

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΥΥΒΔΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2007-08

***Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ  
ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ***

*ΓΩΓΟΥ ΕΥΔΟΞΙΑ*

*ΙΑΤΡΟΣ*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2008

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το διάστημα Ιανουάριος 2004- Δεκέμβριος 2007, υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή Κωνσταντίνου Γουργουλιάνη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες μου σε ανθρώπους, οι οποίοι με συμβούλευσαν, με καθοδήγησαν, με ενθάρρυναν, με εμπιστεύθηκαν και μου συμπαραστάθηκαν στη διάρκεια αυτών των 4 περίπου χρόνων. Οι άνθρωποι αυτοί με επηρέασαν θετικά και είμαι πεπεισμένη πως χωρίς την συμβολή τους η μελέτη αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Σας ευχαριστώ θερμά και σας εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου.

Ευχαριστώ,

- Τον Αντιπρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής αυτής, για την πολύτιμη και καθοριστική του βοήθεια, την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε και την αμέριστη συμπαραστάση του. Η διδασκαλία του και ο τρόπος της επιστημονικής του σκέψης με έχουν επηρεάσει ανεξίτηλα.
- Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά, για την επιστημονική αρωγή και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του.
- Τον Καθηγητή Ανοσολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Γερμενή Αναστάσιο για την επιστημονική αρωγή και επίβλεψη.

- Τη Λέκτορα Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Χατζόγλου Χρυσή, για την επιστημονική βοήθεια και συνεχή υποστήριξη και συμπαράσταση. Η συμβολή της ήταν ιδιαιτέρως σημαντική.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Παρασκευά Ευφροσύνη για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική βοήθεια.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Χατζηευθυμίου Αποστολία για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική βοήθεια.
- Την Επίκουρο Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δανιήλ Ζωή για την επιστημονική αρωγή.
- Τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την εξαιρετική από κάθε άποψη τεχνική υποστήριξη του.
- Την εταιρία Σφαγεία Λάρισας Α.Ε. και όλους τους εργαζομένους σε αυτή, και ιδιαίτερα στο φίλο μου πλέον Σάκη Πουρνάρα για την ανιδιοτελή και πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους στην παροχή του πειραματικού υλικού.
- Τον πολύ καλό συνεργάτη και φίλο κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο για την εξαιρετική συνεργασία και πολύπλευρη συμπαράστασή του.
- Τους συνεργάτες και φίλους Κερενίδη Θεοδώρα, Φιλίτσα Δεληγιώργη, Άντζι Καρυώτου, Χρήστο Δάενα, Ελένη Σουλούκου και Θεόδωρο Κυρόπουλο για την πολύπλευρη συμπαράσταση και υποστήριξή τους.

- Τέλος, αλλά όχι τελευταία, την οικογένειά μου και τους κοντινούς μου συγγενείς για την αγάπη, την ανοχή και την αντοχή τους προς το πρόσωπο μου.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ** (Επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αντιπρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ**

Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ (Επιβλέπων)**

Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αντιπρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ**

Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΣΙΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Ιατρικού τμήματος  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

### **ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ**

Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο: Γώγου Ευδοξία του Μενελάου

Ημερομηνία γέννησης: 16 Οκτωβρίου 1964

Τόπος γέννησης: Χαρίεσσα Νάουσας

Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση: Κ. Κέρκυρα 5, Τ.Κ.41221 Λάρισα

Τηλ.: 2410285282

Ηλεκτρονική διεύθυνση: egogou@med.uth.gr

## **ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ**

Εκπαιδευτικός με ειδικότητα φυσικοθεραπείας, κλάδου ΠΕ18 στο 7<sup>ο</sup> ΤΕΕ Λάρισας. Με απόφαση του ΑΠΥΣΔΕ μου χορηγήθηκε άδεια υπηρεσιακή εκπαίδευσης από 01-09-2004 μέχρι σήμερα για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος Παν/μίου Θεσσαλίας.

## **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

Εγκύκλιες σπουδές:

1971-1977 Δημοτικό σχολείο

1977-1983 Γυμνάσιο-Λύκειο

Προπτυχιακή Εκπαίδευση:

1983-1986: Σχολή Φυσικοθεραπείας ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, απόκτηση πτυχίου με βαθμό «Λίαν Καλώς» επτά και 0,17 ( 7, 17).

1986-1987: Ζωσιμαία Παιδαγωγική Ακαδημία Ιωαννίνων, απόκτηση πτυχίου με βαθμό «Λίαν Καλώς» επτά και 0,70 ( 7, 70).

1996-2003: Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απόκτηση πτυχίου Ιατρικής στις 16-07-2003 με βαθμό «Λίαν Καλώς» Επτά και 0,57 (7,57).

**Χρήση Η/Υ:**

Πιστοποίηση στο πρόγραμμα 30-31-93 (Επιμόρφωση Εκπαιδευτικών στην αξιοποίηση των Τεχνολογιών της Πληροφορίας και των Επικοινωνιών στην Εκπαίδευση) επιτυχώς ( 23-04-2005).

**Ξένες Γλώσσες:**

Αγγλικά: Certificate of Competency in English

**Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής:**

Με θέμα: « Η επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών στη διαπερατότητα του υπεζωκότα» στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Παν/μίου Θεσσαλίας.

## **ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ-ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ**

Συνολικός χρόνος προϋπηρεσίας στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση: 17 έτη.



Συμμετοχή στο πρόγραμμα σπιρομετρήσεων για την έγκαιρη διάγνωση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας στη Θεσσαλία, που διοργανώνει η Πνευμονολογική κλινική του Παν/κού Νοσοκομείου Λάρισας (κάθε μήνα για το διάστημα 2003-2007).

Συμμετοχή στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Αναπνοής και διενέργεια του λειτουργικού ελέγχου των Πνευμόνων (κάθε Δευτέρα για το διάστημα 2005-2007).

### ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

**Δημοσιεύσεις επιστημονικών εργασιών σε διεθνώς αναγνωρισμένα περιοδικά:**

- **Acta pediatric** 91:712-713.2001  
Indoor maternal smoking doubles adolescents' exhaled carbon monoxide. K.I. Gourgoulisanis, **E. Gogou**, V. Hamos, P.A. Molyvdas. Department of Pulmonary and Physiology University of Thessaly.
- **Smoking and health: new research.** Smoking and health. **E. Gogou** and K.I. Gourgoulisanis. Nova Biomedical Books, NY, J.H. Owing editor, c2005.
- **Medical Hypotheses** 68: 860-863, 2007.  
The contribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid to the protective role of pleura during inflammatory reactions. **E. Gogou**, Ch. Hatzoglou, V. Chamos, S. Zarogiannis, K.I. Gourgoulisanis, P.A. Molyvdas. Medical School, University of Thessaly, Department of Physiology.
- **International Journal of Clinical Practice** (in Press).  
Mesothelioma mortality in Greece from 1983 to 2003. **E. Gogou**, Th. Kerenidi, V. Chamos, E. Zintzaras, K.I. Gourgoulisanis. Medical School, University of Thessaly.
- **Lung Cancer** (in Press). Serum Vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients. Katsabeki-Katsafli A, Kerenidi T, Kostikas K, Dalaveris E, Kiropoulos TS, **Gogou E**, Papaioannou AI, Gourgoulisanis KI. Medical School, University of Thessaly.

**Περιλήψεις Ανακοινώσεων σε συνέδρια:**

**Διεθνή συνέδρια:**

1. **16<sup>th</sup> ERS** (European Respiratory Society), Munich, Germany, Sept 2-6, 2006. **Mesothelioma mortality in Greece from 1983 to 2003.** **E.M. Gogou**, Th.S. Kerenidi, V. Chamos, E. Zintzaras, K.I. Gourgoulisanis. Medical School, University of Thessaly.

## Ελληνικά συνέδρια:

1. **15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος**, Κρήτη, 2-5 Νοεμβρίου 2006. **Το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα. Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους.** Α. Κατσαμπέκη, Θ. Κερενίδη, Κ. Κωστίκας, Ε. Δαλαβέρης, Α. Παπαϊωάννου, **Ε. Γώγου**, Θ. Κυρόπουλος, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
2. **15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος**, Κρήτη, 2-5 Νοεμβρίου 2006. **Περιπτώσεις ασθενών με Μεσοθελίωμα στην Πνευμονολογική κλινική του Παν/μίου Θεσσαλίας από το 2001 ως το 2005.** **Ε. Γώγου**, Θ. Κερενίδη, Β. Χάμος, Α. Κατσαμπέκη, Ε. Δαλαβέρης, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
3. **15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος**, Κρήτη, 2-5 Νοεμβρίου 2006. **Επιδημιολογία του Μεσοθελιώματος στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1983-2003.** **Ε. Γώγου**, Θ. Κερενίδη, Β. Χάμος, Α. Κατσαμπέκη, Ε. Δαλαβέρης, Η. Ζιντζαράς, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
4. **16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος**, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007. **Μεταβολή της διαπερατότητας υπεζωκότα προβάτου με τη δράση του ασκορβικού οξέος και της κουερσετίνης.** **Ε. Γώγου**, Χ. Χατζόγλου, Β. Χάμος, Θ. Κερενίδη, Α. Κατσαμπέκη, Ε. Δαλαβέρης, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Παν/μίου Θεσσαλίας.

## Προφορικές Ανακοινώσεις σε Συνέδρια:

1. Ημέρες Πνευμονολογίας Λάρισα, 2006. **Ο προστατευτικός ρόλος της βιταμίνης C και της οξειδωμένης μορφής της στην άθροιση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.** **Γώγου Ε.**, Χατζόγλου Χρ., Χάμος Β., Ζαρογιάννης Σ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μολυβδάς Π.Α. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Παν/μίου Θεσσαλίας.
2. **15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος**, Κρήτη, 2-5 Νοεμβρίου 2006. **Ο προστατευτικός ρόλος της βιταμίνης C και της οξειδωμένης μορφής της στην άθροιση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.** **Γώγου Ε.**, Χατζόγλου Χρ., Χάμος Β., Ζαρογιάννης Σ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μολυβδάς Π.Α. Πνευμονολογική κλινική

Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Παν/μίου Θεσσαλίας.

3. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007. **Προσδιορισμός του VEGF και του 8-Ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.** Ε. Δαλαβέρης, Θ. Κερενίδη, Α. Κατσαμπέκη, Κ. Τανού, Θ. Κυρόπουλος, **Ε. Γώγου**, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Κ. Κωστίκας. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
4. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007. **Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και το οξειδωτικό stress σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα πριν και μετά τη θεραπεία.** Α. Κατσαμπέκη, Θ. Κερενίδη, Κ. Κωστίκας, Ε. Δαλαβέρης, Θ. Κυρόπουλος, Α. Παπαϊωάννου, **Ε. Γώγου**, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

#### **Βραβεία σε συνέδρια**

- **Βραβείο β' καλύτερης ανακοίνωσης** που παρουσιάστηκε στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007 με τίτλο: **Προσδιορισμός του VEGF και του 8-Ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.** Ε. Δαλαβέρης, Θ. Κερενίδη, Α. Κατσαμπέκη, Κ. Τανού, Θ. Κυρόπουλος, **Ε. Γώγου**, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Κ. Κωστίκας. Πνευμονολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

#### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

##### **Παρακολούθηση διεθνών συνεδρίων:**

- 1<sup>st</sup> International Symposium on “ Integrated Research Approaches for Clinical Applications and Practices”, 27<sup>th</sup> Febr-2<sup>nd</sup> March, 2003, Larisa- Hellas.
- 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes, 10-15 September 2005, Athens-Greece.
- 8<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology, 1-5 April 2006, Glasgow- UK.
- 9<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology 28 April-2 May 2007, Budapest-Hungary.

## **Παρακολούθηση Ελληνικών συνεδρίων- σεμιναρίων**

### **Στην Β/θμια Εκπαίδευση**

- Ειδικό επιμορφωτικό πρόγραμμα με θέμα «Αγωγή Υγείας», διάρκειας 36 ωρών, από 01-04-1996 έως 14-06-1996.
- Σεμινάριο Αγωγής Υγείας με τίτλο « Εκπαιδεύοντας τον άνθρωπο του 2000- Δεξιότητες επικοινωνίας», διάρκειας 40 ωρών, Φεβρουάριος και Μάρτιος 1999.
- Επιμορφωτικό σεμινάριο με τίτλο «Αξιοποίηση των Τεχνολογιών της Πληροφορίας & των Επικοινωνιών στην Εκπαίδευση», διάρκειας 48 ωρών, από 02-09-2002 έως 22-10 2002.
- Διημερίδα Επιμόρφωσης εκπαιδευτικών ΤΕΕ Λάρισας, που πραγματοποιήθηκε στις 28-29 Νοεμβρίου 2003 στο ΤΕΙ Λάρισας.

