμιλορίδη ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -15,83 \% \pm 1,08 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -40,17 \% \pm 6,71 \%$  (Διάγραμμα 22).



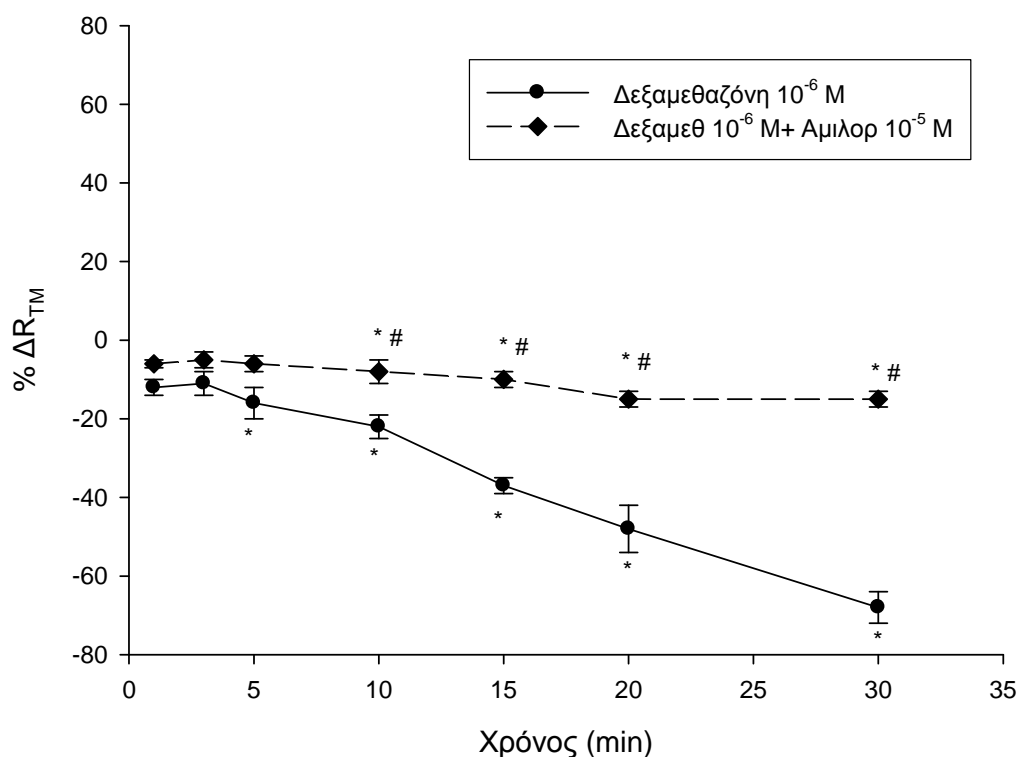
**Διάγραμμα 22.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

Ο συνδυασμός αμιλορίδης και δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως και στατιστικώς σημαντικά τη δράση της δεξαμεθαζόνης από το 1<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 6,33 \% \pm 2,28 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 4,95 \%$  (Διάγραμμα 23).



**Διάγραμμα 23.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

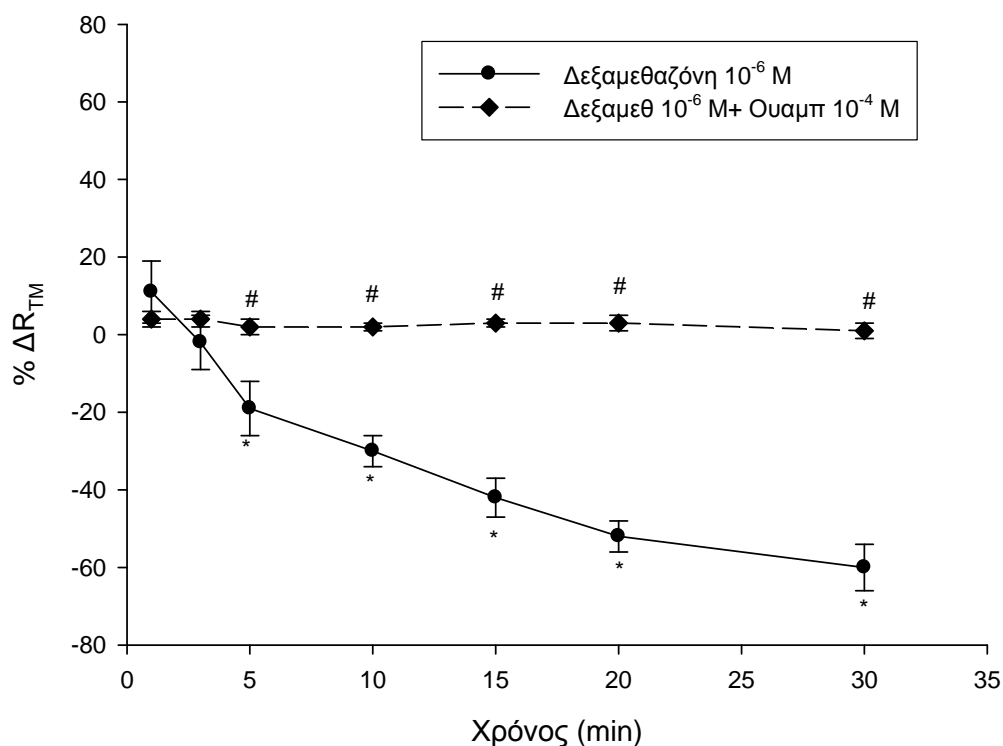
Στο διάγραμμα 24 φαίνεται ότι όταν η αμιλορίδη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα, ανέστειλε σχεδόν πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το  $10^0$  λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = -8 \% \pm 2,56 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -22 \% \pm 2,66 \%$ .



**Διάγραμμα 24.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

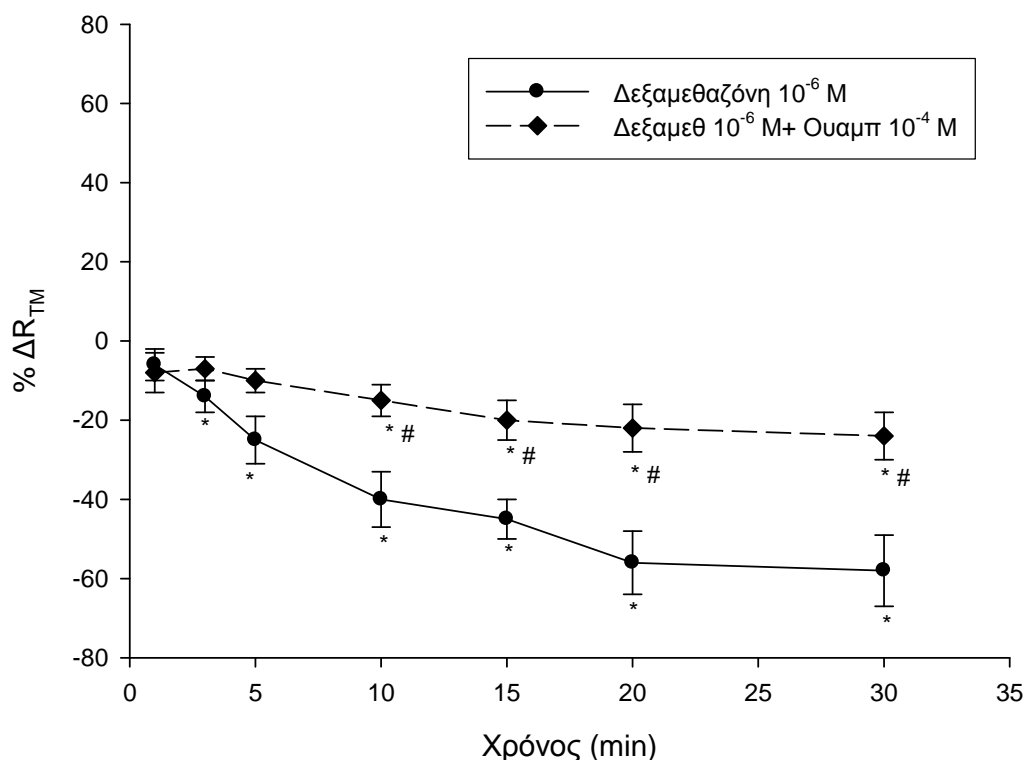
### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την ουαμπαΐνη

Η ουαμπαΐνη, που είναι αναστολέας της αντλίας  $Na^+ - K^+$ , όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 1,83 \% \pm 2,24 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -18,67 \% \pm 6,75 \%$  (Διάγραμμα 25).



**Διάγραμμα 25.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαμπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

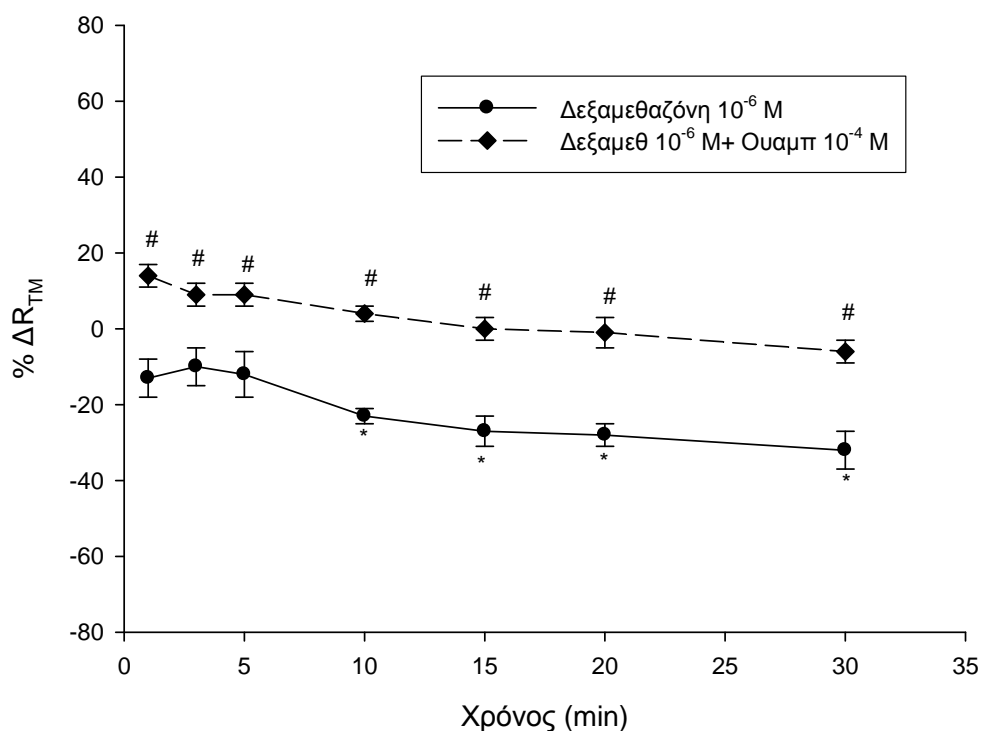
Όταν η ουαμπαΐνη προστέθηκε στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = -15,33 \% \pm 3,58 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -40,17 \% \pm 6,71 \%$  (Διάγραμμα 26).



**Διάγραμμα 26.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

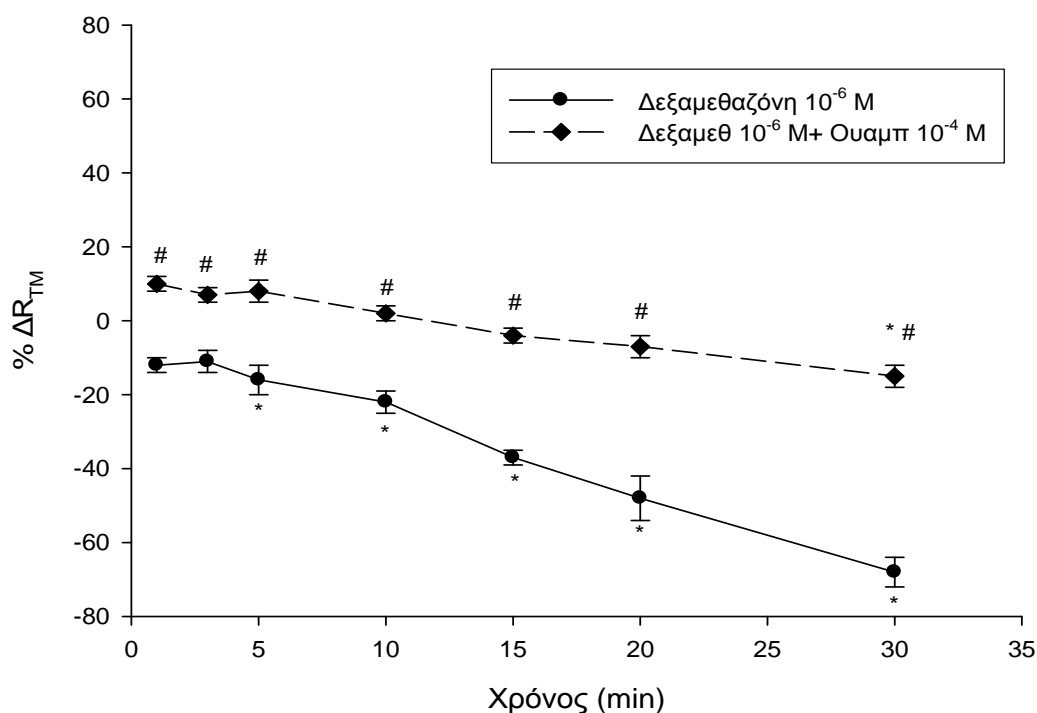
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 27 η ουαπαΐνη στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως και στατιστικώς σημαντικά τη δράση της δεξαμεθαζόνης από το 1<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 13,5 \% \pm 2,57 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 4,95 \%$ .





**Διάγραμμα 27.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαμπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

Ο συνδυασμός ουαμπαΐνης και δεξαμεθαζόνης στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως και στατιστικώς σημαντικά τη δράση της δεξαμεθαζόνης από το 1<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 9,83 \% \pm 2,21 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -12,16 \% \pm 1,80 \%$  (Διάγραμμα 28).



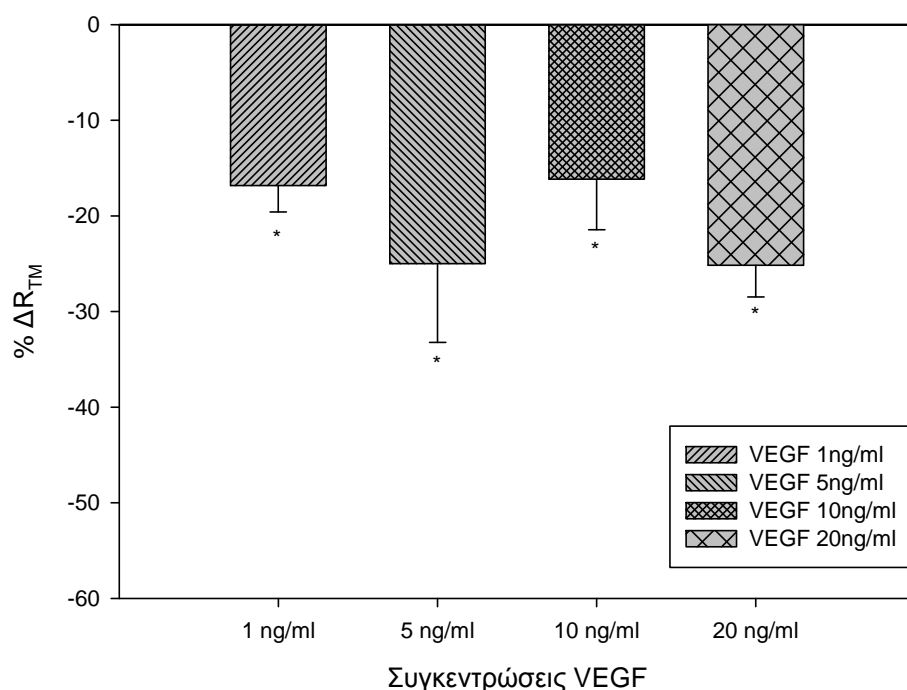
**Διάγραμμα 28.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαμπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, <sup>#</sup> $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

## Αποτελέσματα VEGF

Ο VEGF χρησιμοποιήθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 1ng/ml έως 20ng/ml και είχε παρόμοια δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.

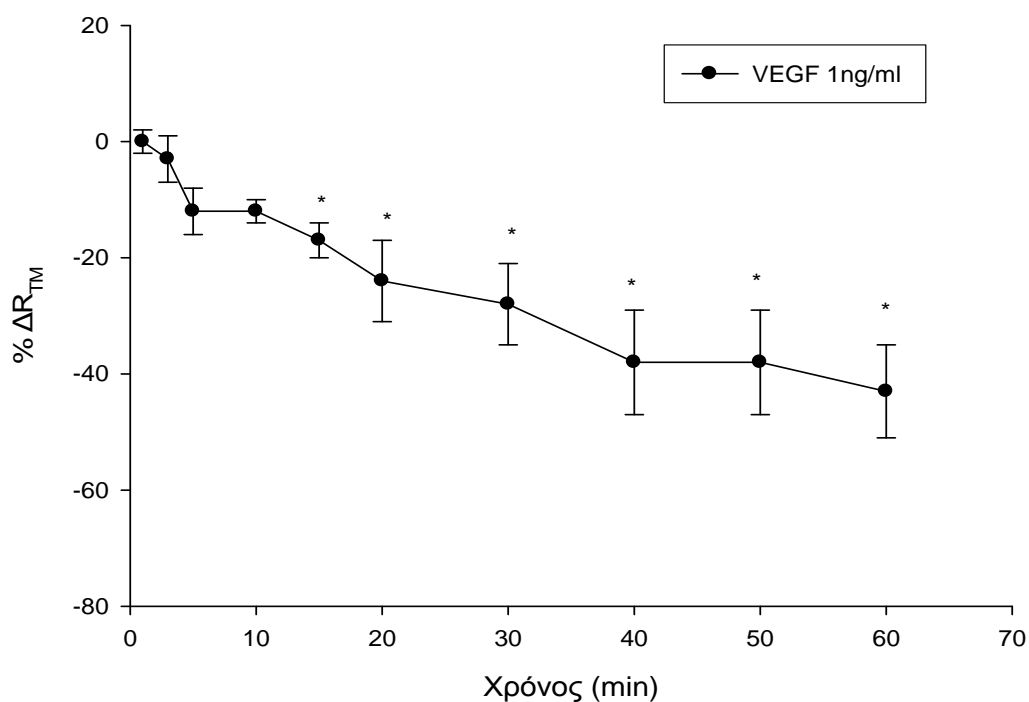
Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης (%  $\Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 15<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 29. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 20ng/ml όπου %  $\Delta R_{TM} = -25,16 \% \pm 3,32 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση

10 ng/ml όπου  $\% \Delta R_{TM} = -16,16 \% \pm 5,29 \%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  σε όλες τις συγκεντρώσεις.