### **Στην Ιατρική**

1. 14<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο, Λάρισα 20-22 Οκτωβρίου 2000.
2. 3<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος, Λάρισα 1-3 Δεκεμβρίου 2000.
3. Ημέρες Πνευμονολογίας 2001, Βόλος 14-16 Σεπτεμβρίου 2001.
4. 2<sup>ο</sup> Παιδιατρικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας, Λάρισα 19-21 Απριλίου 2002.
5. Ημέρες Πνευμονολογίας 2002, Λάρισα 27-29 Σεπτεμβρίου 2002.
6. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Ψυχιατρικής Κλινικής του Παν/κού Νοσοκομείου Λάρισας με θέμα: « Συνήθη Ψυχικά Νοσήματα στην Πρωτοβάθμια φροντίδα Υγείας», Λάρισα, από 31-10-2002 έως 20-03-2003.
7. Ημέρες Πνευμονολογίας 2003, Αργαλαστή Πηλίου 19-21 Σεπτεμβρίου 2003.
8. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες, Λάρισα 7-10 Οκτωβρίου 2004.
9. Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα με θέμα: « Άσθμα, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας», Λάρισα 27-11-2004.
10. Α΄ Κλινικό Φροντιστήριο για τη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, Αιδηψός 18-12-2004.
11. Ημέρες Πνευμονολογίας 2004, Τρίκαλα 24-26 Σεπτεμβρίου 2004.

12. Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα με θέμα: «Νοσήματα του Υπεζωκότα», Λάρισα 25-26 Φεβρουαρίου 2004.
13. Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα με θέμα: «Λειτουργία Ιατρικών Διακοπής Καπνίσματος», Λάρισα 10-11 Ιουνίου 2005.
14. Ημέρες Πνευμονολογίας 2005, Λ.Πλαστήρα 2-4 Σεπτεμβρίου 2005.1
15. Ημέρες Πνευμονολογίας 2006, Λάρισα 22-24 Σεπτεμβρίου 2006.
16. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Κρήτη 2-5 Νοεμβρίου 2006.
17. Ημέρες Πνευμονολογίας 2007, Βόλος 21-22 Σεπτεμβρίου 2007.
18. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα 6-9 Δεκεμβρίου 2007.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η υπεζωκοτική συλλογή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εκδηλώσεις νόσων του αναπνευστικού συστήματος. Οι παθοφυσιολογικές διαδικασίες που οδηγούν στη συλλογή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα οφείλονται στη διαταραχή της ισορροπίας του ρυθμού παραγωγής και απορρόφησης του υγρού.

Ο ρυθμός διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγάλος συγκριτικά με τη μικρή ποσότητα υγρού που φυσιολογικά βρίσκεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Οι μηχανισμοί που ενέχονται στην παραγωγή και απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού περιλαμβάνουν τους εξής: α) την είσοδο του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως μέσω διήθησης από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα και την απομάκρυνσή του από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα, β) τη μεταφορά υγρού μέσω κλίσης διαφοράς πιέσεων διαμέσου του περισπλάχνιου υπεζωκότα, γ) την ενεργητική μεταφορά ηλεκτρολυτών διαμέσου των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα, και δ) την μεταφορά του υγρού σε κυστίδια κατά την ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών.

Πρόσφατες ανασκοπήσεις της βιβλιογραφίας έχουν αναδείξει την ενεργητική μεταφορά ηλεκτρολυτών διαμέσου των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα ως έναν από τους μηχανισμούς που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης προκειμένου να διαπιστωθεί η ακριβής συμμετοχή του και το ποσοστό συμμετοχής του στην όλη διαδικασία. Επομένως παράγοντες που επηρεάζουν την ιοντική διαπερατότητα του υπεζωκότα κρίνονται σημαντικοί προκειμένου να κατανοηθεί η φυσιολογία της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού. Αξιολόγηση του ρόλου και του τρόπου μέσω του οποίου επιτυγχάνεται

αυτός, θα βοηθήσει ενδεχομένως στην ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση των υπεζωκοτικών συλλογών.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>6</b>
<b>ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ.....</b>	<b>7</b>
<i>Εμβρυολογία υπεζωκότα.....</i>	<i>9</i>
<i>Ιστολογία υπεζωκότα .....</i>	<i>10</i>
<i>Μεσοθηλιακά κύτταρα.....</i>	<i>11</i>
<i>Αιμάτωση υπεζωκότα.....</i>	<i>13</i>
<i>Λεμφαγγεία υπεζωκότα.....</i>	<i>13</i>
<i>Νεύρωση υπεζωκότα.....</i>	<i>15</i>
Υπεζωκοτικό υγρό.....	15
<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ.....</b>	<b>18</b>
<i>Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.....</i>	<i>18</i>
<i>Ο ρόλος των πιέσεων στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού.....</i>	<i>19</i>
<i>Διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού διαμέσου των πετάλων του υπεζωκότα.....</i>	<i>21</i>
<i>Ο ρόλος των λεμφαγγείων στην απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού.....</i>	<i>24</i>
<i>Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού με ενδοκυττάρωση.....</i>	<i>27</i>
<b>Παθοφυσιολογία διακίνησης υπεζωκοτικού υγρού.....</b>	<b>28</b>
Υπεζωκοτική συλλογή.....	28
Διϋδρώματα.....	29
Εξιδρώματα.....	31
<b>ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....</b>	<b>35</b>

Διάχυση.....	35
Ενεργητική μεταφορά.....	36
Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων.....	36
<b>Μελέτη διαπερατότητας βιολογικών μεμβρανών – Μέθοδος Ussing System.....</b>	<b>37</b>
Μετρήσεις με τους θαλάμους του Ussing.....	40
<b>ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....</b>	<b>43</b>
Ιστορικά στοιχεία.....	43
Δομή των μεσοθηλιακών κυττάρων και του μεσοθηλίου.....	43
Υπερδομήτων μεσοθηλιακών κυττάρων.....	44
Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων.....	45
Προστατευτικός φραγμός.....	45
Παρουσίαση αντιγόνου.....	46
Προσκόλληση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων.....	46
Μεταφορά διαλυτών και κυττάρων.....	47
Έναρξη και λύση της φλεγμονής και ιστική επιδιόρθωση.....	47
Πήξη και ινοδύλωση.....	48
Σύνθεση κολλαγόνου.....	48
 <b>ΧΡΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ.....</b>	 <b>49</b>
<b>Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ) .....</b>	<b>49</b>
Ενζυμολογία της βιταμίνης C.....	52
Αντιοξειδωτική δράση - Τι ανάγει η βιταμίνη C;.....	53

<i>Συγκέντρωση της βιταμίνης C στο πλάσμα ανθρώπου.....</i>	<i>54</i>
<i>Ρύθμιση της μεταφοράς της βιταμίνης C.....</i>	<i>55</i>
<i>Απλή διάχυση.....</i>	<i>55</i>
<i>Διευκολυνόμενη διάχυση.....</i>	<i>55</i>
<i>Εκροή του ασκορβικού οξέος από τα κύτταρα με διευκολυνόμενη διάχυση...56</i>	
<i>Ενεργητική μεταφορά του ασκορβικού οξέος-Συμμεταφορείς Νατρίου-Ασκορβικού.....</i>	<i>57</i>
<i>Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά του ασκορβικού οξέος μέσω των SVCTs.....</i>	<i>59</i>
<i>Αναστολή μεταφοράς ασκορβικού οξέος στα κύτταρα μέσω των SVCTs.....</i>	<i>60</i>
<b><i>Δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA).....</i></b>	<b><i>61</i></b>
<i>Διευκολυνόμενη διάχυση για το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA).....</i>	<i>62</i>
<b><i>Κουερσετίνη.....</i></b>	<b><i>64</i></b>
<b><i>Krebs χωρίς Νάτριο.....</i></b>	<b><i>67</i></b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>68</b>
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>69</b>
<i>Συλλογή και προετοιμασία ιστού.....</i>	<i>69</i>
<i>Πειραματική διαδικασία.....</i>	<i>70</i>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>75</b>
<i>Αποτελέσματα του Ασκορβικού οξέος σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση.....</i>	<i>75</i>
<i>Αποτελέσματα του Ασκορβικού οξέος με Krebs χωρίς Νάτριο σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση.....</i>	<i>84</i>

<i>Αποτελέσματα του Δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση.....</i>	<i>89</i>
<i>Επίδραση της κουερσετίνης με το ασκορβικό οξύ στον υπεζωκότα.....</i>	<i>97</i>
<i>Επίδραση της κουερσετίνης με το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) στον υπεζωκότα.....</i>	<i>104</i>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>109</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>120</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>122</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>124</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>126</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο υπεζωκότας αποτελείται από μια στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων πάνω σε υποκείμενο συνδετικό ιστό [1]. Τα κυτταρολογικά, τα κυταροχημικά και τα δομικά χαρακτηριστικά των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι κοινά για όλους τους ορογόνους υμένες σε μεγάλη ποικιλία ειδών του ζωικού βασιλείου (άνθρωπο, πρόβατο, χοίρο, σκύλο, κουνέλι), υποστηρίζοντας την άποψη ότι το μεσοθήλιο λειτουργεί ως ολοκληρωμένο σύστημα. Αντίθετα με ότι πίστευαν παλιότερα, σήμερα τα μεσοθηλιακά κύτταρα θεωρούνται ενεργά κύτταρα που συμμετέχουν σε πολλές δομικές και μεταβολικές λειτουργίες [1,2]. Αυτά μπορούν να συνθέτουν μακρομόρια του υποκείμενου συνδετικού ιστού καθώς επίσης και βιολογικώς ενεργά μόρια. Είναι αντιδραστικά κύτταρα, απαντώντας σε φλεγμονώδη ερεθίσματα με αύξηση των παραπάνω δραστηριοτήτων τους, έκφραση πολλών ενζύμων, απελευθέρωση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και χημειοτακτικών πεπτιδίων [1,2]. Επιπλέον, τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν ενεργό ρόλο στη δια-ορογόνιο μεταφορά, αφού διαθέτουν όλα τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται για την ενεργητική μεταφορά και αναφορές για τέτοιου είδους μεταφορά διαμέσου του περισπλάχνιου υπεζωκότα υπάρχουν από το 1979 [3]. Επίσης, η διαπερατότητα του μεσοθηλίου για τις μικρομοριακές ουσίες μοιάζει με αυτήν του ενδοθηλίου των τριχοειδών [2].

Πολλοί μηχανισμοί αλληλεπιδρούν για τον έλεγχο του όγκου και της σύστασης του υγρού που περιέχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα [1]. Οι δυνάμεις του Starling, η λεμφαγγειακή παροχέτευση και η ενεργητική μεταφορά ουσιών διά του μεσοθηλίου εμπλέκονται στη διαμόρφωση του

όγκου και της σύστασης του υπεζωκοτικού υγρού, το οποίο, με τη σειρά του, είναι απαραίτητο για τη διασφάλιση αποτελεσματικής και με τη μικρότερη επιβάρυνση κίνησης των πνευμόνων εντός του θωρακικού κλωβού [1,2]. Επίσης, η υπεζωκοτική κοιλότητα είναι πολύ σημαντική για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος υγρού από το διάμεσο ιστό των πνευμόνων [1]. Επομένως, ο υπεζωκότας και η υπεζωκοτική κοιλότητα μαζί με το υγρό λειτουργούν προστατευτικά για τους πνεύμονες και τη φυσιολογική λειτουργία της αναπνοής.

Η πνευμονική λοίμωξη και οι υπο-υπεζωκοτικές φλεγμονές (που περιλαμβάνουν αυτές που συμβαίνουν κοντά στον τοιχωματικό υπεζωκότα, όπως χρόνια περικαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα, υποδιαφραγματικά αποστήματα) οδηγούν στο σχηματισμό φλεγμονωδών εξιδρωμάτων [4]. Το κύριο αίτιο των περισσότερων εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών είναι η αυξημένη μικροαγγειακή και μεσοθηλιακή διαπερατότητα. Ένα ευρύ φάσμα διεγερτών και μεσολαβητών της φλεγμονής έχει βρεθεί ότι προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας στο ενδοθήλιο. Μερικοί μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)], που μεταβάλλουν τη μικροαγγειακή διαπερατότητα ανιχνεύθηκαν σε υπεζωκοτικά εξιδρώματα [1,2,5]. Η προέλευση αυτών των μεσολαβητών μπορεί να είναι είτε εξωυπεζωκοτική είτε από το ίδιο το μεσοθήλιο του υπεζωκότα, αφού τα ενεργοποιημένα μεσοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν ποικιλία χημειοκινών, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, που επηρεάζουν τη διαπερατότητα [2]. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, αυξάνει η διαπερατότητα μεταξύ των κυττάρων (περικυτταρική) και αναπτύσσεται δυσλειτουργία του μεσοθηλιακού φραγμού [5]. Οι

επιπλεγμένες παραπνευμονικές συλλογές είναι τυπικά εξιδρωματικές με υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και αυξημένο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων, κυρίως πολυμορφοπύρηνων. Τα ουδετερόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση της βιταμίνης C (ασκορβικού οξέος) από τον μεταβολίτη της, δεϋδροασκορβικό οξύ και επομένως στη διατήρηση των αποθεμάτων της. Η βιταμίνη C είναι γνωστή για τον αντιοξειδωτικό της ρόλο και την προστασία που παρέχει στα ουδετερόφιλα αλλά και σε παρακείμενους ιστούς κατά τη φλεγμονή [6,7].