**Διάγραμμα 29.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου στο 15<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις από 1 έως 20 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

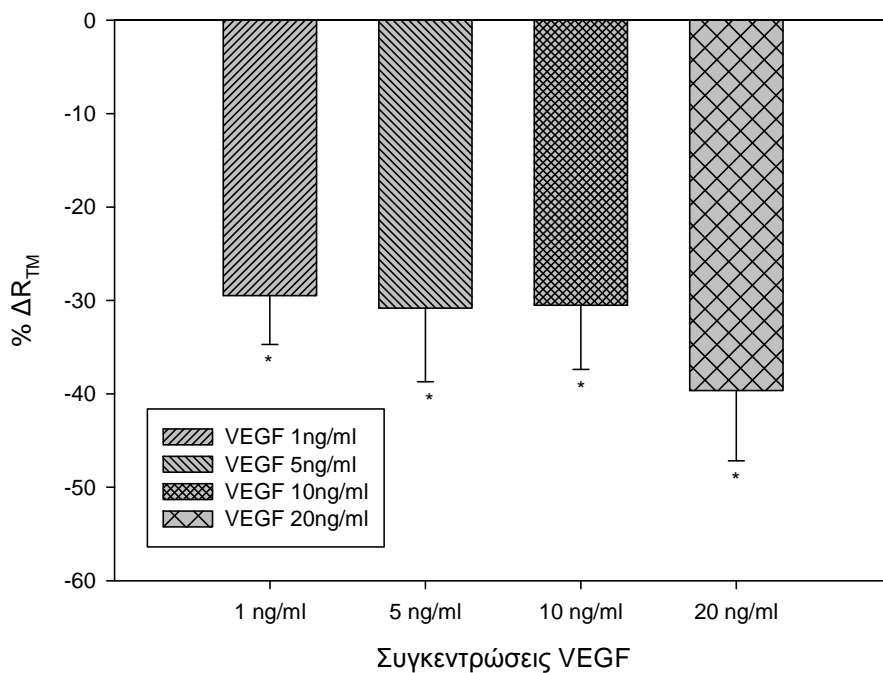
Όταν ο VEGF προστέθηκε σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -16,83 \% \pm 2,75 \%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 30).



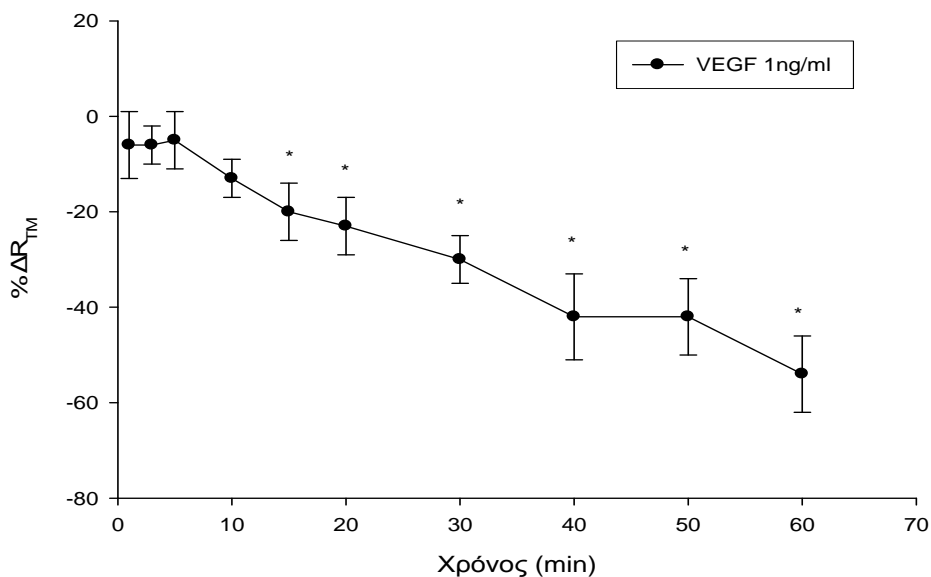
**Διάγραμμα 30.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 30<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 31. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 20ng/ml όπου %  $\Delta R_{TM} = -39,66 \% \pm 7,52 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση 1ng/ml όπου %  $\Delta R_{TM} = -29,5 \% \pm 5,21 \%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Στο διάγραμμα 32 φαίνεται η σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$  μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα και αυτή η πτώση στην τιμή της αντίστασης ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό όπου %  $\Delta R_{TM} = -19,5 \% \pm 5,53 \%$  και συνεχίστηκε προοδευτικά μέχρι το τέλος του πειράματος.

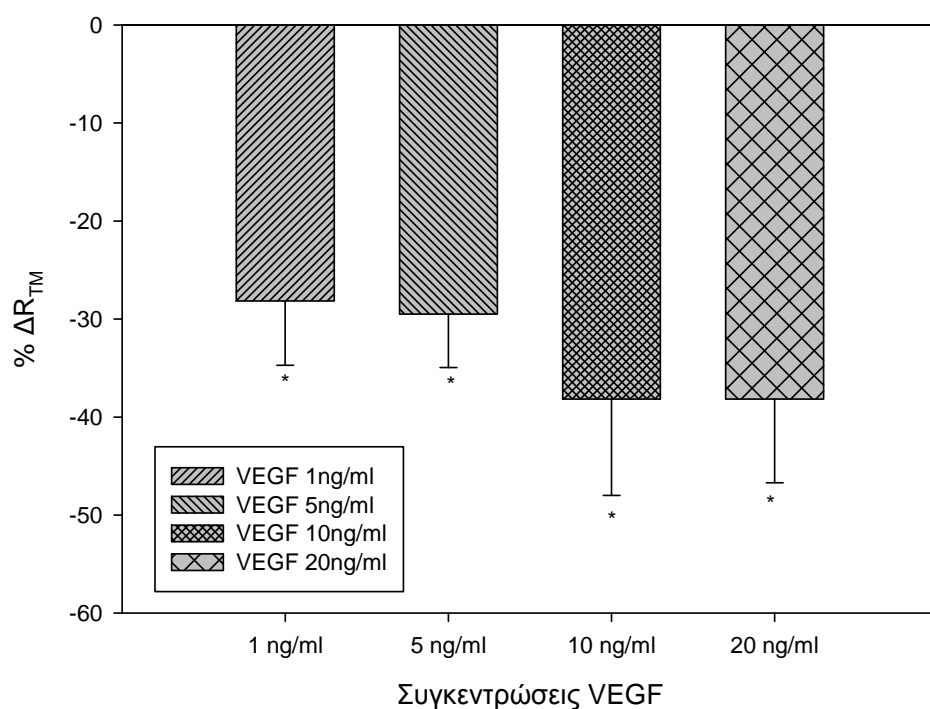


**Διάγραμμα 31.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου στο 30<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις από 1 έως 20 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



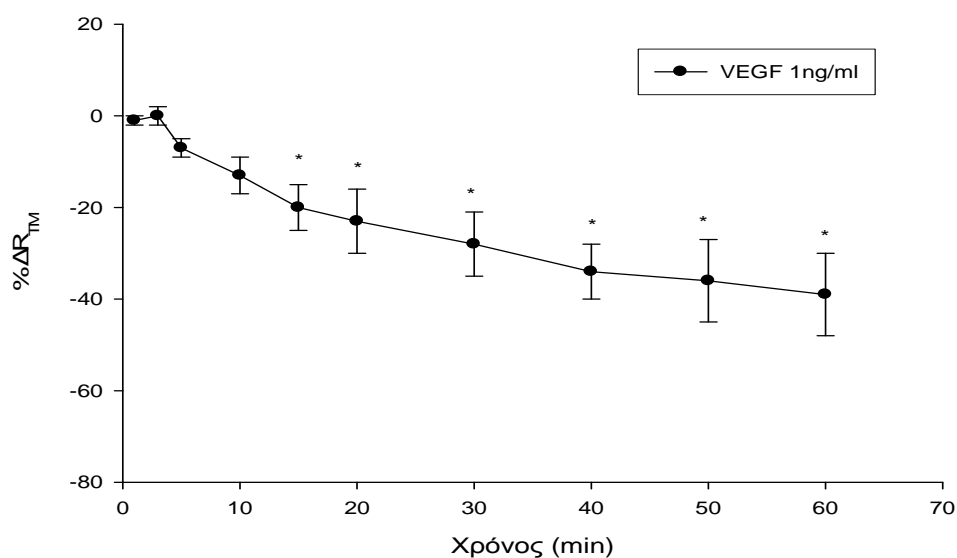
**Διάγραμμα 32.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στο διάγραμμα 33 φαίνεται η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα στο 30<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 20ng/ml όπου  $\% \Delta R_{TM} = -38,16 \% \pm 8,55 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση 1ng/ml όπου  $\% \Delta R_{TM} = -28,16 \% \pm 6,56 \%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι μειώσεις της  $R_{TM}$  σε όλες τις συγκεντρώσεις.



**Διάγραμμα 33.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου στο 30<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις από 1 έως 20 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

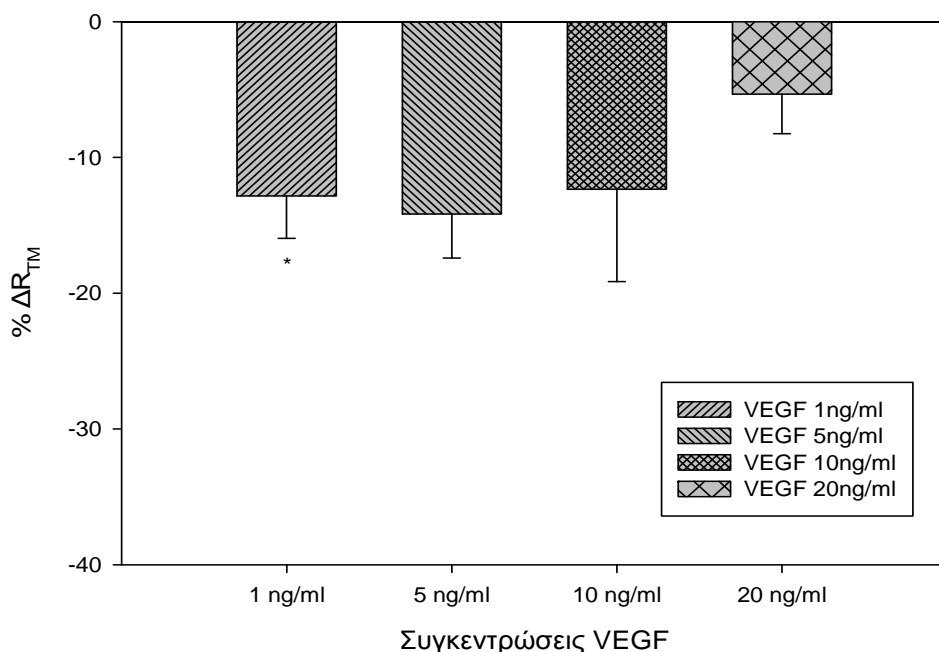
Προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -19,66 \% \pm 5,20 \%$  και συνεχίστηκε έως το 60<sup>ο</sup> λεπτό (Διάγραμμα 34).



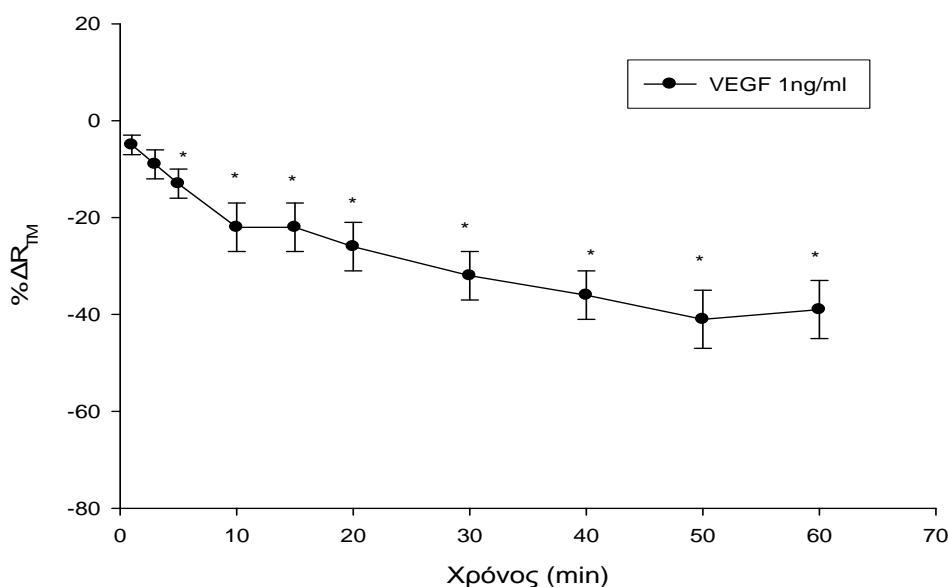
**Διάγραμμα 34.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία μείωση της  $R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο διάγραμμα 35. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη μείωση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 5ng/ml όπου %  $\Delta R_{TM} = -14,16 \% \pm 3,24 \%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση 20ng/ml όπου %  $\Delta R_{TM} = -5,33 \% \pm 2,92 \%$ . Στατιστικώς σημαντική ήταν η μείωση της  $R_{TM}$  στη συγκέντρωση 1ng/ml.

Μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα, παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση της  $R_{TM}$  η οποία συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 36). Η πτώση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 3,14 \%$ .



**Διάγραμμα 35.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις από 1 έως 20 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



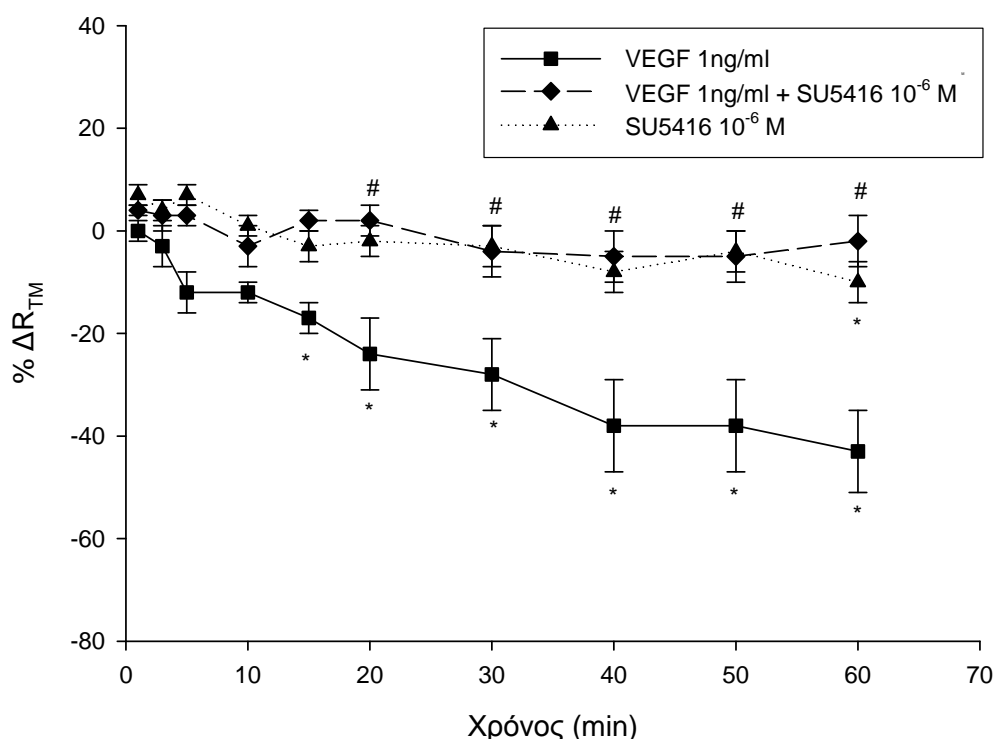
**Διάγραμμα 36.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



## Αποτελέσματα VEGF σε συνδυασμό με SU5416

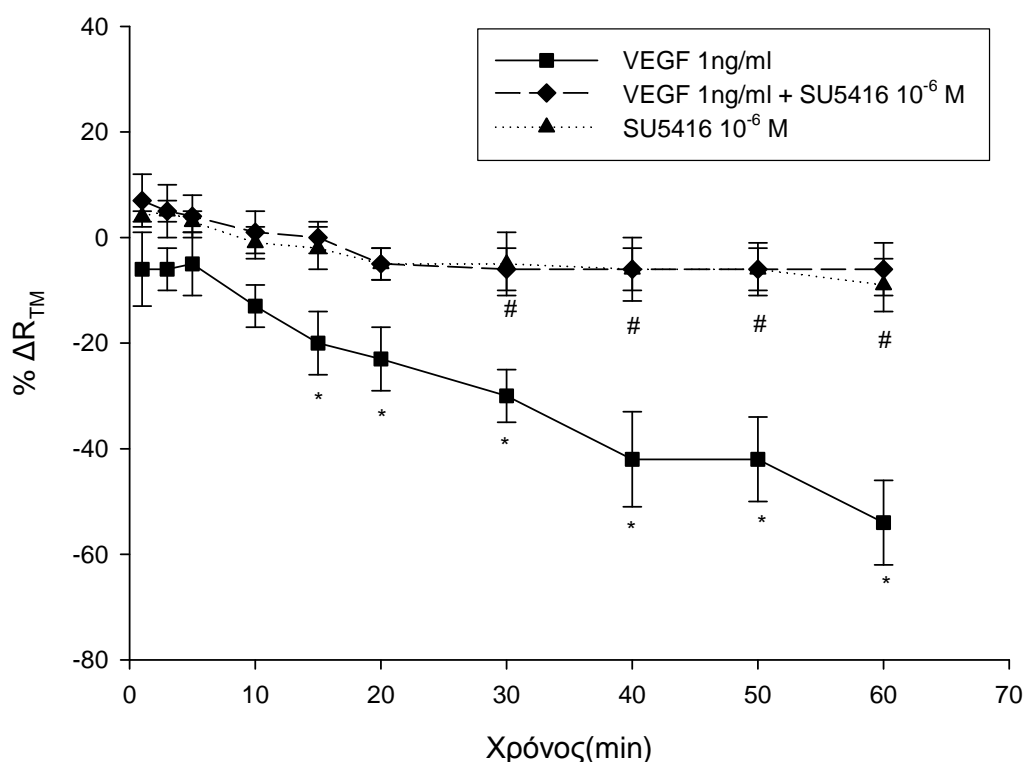
Ο SU5416 είναι αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα και μελετήθηκε η δράση του στον τοιχωματικό και στο σπλαχνικό υπεζωκότα μόνος του και σε συνδυασμό με τον VEGF. Ο SU5416 σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την  $R_{TM}$  στην κορυφαία και στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα (Διαγράμματα 37 και 38).

Προσθήκη SU5416 μαζί με VEGF στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 20<sup>ο</sup> λεπτό, όπου  $\% \Delta R_{TM} = 1,5 \% \pm 2,67 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του όπου  $\% \Delta R_{TM} = -24,16 \% \pm 7,12 \%$  (Διάγραμμα 37).



**Διάγραμμα 37.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU5416  $10^{-6}$  M και SU5416 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ο SU5416 ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 30<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -5,5 \% \pm 4,05 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -29,5 \% \pm 5,21 \%$  (Διάγραμμα 38).

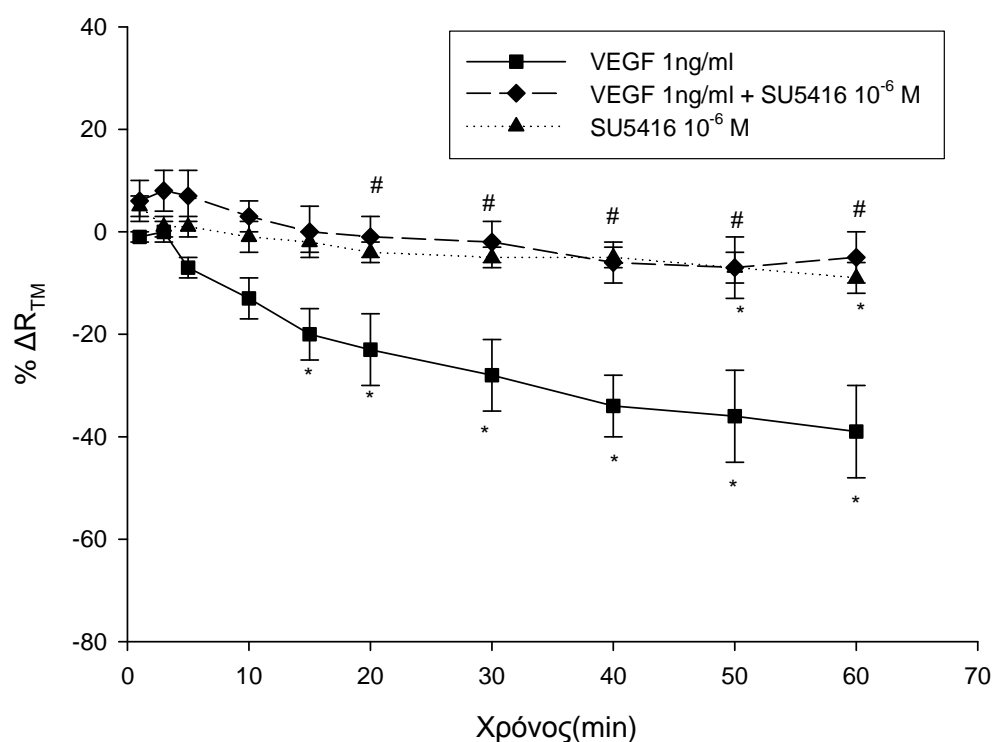


**Διάγραμμα 38.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU5416 10<sup>-6</sup> M και SU5416 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, #P<0,05 σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

Και στις δυο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα ο SU5416 δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την  $R_{TM}$  σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διαγράμματα 39 και 40).

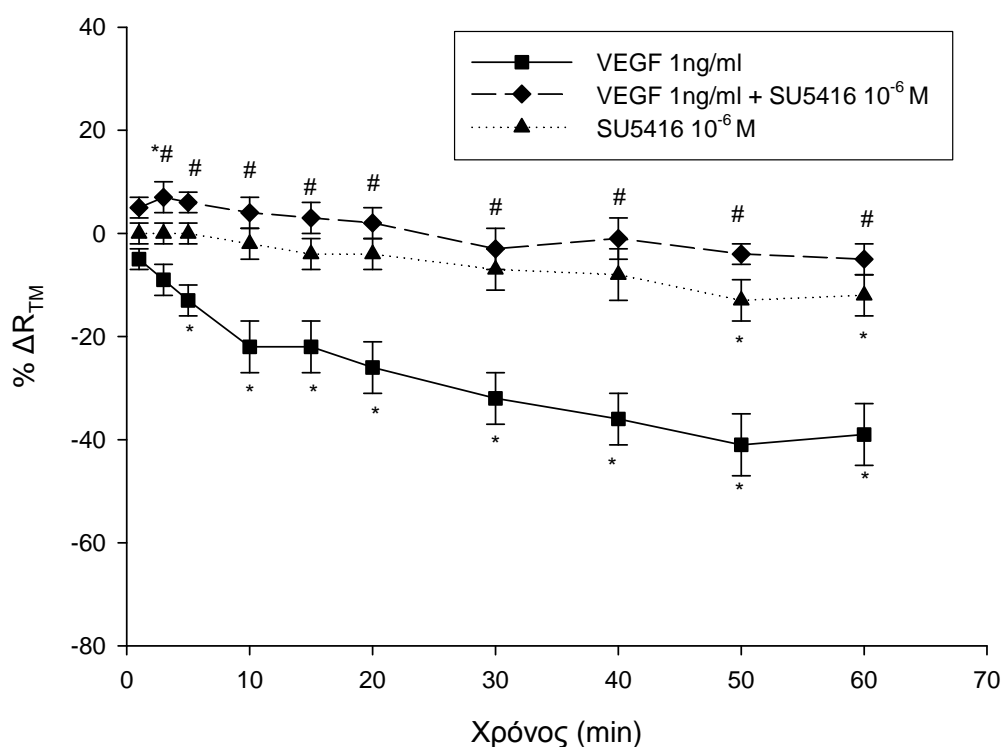
Ο συνδυασμός SU5416 και VEGF στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 20<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν

$\% \Delta R_{TM} = -1,33 \% \pm 4,39 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -22,5 \% \pm 6,99 \%$  (Διάγραμμα 39).



**Διάγραμμα 39.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU5416  $10^{-6}$  M και SU5416 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 40 στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ο SU5416 ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 3<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 7,33 \% \pm 3,05 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -8,83 \% \pm 3,39 \%$ .

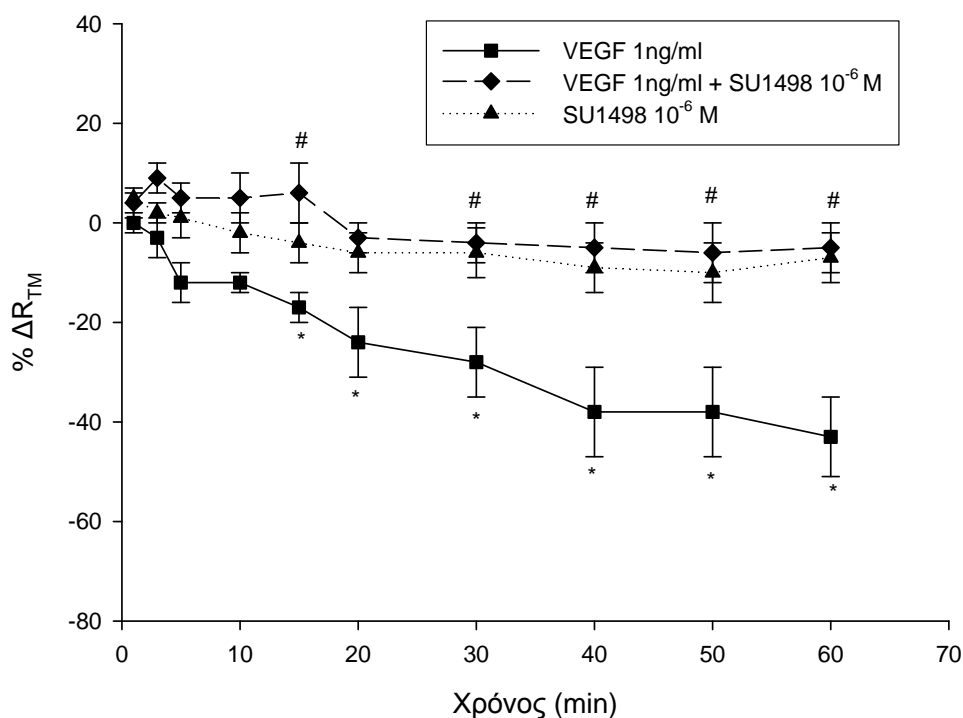


**Διάγραμμα 40.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU5416  $10^{-6}$  M και SU5416 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

### Αποτελέσματα VEGF σε συνδυασμό με SU1498

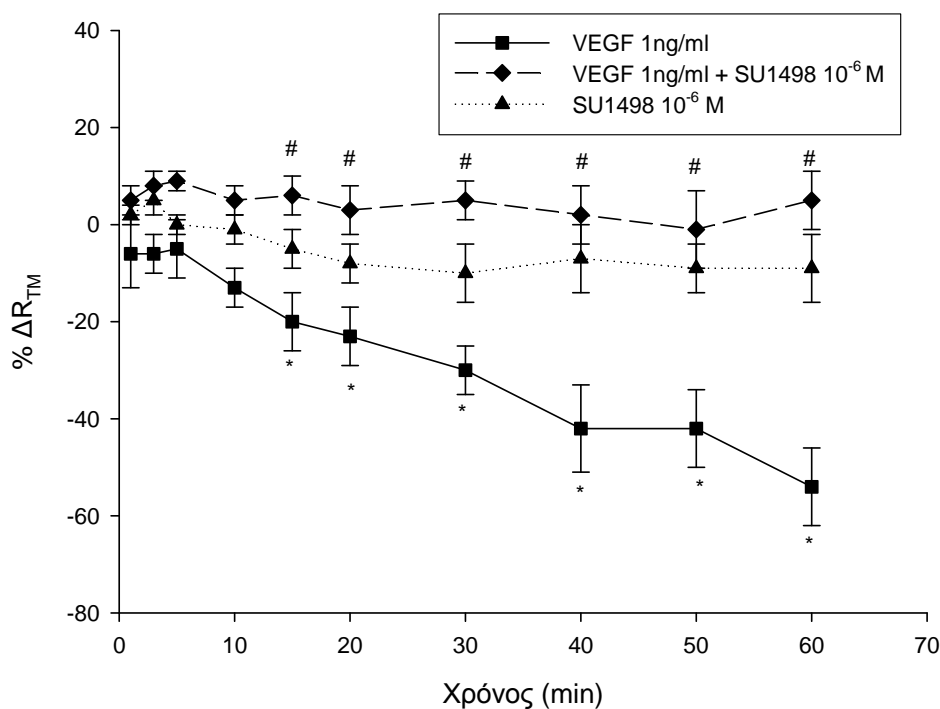
Ο SU1498 που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2, όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M στην κορυφαία και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την  $R_{TM}$  (Διαγράμματα 41 και 42).

Στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ο SU1498 ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 6 \% \pm 4,77 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -16,83 \% \pm 2,75 \%$  (Διάγραμμα 41).



**Διάγραμμα 41.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU1498  $10^{-6}$  M και SU1498 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

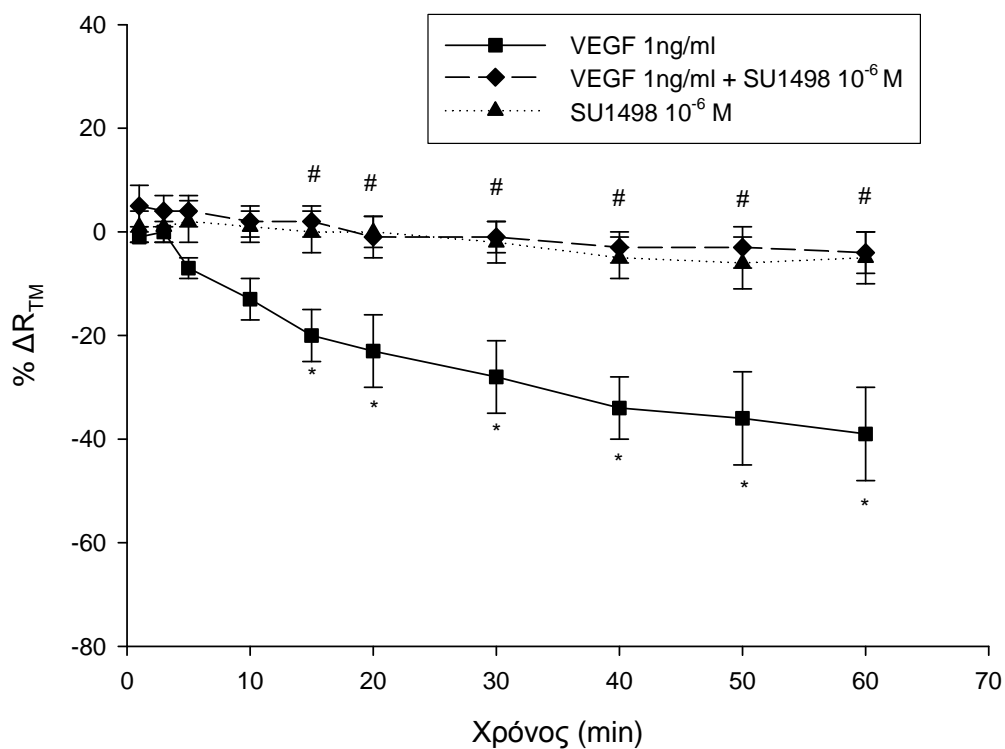
Ομοίως όταν ο SU1498 προστέθηκε στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 5,5 \% \pm 4,38 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -19,5 \% \pm 5,53 \%$  (Διάγραμμα 42).



**Διάγραμμα 42.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU1498  $10^{-6}$  M και SU1498 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, <sup>#</sup> $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

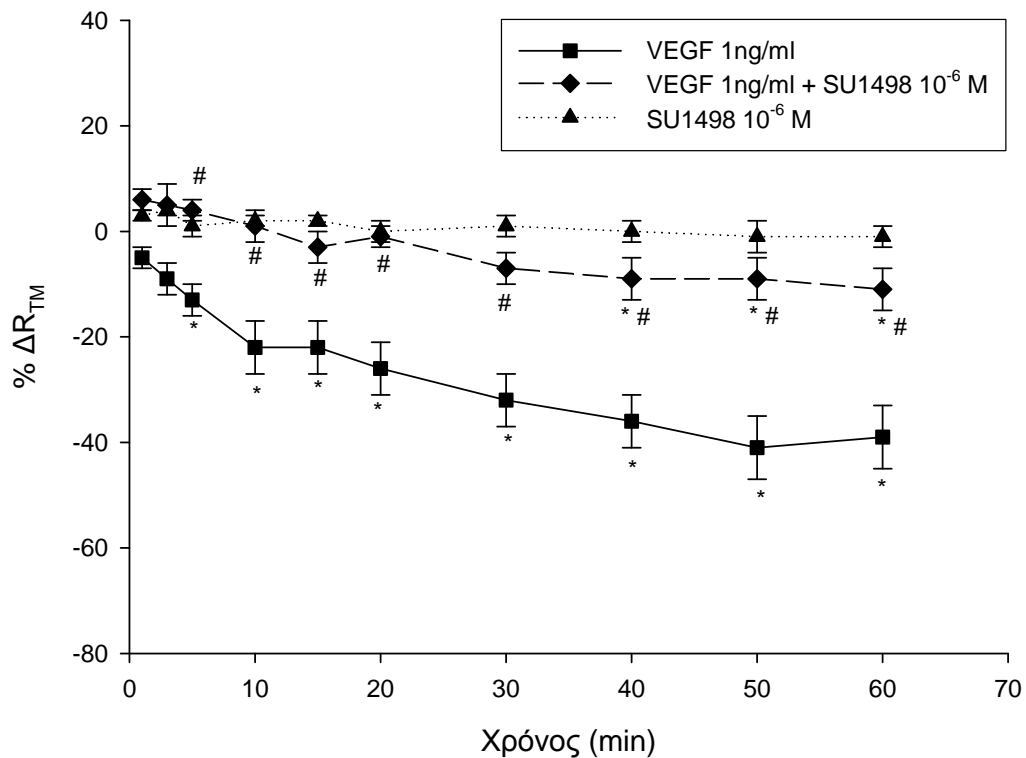
Και στις δυο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα δεν υπήρξε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα του SU1498 (Διαγράμματα 43 και 44).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 43, ο SU1498 στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 1,67 \% \pm 3,29 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -19,66 \% \pm 5,2 \%$ .



**Διάγραμμα 43.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU1498  $10^{-6}$  M και SU1498 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.

Ο συνδυασμός SU1498 και VEGF στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 3,67 \% \pm 2,2 \%$  σε σύγκριση με τον VEGF μόνο του που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -12,83 \% \pm 3,14 \%$  (Διάγραμμα 44).

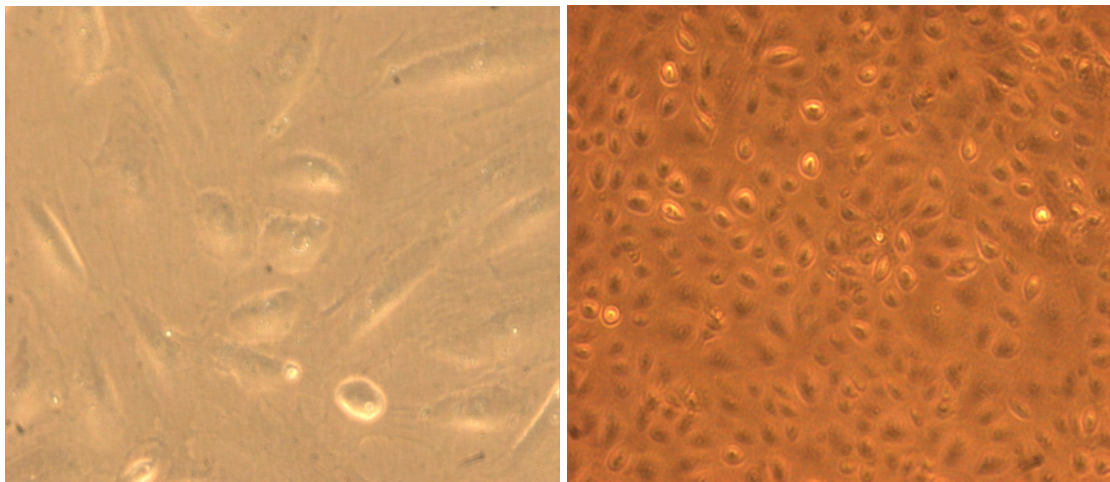


**Διάγραμμα 44.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασηοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF 1ng/ml, SU1498  $10^{-6}$  M και SU1498 μαζί με VEGF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους ( $N=6$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα VEGF.