Το αναπνευστικό σύστημα εκτίθεται συχνά σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Το οξυγόνο, οι ερεθιστικές ουσίες του εισπνεόμενου αέρα, το κάπνισμα και οι φλεγμονές δημιουργούν ελεύθερες ρίζες [8]. Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες συμβάλλοντας έτσι στην πρόληψη πνευμονικής βλάβης. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και τα κυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν νάτριο-εξαρτώμενο σύστημα μεταφοράς για τη βιταμίνη C, ώστε να προστατεύονται επαρκώς από τις ελεύθερες ρίζες [9,10,11]. Το ασκορβικό οξύ, ένας σημαντικός αντιοξειδωτικός παράγοντας, ανιχνεύεται στο πλάσμα και μειώνεται στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων [Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS)]. Το ARDS είναι μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από διάχυτη φλεγμονή στο πνευμονικό παρέγχυμα [8,12]. Στην βάση της παθογένεσης του ARDS σημαντική είναι η οξειδωτική βλάβη των ιστών. Η φλεγμονώδης-οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο σύστημα χημικής και κυτταρικής απάντησης [8]. Ένα αντιπροσωπευτικό σχήμα περιλαμβάνει την προσβολή, που μπορεί να είναι μια φλεγμονή, η οποία προκαλεί την έκφραση κυτοκινών, όπως ο παράγοντας

νέκρωσης των όγκων-α [Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )], ο οποίος ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα επιθηλιακά και τα μακροφάγα και στρατολογεί ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και άλλα ανοσοαντιδραστικά κύτταρα. Όταν μετρήθηκαν αντιοξειδωτικά σε ασθενείς με ARDS, βρέθηκε ότι στο πλάσμα το ασκορβικό οξύ ήταν σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με υγιή άτομα [8].

Η βιταμίνη C ( ασκορβικό οξύ) είναι ένας προστατευτικός παράγοντας κατά τη φλεγμονή με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που διαθέτει. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε η δράση της στον υπεζωκότα να είναι αντίθετη από αυτή των μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως του VEGF, οι οποίοι αυξάνουν τη διαπερατότητά του και προκαλούν δυσλειτουργία του μεσοθηλιακού φραγμού [5].

Αφού τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να συνθέτουν κολλαγόνο και η βιταμίνη C είναι σημαντικός συμπαραγόντας στη σύνθεσή του, είναι πιθανό ότι αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να την προσλαμβάνουν μέσω νάτριο-εξαρτώμενων ή νάτριο-ανεξάρτητων μεταφορέων. Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να διερευνηθεί αν η βιταμίνη C έχει επίδραση στην διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα προβάτου, καθώς επίσης και να διαχωριστεί η δράση του ασκορβικού οξέος από τη δράση του μεταβολίτη του δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA). Διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M και DHA σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Επίσης, μελετήθηκε αν το υπόστρωμα (Krebs-Ringer) χωρίς νάτριο έχει κάποια επίδραση στη δράση του ασκορβικού οξέος, αφού αυτό συµμεταφέρεται στα κύτταρα με νάτριο. Επιπλέον, αν η κουερσετίνη, η οποία είναι μια φλαβονόλη με αντιοξειδωτικές



ιδιότητες που αναστέλλει την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος και του DHA στα κύτταρα, έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα στη δράση του ασκορβικού οξέος ή του DHA. Έτσι, θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί αν η βιταμίνη C έχει και άλλο ρόλο εκτός από τις γνωστές ενζυματικές και μη-ενζυματικές δράσεις της.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

Ο υπεζωκότας είναι μια ορογόνος μεμβράνη που καλύπτει το πνευμονικό παρέγχυμα, το μεσοθωράκιο, το διάφραγμα και το θωρακικό κλωβό. Διακρίνεται σε περισπλάχνιο και τοιχωματικό υπεζωκότα. Ο περισπλάχνιος υπεζωκότας καλύπτει το πνευμονικό παρέγχυμα, όχι μόνο στα σημεία επαφής του με το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα και το μεσοθωράκιο αλλά και στις μεσολόβιες σχισμές. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας καλύπτει εσωτερικά τη θωρακική κοιλότητα. Ανάλογα με τις ενδοθωρακικές επιφάνειες που καλύπτει διακρίνεται σε πλευρικό, μεσοπνευμόνιο και διαφραγματικό τοιχωματικό υπεζωκότα. Ο περισπλάχνιος και ο τοιχωματικός υπεζωκότας έρχονται σε επαφή 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 ως διπλή πτυχή αποτελώντας τον πνευμονικό σύνδεσμο [1].

Ένα λεπτό στρώμα υγρού, το υπεζωκοτικό υγρό, φυσιολογικά βρίσκεται ανάμεσα στον τοιχωματικό και περισπλάχνιο υπεζωκότα. Αυτό το λεπτό στρώμα υγρού δρα ως λιπαντικό και επιτρέπει στον περισπλάχνιο υπεζωκότα, που καλύπτει τους πνεύμονες, να γλιστρά πάνω στον τοιχωματικό υπεζωκότα, που καλύπτει τη θωρακική κοιλότητα, κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων. Ο χώρος, ή λανθάνων χώρος, ανάμεσα στα δύο πέταλα του υπεζωκότα ονομάζεται υπεζωκοτική κοιλότητα. Το μεσοπνευμόνιο διαχωρίζει πλήρως τη δεξιά από την αριστερή υπεζωκοτική κοιλότητα στον άνθρωπο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην

υπεζωκοτική κοιλότητα φυσιολογικά υπάρχει μόνο ένα λεπτό στρώμα υγρού, γι' αυτό θεωρείται ως λανθάνων χώρος [1].

Πολλές παθήσεις σχετίζονται με αυξημένες ποσότητες υπεζωκοτικού υγρού. Η υπεζωκοτική συλλογή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εκδηλώσεις νόσων του αναπνευστικού συστήματος. Στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό που οδηγεί στη συλλογή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα εμπλέκεται κυρίως η διαταραχή του ρυθμού παραγωγής και απορρόφησης αυτού του υγρού. Οι μηχανισμοί που ενέχονται στην παραγωγή και απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού είναι οι εξής: α) η είσοδος του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω διήθησης από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα και την απομάκρυνσή του από τα λεμφαγγεία επίσης του τοιχωματικού υπεζωκότα, β) τη μεταφορά υγρού μέσω κλίσης πίεσης διαμέσου του περισπλάχνιου υπεζωκότα, γ) την ενεργητική μεταφορά ηλεκτρολυτών διαμέσου των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα και δ) τη μεταφορά υγρού σε κυστίδια κατά την ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών [1,4].

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την ενεργητική μεταφορά ηλεκτρολυτών διαμέσου των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα ως έναν από τους μηχανισμούς που χρήζει περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διαπιστωθεί η ακριβής συμμετοχή του καθώς και το ποσοστό συμμετοχής του στη διαδικασία. Επομένως, παράγοντες που επηρεάζουν την ιοντική διαπερατότητα του υπεζωκότα κρίνονται σημαντικοί ώστε να κατανοηθεί η φυσιολογία της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού. Αξιολόγηση του ρόλου και του τρόπου μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτό, θα βοηθήσει

ενδεχομένως στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση των υπεζωκοτικών συλλογών.

### *Εμβρυολογία του υπεζωκότα*

Το κεφαλικό τμήμα της σπλαχνικής κοιλότητας του εμβρύου γίνεται περικάρδιο και επικοινωνεί αμφοτερόπλευρα με τα υπεζωκοτικά ελλείμματα που αυτά 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 μεσοθηλιακή μεμβράνη, τον υπεζωκότα [1].

Όταν εμφανίζεται το αρχέγονο βρογχικό δένδρο, αυτό και η τραχεία βρίσκονται μέσα σε μεσεγχυματική ουσία. Αυτή η μάζα του μεσεγχυματικού ιστού θα αποτελέσει το μελλοντικό μεσοπνευμόνιο, 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 λεπτή στιβάδα μεσοθηλίου, που θα αποτελέσει τον περισπλάχνιο υπεζωκότα. Καθώς οι λοβοί εξελίσσονται

χωριστά συγκρατούν και μεσοθήλιο, το οποίο θα αποτελεί τον περισπλάχνιο υπεζωκότα στις μεσολόβιες σχισμές. Η στιβάδα του μεσοθηλίου στις υπεζωκοτικές κοιλότητες θα αποτελέσει τον τοιχωματικό υπεζωκότα [1].

### *Ιστολογία του υπεζωκότα*

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποτελείται από χαλαρό ακανόνιστο συνδετικό ιστό και μια στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων. Στον υπεζωκότα υπάρχουν αγγεία αίματος κυρίως τριχοειδή και στόμια λεμφαγγείων. Τα στόμια μοιάζουν με επίπεδες δεξαμενές στην αρχή των λεμφαγγείων και βρίσκονται στα μεσοπλεύρια διαστήματα του πλευρικού υπεζωκότα, τουλάχιστον όσο αφορά τον υπεζωκότα προβάτου. Τα μέσο πάχος του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου είναι 20-25μm, ενώ η απόσταση από τα μικρά αγγεία ως την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 10-12μm. Κάτω από τον τοιχωματικό υπεζωκότα βρίσκεται η ενδοθωρακική περιτονία, που αποτελείται από πυκνό-κανονικό συνδετικό ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο και ελασίνη και με πάχος 75-150μm [1,2,4].

Ο περισπλάχνιος υπεζωκότας ποικίλλει στα διάφορα είδη κυρίως ως προς το πάχος. Ο σκύλος, η γάτα και η μαϊμού έχουν λεπτό περισπλάχνιο υπεζωκότα, αντίθετα ο άνθρωπος, το πρόβατο, η αγελάδα, ο χοίρος και το άλογο έχουν παχύ περισπλάχνιο υπεζωκότα. Η διάκριση μεταξύ πνευμόνων με παχύ ή λεπτό περισπλάχνιο υπεζωκότα είναι σημαντική γιατί η παροχή αίματος εξαρτάται από το πάχος. Στα ζώα με παχύ περισπλάχνιο υπεζωκότα η κύρια πηγή αίματος είναι η συστηματική κυκλοφορία, ενώ σ' αυτά με λεπτό περισπλάχνιο υπεζωκότα η παροχή αίματος γίνεται από τη πνευμονική κυκλοφορία [1,4].

Ιστολογικά, ο παχύς περισπλάχνιος υπεζωκότας αποτελείται από δύο στιβάδες: το μεσοθήλιο και τον συνδετικό ιστό. Τα αγγεία του αίματος, τα λεμφαγγεία και τα νεύρα βρίσκονται στον συνδετικό ιστό. Στα πρόβατα το πάχος του είναι 25-83 $\mu\text{m}$  και η απόσταση των μικρών αγγείων από την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 18-56 $\mu\text{m}$  [1,4].

Η στιβάδα του συνδετικού ιστού στον περισπλάχνιο 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 του [1].

### *Μεσοθηλιακά κύτταρα*

Ο τοιχωματικός και ο περισπλάχνιος υπεζωκότας αποτελούνται από μια απλή στιβάδα επίπεδων μεσοθηλιακών κυττάρων. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 6 ως 12 $\mu\text{m}$ . Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν μικρολάχνες σε όλη την επιφάνεια προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και η κατανομή τους είναι ακανόνιστη. Η πυκνότητά τους ποικίλλει από λίγα ως 600/100 $\mu\text{m}^2$ , με μέση τιμή 300/100 $\mu\text{m}^2$ . Οι περισσότερες μικρολάχνες βρίσκονται στα κατώτερα τμήματα του περισπλάχνιου υπεζωκότα και στο πρόσθιο και κατώτερο τμήμα του μεσοπνευμόνιου τοιχωματικού υπεζωκότα. Περισσότερες μικρολάχνες υπάρχουν στον περισπλάχνιο υπεζωκότα απ' ότι στον τοιχωματικό. Η διάμετρός τους είναι 0.1 $\mu\text{m}$  και το μήκος τους ποικίλλει από 0.5 ως 3 $\mu\text{m}$ . Η κύρια λειτουργία αυτών των μικρολαχνών είναι η προσρόφηση των

γλυκοπρωτεϊνών που περιέχουν υαλουρονικό οξύ, ειδικά στο κατώτερο τμήμα του θώρακα, ώστε να μειώνουν τις τριβές ανάμεσα στους πνεύμονες και το θωρακικό τοίχωμα [1].

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι ενεργά κύτταρα, ευαίσθητα και αντιδρούν σε διάφορα ερεθίσματα. Σε καλλιέργειες, τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν κολλαγόνο τύπου I, II και IV, ελαστίνη, φιμπρονεκτίνη και λαμινίνη καθώς και να εκφράζουν ενδιάμεσα ινίδια τυπικά για επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες [13]. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα επίσης παρουσιάζουν προπηκτική δραστηριότητα εξαιτίας ενός ιστικού παράγοντα που συνδέει τον παράγοντα VII στην κυτταρική επιφάνεια [14]. Επιπλέον τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν μονοξείδιο του αζώτου (NO) και TGF  $\beta$ -1 (Transforming growth factor  $\beta$ -1) [15,16].

Η στιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι πολύ εύθραυστη. Όταν η φυσιολογική στιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων διασπάται, το έλλειμμα επιδιορθώνεται με μίτωση και μετανάστευση των κυττάρων αυτών [17]. Μετά από διέγερση μπορούν να συστέλλονται και να διατηρούν τη συνέχεια με τους γειτονικούς ιστούς με σχηματισμούς που λέγονται κυτταρικές γέφυρες. Πολλές φορές εκτοπίζονται από την επιφάνεια του υπεζωκότα και παραμένουν ελεύθερα στο υπεζωκοτικό υγρό, αποκτώντας στρογγυλό ή ωοειδές σχήμα [18]. Το κυτταρόπλασμά τους είναι πλούσιο σε οργάνιλια και σ' αυτήν την κατάσταση μετατρέπονται σε μακροφάγα ικανά για φαγοκυττάρωση και ερυθροφαγοκυττάρωση, καθώς και με ανοσολογικές ιδιότητες [19]. Όλα τα μακροφάγα του υπεζωκοτικού υγρού δεν προέρχονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα, μερικά εξελίσσονται από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και άλλα από τα μακροφάγα των κυψελίδων.



## *Αιμάτωση του υπεζωκότα*

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αιματώνεται από τα τριχοειδή της συστηματικής κυκλοφορίας. Κλάδοι των *μεσοπλεύριων 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 μυσφρενικές αρτηρίες*. Η φλεβική παροχέτευση του τοιχωματικού υπεζωκότα γίνεται διαμέσου των *μεσοπλεύριων φλεβών* που εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα ή στο βραχιονοκεφαλικό στέλεχος [1].

Η αιμάτωση του περισπλάχνιου υπεζωκότα εξαρτάται από το αν το ζώο διαθέτει παχύ ή λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα. Σε ζώα με *λεπτό περισπλάχνιο υπεζωκότα* η αιμάτωσή του προέρχεται από την *πνευμονική κυκλοφορία*, αντίθετα σε ζώα με *παχύ περισπλάχνιο υπεζωκότα* η παροχή αίματος γίνεται από τη συστηματική κυκλοφορία μέσω των *βρογχικών αρτηριών*. Ο Albertine και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι τα πρόβατα έχουν παχύ περισπλάχνιο υπεζωκότα, που αιματώνεται πλήρως και αποκλειστικά από τις βρογχικές αρτηρίες. Ο άνθρωπος διαθέτει επίσης παχύ περισπλάχνιο υπεζωκότα, που πιθανώς αιματώνεται από τις βρογχικές αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση του περισπλάχνιου υπεζωκότα γίνεται διαμέσου των *πνευμονικών φλεβών* [1].

## *Λεμφαγγεία του υπεζωκότα*

Τα λεμφαγγεία του *πλευρικού υπεζωκότα* παροχετεύουν τη λέμφο κοιλιακώς προς τους λεμφαδένες των *έσω θωρακικών αγγείων* και ραχιαίως προς τους λεμφαδένες των *έσω μεσοπλεύριων αγγείων* κοντά στις κεφαλές

των πλευρών. Τα λεμφαγγεία του μεσοπνευμόνιου υπεζωκότα πορεύονται προς τραχειοβρογχικούς και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, ενώ τα λεμφαγγεία του διαφραγματικού υπεζωκότα προς τους παραστερνικούς, μέσους φρενικούς και οπίσθιους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες [1].

Ο περισπλάχνιος υπεζωκότας διαθέτει άφθονα λεμφαγγεία που σχηματίζουν ένα πλέγμα σε όλη την επιφάνεια του πνεύμονα προς την πύλη και επίσης εισχωρούν στο πνευμονικό παρέγχυμα, διαπερνώντας τα μεσολόβια διαφράγματα, ώστε να ενωθούν με τα βρογχικά λεμφαγγεία. Η λέμφος τελικά καταλήγει στη πνευμονική ρίζα. Στον άνθρωπο, το υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα δεν εισέρχεται στα λεμφαγγεία του περισπλάχνιου υπεζωκότα [1].

Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου των στομάτων. Τα στόματα έχουν στρογγυλό ή σχισμοειδές σχήμα, διάμετρο 2-6μm και βρίσκονται κυρίως στο μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα και στη μεσοπλεύρια επιφάνεια στα κατώτερα τμήματα του θώρακα [20]. Εντοπίζονται μόνο στις περιοχές που υπάρχουν διευρυμένοι λεμφαγγειακοί χώροι. Στην περιοχή των στομάτων τα μεσοθηλιακά κύτταρα με τις μικρολάχνες τους είναι σε συνέχεια με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων [20]. Έτσι αυτά τα στόματα και η σχέση τους με τα λεμφαγγεία θεωρούνται η κύρια οδός για την απομάκρυνση κάθε ουσίας από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Είναι δύσκολο να αποδειχθεί η ύπαρξη αυτών των στομάτων στους ανθρώπους. Ο Peng και οι συνεργάτες του απέδειξαν την ύπαρξη τέτοιων στομάτων σε 2 από 9 δείγματα ασθενών [17]. Ο Li έδειξε την ύπαρξη στομάτων με διάμετρο 6.2μm και σχήμα στρογγυλό ή ωοειδές στο διαφραγματικό υπεζωκότα [21].

Δεν υπάρχουν στόματα στον περισπλάχνιο υπεζωκότα και τα λεμφαγγεία του χωρίζονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα από στιβάδα συνδετικού ιστού. Η έλλειψη των στομάτων από τον περισπλάχνιο υπεζωκότα ερμηνεύει την παρατήρηση ότι κάθε ουσία που εγχύεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα απομακρύνεται διαμέσου του τοιχωματικού υπεζωκότα [1,4].

### *Νεύρωση του υπεζωκότα*

Τελικές αισθητικές νευρικές απολήξεις υπάρχουν στον πλευρικό και διαφραγματικό υπεζωκότα. *Τα μεσοπλεύρια νεύρα νευρώνουν τον πλευρικό και το περιφερικό τμήμα του διαφραγματικού υπεζωκότα.* Όταν ερεθίζονται αυτές οι περιοχές ο πόνος εκδηλώνεται στο προσκείμενο θωρακικό τοίχωμα. *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 περισπλάχνιος υπεζωκότας δεν περιέχει νευρικές απολήξεις του πόνου.* Έτσι η εμφάνιση πλευριτικού τύπου πόνου στο θώρακα δείχνει φλεγμονή ή ερεθισμό του τοιχωματικού υπεζωκότα [1].

### *Υπεζωκοτικό υγρό*

Τα κύρια χαρακτηριστικά του υπεζωκοτικού υγρού είναι: ο όγκος, το πάχος του, η κυτταρική του σύσταση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του.

#### *Όγκος*

Φυσιολογικά μικρή ποσότητα υγρού υπάρχει στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έχει βρεθεί ότι σε κουνέλια οι υπεζωκοτικές κοιλότητες περιέχουν 1 mL υπεζωκοτικού υγρού, ενώ σε σκύλους 2.4 mL [22]. Στο σύνολο του υγρού θα πρέπει να υπολογίζεται και το υγρό που προσκολλάται στην

υπεζωκοτική επιφάνεια. 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:  $V_{pl} = 0.39M^{-0.63}$  [2]. Ο συνολικός όγκος υπεζωκοτικού υγρού σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπεριδρωσία που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική θωρακοσκόπηση υπολογίστηκε σε 0.26 mL/kg [4].

### *Πάχος*

Το μικρό ποσό του υπεζωκοτικού υγρού κατανέμεται σχετικά ομοιόμορφα σε όλη την υπεζωκοτική κοιλότητα και συμπεριφέρεται ως συνεχόμενο σύστημα. Ο Albertine και οι συνεργάτες του μελέτησαν το πάχος του υγρού σε κουνέλια με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους [23]. Βρήκαν ότι το μέσο πλάτος της υπεζωκοτικής κοιλότητας ήταν λίγο μικρότερο στην κορυφή (18.5μm) απ' ότι στο κατώτερο τμήμα (20.3μm), ενώ στις πλευροδιαφραγματικές γωνίες ήταν 1-2mm [23].

### *Κυτταρική σύσταση*

Το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό στα κουνέλια περιέχει σημαντικό ποσό λευκών αιμοσφαιρίων και λίγα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο Miserocchi και Agostoni ανέφεραν ότι σε κουνέλια και σκύλους το υπεζωκοτικό υγρό περιέχει περίπου 2450 και 2200 λευκά αιμοσφαίρια ανά  $mm^3$  [13,22]. Στα κουνέλια το 32% ήταν μεσοθηλιακά κύτταρα, το 61% μονοπύρηνια και το 7% λεμφοκύτταρα. Στους σκύλους το 70% ήταν μεσοθηλιακά κύτταρα, 28% μονοπύρηνια και 2% λεμφοκύτταρα. Στον άνθρωπο το υπεζωκοτικό υγρό, υπό φυσιολογικές συνθήκες, περιέχει περίπου 1700 κύτταρα/ $mm^3$ , από τα οποία 75% μακροφάγα, 24% λεμφοκύτταρα και 1% μεσοθηλιακά κύτταρα [4].

### *Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά*

Στο υπεζωκοτικό υγρό φυσιολογικά υπάρχει μικρό ποσό πρωτεΐνης. Σε κουνέλια η μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 1.33 gr/dL και σε σκύλους 1.06 gr/dL. Η μέση ογκωτική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού στα κουνέλια είναι 4.8 cmH<sub>2</sub>O και σε σκύλους 3.2 cmH<sub>2</sub>O [13,22]. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών δείχνει ότι το ηλεκτροφορητικό μοντέλο του υπεζωκοτικού υγρού είναι παρόμοιο με αυτό του ορού, εκτός από τις πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους όπως η αλβουμίνη, η οποία υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα στο υπεζωκοτικό υγρό [1].

Αξιοσημείωτο είναι ότι, η συγκέντρωση των ιόντων στο υπεζωκοτικό υγρό διαφέρει σημαντικά απ' αυτήν του ορού. Τα διττανθρακικά είναι αυξημένα κατά 20-25% σε σχέση με το πλάσμα, ενώ τα κατιόντα νατρίου είναι μειωμένα κατά 3-5% όπως και τα ανιόντα χλωρίου κατά 6-9%. Η συγκέντρωση των ιόντων καλίου και της γλυκόζης είναι σχεδόν ίδια με του πλάσματος [24]. Η διαφορά των διττανθρακικών παραμένει ακόμα και όταν χορηγείται στο ζώο αναστολέας της ανθρακικής ανυδράσης. Η μερική πίεση του P<sub>CO2</sub> στο υπεζωκοτικό υγρό είναι ίδια με του πλάσματος. Το pH του υπεζωκοτικού υγρού είναι αλκαλικό εξαιτίας των αυξημένων διττανθρακικών, ανταποκρινόμενο στο pH του πλάσματος. Αυτές οι διαφορές στους ηλεκτρολύτες προτείνουν μια ενεργητική διαδικασία που εμπλέκεται στον σχηματισμό του υπεζωκοτικού υγρού [1,4].

## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

### *Διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες*

Ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού προκύπτει από την ισορροπία του υγρού που εισρέει και εκρέει από την υπεζωκοτική κοιλότητα και η οποία διέπεται από τις δυνάμεις του Starling, τη λεμφική παροχέτευση διαμέσου των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα καθώς και από την ανταλλαγή υγρού και ηλεκτρολυτών διά των μεσοθηλιακών κυττάρων του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα. Σύμφωνα με την κλασική εξίσωση του Starling η διαϋπεζωκοτική ροή υγρού ( $J_V$ ) ισούται με τη συνολική διαφορά πίεσης ( $\Delta P$ ) μεταξύ του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα:

$$J_V = L_P S \Delta P$$

Όπου  $J_V$  είναι ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού,  $L_P$  είναι η σταθερά υδατικής διαπερατότητας της μεμβράνης του υπεζωκότα,  $S$  η συνολική επιφάνεια 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 υποϋπεζωκοτικά τριχοειδή,  $P_{liq}$  η υδροστατική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού,  $\pi_{liq}$  η κολλοειδοσμωτική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού,  $\pi_c$  η κολλοειδοσμωτική πίεση στα τριχοειδή και  $\sigma$  μια σταθερά που καθορίζεται από τη διαπερατότητα της μεμβράνης στις πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια [4].

## *Ο ρόλος των πιέσεων στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού*

Η υδροστατική πίεση των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότα είναι περίπου 30 cmH<sub>2</sub>O, αφού αυτά προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία. Η πίεση στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι μικρότερη της ατμοσφαιρικής κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της αναπνοής λόγω των δυνάμεων ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων. Αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως την ένταση και τον τύπο της αναπνοής. Η μέση τιμή της είναι περίπου -5cm H<sub>2</sub>O. Επομένως, υπάρχει μια διαφορά πίεσης 35cm H<sub>2</sub>O, που προκαλεί μετακίνηση υγρού από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα [4].

Όσο αφορά τον περισπλάχνιο υπεζωκότα τα τριχοειδή του προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία, όμως η φλεβική παροχέτευση γίνεται από την πνευμονική κυκλοφορία με αποτέλεσμα η υδροστατική τους πίεση να είναι χαμηλότερη και ίση με 24 cmH<sub>2</sub>O. Η διαφορά μεταξύ της υδροστατικής πίεσης του περισπλάχνιου υπεζωκότα και της πίεσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 29 cmH<sub>2</sub>O και συντελεί στη ροή υγρού από τον περισπλάχνιο υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα (Σχήμα 1). Η κολλοειδοσμωτική πίεση και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα είναι 34 cmH<sub>2</sub>O, ενώ στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι μόνο 5 cmH<sub>2</sub>O, αφού μικρό ποσοστό μεγαλομοριακών ενώσεων μπορεί να περάσει το ενδοθήλιο των τριχοειδών και να εισέλθει στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κολλοειδοσμωτική πίεση είναι αυτή που συγκρατεί το υγρό είτε στην υπεζωκοτική κοιλότητα είτε στα αγγεία, αντίθετα με την υδροστατική πίεση η οποία απωθεί το υγρό από αυτούς τους χώρους. Η διαφορά κολλοειδοσμωτικής πίεσης μεταξύ του τοιχωματικού υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι 29 cmH<sub>2</sub>O και έλκει υγρό

προς τον τοιχωματικό υπεζωκότα. Η ίδια διαφορά (29 cmH<sub>2</sub>O) υπάρχει μεταξύ του περισπλάχνιου υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας, η οποία έλκει υγρό προς τον περισπλάχνιο υπεζωκότα. Λαμβάνοντας υπόψη και την υδροστατική πίεση, τελικά προκύπτει μια διαφορά πιέσεων 6 cmH<sub>2</sub>O, που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και μηδενική διαφορά (αν και αυτό δεν έχει αποδειχθεί πειραματικά) στο επίπεδο του περισπλάχνιου υπεζωκότα (Σχήμα 1) [1].