## **ΜΕΡΟΣ Β: Αποτελέσματα ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα**

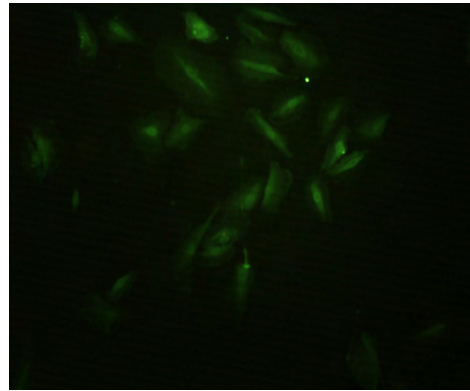
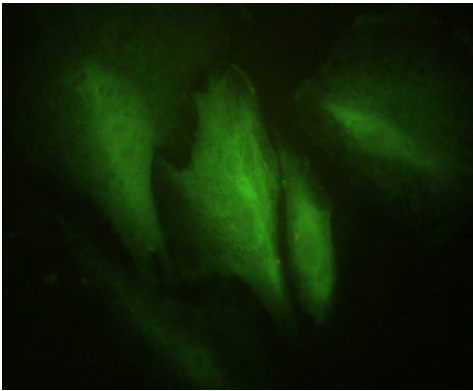
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα (Εικόνα 7). Τα κύτταρα εμφανίζονταν πιο επιμήκη τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας, στη συνέχεια όμως καθώς πλησίαζαν στον κορεσμό τους αποκτούσαν ένα ομογενές πολυγωνικό σχήμα, τυπικό μορφολογικό χαρακτηριστικό των μεσοθηλιακών κυττάρων με βάση τη βιβλιογραφία.



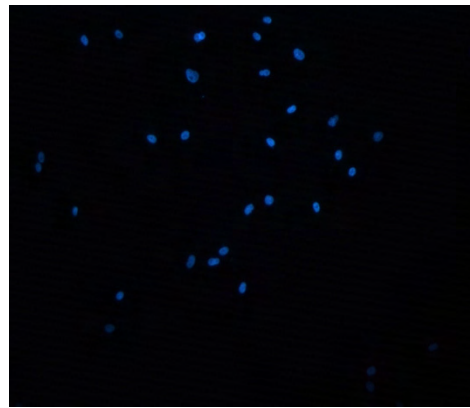
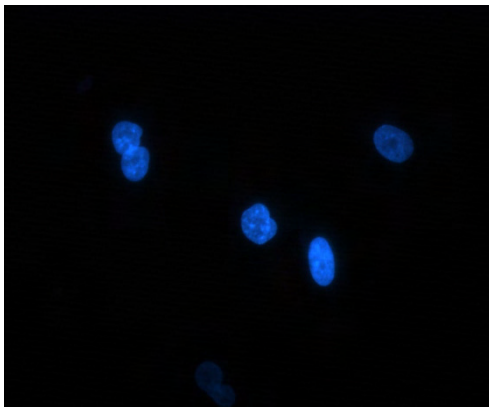
***Εικόνα 7:** Μεσοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου υπεζωκότα πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τον κορεσμό όπως φαίνονται σε ανάστροφο μικροσκόπιο.*

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας όλα τα κύτταρα βάφτηκαν θετικά για αντίσωμα κατά της κυτοκερατίνης 19, η παρουσία της οποίας αποτελεί χαρακτηριστικό του μεσοθηλίου (Εικόνα 8).

A)

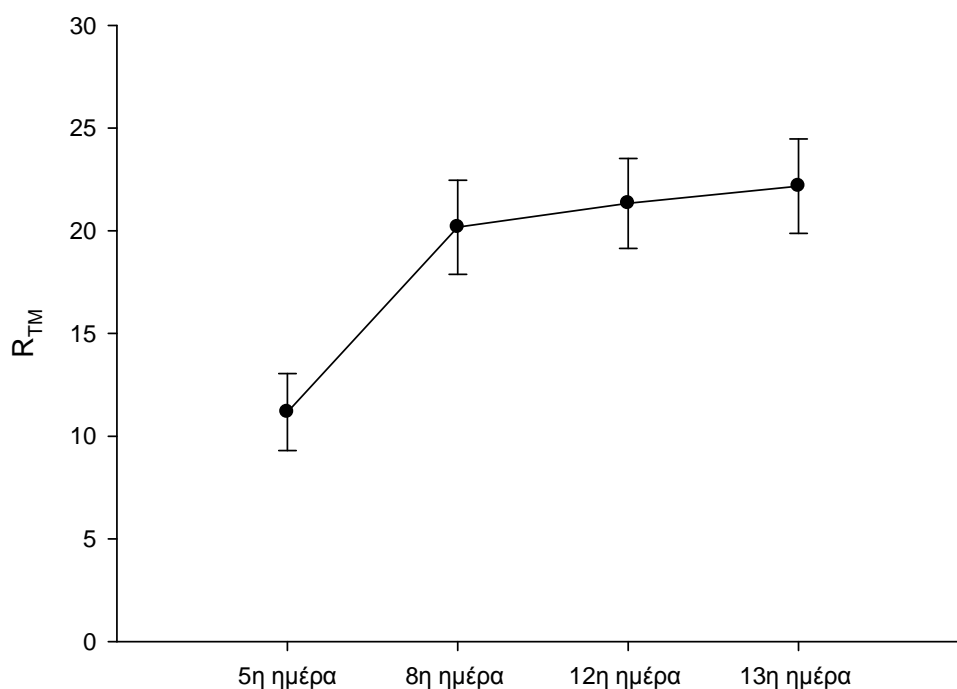


B)



**Εικόνα 8:** Βαφή ανοσοφθορισμού μεσοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου υπεζωκότα. Τα κύτταρα βάφτηκαν A) με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της κυτοκερατίνης 19 και B) με DAPI για χρώση DNA.

Η διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) των κορεσμένων ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων την 13<sup>η</sup> μέρα ήταν  $22,17 \pm 2,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα, N= 6) (Διάγραμμα 45). Μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη συσκευή EVOMX όταν τα κύτταρα ήταν στα φίλτρα πολυεστέρα και λίγο πριν αυτά μεταφερθούν και τοποθετηθούν για μετρήσεις στη συσκευή Ussing.

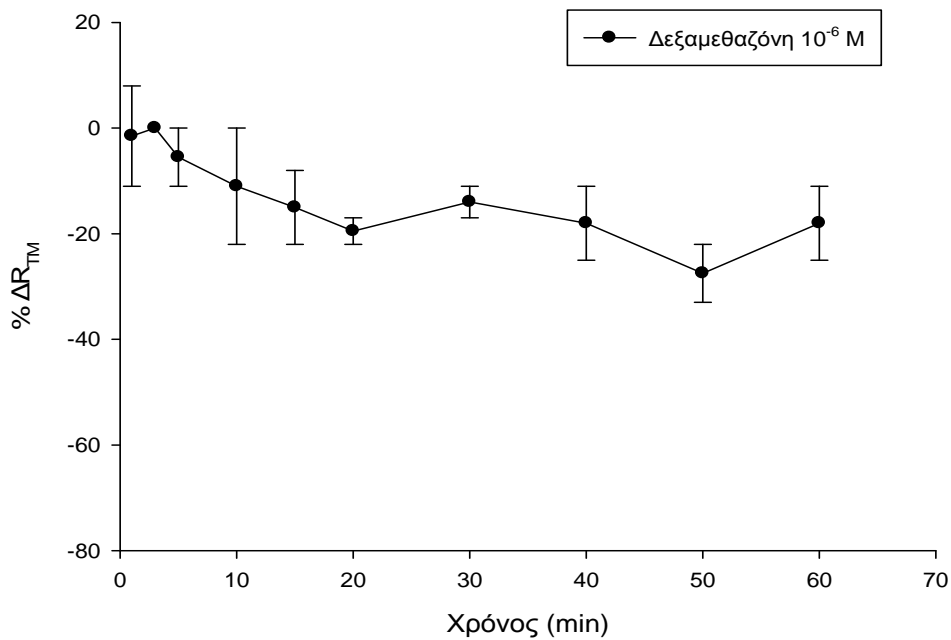


**Διάγραμμα 45.** Μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $R_{TM}$  των μεσοθηλιακών κυττάρων σε διάφορες μέρες μετά την τοποθέτησή τους στα φίλτρα πολυεστέρα μέχρι τον κορεσμό. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 6 πειραμάτων ( $N=6$ ).

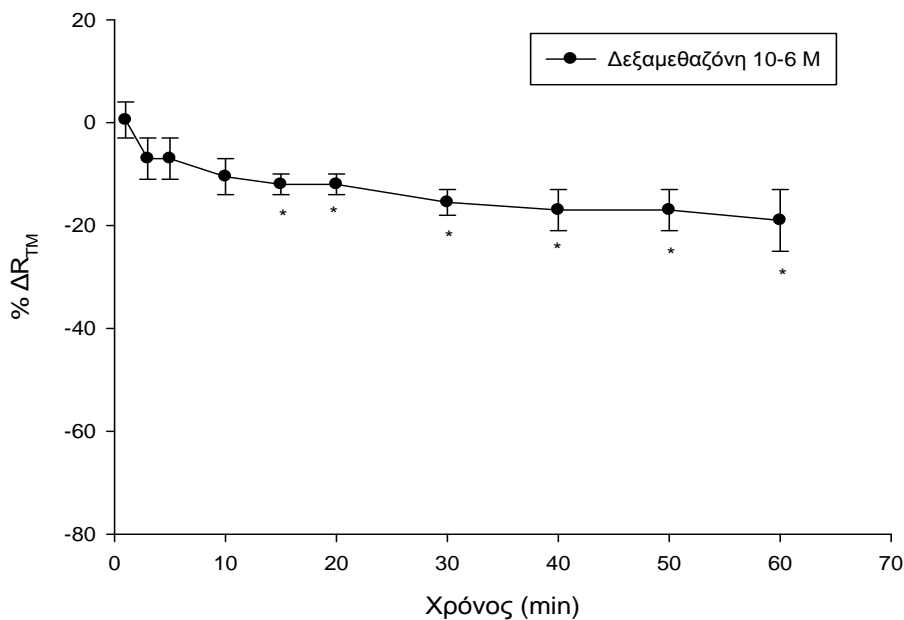
### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης

Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 46).

Στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι όταν η δεξαμεθαζόνη προστέθηκε σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό όπου  $\% \Delta R_{TM} = -12\% \pm 2\%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 47).



**Διάγραμμα 46.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων (N=2).

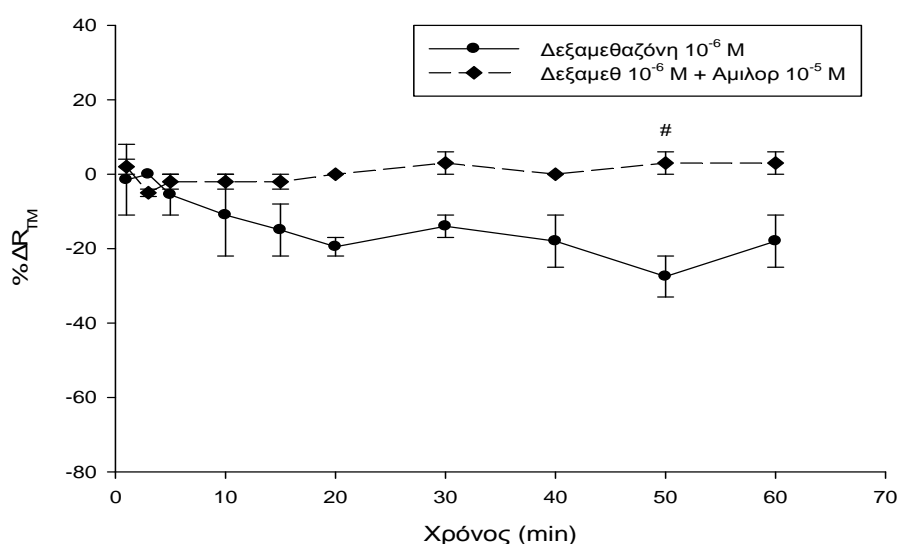


**Διάγραμμα 47.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων (N=2). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

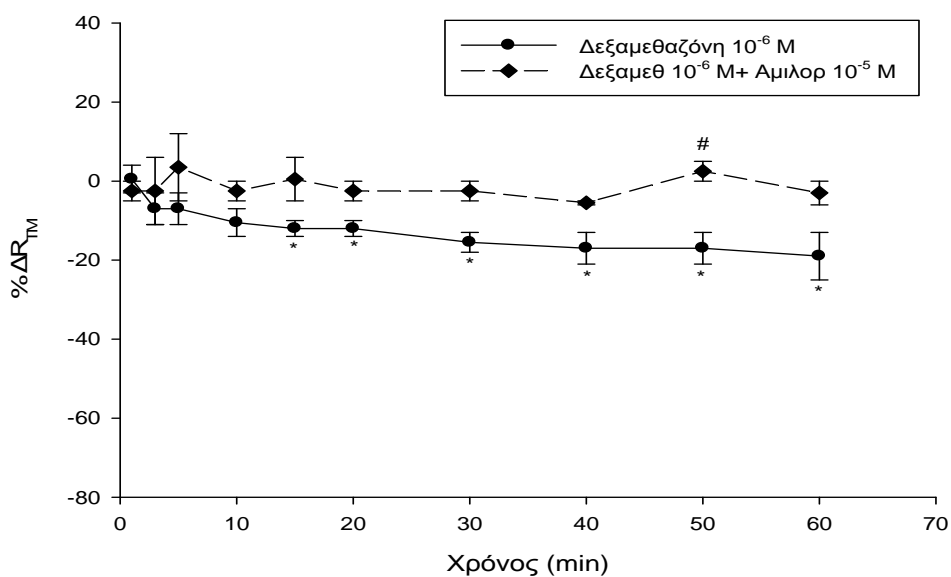
## Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την αμιλορίδη

Ο συνδυασμός αμιλορίδης ( $10^{-5}$  M) και δεξαμεθαζόνης ( $10^{-6}$  M) στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική στο 50<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 3 \% \pm 3 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -27,5 \% \pm 5,5 \%$  (Διάγραμμα 48).

Στο διάγραμμα 49 φαίνεται ότι όταν η αμιλορίδη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική στο 50<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 2,5 \% \pm 2,5 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = -17 \% \pm 4 \%$ .



**Διάγραμμα 48.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων ( $N=2$ ).  $^{\#}P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

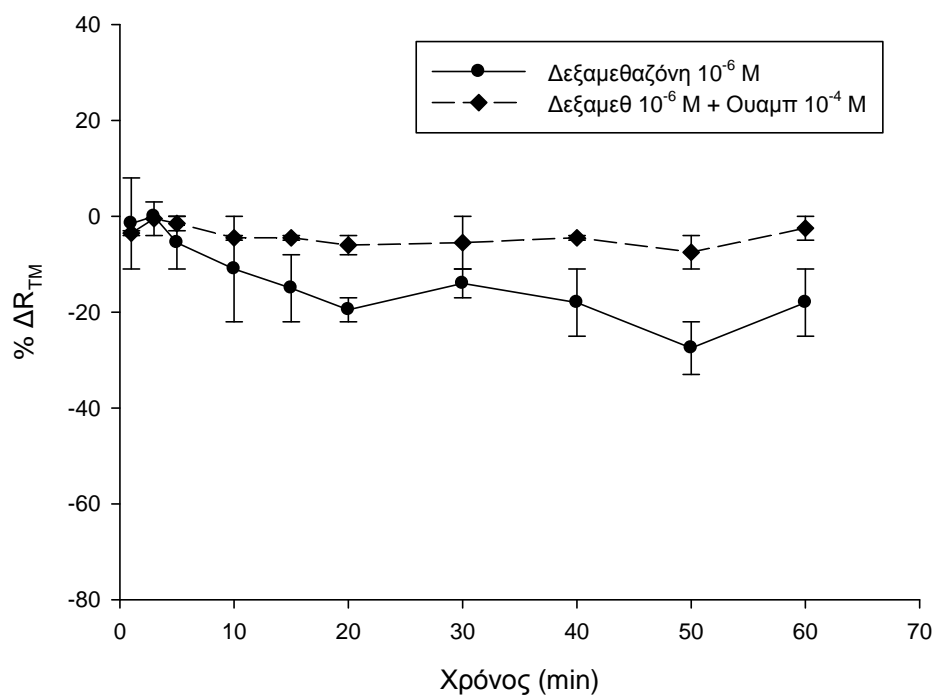


**Διάγραμμα 49.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και αμιλορίδης  $10^{-5}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων ( $N=2$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφορά, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

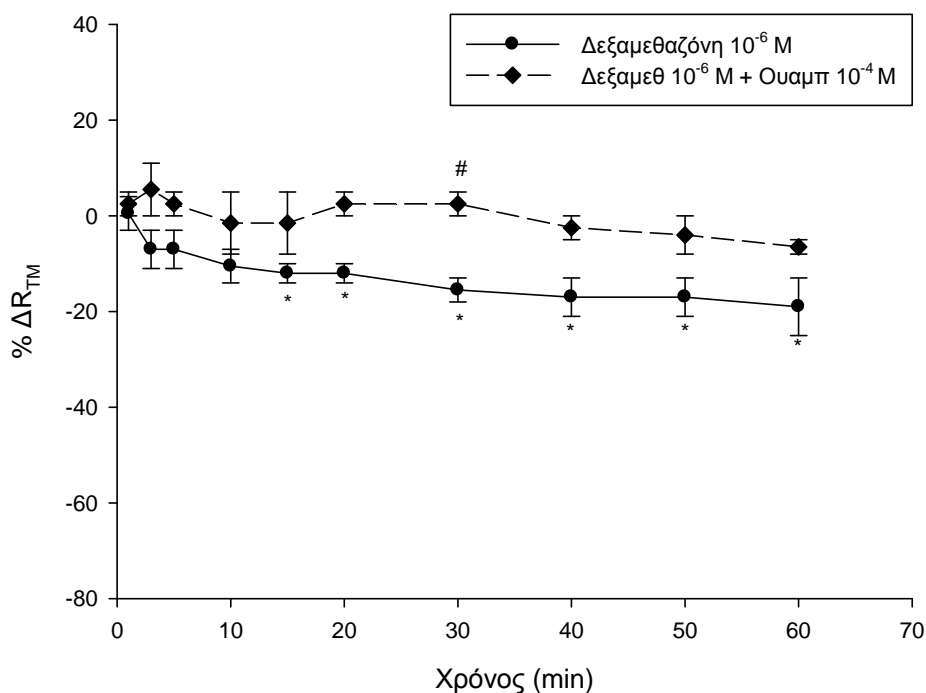
### Αποτελέσματα δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την ουαμπαΐνη

Η προσθήκη ουαμπαΐνης ( $10^{-4}$  M) και δεξαμεθαζόνης ( $10^{-6}$  M) στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων προκάλεσε αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης, όχι όμως στατιστικώς σημαντική (Διάγραμμα 50).

Στο διάγραμμα 51 φαίνεται ότι όταν η ουαμπαΐνη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική στο 30<sup>ο</sup> λεπτό, όπου η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  ήταν %  $\Delta R_{TM} = 2,5 \% \pm 2,5 \%$  σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη μόνη της που ήταν %  $\Delta R_{TM} = -15,5 \% \pm 2,5 \%$ .



**Διάγραμμα 50.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαμπαίνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων ( $N=2$ ).



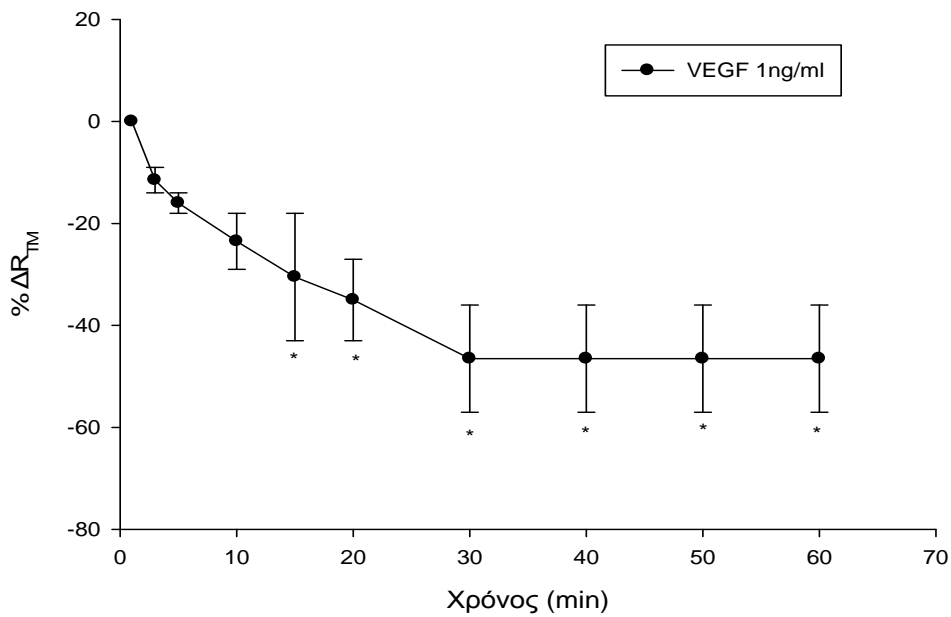
**Διάγραμμα 51.** Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης  $10^{-6}$  M και ουαπαΐνης  $10^{-4}$  M μαζί με δεξαμεθαζόνη  $10^{-6}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων ( $N=2$ ). \* $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφορά, # $P<0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα δεξαμεθαζόνης.

## Αποτελέσματα VEGF

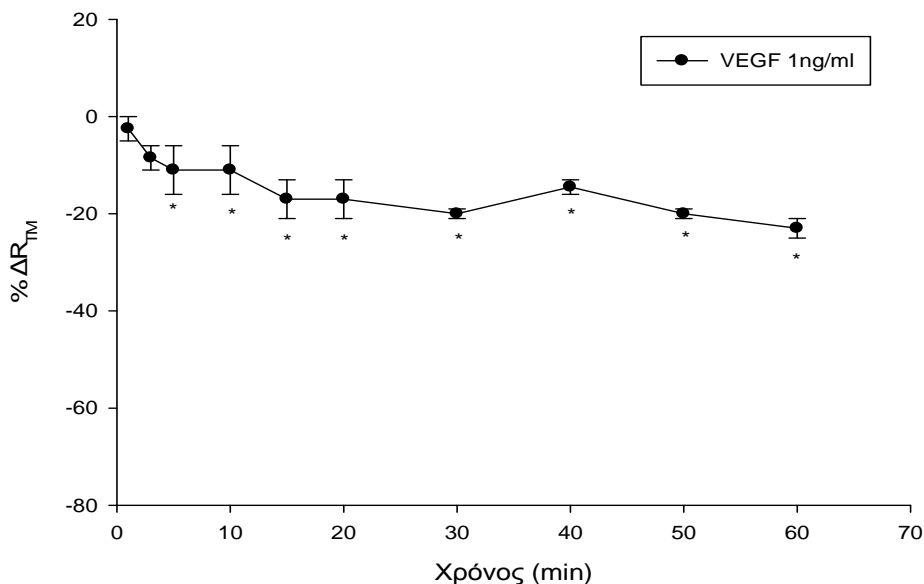
Όταν ο VEGF προστέθηκε σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 15<sup>ο</sup> λεπτό όπου %  $\Delta R_{TM} = -30,5 \% \pm 12,5 \%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 52).

Ομοίως, στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι όταν ο VEGF προστέθηκε σε συγκέντρωση 1ng/ml προκάλεσε σταδιακή μείωση της  $R_{TM}$ , η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5<sup>ο</sup> λεπτό όπου %  $\Delta R_{TM} = -11 \% \pm 5 \%$  και συνεχίστηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 53).





**Διάγραμμα 52.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων (N=2). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



**Διάγραμμα 53.** Ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %  $\Delta R_{TM}$  στη βασεοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1 ng/ml. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. 2 πειραμάτων (N=2). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη είχε μία σημαντική άμεση δράση στον τοιχωματικό και στον σπλαχνικό υπεζωκότα. Συγκεκριμένα, η χορήγηση δεξαμεθαζόνης οδήγησε σε μία σημαντική και ταχεία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ). Η μείωση αυτή ήταν προοδευτική και διαρκούσε για όλη τη διάρκεια του πειράματος και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα και ήταν δόσοεξαρτώμενη. Η μίφεπριστόνη, ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ανέστειλε μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης και στις δύο πλευρές του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης από τη σπιρολακτόνη που είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών και στις δύο πλευρές του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ στο σπλαχνικό υπεζωκότα μόνο μερική αναστολή. Η σπιρολακτόνη μόνη της προκάλεσε μία ταχεία μείωση της  $R_{TM}$  και στις δύο πλευρές στον τοιχωματικό και στο σπλαχνικό υπεζωκότα μικρότερη όμως σε μέγεθος από εκείνη της δεξαμεθαζόνης.

Ο ΕΙΡΑ, αύξησε παροδικά την  $R_{TM}$  όταν προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Όταν ο ΕΙΡΑ προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη επίδραση της δεξαμεθαζόνης και επιπλέον υπήρξε μία πλήρης αναστροφή της δράσης της. Αντιθέτως στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα καθώς και στις δύο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα την ανέστειλε μερικώς.

Η αμιλορίδη ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα και μερικώς στη βασεοπλευρική επιφάνεια και των δύο πετάλων του υπεζωκότα.

Τέλος η ουαμπαϊνή ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης σε κάθε επιφάνεια του υπεζωκότα εκτός από την βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα όπου παρατηρήθηκε μερική αναστολή.

Από τα αποτελέσματά μας είναι φανερό ότι η δεξαμεθαζόνη μείωσε την  $R_{TM}$  και επομένως αύξησε τη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες *in vitro* μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι η δεξαμεθαζόνη μείωσε την αντίσταση εντερικού επιθηλίου κουνελιού [195] και

αρουραίου [196]. Επίσης έχει αναφερθεί μείωση της διαεπιθηλιακής αντίστασης έπειτα από προσθήκη κορτικοστεροειδών στην κορυφαία επιφάνεια του μελάγχρουν επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς χιτώνα χοίρου και βοοειδούς [197]. Η δεξαμεθαζόνη επίσης μείωσε την διαεπιθηλιακή αντίσταση καλλιεργούμενου επιθηλίου σπερματικού πόρου χοίρου [198].

Η δράση της δεξαμεθαζόνης ήταν άμεση και η μείωση στην  $R_{TM}$  ήταν εμφανής μέσα σε 3 ή 5 λεπτά. Αυτό υποδεικνύει ένα μη γενομικό τρόπο δράσης της δεξαμεθαζόνης στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα. Την τελευταία δεκαετία τα γλυκοκορτικοειδή και άλλες στεροειδείς ορμόνες έχει αναφερθεί ότι προκαλούν άμεσες επιδράσεις (δευτερόλεπτα έως λεπτά) σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταφορά ιόντων. Οι άμεσες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών έχουν περιγραφεί σε διάφορους ιστούς όπως σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα [91], σε κύτταρα του ενδομητρίου [95], σε λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα [199, 200] και σε νεφρικά κύτταρα [201]. Αυτές οι γρήγορες δράσεις δεν συμβαδίζουν με το κλασσικό γενομικό μονοπάτι για τη δράση των στεροειδών ορμονών δηλαδή τη δράση των στεροειδών ορμονών μέσω αλλαγών στην μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων, που προκαλούνται από αλληλεπιδράσεις του ενεργοποιημένου συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με το DNA, παράγοντες μεταγραφής ή συνενεργοποιητές/ συγκαταστολείς [88].

Οι μηχανισμοί των άμεσων μη γενομικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών έχουν ερευνηθεί λιγότερο σε σχέση με τα άλλα στεροειδή και αποτελούν ένα θέμα τρέχουσας έρευνας.

Ο τρόπος δράσης της δεξαμεθαζόνης στα κύτταρα αυτά μπορεί να ερμηνευθεί μέσω πέντε πιθανών μηχανισμών:

- α. Τους γνωστούς κλασσικούς ενδοκυττάριους υποδοχείς.
- β. Τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς.
- γ. Τους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών, όπως είναι ο υποδοχέας του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.
- δ. Άμεσες επιδράσεις στην κυτταρική μεμβράνη, μεταβάλλοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες της. Πρόκειται για τη μη εξειδικευμένη άμεση δράση που συμβαίνει στις μεγάλες συγκεντρώσεις. Λόγω της μεγάλης λιποφιλίας τους, οι στεροειδείς ορμόνες μεταβάλλουν τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, τη διάταξη των πρωτεϊνών και την μεταφορά ιόντων, επηρεάζοντας έτσι τη διαπερατότητα του υπεζωκότα.

ε. Ενεργοποιώντας δεύτερους διαβιβαστές [99, 107, 202, 203].

Εξετάστηκε η πιθανή εμπλοκή των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και των αλατοκορτικοειδών στην άμεση μη γενομική δράση της δεξαμεθαζόνης, καθώς η δεξαμεθαζόνη μπορεί δρώντας ως αγωνιστής να ενεργοποιήσει και τους δύο αυτούς υποδοχείς. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η μιφεπριστόνη ανέστειλε εν μέρει τη δράση της δεξαμεθαζόνης σε όλες τις πλευρές, καθώς ο συνδυασμός μιφεπριστόνης και δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μείωση της  $R_{TM}$ , μικρότερη όμως από εκείνη που προκάλεσε μόνη της η δεξαμεθαζόνη. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τη δεξαμεθαζόνη και αναστέλλονται από τη μιφεπριστόνη. Η μη πλήρης όμως αναστολή του αποτελέσματος της δεξαμεθαζόνης κάνει φανερή την ύπαρξη και άλλων μηχανισμών και υποδηλώνει ότι η δεξαμεθαζόνη μπορεί να εκδηλώσει τη δράση της και χωρίς την μεσολάβηση της διέγερσης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών. Και σε άλλες μελέτες έχει δειχθεί η συμμετοχή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε μη γενομικές δράσεις των στεροειδών, όπως για παράδειγμα σε κύτταρα της υπόφυσης η δεξαμεθαζόνη επάγει μία γρήγορη φωσφορυλίωση και στη συνέχεια εξωτερίκευση της ανεξίνης 1 μέσω ενός μη γενομικού μηχανισμού που εξαρτάται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [204]. Επίσης σε κύτταρα του ενδομητρίου η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε γρήγορες αλλαγές στον πολυμερισμό της ακτίνης και η δράση αυτή αναστάλθηκε πλήρως από τη μιφεπριστόνη, υποδεικνύοντας ότι μεσολαβείτε μέσω της διέγερσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών [95].

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και ο συνδυασμός δεξαμεθαζόνης και σπιρολακτόνης. Σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης παρατηρήθηκε από τη σπιρολακτόνη και στις δύο πλευρές του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ στο σπλαχνικό υπεζωκότα μόνο μερική αναστολή, καθώς ο συνδυασμός σπιρολακτόνης και δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μείωση της  $R_{TM}$ , μικρότερη όμως από εκείνη που προκάλεσε η δεξαμεθαζόνη μόνη της. Επομένως, η δράση της δεξαμεθαζόνης εν μέρει μεσολαβείτε από τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών.

Η σπιρολακτόνη μόνη της παρουσίασε παρόμοια δράση με τη δεξαμεθαζόνη. Προκάλεσε μία μείωση της  $R_{TM}$  και στις δύο πλευρές στον τοιχωματικό και στο σπλαχνικό υπεζωκότα η οποία ήταν άμεση, είχε την ίδια διάρκεια αλλά ήταν μικρότερη σε μέγεθος από εκείνη της δεξαμεθαζόνης. Η σπιρολακτόνη συντέθηκε για

να μπλοκάρει την αλδοστερόνη, μία ενδογενή στεροειδή ορμόνη που επηρεάζει την ομοιόσταση των ιόντων νατρίου, καλίου και υδρογόνου [114]. Εδώ και 30 χρόνια χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία καταστάσεων κατακράτησης νατρίου και για την αντιμετώπιση της υπέρτασης [115]. Έχει βρεθεί ότι η σπιρολακτόνη δρα ως αγωνιστής στον υποδοχέα της προγεστερόνης και προστατεύει ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της φλέβας του ομφάλιου λώρου από απόπτωση αναστέλλοντας τη δράση της κασπάσης 3 [113]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η σπιρολακτόνη εμφανίζει μερική αγωνιστική δράση σε πολλές κυτταρικές σειρές όπως σε κυτταρική σειρά από ανθρώπινο ηπάτωμα και σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα. Αυτή η δράση εξαρτάται από την παρουσία των υποδοχέων των αλατοκορτικοειδών και παρατηρείται και για άλλους ανταγωνιστές του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών. Η μερική αγωνιστική δράση της σπιρολακτόνης, η οποία εξαρτάται από το είδος του κυττάρου, οδηγεί σε μη πλήρη αναστολή της δράσης της αλδοστερόνης σε αυτά τα κύτταρα [117]. Αυτό υποδεικνύει ότι η σπιρολακτόνη εμφανίζει μερική ανταγωνιστική και αγωνιστική δράση στον ίδιο ιστό. Ακόμη, η σπιρολακτόνη εμφάνισε ταχεία θετική ινοτροπική δράση στο μυοκάρδιο αρουραίου παρόμοια με εκείνη της αλδοστερόνης [118], πιθανώς αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ ) [205]. Επιπλέον, η σπιρολακτόνη έχει δειχθεί ότι επάγει τη συστολή ανθρώπινων αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων [206]. Σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου έχει αναφερθεί μερική αγωνιστική δράση της σπιρολακτόνης, καθώς η σπιρολακτόνη προκάλεσε διέγερση του συμμεταφορέα Na - K - 2Cl [119]. Τέλος, η σπιρολακτόνη μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από φαινυλεφρίνη αγγειακή συστολή [207].

Προκειμένου να μελετηθεί ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιήθηκε ο EIPA, ως ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων  $Na^+$  -  $H^+$  και μελετήθηκε η επίδραση που έχει μόνος και σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Παρόλο που η μεταφορά ιόντων που μεσολαβείτε από τον αντιμεταφορέα ιόντων  $Na^+$  -  $H^+$  είναι ηλεκτρικά ουδέτερη, θα περίμενε κανείς μία παροδική διαταραχή της ιοντικής διαπερατότητας του μεσοθηλίου, εξαιτίας του γεγονότος ότι αυτός ο αντιμεταφορέας είναι μέρος του συστήματος των ιοντικών μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης του μεσοθηλίου που ρυθμίζει τη μεταφορά ιόντων στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Πράγματι όταν ο EIPA προστέθηκε μόνος του στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα προκάλεσε μία σημαντική, βραχυπρόθεσμη αύξηση της  $R_{TM}$

που διήρκησε για 3 λεπτά επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη του αντιμεταφορέα. Μελέτες σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα έδειξαν την ύπαρξη του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  ως ένας από τους ρυθμιστές του ενδοκυτταρικού pH [208]. Ακόμη *in vivo* μελέτες σε κουνέλια πρότειναν ότι ο αντιμεταφορέας ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  εντοπίζεται στην κορυφαία επιφάνεια του υπεζωκότα [11].

Όταν ο EIPA προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανέστειλε πλήρως τη επίδραση της δεξαμεθαζόνης και επιπλέον υπήρξε μία πλήρης αναστροφή της δράσης της δεξαμεθαζόνης. Αντιθέτως, ο EIPA ανέστειλε μόνο μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και στις δύο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα. Από τα ευρήματα αυτά προκύπτει ότι η δράση της δεξαμεθαζόνης στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ . Έχει βρεθεί ότι σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μέσου ωτός η δεξαμεθαζόνη αυξάνει την έκφραση της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  [209] και σε νεφρικά κύτταρα διεγείρει την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  και η δράση αυτή εξαρτάται από την πρωτεϊνοσύνθεση [210]. Υπάρχουν όμως και μελέτες που αναφέρουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  μέσω ενός μη γενομικού μηχανισμού. Έχει βρεθεί σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα ότι η δεξαμεθαζόνη διεγείρει την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  μέσω ενός μη γενομικού μηχανισμού που περιλαμβάνει εξαρτώμενη από cAMP ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης PKA και ERK1/2 MAP κινασών [91]. Ακόμη σε νεφρικά επιθήλια η δεξαμεθαζόνη αυξάνει τη δράση της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  αυξάνοντας την εξωκυττάρωση του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  [211] [212]. Επίσης και σε άλλη μελέτη έχει βρεθεί ότι σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα η δεξαμεθαζόνη ενεργοποιεί την αντιμεταφορά ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  όχι μόνο αυξάνοντας τη μεταγραφή του γονιδίου αλλά και φωσφορυλιώνοντας τον αντιμεταφορέα στο κατάλοιπο σερίνης Ser663 (το οποίο είναι συντηρημένο στον αντιμεταφορέα πολλών ειδών οργανισμών) μέσω της επαγόμενης από ορό και γλυκοκορτικοειδή κινάσης 1 (serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1, SGK1). Η φωσφορυλίωση αυτή αυξάνει την εξωκυττάρωση του αντιμεταφορέα και επομένως τη δράση του [213].

Η κατανομή των αντιμεταφορέων ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  στις επιφάνειες του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα ίσως να είναι διαφορετική και είναι πιθανόν περισσότεροι αντιμεταφορείς να υπάρχουν στην κορυφαία επιφάνεια του

τοιχωματικού υπεζωκότα. Επίσης υπάρχουν πολλές ισομορφές του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  [122, 214] και δε γνωρίζουμε ποιες από αυτές επηρεάζει η δεξαμεθαζόνη στον υπεζωκότα. Βρέθηκε ότι τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη δράση του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  και το mRNA της NHE3 ισομορφής στο έντερο κουνελιού ενώ δεν επηρεάζουν το mRNA των NHE1 και NHE2 ισομορφών [215].