Το υγρό, επομένως, φυσιολογικά εισέρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα αλλά και από τα αγγεία του περισπλάχνιου υπεζωκότα. Η απομάκρυνση του υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα (Σχήμα 1).



	ΤΟΙΧΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ	ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ
ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	30	-5	24
ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	34	5	34
ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (cm H <sub>2</sub> O)	6	0	

**Σχήμα 1.** Υδροστατικές και κολλοειδοοσμωτικές πιέσεις στον τοιχωματικό, τον πνευμονικό υπεζωκότα και την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τελικά υπάρχει μια διαφορά πίεσης 6 cmH<sub>2</sub>O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

### 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 διαμέσου ημιδιαπερατών μεμβρανών, δηλαδή την παθητική διάχυση και την ενεργητική μεταφορά. Η παθητική διάχυση είναι ο μηχανισμός με τον οποίο συντελείται 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 με τη συμμετοχή πρωτεϊνών που λειτουργούν ως φορείς, με φορά αντίθετη προς το ηλεκτροχημικό πραινές και με κατανάλωση επιπρόσθετης ενέργειας [4].

Η μεταφορά διαμέσου των επιθηλίων γίνεται με δύο τρόπους: α) διακυττάρια, μέσα από τα κύτταρα, με ενεργητική μεταφορά και παθητική διάχυση και β) παρακυττάρια, μεταξύ των κυττάρων. Η διακίνηση ιόντων ή μορίων παρακυτταρίως περιορίζεται από τις στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions) μεταξύ των κυττάρων. Η μετακίνηση μέσω παρακυτταρίων οδών ενώ θεωρούνταν παθητική, κυρίως ως αποτέλεσμα διαφορών υδροστατικών ή ογκωτικών πιέσεων ή κλίσης ιόντων, που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά, σήμερα υποστηρίζεται ότι μπορεί να ρυθμίζεται ενεργά [4].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα είναι μεταβολικά ενεργά και διαθέτουν κυτταρικά χαρακτηριστικά για ενεργητική μεταφορά διαλυμένων ουσιών και ιόντων συμπεριλαμβανομένης και της κυστικής μεταφοράς πρωτεϊνών με ενδοκυττάρωση. Επιπλέον, το μεσοθήλιο αποδείχθηκε, από πρόσφατα πειράματα in vivo και in vitro, ότι είναι λιγότερο διαπερατό, απ' ό,τι πίστευαν παλιότερα, έχοντας χαρακτηριστικά ως προς τη διαπερατότητα παρόμοια με του ενδοθηλίου των μικρών αγγείων [4]. Οι ερευνητές βρήκαν μια σημαντική ελάττωση του ρυθμού απορρόφησης προκλητού υδροθώρακα σε κουνέλια, όταν στο υγρό εμπεριέχονταν ουσίες που εμποδίζουν τη μεταφορά ιόντων, όπως η αμιλορίδη και η ουαμπαΐνη. Έτσι, υποστηρίχθηκε η ύπαρξη

αντιμεταφορέων  $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+ - \text{H}^+ \text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ , καθώς και η ύπαρξη αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  και από τις δύο πλευρές των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα, κορυφαία και βασική επιφάνεια [25,26,27]. Η συγκέντρωση των ιόντων νατρίου βρέθηκε να μειώνεται σε υπέρτονο υδροθώρακα, γιατί το νερό δεν ακολούθησε τη μεταφορά των ιόντων νατρίου [26]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ελάττωση του ρυθμού απορρόφησης με τη προσθήκη αναστολέων σε αυξανόμενου μεγέθους προκλητούς υδροθώρακες σε κουνέλια, ήταν ανεξάρτητη από τον όγκο του υπεζωκοτικού υγρού, με βάση την αναστολή της ενεργητικής μεταφοράς [28], ενώ η λεμφαγγειακή παροχέτευση αυξήθηκε ανάλογα με την αύξηση του όγκου του υγρού [29]. Επιπλέον, υπάρχουν αποδείξεις ενεργητικής μεταφοράς από τα μεσοθηλιακά κύτταρα χωρίς τη χρήση αναστολέων. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί αντιστροφή της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού, όταν τα ιόντα του νατρίου ή του χλωρίου αντικαταστάθηκαν από ουσίες που δεν διαχέονται [27]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ενεργητική μεταφορά ενισχύεται μετά από διέγερση των  $\beta_2$  αδρενεργικών υποδοχέων σε προκλητούς υδροθώρακες που περιέχουν 1% αλβουμίνη [30,31].

Τα αποτελέσματα από τις ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες των πετάλων του υπεζωκότα είναι αντιφατικά. Έρευνες που διεξήχθησαν σε τοιχωματικό και περισπλάχνιο υπεζωκότα προβάτου και σκύλου δεν έδειξαν ανάπτυξη διαφοράς δυναμικού όπως θα αναμένονταν αν η μεταφορά ήταν ενεργητική, αλλά ότι συμπεριφέρονται ως εξαιρετικά διαπερατές μεμβράνες [32,33]. Αυτή η υψηλή διαπερατότητα και των δύο πετάλων του υπεζωκότα θα μπορούσε να ερμηνεύσει την απουσία ενεργητικής μεταφοράς, παρόλο που το μεσοθήλιο διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά που απαιτεί η ενεργητική

μεταφορά. Διαφορά δυναμικού βρέθηκε να υπάρχει σε περισπλάχνιο υπεζωκότα ποντικίου και σε τοιχωματικό υπεζωκότα σκύλου [3,34]. Παρόλα αυτά, το υπεζωκοτικό υγρό είναι πιο αλκαλικό από το πλάσμα και αυτή η διαφορά είναι δύσκολο να διατηρηθεί αν το μεσοθήλιο είναι εξαιρετικά διαπερατό. Από την άλλη πλευρά, μελέτες έχουν δείξει μείωση της διαπερατότητας τόσο του τοιχωματικού όσο και του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου, μετά την προσθήκη ουσιών που εμποδίζουν τη διακίνηση ιόντων αλλά και ορμονών όπως η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη [35,36].

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

Η παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού διά των λεμφαγγείων του υπεζωκότα ερμηνεύει την απουσία συσσώρευσης υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η υπεζωκοτική κοιλότητα επικοινωνεί με τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα διαμέσου των στομάτων αυτού. Τέτοια στόματα δεν υπάρχουν στον περισπλάχνιο υπεζωκότα. Πρωτεΐνες, κύτταρα και άλλα σωματίδια απομακρύνονται από την υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Το ποσό του υγρού που παροχετεύεται είναι σταθερό. Ο Stewart βρήκε ότι η μέση λεμφαγγειακή ροή από την υπεζωκοτική κοιλότητα σε επτά ασθενείς ήταν 0.40 mL/Kg/ώρα, ενώ οι Leckie και Tothill βρήκαν ότι η μέση λεμφαγγειακή ροή σε επτά ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ήταν 0.22 mL/Kg/ώρα. Σ' αυτές τις μελέτες σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών. Ανάγοντας αυτά τα αποτελέσματα σε φυσιολογικό

άτομο με βάρος 60Kg θα έχουμε λεμφαγγειακή παροχέτευση από κάθε υπεζωκοτική κοιλότητα περίπου 20 mL/ώρα ή 500 mL/ημέρα [1].

Η λεμφαγγειακή ροή από την υπεζωκοτική κοιλότητα σε φυσιολογικές συνθήκες είναι 0.02 mL/Kg/ώρα, όπως υπολογίστηκε σε σκύλους μετά από έγχυση ραδιοσημασμένης αλβουμίνης 0.5 mL στην κοιλότητα, ενώ σε κουνέλια είναι μεγαλύτερη 0.07 mL/Kg/ώρα [37,38]. Αυτή αντιπροσωπεύει τη συνολική λεμφαγγειακή ροή από την υπεζωκοτική κοιλότητα που συμπεριλαμβάνει τη ροή μέσω των λεμφαγγείων του διάμεσου ιστού, τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα, καθώς επίσης και την διάχυση και ενδοκυττάρωση [4]. Η σημαντική ελάττωση του ποσού της ραδιοσημασμένης αλβουμίνης στο αίμα μετά από απολίνωση του θωρακικού πόρου δείχνει ότι τα στόματα των λεμφαγγείων δεν είναι η κύρια οδός απομάκρυνσης του υγρού, αλλά ότι η αλβουμίνη απομακρύνεται και δια των λεμφαγγείων του διάμεσου ιστού [39]. Η ακριβής συμμετοχή της κάθε οδού, όπως της διάχυσης και ενδοκυττάρωσης, στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών χρειάζεται να προσδιοριστεί ώστε να καθοριστεί η λεμφαγγειακή ροή μέσω των στομάτων. Η λεμφαγγειακή ροή μέσω των στομάτων είναι αναγκαία για την απομάκρυνση μικροσωματιδίων και κυττάρων από την υπεζωκοτική κοιλότητα, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό [28,40,41], μετά από διέγερση β αδρενεργικών υποδοχέων των λείων μυικών ινών των λεμφαγγείων [42] και κυρίως με την αύξηση του όγκου του υγρού [29,40,43]. Υπό αυτές τις συνθήκες η λεμφαγγειακή ροή μέσω των στομάτων αντιπροσωπεύει τον πιο αποτελεσματικό τρόπο περιορισμού της συσσώρευσης υγρού και γίνεται ο

κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης υγρού σε παθολογικές καταστάσεις [44-46].

Ωστόσο, ο ρόλος του περισπλάχνιου υπεζωκότα στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού έχει υποβαθμιστεί εξαιτίας των διαφορετικών απόψεων σχετικά με το μεσοθήλιο. Άλλοι υποστηρίζουν ότι είναι διαπερατό [47], άλλοι ότι είναι σχεδόν στεγανό [44-46] και άλλοι ότι δεν υπάρχει κλίση πιέσεων για την απορρόφηση υγρού διά του περισπλάχνιου υπεζωκότα [47]. Άμεσες και έμμεσες αποδείξεις υποστηρίζουν ότι το μεσοθήλιο δεν είναι τόσο διαπερατό όσο θεωρούνταν παλιότερα, έτσι η διαπερατότητά του στο νερό και σε διαλυμένες ουσίες μοιάζει με αυτή του ενδοθηλίου των τριχοειδών και παρουσιάζει ενεργητική μεταφορά ουσιών και υγρού [25-28,48-50]. Από την άλλη, σε αρκετές έρευνες έχει παρατηρηθεί κλίση πίεσης κατά πλάτος του περισπλάχνιου υπεζωκότα που οδηγεί σε απορρόφηση υγρού [45,51].

Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα μπορούν να μειώνουν την υδροστατική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού δρώντας ως αντλίες. Πραγματικά, 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 εξωγενώς από τις ίνες του διαφράγματος [52], τα λεμφαγγεία των πνευμόνων από τις δυνάμεις ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων [53]). Το υγρό σε υπο-ατμοσφαιρικές 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 μια κατεύθυνση, λειτουργώντας σαν βαλβίδα [4].

### *Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού με ενδοκυττάρωση*

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η κυστική μεταφορά υγρού που σχετίζεται με ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών αντιπροσωπεύει μια επιπρόσθετη οδό για την απορρόφηση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Είναι γνωστό ότι, τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν κυτταροπλασματικά κυστίδια [48-50,54-58]. Ενδοκυττάρωση μακρομορίων έχει βρεθεί στο μεσοθήλιο του τοιχωματικού πετάλου του περικαρδίου [59]. Σε *in vivo* πειράματα σε κουνέλια, όπου χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της ενδοκυττάρωσης (νοκοδαζόλη), βρέθηκε ότι μειώνεται σημαντικά η απορρόφηση ραδιοσημασμένων μακρομορίων που εγχύθηκαν στην υπεζωκοτική κοιλότητα και η εμφάνισή τους στο πλάσμα [60]. Υπολογίστηκε ότι με την ενδοκυττάρωση απομακρύνονται περίπου 160 μg/Kg/ώρα αλβουμίνης και 18 μg/Kg/ώρα υπεζωκοτικού υγρού [60]. Η αλβουμίνη στη συνέχεια μεταφέρεται από τα λεμφαγγεία του διάμεσου ιστού, τα οποία συμβάλλουν σταθερά στη συνολική λεμφαγγειακή παροχέτευση της αλβουμίνης και του υγρού. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν έναν σχετικό ρόλο της ενδοκυττάρωσης των πρωτεϊνών στον έλεγχο της κολλοειδοσμωτικής πίεσης του υπεζωκοτικού υγρού καθώς και της διακίνησής του. Επομένως, φαίνεται ότι η λεμφαγγειακή ροή διά των στομάτων δεν είναι η μοναδική οδός απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από την υπεζωκοτική κοιλότητα και ο ρόλος τους στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού ίσως να έχει υπερεκτιμηθεί.

## ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Η αύξηση του όγκου του υπεζωκοτικού υγρού αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα της επιπλέον συσσώρευσης υγρού, που επιφέρει αλλαγές στην ισορροπία των διαϋπεζωκοτικών πιέσεων και αυξάνει τη λεμφαγγειακή παροχέτευση, μετατοπίζοντας την ισορροπία της ροής υγρού προς την 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 στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού. Αυτό εξηγείται ως εξής: όταν αυξάνει ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού προκαλείται: 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 περισπλάχνιου υπεζωκότα, 2) αν ο υδροθώρακας προκληθεί με υγρό χωρίς πρωτεΐνη, τότε η μειωμένη κολλοειδοσμωτική 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 μυικών ινών των λεμφαγγείων) προκαλεί αύξηση της απορρόφησης του υγρού διαμέσου των στομάτων των λεμφαγγείων [4].

### *Υπεζωκοτική συλλογή*

Οι αιτίες που προκαλούν συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:



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

Οι παράγοντες που μεταβάλλουν την ισορροπία των δυνάμεων Starling είναι κυρίως εξωϋπεζωκοτικοί, αυτοί που μειώνουν τη 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 [4]. 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 *διιδρώματα* (με φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υγρό) και *εξιδρώματα*. Στην κλινική πράξη ο διαχωρισμός των διιδρωμάτων από τα εξιδρώματα γίνεται με τα κριτήρια του Light [1]. Σύμφωνα με αυτά, στα εξιδρώματα ο λόγος της συγκέντρωσης πρωτεΐνης υγρού/ πρωτεΐνη πλάσματος είναι μεγαλύτερος από 0.5, ο λόγος LDH υγρού/ LDH πλάσματος είναι μεγαλύτερος από 0.6 ή η LDH υγρού είναι μεγαλύτερη από τα 2/3 της ανώτερης φυσιολογικής τιμής LDH του πλάσματος.

### *Διιδρώματα*

Τα διιδρώματα 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 ενδοθηλίου των τριχοειδών και του μεσοθηλίου δεν επηρεαστούν. *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 περισπλάχνιο 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 (μεμονωμένη *δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια* ή *χρόνια πνευμονική υπέρταση*). 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 διάμεσου 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 διιδρωμάτων είναι η *περιοριστική περικαρδίτιδα*, η *υπερφόρτωση υγρών σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση*, η *χρόνια νεφρική ανεπάρκεια* (που προκαλεί αύξηση του όγκου του πλάσματος) και η *υπολευκωματιναιμία*. Επίσης, σε *ατελεκτασία* ή σε <<παγιδευμένο>> πνεύμονα εξαιτίας σχηματισμού ινώδους κάψας γύρω από τμήμα του πνεύμονα ως επακόλουθο φλεγμονής, η μειωμένη υδροστατική πίεση στο υπεζωκοτικό υγρό ευνοεί τη διήθηση υγρού προς την κοιλότητα.

Διιδρωματικό υγρό μπορεί να συσσωρεύεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου μη φυσιολογικών οδών, όπως μέσω *διαφραγματικών ελλειμμάτων* λόγω της υπάρχουσας διαφοράς πίεσης μεταξύ της κοιλίας και της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Αυτό συμβαίνει σε μερικές περιπτώσεις κίρρωσης του ήπατος και σε μη εμφανή ασκίτη [1,4,61].

### *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 διαπερατής μεσοθηλιακής μεμβράνης. *Η μείωση της λεμφαγγειακής παροχέτευσης* μπορεί να είναι η πρωταρχική αιτία ενός εξιδρώματος. Πραγματικά, η φυσιολογική λεμφική ροή διαμέσου των στομάτων, εκτός από τη συμβολή της στην απομάκρυνση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κολλοειδοσμωτικής πίεσης του υγρού σε χαμηλά επίπεδα, αφού απομακρύνει τις πρωτεΐνες από το υγρό. Όταν η κολλοειδοσμωτική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού αυξάνει, αλλάζει η ισορροπία των πιέσεων στα πέταλα του υπεζωκότα ευνοώντας τη διήθηση και εμποδίζοντας την απορρόφηση του υγρού. Η συλλογή του υγρού σε αρχικό στάδιο είναι *διίδρωμα* στη συνέχεια μετατρέπεται σε *εξίδρωμα* ακόμα και χωρίς να μεταβληθούν τα χαρακτηριστικά της διαπερατότητας του φραγμού. Μειωμένη λεμφική ροή μπορεί να υπάρχει σε βλάβη των λεμφαγγείων, όπως *διήθηση του υπεζωκότα από φλεγμονή ή κακοήθεια, σε απόφραξη των στομάτων από εναπόθεση ινικής σε τελικά στάδια παραπνευμονικών συλλογών*, ή να είναι αποτέλεσμα διαταραχών εξωϋπεζωκοτικών λεμφαγγείων, όπως σε

υποπλασία του λεμφικού συστήματος, απόφραξη των μεσοθωρακικών λεμφαγγείων ή του θωρακικού πόρου. Επίσης αύξηση της συστηματικής φλεβικής πίεσης (καρδιακή ανεπάρκεια, συμπίεστική περικαρδίτιδα, σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας) μπορεί να μειώσει την απορρόφηση του υγρού λόγω αυξημένης πίεσης στον θωρακικό πόρο [62-65].

Η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών και του μεσοθηλίου αποτελεί τη βάση στη δημιουργία των περισσότερων εξιδρωμάτων. Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνει με δύο μηχανισμούς: 1) με τη δημιουργία νέων ανοιγμάτων (οπών) μεταξύ των κυττάρων, ως επακόλουθο της συστολής των κυττάρων και 2) με διακυττάρειες οδούς, πιθανώς 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 αυτών, έτσι είναι μεγαλύτερη η διαπερατότητα στο νερό και σε μικρομόρια, ενώ η διαπερατότητα για τα μεγάλα μόρια είναι περιορισμένη. Στη δεύτερη περίπτωση αυξάνει και η διαπερατότητα σε μακρομόρια. Πολλές ουσίες έχουν βρεθεί που προκαλούν αυτές τις αλλαγές στο ενδοθήλιο [66]. Στο μεσοθήλιο μπορεί να συμβαίνουν κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς, αφού ουσίες που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου έχουν βρεθεί σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές. Η προέλευση αυτών των ουσιών μπορεί να είναι είτε εξωυπεζωκοτική, είτε από τα ίδια τα μεσοθηλιακά κύτταρα, αφού τα ενεργοποιημένα μεσοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν ένα ευρύ φάσμα χημειοκινών, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, που επιδρούν στη διαπερατότητα. Αυτό με τη σειρά του επηρεάζει την είσοδο στην υπεζωκοτική κοιλότητα φλεγμονωδών κυττάρων, που παράγουν μεσολαβητές της

φλεγμονής και επιφέρουν και άλλες αλλαγές στο μεσοθηλιακό φραγμό. Κυτταρικοί μηχανισμοί θεωρείται ότι εμπλέκονται στη δημιουργία των εξιδρωμάτων που σχετίζονται με όλες τις μορφές *τοπικής φλεγμονής* (πνευμονία, εμβολή, πλευρίτιδα σε νοσήματα του κολλαγόνου), *εξωυπεζωκοτικής φλεγμονής* (παγκρεατίτιδα) και *κακοήθειες*, που συχνά σχετίζονται με ελάττωση της λεμφικής ροής, εξαιτίας διήθησης υπεζωκοτικών ή μεσοθωρακικών λεμφαδένων [1,4,61].

Η *παραπνευμονική συλλογή* είναι φλεγμονώδες εξίδρωμα με πολυμορφοπυρηνικό τύπο, που παρατηρείται σε πνευμονία και υποϋπεζωκοτικές φλεγμονές (συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που συμβαίνουν στον τοιχωματικό υπεζωκότα, όπως σε χρόνια περικαρδίτιδα, σε παγκρεατίτιδα και υποδιαφραγματικά αποστήματα). Οι μηχανισμοί και τα *στάδια* που χαρακτηρίζουν την παραπνευμονική συλλογή είναι τα εξής:

- κατά τη διάρκεια φλεγμονής σε υποϋπεζωκοτικές κυψελίδες, ο διάμεσος ιστός των πνευμόνων γεμίζει με υγρό πλούσιο σε πρωτεΐνες (εξαιτίας της αγγειοδιαστολής, της αυξημένης υδροστατικής πίεσης και της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου). Η αυξημένη υδροστατική πίεση των τριχοειδών και του διαμέσου χώρου υπερβαίνει την αυξημένη επίσης κολλοειδοσμητική του διαμέσου χώρου και οδηγεί σε διήθηση υγρού διαμέσου του περισπλάχνιου υπεζωκότα και στη δημιουργία διιδρώματος, αν το μεσοθήλιο διατηρεί τις φυσιολογικές διηθητικές του ιδιότητες (*αρχικό στάδιο*) [67].
- Αυτό, βέβαια, είναι παροδικό, γιατί στη συνέχεια φλεγμονώδη κύτταρα και μεσολαβητές της φλεγμονής αλληλεπιδρούν με τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Ακολουθεί άμεση βλάβη του μεσοθηλίου με απώλεια της

εκλεκτικότητας του μεσοθηλιακού φραγμού και δημιουργείται μικρή πολυμορφοποιητική σειρά εξιδρωματική συλλογή (*τριχοειδική διαφυγή ή εξιδρωματικό στάδιο*) [67].

- Σε προχωρημένο στάδιο, αν επιδεινωθεί η βλάβη του ενδοθηλίου και του μεσοθηλίου, αυξάνει ο σχηματισμός υπεζωκοτικού υγρού και μπορεί να εισέλθουν μικρόβια στην υπεζωκοτική κοιλότητα (*μικροβιακή εισβολή ή ινωδοπυώδες στάδιο*), καθώς επίσης και να σχηματιστούν διαφράγματα ινικής, που αυξάνουν ακόμα περισσότερο τη διαπερατότητα και εμποδίζουν την απομάκρυνση του υγρού. Πράγματι, στα εξιδρώματα συμβαίνει και διαταραχή στη διακίνηση του ινώδους, δηλαδή αυξημένη προπηκτική δραστηριότητα και μειωμένη ινωδολυτική (το αντίθετο συμβαίνει στα διιδρώματα) [67].

## ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας που επιτρέπει στο κυτταρόπλασμα να διατηρεί σύσταση διαφορετική από εκείνη του εξωκυττάριου χώρου.

Καθημερινά απορροφούνται περίπου 180 λίτρα υγρού από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, 9 λίτρα την ημέρα από το επιθήλιο του λεπτού εντέρου και περισσότερα από 700 mL την ημέρα από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, αλλά υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τους μηχανισμούς [68]. Περισσότερα από 100 χρόνια πριν, ανακαλύφθηκε ότι η απορρόφηση υγρού από το έντερο απαιτεί ακέραιο επιθήλιο και ότι η διακίνηση υγρού διαμέσου της μεμβράνης γίνεται χωρίς να υπάρχει κάποια οσμωτική δύναμη [69]. Έκτοτε πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μας έδωσαν τη δυνατότητα σήμερα να γνωρίζουμε τους βασικούς μηχανισμούς που διέπουν τη διαμεμβρανική μεταφορά ύδατος και ουσιών. Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η μεταφορά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, είτε αυτή αφορά στη μετακίνηση μέσα από τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα, είτε μέσα από τις πρωτεΐνες της μεμβράνης, είναι η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά.

### *Διάχυση*

Διάχυση είναι η τυχαία διακίνηση ουσιών, μόριο με μόριο, μέσα από χώρους που παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων στη μεμβράνη, είτε σε συνδυασμό με πρωτεΐνη φορέα. Η διάχυση επιτελείται με τη συνήθη κινητική ενέργεια της ύλης. Τα ιόντα διαχέονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα μόρια, καθώς επίσης και τα αιωρούμενα κολλοειδή σωματίδια, με τη διαφορά

ότι τα κολλοειδή κινούνται με πολύ μικρότερη ταχύτητα εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους [69].

### *Ενεργητική Μεταφορά*

Η ενεργητική μεταφορά συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή άλλων ουσιών, διαμέσου της μεμβράνης, με τη συμμετοχή μιας πρωτεΐνης φορέα. Επιπλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πρσανές, όπως από χαμηλή συγκέντρωση προς υψηλή συγκέντρωση, διεργασία για την οποία απαιτείται επιπρόσθετη ενέργεια εκτός από την κινητική για την πραγματοποίηση της μετακίνησης [69,70].

### *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 στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από εκείνες της μεμβράνης που βλέπει προς την άλλη πλευρά.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου των νεφρών αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της πολικότητας. Το συμπλήρωμα των μεταφορικών πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ψηκτροειδή παρυφή που βλέπει προς τον αυλό του λεπτού εντέρου ή του ουροφόρου σωληναρίου διαφέρει ως προς τη σύσταση των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας της μεμβράνης του κυττάρου. Οι στενές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν τη μίξη των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας των



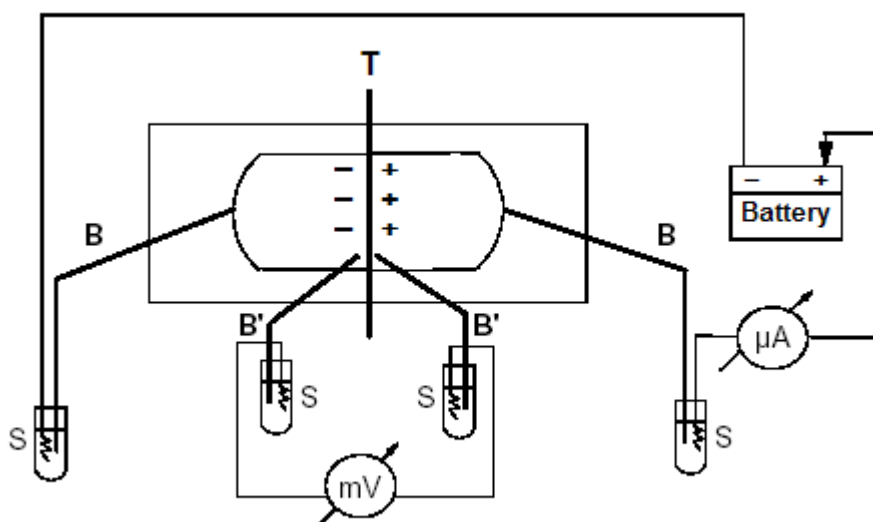
κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της κορυφαίας, διατηρώντας έτσι την πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν τη δίοδο ύδατος και μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι, υπάρχουν δυο τύποι οδών μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: (α) διακυτταρικές οδοί, μέσα από τα κύτταρα και (β) παρακυττάρια οδοί, μεταξύ των κυττάρων [70].

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που αναφέρθηκαν. Η διακίνηση μέσω των παρακυτταρίων οδών περιορίζεται από τις στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων [71,72]. Η μεταφορά στις παρακυττάρια οδούς θεωρούνταν παθητική, κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων, που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά ιόντων [73,74]. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται ενεργά [75-78].

### ***Μελέτη Διαπερατότητας Βιολογικών Μεμβρανών – Μέθοδος Ussing System***

Η μέθοδος Ussing System αποτελεί μια κλασσική μέθοδο μελέτης διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών [79]. Όταν ο Hans Ussing επινόησε τη συσκευή που αργότερα πήρε το όνομά του, δεν θα μπορούσε να γνωρίζει την ευρύτητα των εφαρμογών για την οποία θα χρησιμοποιούνταν [80]. Ο θάλαμος αρχικά σχεδιάστηκε προκειμένου να μελετηθεί η ενεργητική μεταφορά ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχου. Σήμερα η μέθοδος χρησιμοποιείται για ποικιλία εφαρμογών που κυμαίνονται από την μελέτη της

ακεραιότητας κυτταρικών στρωμάτων έως και τη μελέτη της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και σε μελέτες απορρόφησης φαρμάκων [81,82]. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου φαίνεται στο Σχήμα 2. Ο ιστός (**T**) είναι τοποθετημένος σαν επίπεδο στρώμα σε μια 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 βολτόμετρο (mV). Με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) και ενός διαιρέτη τάσης ( $\mu A$ ), ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B**, **B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm έκαστο από την επιφάνεια του ιστού.



**Σχήμα 2.** Διάγραμμα της συσκευής *Ussing System*. **B**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (**S**) για την 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. (Stefanidis et al, 2005)

Το Ussing System στην βασική του μορφή αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη. Το ένα από αυτά είναι ο θάλαμος αυτός καθ' αυτός, ενώ το δεύτερο είναι το ηλεκτρικό κύκλωμα που προσαρμόζεται επάνω του. Η ποικιλία των εφαρμογών της διάταξης οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία των μετατροπών που έχουν υποστεί τα δύο αυτά μέρη προκειμένου να προσαρμόζεται κατά περίπτωση στις ανάγκες των πειραμάτων. Με την πάροδο του χρόνου έχουν αναπτυχθεί αρκετές παραλλαγές του συστήματος του Ussing, ούτως ώστε σήμερα να είναι δυνατή πέραν της μέτρησης της διαφοράς δυναμικού, της έντασης του ρεύματος, της αντίστασης του δείγματος και η μέτρηση παραμέτρων όπως η χωρητικότητα και η εμπέδισή του συστήματος.

Η αρχική σχεδίαση της διάταξης του Ussing επέτρεπε στον εφευρέτη του να προσαρμόζει και να μελετά το δέρμα του βατράχου. Αυτό ήταν σχετικά εύκολο δεδομένης της αντοχής και της ελαστικότητας του συγκεκριμένου ιστού. Αν ο θάλαμος είχε περιοριστεί στο αρχικό του σχήμα, δεν θα είχε επεκταθεί με τόση επιτυχία στα διάφορα ερευνητικά κέντρα. Ωστόσο, η ανάπτυξη θαλάμων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ακόμη και τα μικρότερα κομμάτια ζωντανού ιστού μέσω εφαρμογής μικροχειρουργικών τεχνικών, καθώς και η δυνατότητα ορισμένων οργάνων να μελετούν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες κυτταρικών σειρών που έχουν αναπτυχθεί πάνω σε ειδικά σχεδιασμένους θαλάμους, έχουν αναδείξει το σύστημα του Ussing σε ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα και ακριβή συστήματα μελέτης της συμπεριφοράς ζωντανών επιθηλίων.

Σήμερα οι διάφοροι θάλαμοι του Ussing, κατηγοριοποιούνται στους κυκλοφορούντες θαλάμους (Circulating Chambers) και στους συνεχώς

διηθούμενους θαλάμους (Continuously Perfused Chambers). Οι δύο αυτοί βασικοί τύποι θαλάμων έχουν αρκετές διαφορές στη δομή και τη λειτουργία τους. Ο κυκλοφορούντες θάλαμοι, είναι αυτοί που έχουν επικρατήσει σαν πρότυπο στα περισσότερα εργαστήρια λόγω της απλότητας στην κατασκευή, λειτουργία, χρήση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι συνεχώς διηθούμενοι θάλαμοι ωστόσο προσφέρουν αρκετές εναλλακτικές λειτουργίες και μετρήσεις μη διαθέσιμες στα μοντέλα των κυκλοφορούντων θαλάμων.

*Μετρήσεις με τους θαλάμους του Ussing*

### **Αντίσταση R**

Οι επιθηλιακές μεμβράνες εμφανίζουν δύο χαρακτηριστικά που τις διαχωρίζουν από τους υπόλοιπους ιστούς: την πολικότητα και την ιστική συνοχή. Με τον όρο πολικότητα αναφερόμαστε στη μετρούμενη διαφορά δυναμικού που δημιουργείται λόγω της ασύμμετρης κατανομής των πρωτεϊνών μεταξύ της κορυφαίας (apical) και βασικής (basolateral) επιφάνειας του επιθηλίου. Με τον όρο συνοχή του ιστού αναφερόμαστε στο μέτρο της ακεραιότητας και της αντίστασης του ιστού τόσο σε ηλεκτρικές όσο και μηχανικές καταπονήσεις όπως αυτό προκύπτει από το σχηματισμό πρωτεϊνικών διασυνδέσεων με τον όνομα Tight Junctions (Στενές Συνδέσεις). Οι σύνδεσμοι αυτοί διαχωρίζουν τις δύο επιθηλιακές επιφάνειες και η πυκνότητα τους καθορίζει την συνοχή του ιστού ως μετρήσιμο μέγεθος.

Η συνοχή ενός ιστού μπορεί να προσδιορισθεί με τη βοήθεια του μετρήσιμου μεγέθους της ηλεκτρικής αντίστασής του. Την αρχή αυτή διατύπωσε ο ίδιος ο εφευρέτης του συστήματος, Hans Ussing. Όπως είναι γνωστό η αντίσταση ενός υλικού δίνεται από την εξίσωση:

$$R = \rho \cdot l / A \quad (1)$$

Όπου R η ωμική αντίσταση του υλικού, ρ η ειδική αντίσταση του υλικού που οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, l το πάχος του υλικού κατά τη φορά του ρεύματος και A το εμβαδόν της περιοχής που μετράται.

Είναι σαφές από τα παραπάνω πως όταν διατηρούνται σταθερά τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του υλικού l και A, η αντίσταση που εμφανίζει οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, που ως εκ τούτου αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής.

Προκειμένου να μετρηθεί η συνολική αντίσταση της μεμβράνης με τη χρήση του συστήματος του Ussing, είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτό έχει σαν 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) [81].

Το μειονέκτημα της σύνδεσης δυναμικού, είναι η μετακίνηση ηλεκτρολυτών διαλυμένων στο κυτταρόπλασμα κατά τη φορά της εφαρμοζόμενης διαφοράς τάσης. Το φαινόμενο αυτό της ιοντικής μετανάστευσης 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* [81].

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, προτάθηκε και χρησιμοποιείται η μέτρηση με Σύνδεση Ρεύματος (Current Clamp). Αντίθετα με την τεχνική του Voltage Clamp, 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 [81].

## ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

### *Ιστορικά στοιχεία*

Το μεσοθήλιο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Bichat το 1827 [83]. Με χρήση ιστολογικών τεχνικών, παρατήρησε ότι οι ορογόνες κοιλότητες καλύπτονται από μια μονήρη στοιβάδα αποπλατυσμένων κυττάρων, παρόμοιων με αυτά των λεμφαγγείων. Το 1880, ο Minot εισήγαγε τον όρο «μεσοθήλιο» [84]. Εμβρυολογικά το μεσοθήλιο αναπτύσσεται από το μεσόδερμα μεταξύ της 8ης και της 18ης ημέρας από την έναρξη της κυοφορίας, ανάλογα με το είδος [85,86]. Στους ανθρώπους αναπτύσσεται την 14<sup>η</sup> ημέρα, με την σταδιακή διαφοροποίηση των σφαιρικών και κυβοειδών κυττάρων σε επιμήκη αποπλατυσμένα κύτταρα που καλύπτουν την εμβρυική σπλαχνική κοιλότητα [85].

Παρόλο που το μεσοθήλιο ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε τόσο παλιά, ο σημαντικός του ρόλος στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία άρχισε να γίνεται γνωστός πρόσφατα. Δεν πρόκειται αποκλειστικά και μόνο για μία στοιβάδα που απλά καθορίζει τα όρια των οργάνων και εμποδίζει τη μεταξύ τους προσκόλληση, αλλά και για μια δυναμική δομή που ρυθμίζει την ανταπόκριση των ορογόνων μεμβρανών κατά τον τραυματισμό, την λοίμωξη και την ασθένεια.

### *Δομή των μεσοθηλιακών κυττάρων και του μεσοθηλίου*

Το μεσοθήλιο εκτείνεται σε όλη την επιφάνεια των τριών ορογόνων κοιλοτήτων (υπεζωκοτική, περικαρδιακή, περιτοναϊκή) και στους άρρενες

επενδύει τον σάκο που περιβάλλει τους όρχεις (ελυτροειδή χιτώννα). Το μεσοθήλιο που καλύπτει τα όργανα ονομάζεται περισπλάχνιο, ενώ αυτό που καλύπτει το τοίχωμα ονομάζεται περίτονο ή τοιχωματικό. Μορφολογικές μελέτες του μεσοθηλίου σε διάφορα είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων αρουραίων, ποντικών, ινδικών χοιριδίων, σκύλων, κουνελιών, αλόγων, προβάτων και ανθρώπων, έχουν δείξει ότι με ελάχιστες εξαιρέσεις, το μεσοθήλιο των θηλαστικών είναι όμοιο [55,57,87-100]. Επιπροσθέτως ιστοχημικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τα ανωτέρω [101,102].

### *Υπερδομή των μεσοθηλιακών κυττάρων*

Το μεσοθήλιο αποτελείται κυρίως από αποπλατυσμένα κύτταρα και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από κυβοειδή κύτταρα. Ανάλυση της υπερδομής των δύο ειδών μεσοθηλιακών κυττάρων, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχει δείξει διαφορές αναφορικά με τον πυρήνα τους και τα κυτταρικά τους οργανίδια. Ο πυρήνας των αποπλατυσμένων κυττάρων έχει σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές, ενώ των κυβοειδών είναι μεγαλύτερος και περιέχουν διακριτό πυρηνίσκο [55,89,95,103].

Τα οργανίδια των αποπλατυσμένων κυττάρων εντοπίζονται κεντρικά, κοντά στον πυρήνα. Αυτά τα κύτταρα περιέχουν μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια, γλυκογόνο, λίγα μιτοχόνδρια, όχι καλά ανεπτυγμένο σύστημα Golgi και μικρή ποσότητα κοκκιώδους ενδοπλασματικού δικτύου [89,90,95,103]. Τα κυβοειδή κύτταρα διαθέτουν πολλά μιτοχόνδρια και κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο, καλά ανεπτυγμένο σύστημα Golgi, μικροσωληνίσκους και μεγαλύτερη ποσότητα μικρονηματίων, συνιστώντας περισσότερο μεταβολικά ενεργά κύτταρα [55,90,103].



### *Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων*

Ο κύριος ρόλος που είχε αποδοθεί στα μεσοθηλιακά κύτταρα ήταν αυτός του προστατευτικού φραγμού έναντι τραυματισμών και εισβολής μικροοργανισμών, καθώς και ο ρόλος της επιφάνειας που θα παρείχε τις ελάχιστες των τριβών προκειμένου να διασφαλίζεται η ομαλή κίνηση οργάνων και ιστών που βρίσκονται σε επαφή. Παρόλα αυτά πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν πολλές λειτουργίες [84].