Η δράση της δεξαμεθαζόνης αναστάλθηκε πλήρως όταν η αμιλορίδη προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα, ενώ η αναστολή ήταν μερική όταν η αμιλορίδη προστέθηκε στη βασεοπλευρική επιφάνεια και των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η δεξαμεθαζόνη πιθανόν να δρα μέσω ευαίσθητων σε αμιλορίδη διαύλων  $\text{Na}^+$  στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα. Έχει βρεθεί ότι η δεξαμεθαζόνη διεγείρει την ευαίσθητη σε αμιλορίδη καθαρή απορρόφηση  $\text{Na}^+$  σε εντερικό επιθήλιο αρουραίου επάγοντας διαύλους  $\text{Na}^+$  ύστερα από ενεργοποίηση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών [196]. Και σε άλλη μελέτη επίσης στο εντερικό επιθήλιο αρουραίου η δεξαμεθαζόνη διέγειρε την απορρόφηση  $\text{Na}^+$  [216]. Η διέγερση της ευαίσθητης σε αμιλορίδη μεταφοράς  $\text{Na}^+$  από δεξαμεθαζόνη σε κύτταρα ανθρώπινου βρογχικού επιθηλίου γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από το cAMP [217]. Σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα η δεξαμεθαζόνη διεγείρει την ευαίσθητη σε αμιλορίδη μεταφορά  $\text{Na}^+$  αυξάνοντας την έκφραση του mRNA των  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -υπομονάδων του διαύλου  $\text{Na}^+$  (ENaC) και της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης *sgk 1* [218]. Αντιθέτως ενώ η δεξαμεθαζόνη έχει δειχθεί *in vitro* ότι αυξάνει την ευαίσθητη σε αμιλορίδη απορρόφηση  $\text{Na}^+$  σε επιθήλια αεραγωγών, *in vivo* βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει την απορρόφηση  $\text{Na}^+$  κατά μήκος ρινικού και τραχειακού επιθηλίου ποντικού [219].

Η προσθήκη ουαμπαΐνης ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης σε κάθε επιφάνεια του υπεζωκότα εκτός από την βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα όπου παρατηρήθηκε μερική αναστολή. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η δράση της δεξαμεθαζόνης στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση αντλιών  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η δεξαμεθαζόνη αυξάνει τη δράση της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  και την έκφραση του mRNA της  $\beta$ -υπομονάδας της [220]. Σε εντερικό επιθήλιο αρουραίου η δεξαμεθαζόνη δεν επηρέασε την μεγίστη ικανότητα της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  για μεταφορά  $\text{Na}^+$  αλλά αύξησε σημαντικά τη συγγένεια της

αντλίας για ιόντα  $\text{Na}^+$  καθώς και τον αριθμό ιόντων  $\text{Na}^+$  που προσδένονται σε κάθε πλευρά της αντλίας [196]. Επίσης στο ίδιο επιθήλιο βρέθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη αύξησε τη δράση της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ενεργοποιώντας τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών αλλά και τους υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών [221]. Η δεξαμεθαζόνη βρέθηκε ότι αυξάνει τη δράση της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα επάγοντας την μεταφορά της από ενδοκυτταρικές περιοχές προς την πλασματική μεμβράνη (μεταμεταφραστική τροποποίηση)[128].

Η μείωση της  $R_{TM}$  από τη δεξαμεθαζόνη και επομένως η αύξηση της διαπερατότητας είναι πιθανόν να έχει κλινική σημασία. Η χορήγηση κορτικοστεροειδών σε συγκεκριμένες συνθήκες που συνοδεύονται από εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές οδηγεί σε επιτάχυνση της λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής [80]. Επειδή οι αλλαγές στην  $R_{TM}$  αντανακλούν και το πέρασμα ιόντων και επομένως νερού είναι πιθανό ότι η αύξηση στην διαπερατότητα που επάγεται από τη δεξαμεθαζόνη οδηγεί σε μειωμένη συσσώρευση υγρού και επομένως διευκολύνει τη μεταφορά υγρού έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα και άρα διευκολύνει τη λύση των υπεζωκοτικών συλλογών. Παρόλο που η λεμφαγγειακή παροχέτευση συνεισφέρει κυρίως στην απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού στις υπεζωκοτικές συλλογές [66, 70, 222, 223], φαίνεται ότι η δεξαμεθαζόνη διεγείρει ένα άλλο σημαντικό μηχανισμό, την ανταλλαγή υγρού και ηλεκτρολυτών.

Τέλος, η δεξαμεθαζόνη επιδρά και στην παρακυττάρια οδό αναδιοργανώνοντας τους στεγανούς συνδέσμους (tight junctions) και τους συνδέσμους προσκόλλησης (adherens junctions) στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, οδηγώντας σε αυξημένη προσκόλληση μεταξύ των γειτονικών κυττάρων, μειώνοντας έτσι την παρακυττάρια διαπερατότητα. Συγκεκριμένα σε κύτταρα από ανθρώπινο βρογχικό επιθήλιο έχει βρεθεί ότι η δεξαμεθαζόνη αποκατέστησε τα επίπεδα των πρωτεϊνών των συνδέσμων προσκόλλησης, της E-καντερίνης και της β-κατενίνης, των οποίων η έκφραση είχε μειωθεί από τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF- $\alpha$  [224]. Σε επιθηλιακά κύτταρα του αδένου των θηλαστικών μία κυτοκίνη που προκαλεί φλεγμονή, ο αυξητικός παράγοντας της μεταμόρφωσης TGF- $\beta$  χαλαρεί την ακεραιότητα και τη λειτουργία των στεγανών συνδέσμων αλλάζοντας την κατανομή των ZO-1 πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσμων. Η δεξαμεθαζόνη ανταγωνίζεται αυτή τη δράση μέσω του ίδιου μονοπατιού, επάγοντας τη στρατολόγηση των ZO-1 πρωτεϊνών στην κυτταρική περιφέρεια, στις περιοχές επαφής των γειτονικών κυττάρων, διεγείροντας έτσι το σχηματισμό στεγανών



συνδέσμων [225]. Επίσης σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου των θηλαστικών η δεξαμεθαζόνη μείωσε τα επίπεδα της RhoA, μιας πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των μικρών GTPασών. Αυτή η διαδικασία απαιτείται για την αναδιοργάνωση των στεγανών συνδέσμων και των συνδέσμων προσκόλλησης από τη δεξαμεθαζόνη. Στη συνέχεια το «σφράγισμα» της επιθηλιακής μεμβράνης μεσολαβεί από ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει την Ras και την PI3κινάση [226]. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες που προαναφέρθηκαν (όπως ο TGF-β) είναι παρών σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές και επηρεάζουν τη συνοχή του μεσοθηλιακού φραγμού καθιστώντας τον περισσότερο διαπερατό [227], διαταράσσοντας τους στεγανούς συνδέσμους και τους συνδέσμους προσκόλλησης της κορυφαίας επιφάνειας. Είναι πιθανόν λοιπόν η δεξαμεθαζόνη να ανταγωνίζεται αυτή τη δράση στον υπεζωκότα, επάγοντας το «σφράγισμα» της μεσοθηλιακής μεμβράνης ύστερα από ζημιά που οφείλεται σε φλεγμονώδεις παράγοντες, αναδιοργανώνοντας τους στεγανούς συνδέσμους και τους συνδέσμους προσκόλλησης. Αυτή όμως η δράση της δεξαμεθαζόνης στους στεγανούς συνδέσμους και τους συνδέσμους προσκόλλησης θα οδηγούσε σε αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή σε αύξηση της  $R_{TM}$  και επομένως μείωση της διαπερατότητας, άρα θα ερχόταν σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Όμως στα πειράματα αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τμήματα υγιούς υπεζωκότα χωρίς σημάδια φλεγμονής, τα οποία είχαν απομονωθεί από υγιή πρόβατα, καθιστώντας τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην αποκατάσταση της ακεραιότητας του μεσοθηλιακού φραγμού λιγότερο πιθανή.

Αντιθέτως, αυτές οι δύο ξεχωριστές δράσεις της δεξαμεθαζόνης, η διέγερση της ανταλλαγής υγρού και ηλεκτρολυτών καθώς και η αποκατάσταση της ακεραιότητας του μεσοθηλιακού φραγμού ίσως δίνουν μία εξήγηση στην επιτάχυνση της λύσης των εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών ύστερα από θεραπεία με κορτικοστεροειδή.

Ο VEGF με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έχει μια σημαντική επίδραση στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα. Προκάλεσε μείωση της  $R_{TM}$  αμέσως μόλις προστέθηκε. Η μείωση αυτή ήταν προοδευτική και διαρκούσε για όλη τη διάρκεια του πειράματος και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα. Ο SU5416, ο αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Ομοίως ο SU1498 που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF σε όλες τις επιφάνειες και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.

Από τα αποτελέσματά είναι φανερό ότι ο VEGF οδήγησε σε μία ταχεία μείωση της  $R_{TM}$  και επομένως αύξηση της διαπερατότητας και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα. Ανασυνδυασμένο VEGF βρέθηκε ότι μείωσε την αντίσταση σε μονοστοιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων [151]. Επίσης σε κύτταρα μελάγχρουν επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς χιτώνα ο VEGF μείωσε την αντίσταση [228].

Στο πλάσμα ο VEGF καταγράφηκε σε επίπεδα pg/ml ( $22 \pm 10$  pg/ml) [229] καθώς επίσης και σε υπεζωκοτικές συλλογές τα επίπεδα του είναι σε pg/ml (μόνο σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές όπου συναντάμε τα υψηλότερα επίπεδα φθάνει πάνω από 1000 pg/ml). Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση 1ng/ml VEGF επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τους αναστολείς.

Η πτώση στην  $R_{TM}$  εμφανίστηκε στην παρούσα μελέτη σε όλες τις συγκεντρώσεις VEGF που χρησιμοποιήθηκαν από 1ng/ml έως 20ng/ml. Η δράση του VEGF ήταν δόσοεξαρτώμενη, όμως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10 και 20ng/ml) φαινόταν να μειώνεται η δράση του. Έχει βρεθεί σε κάποια μελέτη ότι ο VEGF μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές επιδράσεις στη διαπερατότητα του πνευμονικού ενδοθηλίου ανάλογα με τη συγκέντρωσή του. Έτσι σε συγκέντρωση 10 ng/ml ο VEGF αύξησε την αντίσταση του ενδοθηλίου, ενώ σε συγκέντρωση 100 ng/ml μείωσε την αντίσταση του ενδοθηλίου, σχηματίστηκαν κενά στην παρακυττάρια οδό και χαλάρωσαν οι σύνδεσμοι προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρατηρήθηκε δηλαδή μία χαλάρωση του ενδοθηλιακού φραγμού σε αυτή τη συγκέντρωση μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης [230].

Ο VEGF είναι γνωστό ότι επάγει την αγγειακή διαπερατότητα για αυτό αρχικά ονομάστηκε ως παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας (VPF, Vascular Permeability Factor) [144], άρα είναι πιθανόν να αυξάνει την ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού που διηθείται από τα τριχοειδή και έτσι να συσσωρεύεται υπεζωκοτικό υγρό στην υπεζωκοτική κοιλότητα και να σχηματίζεται υπεζωκοτική συλλογή [170, 175]. Δεν είναι όμως γνωστά τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων ο VEGF επάγει την αγγειακή διαπερατότητα [136, 160]. Ο σχηματισμός «παραθύρων», εξειδικευμένων περιοχών στην πλασματική μεμβράνη που είναι ιδιαίτερα διαπερατές σε μικρά μόρια, ίσως είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο ο VEGF επάγει την αγγειακή διαπερατότητα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολαβούν στην επαγόμενη από τον VEGF δημιουργία «παραθύρων» δεν είναι γνωστά, πιστεύεται όμως ότι απαιτούνται αλλαγές στην σύσταση εξωκυτταρικής

μήτρας και μικρές εγκοιλώσεις στην πλασματική μεμβράνη [161-163]. Έχει υποστηριχθεί ότι ο NO και η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>) διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην επαγόμενη από το VEGF αγγειακή διαπερατότητα [164]. Άλλες μελέτες εμπλέκουν την PLC-γ φωσφορυλίωση, την κινητοποίηση ενδοκυτταρικού Ca<sup>+2</sup> και ενεργοποίηση της PKC [165]. Φωσφορυλίωση των συστατικών των διακυτταρικών συνδέσμων προσκόλλησης και των στεγανών συνδέσμων από τον VEGF οδηγεί σε χαλάρωση των συνδέσμων των ενδοθηλιακών κυττάρων και σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα [166]. Ο VEGF αύξησε τη φωσφορυλίωση συστατικών των συνδέσμων προσκόλλησης, της VE-καντερίνης [167] και της β-κατενίνης [168]. Επίσης ο VEGF διέγειρε την φωσφορυλίωση τυροσίνης των πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσμων οκκλουδίνη και ZO-1 [169].

Η ανακάλυψη του VEGF και ο ρόλος του στο σχηματισμό υπεζωκοτικών συλλογών έχει προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η παθοφυσιολογία των υπεζωκοτικών συλλογών. Οι υποδοχείς του VEGF εκφράζονται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν βρεθεί όμως και σε μεσοθηλιακά κύτταρα υγιούς και ασθενούς υπεζωκότα, επιβεβαιώνοντας ότι ο VEGF διαδραματίζει ένα σημαντικό λειτουργικό ρόλο στον υπεζωκότα [170]. Αν και όλοι σχεδόν οι κυτταρικοί τύποι εκφράζουν τον VEGF, η κύρια πηγή του στα εξιδρώματα είναι η τοπική παραγωγή από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα παρά η διάχυση από τη συστηματική κυκλοφορία [135]. Σε αυτό επίσης συνηγορούν ευρήματα ότι ο μέσος όρος των επιπέδων του VEGF σε εξιδρώματα ήταν σημαντικά υψηλότερος από τον μέσο όρο των επιπέδων του VEGF στον ορό [171].

Ο VEGF είναι παρών σε σημαντικές ποσότητες σε υπεζωκοτικές συλλογές διαφόρων αιτιολογιών. Τα επίπεδα του είναι υψηλότερα σε εξιδρώματα παρά σε διυρώματα [150, 175, 176]. Επίσης βρέθηκε ότι τα επίπεδα του VEGF είναι υψηλότερα σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές από διάφορους καρκίνους (συμπεριλαμβανομένου καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και μεσοθηλίωμα [150]) παρά σε καλοήθεις [170, 175-178].

Επίσης βρέθηκε ότι ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*), ένα κοινό μικρόβιο που προκαλεί εμπύημα διεγείρει την παραγωγή του VEGF από υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα και αυξάνει τη διαπερατότητα του μεσοθηλίου, οδηγώντας σε εξίδρωμα με αυξημένη πρωτεΐνη [151]. Είναι πιθανόν λοιπόν μέσα από τα κενά που δημιουργούνται στο μεσοθηλιακό φραγμό να περνάει το υπεζωκοτικό υγρό αλλά και πρωτεΐνες και να σχηματίζεται εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή.

Αυτό ίσως εξηγεί γιατί τα επίπεδα του VEGF είναι υψηλότερα σε εξιδρώματα [150, 175, 176] όπου και η ποσότητα των πρωτεϊνών είναι επίσης αυξημένη.

Προκειμένου να εξεταστεί μέσω ποιών υποδοχέων δρα ο VEGF στον υπεζωκότα, χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των υποδοχέων του. Ο SU1498 που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 (KDR/ Flk-1) ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF σε όλες τις επιφάνειες και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα, άρα προκύπτει ότι η δράση του VEGF στη διαπερατότητα του υπεζωκότα εκδηλώνεται με τη μεσολάβηση του VEGFR2. Ο VEGFR2 (KDR/ Flk-1) ενεργοποιείται από την πρόσδεση του VEGF, διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης τυροσίνης. Ακολουθεί φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης διαφόρων πρωτεϊνών όπως της φωσφολιπάσης C - γ (PLC - γ) και της φωσφατιδυλοϊνοσιτολικής-3 κινάσης (PI3K). Ακόμη ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό του VEGFR2 υποδοχέα είναι ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι Raf - Mek - Erk μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και όχι της Ras [140, 160]. Ο VEGFR2 (KDR/ Flk-1) είναι ο βασικός υποδοχέας μέσω του οποίου ο VEGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγει την αγγειακή διαπερατότητα [146].

Επομένως εκτός ότι ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου είναι πιθανόν να χαλαρώνει τον μεσοθηλιακό φραγμό (τους συνδέσμους προσκόλλησης των μεσοθηλιακών κυττάρων) και έτσι να συσσωρεύεται υπεζωκοτικό υγρό και να σχηματίζεται υπεζωκοτική συλλογή.

Τα πειράματα σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα, από πρωτογενή καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκαν συγκριτικά με εκείνα σε τμήματα τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Μελετήθηκε λοιπόν η επίδραση της δεξαμεθαζόνης και του VEGF αποκλειστικά σε μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα καθώς στην ακέραια μεμβράνη υπεζωκότα υπάρχει επιπλέον και μία στιβάδα συνδετικού ιστού που είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία. Τα αποτελέσματα από τα μεσοθηλιακά κύτταρα ήταν παρόμοια με εκείνα της μεμβράνης υπεζωκότα. Η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε προοδευτική μείωση της  $R_{TM}$  που διαρκούσε για όλη τη διάρκεια του πειράματος στην κορυφαία και στη βασηοπλευρική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Η αμιλορίδη και η ουαμπαΐνη ανέστειλαν πλήρως αυτή τη δράση της δεξαμεθαζόνης. Ο VEGF προκάλεσε μείωση της  $R_{TM}$ . Η μείωση αυτή ήταν προοδευτική και διαρκούσε για όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο πλευρές των μεσοθηλιακών κυττάρων. Επομένως ότι αναφέρθηκε πιο πάνω για τη

δράση αυτών των ουσιών στον υπεζωκότα θα μπορούσε να αναφερθεί και στην περίπτωση των κυττάρων.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε μία σημαντική και ταχύτατη μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) και επομένως αύξηση στη διαπερατότητα στην κορυφαία και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.
2. Ο τρόπος με τον οποίο έδρασε η δεξαμεθαζόνη είχε τα χαρακτηριστικά της άμεσης, μη γενομικής δράσης.
3. Η δεξαμεθαζόνη εν μέρει δρα μέσω των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και στις δύο επιφάνειες και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.
4. Η δράση της δεξαμεθαζόνης εν μέρει μεσολαβείτε από τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών και στις δύο επιφάνειες και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.
5. Η σπιρολακτόνη εμφάνισε και η ίδια άμεση αγωνιστική δράση στον υπεζωκότα και μείωσε την αντίσταση του.
6. Η δράση της δεξαμεθαζόνης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της αντιμεταφοράς ιόντων  $Na^+ - H^+$ , καθώς ο EIPA ανέστειλε πλήρως τη δράση της όταν προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα και μερικώς στην βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και στις δύο πλευρές του σπλαχνικού υπεζωκότα.
7. Η δράση της δεξαμεθαζόνης επιτυγχάνεται μέσω ευαίσθητων σε αμιλορίδη διαύλων  $Na^+$ , καθώς η προσθήκη αμιλορίδης ανέστειλε πλήρως τη δράση της στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα και μερικώς στη βασεοπλευρική επιφάνεια και των δύο πετάλων του υπεζωκότα.
8. Η δεξαμεθαζόνη δρα μέσω της ενεργοποίησης αντλιών  $Na^+ - K^+$ , καθώς η ουαμπαΐνη ανέστειλε πλήρως τη δράση της σε κάθε επιφάνεια του υπεζωκότα εκτός από την βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα όπου παρατηρήθηκε μερική αναστολή.

9. Η αύξηση στη διαπερατότητα του υπεζωκότα από τη δεξαμεθαζόνη είναι πιθανόν να διευκολύνει τη μεταφορά υγρού έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα και άρα τη λύση υπεζωκοτικών συλλογών.
10. Ο VEGF προκάλεσε μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) και επομένως αύξηση στη διαπερατότητα στην κορυφαία και στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα.
11. Η δράση του VEGF στη διαπερατότητα του υπεζωκότα εκδηλώνεται με τη μεσολάβηση του VEGFR2, καθώς ο SU1498 που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 ανέστειλε πλήρως τη δράση του VEGF σε όλες τις επιφάνειες και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα.
12. Ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα του υπεζωκότα και είναι πιθανόν μέσα από τα κενά που δημιουργούνται στο μεσοθηλιακό φραγμό να περνάει το υπεζωκοτικό υγρό αλλά και πρωτεΐνες και να σχηματίζεται εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή.
13. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε διάφορες ασθένειες και σύνδρομα οι ασθενείς συχνά αναπτύσσουν υπεζωκοτική συλλογή, που είναι η συσσώρευση υπεζωκοτικού υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Σε ένα αριθμό τέτοιων ασθενειών και συνδρόμων και πιο συγκεκριμένα στη φυματίωση, το μετεμφραγματικό σύνδρομο, το συστηματικό ερυθματώδη λύκο, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τη σαρκοείδωση, η χορήγηση κορτικοστεροειδών οδηγεί σε επιτάχυνση της λύσης της υπεζωκοτικής συλλογής, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός. Επίσης τα επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) είναι υψηλότερα σε εξιδρώματα και σε κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές παρά σε διδρώματα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των κορτικοστεροειδών και του VEGF στη διαπερατότητα του υπεζωκότα.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αντλίες τύπου Ussing, οι οποίες περιείχαν διάλυμα Krebs-Ringer σε θερμοκρασία 37° C και οξυγονώνονταν συνεχώς με 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>. Με την εν λόγω πειραματική διάταξη μετριούνταν η διαμεσοθηλιακή αντίσταση (R<sub>TM</sub>) του υπεζωκότα μετά την προσθήκη διαφόρων ουσιών. Μελετήθηκε η επίδραση της δεξαμεθαζόνης (10<sup>-9</sup> M έως 10<sup>-6</sup> M) και χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η μιφεπριστόνη (10<sup>-5</sup> M) και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, η σπιρολακτόνη (10<sup>-5</sup> M). Προκειμένου να μελετηθούν κάποιοι από τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιήθηκε ο EIPA (10<sup>-4</sup> M), που είναι ειδικός αναστολέας της αντιμεταφοράς ιόντων Na<sup>+</sup>- H<sup>+</sup>, η αμιλορίδη (10<sup>-5</sup> M) που είναι αναστολέας των διαύλων ιόντων Na<sup>+</sup> και η ουαμπαΐνη (10<sup>-4</sup> M) που είναι αναστολέας της αντλίας Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>. Ακόμη εξετάστηκε η επίδραση του VEGF (1ng/ml έως 20ng/ml), του SU5416 (10<sup>-6</sup> M), που είναι αναστολέας του VEGFR1 και του VEGFR2 υποδοχέα και του SU1498 (10<sup>-6</sup> M) που είναι εκλεκτικός αναστολέας του VEGFR2 υποδοχέα.

Η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε μία σημαντική και σταδιακή μείωση της R<sub>TM</sub> μέσα σε 3 ή 5 λεπτά στον τοιχωματικό και το σπλαχνικό υπεζωκότα. Η μιφεπριστόνη και η σπιρολακτόνη ανέστειλαν μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης, ενώ η σπιρολακτόνη εμφάνισε και η ίδια αγωνιστική δράση στον υπεζωκότα και μείωσε την



αντίσταση του. Η δράση της δεξαμεθαζόνης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της αντιμεταφοράς ιόντων  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ , των διαύλων  $\text{Na}^+$  και των αντλιών  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  καθώς ο EIPA, η αμιλορίδη και η ουαμπαΐνη ανέστειλαν πλήρως ή μερικώς τη δράση της στις δυο επιφάνειες του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα. Ο VEGF προκάλεσε και αυτός μείωση της  $R_{TM}$  η οποία αναστάλθηκε πλήρως από τον SU5416 και τον SU1498. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ανάλογα πειράματα με ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η  $R_{TM}$  και επομένως η διαπερατότητα του υπεζωκότα επηρεάζεται από την επίδραση των κορτικοστεροειδών και του VEGF. Οι αλλαγές αυτές στην αντίσταση του υπεζωκότα είναι πιθανόν να επηρεάζουν την ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

## SUMMARY

Patients affected by various diseases and syndromes often develop pleural effusion, which is the accumulation of excess pleural fluid in the pleural cavity. In a number of such diseases and syndromes and more specifically in tuberculosis, postcardiac injury syndrome, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and sarcoidosis, administration of corticosteroids results in acceleration of the effusion resolution. The mechanism through which administration of corticosteroids results in a faster resolution of pleural effusions is not known. The level of VEGF is consistently higher in exudative pleural effusions and in malignant effusions from various cancers than in transudative pleural effusions. The main purpose of this study was to investigate the effect of corticosteroids and VEGF on the permeability of pleura.

To this end intact specimens of sheep parietal and visceral pleura were used. They were mounted as planar sheets in Ussing-type chambers which contained Krebs-Ringer solution at 37° C and were continuously oxygenated with 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>. Transmesothelial resistance ( $R_{TM}$ ) of pleura was measured after the addition of different substances. It was studied the effect of dexamethasone ( $10^{-9}$  M to  $10^{-6}$  M). The glucocorticoid receptor antagonist mifepristone ( $10^{-5}$  M) and the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone ( $10^{-5}$  M) were used. In order to be studied some of the potential mechanisms of action of dexamethasone, EIPA ( $10^{-4}$  M), a specific inhibitor of the Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchanger, amiloride ( $10^{-5}$  M), that inhibits Na<sup>+</sup> channels and ouabain ( $10^{-4}$  M) that inhibits Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase were used. Furthermore it was studied the effect of VEGF (1ng/ml to 20ng/ml), of SU5416 ( $10^{-6}$  M), which is the inhibitor of VEGFR1 and VEGFR2 receptors and of SU1498 ( $10^{-6}$  M), which is a selective inhibitor of VEGFR2 receptor.

Dexamethasone induced a significant and gradual decrease of the  $R_{TM}$  within 3 or 5 minutes on the parietal and visceral pleura. Mifepristone and spironolactone inhibited partially the effect of dexamethasone. Spironolactone exhibited agonist effect in pleura and reduced the resistance itself. The effect of dexamethasone involves the activation of the Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase since EIPA, amiloride and ouabain inhibited completely or partially this effect on both sides of parietal and visceral pleura. VEGF resulted in a gradual decrease of the  $R_{TM}$

which was completely inhibited by SU5416 and SU1498. Similar results were observed in experiments with human pleural mesothelial cells.

The present results demonstrate that  $R_{TM}$  and thus permeability of pleura were affected in response to corticosteroids and VEGF. It is possible that these changes in the resistance of pleura may play a role in the pleural fluid recycling in the pleural cavity.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Light RW: Anatomy of the pleura; Pleural diseases. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp 1-8.
- 2 Wang NS: Anatomy and physiology of the pleural space. Clin Chest Med 1985;6:3-16.
- 3 Wang NS: Anatomy of the pleura. Clin Chest Med 1998;19:229-240.
- 4 Mariassy AT, Wheeldon EB: The pleura: A combined light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic study in the sheep. I. Normal pleura. Exp Lung Res 1983;4:293-314.
- 5 Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G: Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study. Chest 1988;93:149-153.
- 6 Andrews PM, Porter KR: The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. Anat Rec 1973;177:409-426.
- 7 Wang NS: The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. Am Rev Respir Dis 1974;110:623-633.
- 8 Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, Didio LJ: Comparative electron microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium, as materials for cardiac valve bioprostheses. J Submicrosc Cytol 1986;18:53-65.
- 9 Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC: Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. Am J Cardiol 1980;46:744-753.
- 10 Agostoni E, Zocchi L: Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. Respir Physiol 1990;81:19-27.
- 11 Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D: Electrolyte transport across the pleura of rabbits. Respir Physiol 1991;86:125-138.
- 12 Zocchi L, Cremaschi D, Agostoni E: Liquid volume, Na<sup>+</sup> and mannitol concentration in a hypertonic mannitol-ringer hydrothorax. Respir Physiol 1992;89:341-351.
- 13 Agostoni E, Zocchi L: Active Na<sup>+</sup> transport and coupled liquid outflow from hydrothoraces of various size. Respir Physiol 1993;92:101-113.

- 14 Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D: Beta-agonist activation of an amiloride-insensitive transport mechanism in rabbit pleura. *Respir Physiol* 1995;100:7-13.
- 15 Lai-Fook SJ, Kaplowitz MR: Pleural space thickness in situ by light microscopy in five mammalian species. *J Appl Physiol* 1985;59:603-610.
- 16 Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Staub NC: The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. *Anat Rec* 1984;208:401-409.
- 17 Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Roos PJ, Staub NC: Structure, blood supply, and lymphatic vessels of the sheep's visceral pleura. *Am J Anat* 1982;165:277-294.
- 18 Lemos M, Pozo RM, Montes GS, Saldiva PH: Organization of collagen and elastic fibers studied in stretch preparations of whole mounts of human visceral pleura. *Ann Anat* 1997;179:447-452.
- 19 Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J: The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:463-481.
- 20 Wang NS: The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:12-20.
- 21 Negrini D, Mukenge S, Del Fabbro M, Gonano C, Miserocchi G: Distribution of diaphragmatic lymphatic stomata. *J Appl Physiol* 1991;70:1544-1549.
- 22 Peng MJ, Wang NS, Vargas FS, Light RW: Subclinical surface alterations of human pleura. A scanning electron microscopic study. *Chest* 1994;106:351-353.
- 23 Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W: Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1023-1026.
- 24 Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Licko V, Staub NC: Protein egress and entry rates in pleural fluid and plasma in sheep. *J Appl Physiol* 1984;56:459-463.
- 25 Miserocchi G, Agostoni E: Contents of the pleural space. *J Appl Physiol* 1971;30:208-213.
- 26 Lai-Fook SJ: Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev* 2004;84:385-410.
- 27 Broaddus VC, Araya M: Liquid and protein dynamics using a new minimally invasive pleural catheter in rabbits. *J Appl Physiol* 1992;72:851-857.

- 28 Sahn SA, Willcox ML, Good JT, Jr., Potts DE, Filley GF: Characteristics of normal rabbit pleural fluid: Physiologic and biochemical implications. *Lung* 1979;156:63-69.
- 29 Aukland K, Reed RK: Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 1993;73:1-78.
- 30 Lai-Fook SJ, Kaplowitz MR: Pleural protein concentration and liquid volume in spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* 1988;35:101-108.
- 31 Broaddus VC, Araya M, Carlton DP, Bland RD: Developmental changes in pleural liquid protein concentration in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:38-41.
- 32 Miserocchi G, Negrini D, Mortola JP: Comparative features of starling-lymphatic interaction at the pleural level in mammals. *J Appl Physiol* 1984;56:1151-1156.
- 33 Miserocchi G, Pistolesi M, Miniati M, Bellina CR, Negrini D, Giuntini C: Pleural liquid pressure gradients and intrapleural distribution of injected bolus. *J Appl Physiol* 1984;56:526-532.
- 34 Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN: The mesothelium and its reactions: A review. *Crit Rev Toxicol* 1982;10:81-144.
- 35 Mutsaers SE: Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002;7:171-191.
- 36 Hesseldahl H, Larsen JF: Ultrastructure of human yolk sac: Endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat* 1969;126:315-335.
- 37 Tiedemann K: On the yolk sac of the cat. Endoderm and mesothelium. *Cell Tissue Res* 1976;173:109-127.
- 38 Mutsaers SE: The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:9-16.
- 39 Michailova KN, Usunoff KG: Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006;183:i-vii, 1-144, back cover.
- 40 Madison LD, Bergstrom-Porter B, Torres AR, Shelton E: Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells. Formation of microvilli and vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol* 1979;82:783-797.
- 41 Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A: Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int* 2000;57:476-486.

- 42 Cunliffe WJ, Sugarbaker PH: Gastrointestinal malignancy: Rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg* 1989;76:1082-1090.
- 43 Jones LM, Gardner MJ, Catterall JB, Turner GA: Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: A natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:373-380.
- 44 Zocchi L: Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 2002;20:1545-1558.
- 45 Gumbiner B: Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987;253:C749-758.
- 46 Harris PJ, Chatton JY, Tran PH, Bungay PM, Spring KR: Ph, morphology, and diffusion in lateral intercellular spaces of epithelial cell monolayers. *Am J Physiol* 1994;266:C73-80.
- 47 Gorodeski GI, Goldfarb J: Extracellular ATP regulates transcervical permeability by modulating two distinct paracellular pathways. *Am J Physiol* 1997;272:C1602-1610.
- 48 Gorodeski GI, De Santis BJ, Goldfarb J, Utian WH, Hopfer U: Osmolar changes regulate the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol* 1995;269:C870-877.
- 49 Wright EM, Pietras RJ: Routes of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J Membr Biol* 1974;17:293-312.
- 50 Yung S, Li FK, Chan TM: Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int* 2006;26:162-173.
- 51 Engelberg J, Radin J: Tracheal-vascular and vascular-pleural electrical potentials in the rat lung. *Respir Physiol* 1977;30:253-263.
- 52 D'Angelo E, Heisler N, Agostoni E: Acid-base balance of pleural liquid in dogs. *Respir Physiol* 1979;37:137-149.
- 53 Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, Berthiaume Y, Staub NC: Removal of pleural liquid and protein by lymphatics in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988;64:384-390.
- 54 Ji HL, Nie HG: Electrolyte and fluid transport in mesothelial cells. *J Epithel Biol Pharmacol* 2008;1:1-7.

- 55 Sarkos S, Hatzoglou C, Dahabre J, Gourgoulisian KI, Molyvdas PA: Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2002;132:233-237.
- 56 Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, Ioannou M, Paraskeva E, Gourgoulisian K, Molyvdas PA: Comparison of the electrophysiological properties of the sheep isolated costal and diaphragmatic parietal pleura. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:129-131.
- 57 Nie HG, Tucker T, Su XF, Na T, Peng JB, Smith PR, Idell S, Ji HL: Expression and regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by nucleotides in pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008
- 58 Hatzoglou CH, Gourgoulisian KI, Molyvdas PA: Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol* 2001;90:1565-1569.
- 59 Liaw YS, Yang PC, Yu CJ, Kuo SH, Luh KT, Lin YJ, Wu ML: PKC activation is required by EGF-stimulated Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in human pleural mesothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:L665-672.
- 60 Ito K, Kuwahara M, Sugano S: Role of intra- and extracellular calcium stores in mesothelial cell response to histamine. *Am J Physiol* 1995;268:L63-70.
- 61 Song Y, Yang B, Matthay MA, Ma T, Verkman AS: Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1744-1750.
- 62 Sironi C, Bodega F, Porta C, Zocchi L, Agostoni E: Expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT1) in visceral and parietal mesothelium of rabbit pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;159:68-75.
- 63 Light RW: *Physiology of the pleural space; Pleural diseases*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001
- 64 Negrini D, Pistolesi M, Miniati M, Bellina R, Giuntini C, Miserocchi G: Regional protein absorption rates from the pleural cavity in dogs. *J Appl Physiol* 1985;58:2062-2067.
- 65 Miniati M, Parker JC, Pistolesi M, Cartledge JT, Martin DJ, Giuntini C, Taylor AE: Reabsorption kinetics of albumin from pleural space of dogs. *Am J Physiol* 1988;255:H375-385.
- 66 Agostoni E, Zocchi L: Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;159:311-323.



- 67 Miserocchi G, Negrini D: Contribution of starling and lymphatic flows to pleural liquid exchanges in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1986;61:325-330.
- 68 Agostoni E, Zocchi L: Starling forces and lymphatic drainage in pleural liquid and protein exchanges. *Respir Physiol* 1991;86:271-281.
- 69 Negrini D, Ballard ST, Benoit JN: Contribution of lymphatic myogenic activity and respiratory movements to pleural lymph flow. *J Appl Physiol* 1994;76:2267-2274.
- 70 Bodega F, Agostoni E: Contribution of lymphatic drainage through stomata to albumin removal from pleural space. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;142:251-263.
- 71 Miserocchi G: Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 1997;10:219-225.
- 72 Negrini D, Fabbro MD: Subatmospheric pressure in the rabbit pleural lymphatic network. *J Physiol* 1999;520 Pt 3:761-769.
- 73 Agostoni E, Zocchi L: Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space. *Clin Chest Med* 1998;19:241-260.
- 74 Agostoni E, D'Angelo E: Pleural liquid pressure. *J Appl Physiol* 1991;71:393-403.
- 75 Agostoni E: Mechanics of the pleural space. *Physiol Rev* 1972;52:57-128.
- 76 Bodega F, Zocchi L, Agostoni E: Albumin transcytosis in mesothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L3-11.
- 77 Agostoni E, Bodega F, Zocchi L: Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol* 2002;93:1806-1812.
- 78 Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC, Jr.: Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77:507-513.
- 79 Ferrer J, Roldan J: Clinical management of the patient with pleural effusion. *Eur J Radiol* 2000;34:76-86.
- 80 Cohen M, Sahn SA: Resolution of pleural effusions. *Chest* 2001;119:1547-1562.
- 81 Balaban RS, Mandel LJ, Benos DJ: On the cross-reactivity of amiloride and 2,4,6 triaminopyrimidine (TAP) for the cellular entry and tight junctional cation permeation pathways in epithelia. *J Membr Biol* 1979;49:363-390.
- 82 Ussing HH, Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-127.

- 83 Li H, Sheppard DN, Hug MJ: Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* 2004;3 Suppl 2:123-126.
- 84 Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Kourti P, Poultsidi A, Mertens PR, Gourgoulialis K, Molyvdas PA: Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: Ussing-type chamber experiments. *Artif Organs* 2005;29:919-922.
- 85 Mall M, Bleich M, Greger R, Schreiber R, Kunzelmann K: The amiloride-inhibitable  $\text{Na}^+$  conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest* 1998;102:15-21.
- 86 Singh AK, Schultz BD, van Driessche W, Bridges RJ: Transepithelial fluctuation analysis of chloride secretion. *J Cyst Fibros* 2004;3 Suppl 2:127-132.
- 87 Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schutz G: Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 1995;60:93-96.
- 88 Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M: Nongenomic steroid action: Controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003;83:965-1016.
- 89 Beato M, Chavez S, Truss M: Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996;61:240-251.
- 90 Beato M, Klug J: Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225-236.
- 91 Verriere VA, Hynes D, Faherty S, Devaney J, Bousquet J, Harvey BJ, Urbach V: Rapid effects of dexamethasone on intracellular pH and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:35807-35814.
- 92 Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW: Steroid receptor family: Structure and functions. *Endocr Rev* 1990;11:201-220.
- 93 Edwardson JA, Bennett GW: Modulation of corticotrophin-releasing factor release from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 1974;251:425-427.
- 94 Hua SY, Chen YZ: Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology* 1989;124:687-691.
- 95 Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Margioris AN, Gravanis A, Stournaras C: Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human

endometrial cells: Evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J Cell Biochem* 1996;62:251-261.

96 Wagner PG, Jorgensen MS, Arden WA, Jackson BA: Stimulus-secretion coupling in porcine adrenal chromaffin cells: Acute effects of glucocorticoids. *J Neurosci Res* 1999;57:643-650.

97 Hinz B, Hirschelmann R: Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res* 2000;17:1273-1277.

98 Feldman S, Dafny N: Changes in single cell responsiveness in the hypothalamus in cats following cortisol administration. *Brain Res* 1970;20:369-377.

99 Falkenstein E, Norman AW, Wehling M: Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2072-2075.

100 Orchinik M, Matthews L, Gasser PJ: Distinct specificity for corticosteroid binding sites in amphibian cytosol, neuronal membranes, and plasma. *Gen Comp Endocrinol* 2000;118:284-301.

101 Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS: Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 1999;64:107-119.

102 Grote H, Ioannou I, Voigt J, Sekeris CE: Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: Evidence for plasma membrane bound receptor. *Int J Biochem* 1993;25:1593-1599.

103 Gametchu B, Watson CS, Wu S: Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J* 1993;7:1283-1292.

104 Powell CE, Watson CS, Gametchu B: Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49<sup>+</sup> lymphoma cells: Biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* 1999;10:271-280.

105 Breuner CW, Orchinik M: Seasonal regulation of membrane and intracellular corticosteroid receptors in the house sparrow brain. *J Neuroendocrinol* 2001;13:412-420.

106 Harvey BJ, Condliffe S, Doolan CM: Sex and salt hormones: Rapid effects in epithelia. *News Physiol Sci* 2001;16:174-177.

- 107 Harvey BJ, Alzamora R, Healy V, Renard C, Doolan CM: Rapid responses to steroid hormones: From frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing. *Biochim Biophys Acta* 2002;1566:116-128.
- 108 Stoenoiu MS, Ni J, Verkaeren C, Debaix H, Jonas JC, Lameire N, Verbavatz JM, Devuyst O: Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:555-565.
- 109 Rovensky J, Simorova E, Radikova Z, Imrich R, Greguska O, Vigas M, Macho L: Comparison of hormone transfer to pleural and synovial exudates. *Endocr Regul* 2006;40:29-36.
- 110 Sannomiya P, Anteghini HJ, Vianna ES, Garcia-Leme J: Involvement of lymphocytes in non-immune inflammation: Dual effect of glucocorticoids. *Agents Actions* 1985;16:552-557.
- 111 Hatzoglou C, Gourgoulialis KI, Hatzoglou A, Castanas E, Molyvdas PA: Rapid effects of 17beta-estradiol and progesterone on sheep visceral and parietal pleurae via a nitric oxide pathway. *J Appl Physiol* 2002;93:752-758.
- 112 Klijn JG, de Jong FH, Bakker GH, Lamberts SW, Rodenburg CJ, Alexieva-Figusch J: Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:2851-2856.
- 113 Williams TA, Verhovez A, Milan A, Veglio F, Mulatero P: Protective effect of spironolactone on endothelial cell apoptosis. *Endocrinology* 2006;147:2496-2505.
- 114 Corvol P, Claire M, Oblin ME, Geering K, Rossier B: Mechanism of the antimineralocorticoid effects of spiro lactones. *Kidney Int* 1981;20:1-6.
- 115 Skluth HA, Gums JG: Spironolactone: A re-examination. *DICP* 1990;24:52-59.
- 116 Couette B, Marsaud V, Baulieu EE, Richard-Foy H, Rafestin-Oblin ME: Spironolactone, an aldosterone antagonist, acts as an antigluco corticosteroid on the mouse mammary tumor virus promoter. *Endocrinology* 1992;130:430-436.
- 117 Massaad C, Lombes M, Aggerbeck M, Rafestin-Oblin ME, Barouki R: Cell-specific, promoter-dependent mineralocorticoid agonist activity of spironolactone. *Mol Pharmacol* 1997;51:285-292.
- 118 Barbato JC, Mulrow PJ, Shapiro JI, Franco-Saenz R: Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. *Hypertension* 2002;40:130-135.

- 119 Jiang G, Cobbs S, Klein JD, O'Neill WC: Aldosterone regulates the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle. *Hypertension* 2003;41:1131-1135.
- 120 Vigne P, Frelin C, Cragoe EJ, Jr., Lazdunski M: Structure-activity relationships of amiloride and certain of its analogues in relation to the blockade of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system. *Mol Pharmacol* 1984;25:131-136.
- 121 Murer H, Hopfer U, Kinne R: Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 1976;154:597-604.
- 122 Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J: Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Cell* 1989;56:271-280.
- 123 Mahnensmith RL, Aronson PS: The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 1985;56:773-788.
- 124 Benos DJ: Amiloride: A molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 1982;242:C131-145.
- 125 Lescale-Matys L, Putnam DS, McDonough AA: Na(+)-K(+)-ATPase alpha 1- and beta 1-subunit degradation: Evidence for multiple subunit specific rates. *Am J Physiol* 1993;264:C583-590.
- 126 Lingrel JB, Orłowski J, Shull MM, Price EM: Molecular genetics of Na-K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990;38:37-89.
- 127 Jorgensen PL: Mechanism of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump. Protein structure and conformations of the pure (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1982;694:27-68.
- 128 Barquin N, Ciccolella DE, Ridge KM, Sznajder JJ: Dexamethasone upregulates the Na-K-ATPase in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1997;273:L825-830.
- 129 Ferrara N, Keyt B: Vascular endothelial growth factor: Basic biology and clinical implications. *EXS* 1997;79:209-232.
- 130 Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
- 131 Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. *Multiple*

protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-11954.

132 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.

133 Robinson CJ, Stringer SE: The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-865.

134 Schlaeppli JM, Wood JM: Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anti-tumor therapy, by anti-vegf neutralizing monoclonal antibodies or by vegf receptor tyrosine-kinase inhibitors. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:473-481.

135 Grove CS, Lee YC: Vascular endothelial growth factor: The key mediator in pleural effusion formation. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:294-301.

136 Zachary I, Gliki G: Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-581.

137 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.

138 Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M: A unique signal transduction from Flt tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 1995;10:135-147.

139 de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.

140 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.

141 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D: Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 1996;87:3336-3343.

142 Wang H, Keiser JA: Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: Role of flt-1. *Circ Res* 1998;83:832-840.

143 Tomimoto H, Yano S, Muguruma H, Kakiuchi S, Sone S: Levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 are elevated in the exudative pleural effusions. *J Med Invest* 2007;54:146-153.

- 144 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
- 145 Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997;79:233-269.
- 146 Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005;4:315-321.
- 147 Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA: Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270:13333-13340.
- 148 Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF: Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;95:1798-1807.
- 149 Gary Lee YC, Melkerneker D, Thompson PJ, Light RW, Lane KB: Transforming growth factor beta induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:88-94.
- 150 Cheng D, Lee YC, Rogers JT, Perkett EA, Moyers JP, Rodriguez RM, Light RW: Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest* 2000;118:1747-1753.
- 151 Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick J, Logie CS, Patterson CE, Antony VB: Bacterial induction of pleural mesothelial monolayer barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L119-125.
- 152 Clauss M, Schaper W: Vascular endothelial growth factor: A jack-of-all-trades or a nonspecific stress gene? *Circ Res* 2000;86:251-252.
- 153 D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, Gaetano C, Capogrossi MC: Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000;86:312-318.
- 154 Milligan SA, Owens MW, Grisham MB: Augmentation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by hydrogen peroxide. *Am J Physiol* 1996;271:L114-120.

- 155 Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741.
- 156 Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D: Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001;22:432-443.
- 157 Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M: Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of sp-1. *J Biol Chem* 1996;271:28220-28228.
- 158 Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, Perruchoud AP: Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:398-406.
- 159 Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT: Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 2000;141:2075-2083.
- 160 Zachary I: Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1375-1386.
- 161 Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W: Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947-959.
- 162 Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108 ( Pt 6):2369-2379.
- 163 Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB: Vegf induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:192-197.
- 164 Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107.
- 165 Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ: Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol* 1999;276:H535-542.



- 166 Dejana E: Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98:1949-1953.
- 167 Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W: Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 13):1853-1865.
- 168 Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC, Jr.: VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* 1999;277:H2038-2049.
- 169 Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW: Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999;274:23463-23467.
- 170 Thickett DR, Armstrong L, Millar AB: Vascular endothelial growth factor (vegf) in inflammatory and malignant pleural effusions. *Thorax* 1999;54:707-710.
- 171 Sack U, Hoffmann M, Zhao XJ, Chan KS, Hui DS, Gosse H, Engelmann L, Schauer J, Emmrich F, Hoheisel G: Vascular endothelial growth factor in pleural effusions of different origin. *Eur Respir J* 2005;25:600-604.
- 172 Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Nezu K, Kushibe K, Taniguchi S, Kotake Y, Konishi Y: Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2506-2510.
- 173 Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP: Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:2013-2016.
- 174 Cacciotti P, Strizzi L, Vianale G, Iaccheri L, Libener R, Porta C, Tognon M, Gaudino G, Mutti L: The presence of simian-virus 40 sequences in mesothelioma and mesothelial cells is associated with high levels of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:189-193.
- 175 Cheng D, Rodriguez RM, Perkett EA, Rogers J, Bienvenu G, Lappalainen U, Light RW: Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999;116:760-765.
- 176 Yanagawa H, Takeuchi E, Suzuki Y, Ohmoto Y, Bando H, Sone S: Vascular endothelial growth factor in malignant pleural effusion associated with lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:396-400.

- 177 Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM: Targeting vascular endothelial growth factor blockade: Ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1:45-50.
- 178 Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G, Puntoni R, Mutti L, Procopio A: Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001;193:468-475.
- 179 Light RW: Pleural disease in obstetrics and gynecology; Pleural diseases. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp 247-252.
- 180 Ishiko O, Yoshida H, Sumi T, Hirai K, Ogita S: Vascular endothelial growth factor levels in pleural and peritoneal fluid in Meigs' syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;98:129-130.
- 181 Masood R, Kundra A, Zhu S, Xia G, Scalia P, Smith DL, Gill PS: Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops. *Int J Cancer* 2003;104:603-610.
- 182 Ishigami SI, Ariei S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M: Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;78:1379-1384.
- 183 Gadducci A, Ferdeghini M, Fanucchi A, Annicchiarico C, Ciampi B, Prontera C, Genazzani AR: Serum preoperative vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer: Relationship with prognostic variables and clinical outcome. *Anticancer Res* 1999;19:1401-1405.
- 184 Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H: High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998;79:144-146.
- 185 Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S: Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res* 1997;17:2811-2814.
- 186 Demirag F, Unsal E, Yilmaz A, Caglar A: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis, and mitotic activity index in malignant pleural mesothelioma. *Chest* 2005;128:3382-3387.
- 187 Catalano A, Romano M, Martinotti S, Procopio A: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role in the tumor

progression potential induced by simian virus 40 large T antigen. *Oncogene* 2002;21:2896-2900.

188 Yano S, Shinohara H, Herbst RS, Kuniyasu H, Bucana CD, Ellis LM, Fidler IJ: Production of experimental malignant pleural effusions is dependent on invasion of the pleura and expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor by human lung cancer cells. *Am J Pathol* 2000;157:1893-1903.

189 Itokawa T, Nokihara H, Nishioka Y, Sone S, Iwamoto Y, Yamada Y, Cherrington J, McMahon G, Shibuya M, Kuwano M, Ono M: Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* 2002;1:295-302.

190 Takamoto T, Sasaki M, Kuno T, Tamaki N: Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival. *Kobe J Med Sci* 2001;47:181-191.

191 Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawver LK: Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res* 1996;56:3540-3545.

192 Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990;37:1563-1570.

193 Li FK, To CH, Leung JK, Chan TM, Lai KN: Electrophysiology and glucose transport of human peritoneal mesothelial cells: Implications for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2001;21:115-121.

194 Thomas CP, Campbell JR, Wright PJ, Husted RF: cAMP-stimulated Na<sup>+</sup> transport in H441 distal lung epithelial cells: Role of PKA, phosphatidylinositol 3-kinase, and sgk1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L843-851.

195 Clauss W, Durr J, Skadhauge E, Hornicke H: Effects of aldosterone and dexamethasone on apical membrane properties and Na-transport of rabbit distal colon in vitro. *Pflugers Arch* 1985;403:186-192.

196 Sandle GI, McGlone F: Acute effects of dexamethasone on cation transport in colonic epithelium. *Gut* 1987;28:701-706.

197 Arndt C, Sari A, Ferre M, Parrat E, Courtas D, De Seze J, Hache J, Matran R: Electrophysiological effects of corticosteroids on the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:472-475.

- 198 Phillips ML, Schultz BD: Steroids modulate transepithelial resistance and Na<sup>+</sup> absorption across cultured porcine vas deferens epithelia. *Biol Reprod* 2002;66:1016-1023.
- 199 Steiner A, Vogt E, Locher R, Vetter W: Stimulation of the phosphoinositide signalling system as a possible mechanism for glucocorticoid action in blood pressure control. *J Hypertens Suppl* 1988;6:S366-368.
- 200 Muto S, Ebata S, Okada K, Saito T, Asano Y: Glucocorticoid modulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 2000;57:2319-2333.
- 201 Harvey BJ, Higgins M: Nongenomic effects of aldosterone on Ca<sup>2+</sup> in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int* 2000;57:1395-1403.
- 202 Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M: Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 2000;21:57-94.
- 203 Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB: Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:113-133.
- 204 Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC: Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2003;144:1164-1174.
- 205 Barbato JC, Rashid S, Mulrow PJ, Shapiro JI, Franco-Saenz R: Mechanisms for aldosterone and spironolactone-induced positive inotropic actions in the rat heart. *Hypertension* 2004;44:751-757.
- 206 Gros R, Ding Q, Armstrong S, O'Neil C, Pickering JG, Feldman RD: Rapid effects of aldosterone on clonal human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C788-794.
- 207 Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R, Feldman RD: Aldosterone regulates vascular reactivity: Short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2003;108:2400-2406.
- 208 Liaw YS, Yang PC, Yu CJ, Kuo SH, Luh KT, Lin YJ, Wu ML: Intracellular pH regulation in cultured human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:597-602.

- 209 Choi JY, Kim SY, Son EJ, Kim JL, Shin JH, Song MH, Moon UY, Yoon JH: Dexamethasone increases fluid absorption via Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) 3 activation in normal human middle ear epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2006;536:12-18.
- 210 Baum M, Cano A, Alpern RJ: Glucocorticoids stimulate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in OKP cells. *Am J Physiol* 1993;264:F1027-1031.
- 211 Dagan A, Gattineni J, Cook V, Baum M: Prenatal programming of rat proximal tubule Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by dexamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R1230-1235.
- 212 Bobulescu IA, Dwarakanath V, Zou L, Zhang J, Baum M, Moe OW: Glucocorticoids acutely increase cell surface Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 (NHE3) by activation of NHE3 exocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F685-691.
- 213 Wang D, Sun H, Lang F, Yun CC: Activation of NHE3 by dexamethasone requires phosphorylation of NHE3 at Ser663 by SGK1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C802-810.
- 214 Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE: Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 1992;267:9331-9339.
- 215 Yun CH, Gurubhagavatula S, Levine SA, Montgomery JL, Brant SR, Cohen ME, Cragoe EJ, Jr., Pouyssegur J, Tse CM, Donowitz M: Glucocorticoid stimulation of ileal Na<sup>+</sup> absorptive cell brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and association with an increase in message for NHE-3, an epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform. *J Biol Chem* 1993;268:206-211.
- 216 Jorkasky D, Cox M, Feldman GM: Differential effects of corticosteroids on Na<sup>+</sup> transport in rat distal colon in vitro. *Am J Physiol* 1985;248:G424-431.
- 217 Ramminger SJ, Richard K, Inglis SK, Land SC, Olver RE, Wilson SM: A regulated apical Na<sup>+</sup> conductance in dexamethasone-treated H441 airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L411-419.
- 218 Itani OA, Auerbach SD, Husted RF, Volk KA, Ageloff S, Knepper MA, Stokes JB, Thomas CP: Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na<sup>+</sup> transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L631-641.
- 219 Grubb BR, Boucher RC: Effect of in vivo corticosteroids on Na<sup>+</sup> transport across airway epithelia. *Am J Physiol* 1998;275:C303-308.

- 220 Dagenais A, Denis C, Vives MF, Girouard S, Masse C, Nguyen T, Yamagata T, Grygorczyk C, Kothary R, Berthiaume Y: Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L217-230.
- 221 Binder HJ, McGlone F, Sandle GI: Effects of corticosteroid hormones on the electrophysiology of rat distal colon: Implications for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport. *J Physiol* 1989;410:425-441.
- 222 Bodega F, Zocchi L, Agostoni E: Labeled albumin in plasma and removal paths from pleural space in control and increased ventilation. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;140:301-311.
- 223 Gourgoulianis KI, Hatzoglou CH, Molyvdas PA: The major route for absorption of fluid from the pleural space. *Lymphology* 2002;35:97-98.
- 224 Carayol N, Campbell A, Vachier I, Mainprice B, Bousquet J, Godard P, Chanez P: Modulation of cadherin and catenins expression by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:341-347.
- 225 Woo PL, Cha HH, Singer KL, Firestone GL: Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor-beta in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:404-412.
- 226 Rubenstein NM, Guan Y, Woo PL, Firestone GL: Glucocorticoid down-regulation of RhoA is required for the steroid-induced organization of the junctional complex and tight junction formation in rat mammary epithelial tumor cells. *J Biol Chem* 2003;278:10353-10360.
- 227 Jantz MA, Antony VB: Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 2008;75:121-133.
- 228 Ablonczy Z, Crosson CE: VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res* 2007;85:762-771.
- 229 Kaner RJ, Crystal RG: Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Mol Med* 2001;7:240-246.
- 230 Mirzapioiazova T, Kolosova I, Usatyuk PV, Natarajan V, Verin AD: Diverse effects of vascular endothelial growth factor on human pulmonary endothelial barrier and migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L718-724.