### *Προστατευτικός φραγμός*

Το μεσοθήλιο συνιστά ένα προστατευτικό φραγμό κατά των τραυματισμών και της δυνητικής εισβολής μικροοργανισμών. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω των στενών συνδέσεων, και εκκρίνουν στην επιφάνειά τους γλυκοζαμίνες, κυρίως υαλουρονικό οξύ, το οποίο συναθροιζόμενο συνιστά περικυτταρικά περιβλήματα γύρω από τις μικρολάχνες. Η δομή αυτή προστατεύει τα μεσοθηλιακά κύτταρα από τραυματισμό λόγω τριβής και από μολυσματικούς παράγοντες. Το υαλουρονικό οξύ ενδέχεται να παίζει ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και να εμποδίζει τον σχηματισμό συμφύσεων και τη διασπορά κυττάρων προερχόμενα από όγκους. Επίσης, τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν φωσφατιδυλχολίνη, το μείζον συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμονικών κυψελίδων, που λειτουργεί ως λιπαντικό για να μειώνει την τριβή μεταξύ των ορογόνων μεμβρανών, λειτουργία ιδιαίτερα σημαντική και κατά τη διάρκεια της αναπνοής [2,104-110].

## *Παρουσίαση αντιγόνου*

Η αντιγονική παρουσίαση και η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων είναι τα πρώτα βήματα στην παραγωγή μιας συγκεκριμένης ανοσολογικής απάντησης. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου του ανθρώπου διεγείρουμε από ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), επάγουν τον πολλαπλασιασμό των CD4+ βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων υπό την παρουσία αντιγόνου. Το μόριο ενδοκυττάριας προσκόλλησης-1 (ICAM-1) είναι το μείζον συνεργό μόριο για την παρουσίαση αντιγόνου από αυτά τα κύτταρα [111]. Υπό την παρουσία IFN-γ, τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-15 (IL-15), μια πλειοτροπική κυτταροκίνη, η οποία πιθανόν να συνεργάζεται με τη ιντερλευκίνη-2 (IL-2) στην έναρξη της ανοσολογικής απάντησης [111].

## *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, 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 [112]. Ωστόσο, πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ προερχόμενο από επιφάνεια καλλιέργειας μεσοθηλιακών κυττάρων απέτρεψε την προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων στο υαλουρονικό των

μεσοθηλιακών κυττάρων, πιθανότατα λόγω σύνδεσής του με τα μόρια CD44 των νεοπλασματικών κυττάρων [113].

### *Μεταφορά διαλυτών και κυττάρων*

Το μεσοθήλιο εμπλέκεται ενεργά στη διακίνηση και μεταφορά υγρού και κυττάρων στις ορογόνες κοιλότητες διαμέσου της ενεργητικής μεταφοράς ηλεκτρολυτών [2,4,25-28,30,33,35,36,42,68,84,114-119], των πινοκυτταρικών κυστιδίων [2,4,59,60], των ενδοκυτταρικών συνδέσμων [2,4,71,105] και των στομάτων [2,4,29,93,94,120-126].

### *Έναρξη και λύση της φλεγμονής και ιστική επιδιόρθωση*

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στην έναρξη και λύση της φλεγμονής των ορογόνων μεμβρανών καθώς επίσης και στην επιδιόρθωσή τους. Αυτή η λειτουργία επιτυγχάνεται με την έκκριση προϊόντων της διαδικασίας της πήξεως, κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων, προσταγλανδινών, αντιοξειδωτικών ενζύμων και μορίων του εξωκυττάριου στρώματος [84]. Η ρύθμιση όλων αυτών των παραγόντων από τα μεσοθηλιακά κύτταρα στους ορογόνους ιστούς είναι μείζονος σημασίας για τα τραύματα που δημιουργούνται έπειτα από χειρουργική επέμβαση, από μόλυνση, ή από θεραπείες όπως η περιτοναϊκή κάθαρση. Η ισορροπία των παραγόντων αυτών οδηγεί στην αναγέννηση του ιστού και διατήρηση της φυσιολογικής του λειτουργίας. Σε αντίθετη περίπτωση παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα, οίδημα, σχηματισμός εξιδρωμάτων πλούσιων σε πρωτεΐνη, και τελικά σχηματισμός συμφύσεων και ίνωση [127].

## *Πήξη και ινωδόλυση*

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εναπόθεση και διάσπαση ινικής στις ορογόνες κοιλότητες. Η ινωδολυτική διαδικασία είναι μείζονος σημασίας στην απομάκρυνση εναποθέσεων ινικής που σχηματίζονται ως επακόλουθο τραυματισμού, αιμοθώρακα και μόλυνσης. Στην περίπτωση που η ινωδολυτική διαδικασία είναι ανεπαρκής, η συσσώρευση ινικής έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμφύσεων μεταξύ των απέναντι ορογόνων επιφανειών [128].

## *Σύνθεση κολλαγόνου*

Σε καλλιέργειες τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν κολλαγόνο τύπου I, II και IV, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη και λαμίνη καθώς και να εκφράζουν ενδιάμεσα ινίδια τυπικά για επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες [13]. Για τη σύνθεση κολλαγόνου απαραίτητος συμπαραγόντας είναι η βιταμίνη C και πιθανώς τα μεσοθηλιακά κύτταρα να διαθέτουν σύστημα μεταφοράς αυτής της βιταμίνης.

# ΧΡΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

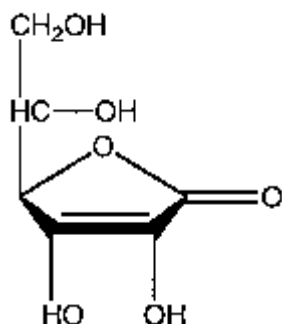
## ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ

### ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

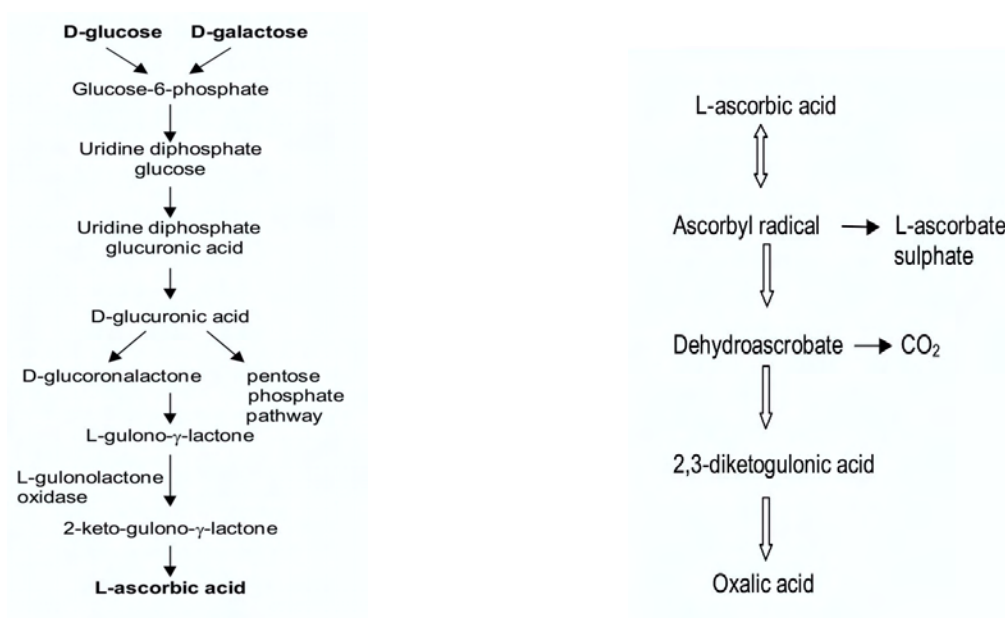
Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των αντιοξειδωτικών παραγόντων στη διακίνηση ηλεκτρολυτών και νερού στον υπεζωκότα προβάτου χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες: ασκορβικό οξύ, δεϋδροασκορβικό οξύ, κουερσετίνη και ασκορβικό οξύ με διάλυμα Krebs-Ringer χωρίς Νάτριο.

#### ***Βιταμίνη C-Ασκορβικό Οξύ***

Το αντισκορβουτικό αίτιο αναγνωρίστηκε και ονομάστηκε ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) το 1932 και είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία που μοιάζει με τη γλυκόζη (Εικόνα 1) [129,130]. Το ασκορβικό οξύ είναι μια λακτόνη με 6 άτομα άνθρακα, η οποία συντίθεται από τη γλυκόζη στο ήπαρ των περισσότερων θηλαστικών, εκτός από τους ανθρώπους, τους μη-ανθρώπινους πρωτεύοντες οργανισμούς και τους χοίρους Γουινέας. Αυτά τα είδη δε διαθέτουν το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του ασκορβικού οξέος ως ενδιάμεσος πρόδρομος της 2-κετο-L-γουλονολακτόνης (2-keto-L-gulonolactone) (Εικόνα 2). Το DNA που κωδικοποιεί την οξειδάση της γουλονολακτόνης έχει υποστεί μετάλλαξη, με αποτέλεσμα την απουσία ενός λειτουργικού ενζύμου [131,132]. Επομένως, όταν οι άνθρωποι δεν προσλαμβάνουν βιταμίνη C με τη διατροφή τους θα εμφανίσουν ανεπάρκεια με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, γνωστή ως σκορβούτο, που μπορεί να είναι θανατηφόρος χωρίς κατάλληλη θεραπεία. Έτσι, οι άνθρωποι πρέπει να καταναλώνουν βιταμίνη C για να επιβιώσουν.



**Εικόνα 1.** Χημικός τύπος του ασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ είναι μια λακτόνη με 6 άτομα άνθρακα



**Εικόνα 2.** Σύνθεση και καταβολισμός του ασκορβικού οξέος.

Η βιταμίνη C είναι δότης ηλεκτρονίων, δηλαδή αναγωγικός παράγοντας. Όλες οι γνωστές φυσιολογικές και βιοχημικές δράσεις της βιταμίνης C οφείλονται στο ότι είναι δότης ηλεκτρονίων. Το ασκορβικό οξύ δίνει δύο ηλεκτρόνια από το διπλό δεσμό μεταξύ του 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> ατόμου του άνθρακα από το μόριό του με τα 6 άτομα άνθρακα. Δίνοντας τα ηλεκτρόνια προστατεύει άλλες ουσίες από την οξείδωση, γι' αυτό λέγεται αντιοξειδωτικός

παράγοντας. Όταν χορηγεί τα ηλεκτρόνια οξειδώνεται και είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η διαδικασία χορήγησης των ηλεκτρονίων γίνεται διαδοχικά. Πρώτα χάνει ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες, όπως ημι-δεϋδροασκορβικό οξύ ή ρίζες ασκορβικού (Εικόνα 2). Οι ρίζες ασκορβικού είναι σχετικά σταθερές και σχεδόν αδρανείς με χρόνο ημιζωής  $10^{-5}$  sec. Όταν αυτές χάσουν και δεύτερο ηλεκτρόνιο, τότε σχηματίζεται δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Η σταθερότητα του DHA εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH και διαρκεί μόνο λίγα λεπτά [133]. Τα οξειδωτικά που μεσολαβούν στο σχηματισμό των ριζών ασκορβικού και του DHA είναι ποικίλα και περιλαμβάνουν: το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), τα υπεροξειδία ( $O_2$ ), οι ρίζες υδροξυλίου ( $OH$ ), υποχλωριώδες ( $HCl_2$ ), ενεργές ρίζες αζώτου ( $NO$ ) και ίχνη μετάλλων σιδήρου και χαλκού [130].

Οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος μπορούν να αναχθούν και πάλι σε ασκορβικό οξύ τουλάχιστον με τρεις διαφορετικές ενζυματικές οδούς, καθώς επίσης και με αναγωγικές βιολογικές ουσίες, όπως η γλουταθειόνη. Στους ανθρώπους γίνεται μόνο μερική αναγωγή του ασκορβικού οξέος κι έτσι όλο το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ δεν αποκαθίσταται. Αν η αναγωγή ήταν πλήρης δεν θα υπήρχε το σκορβούτο. Ένα μέρος του DHA υδρολύεται σε ξυλόζη (xylose), ξυλονάιτ (xylonite), λυξονικού οξέος (lyxonate) και 2,3-δικετογουλονικό οξύ (2,3-diketogulonic acid), το οποίο στη συνέχεια μεταβολίζεται σε ξυλόζη, λυξονικό οξύ και οξαλικό οξύ (oxalate). Ο σχηματισμός του οξαλικού οξέος έχει κλινική σημασία, γιατί η υπεροξαλουρία (αυξημένη αποβολή οξαλικού οξέος στα ούρα) μπορεί να προκαλέσει δημιουργία οξαλικών λίθων στους νεφρούς [130].

### *Ενζυμολογία της βιταμίνης C*

Στον άνθρωπο η βιταμίνη C είναι δότης ηλεκτρονίων σε οχτώ διαφορετικά ένζυμα, συγκεκριμένα :

- Σε τρία ένζυμα που συμμετέχουν στην υδροξυλίωση του κολλαγόνου, προσθέτοντας υδροξύλια στα αμινοξέα της προλίνης ή της λυσίνης του μορίου του κολλαγόνου, αυξάνοντας τη σταθερότητα της τριπλής έλικας του κολλαγόνου [134-137].
- Σε δύο άλλα ένζυμα απαραίτητα για τη σύνθεση της καρνιτίνης. Η καρνιτίνη χρησιμεύει στη μεταφορά λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ATP [138].
- Σε ένα που παίρνει μέρος στη βιοσύνθεση της νορεπινεφρίνης από την ντοπαμίνη [139].
- Σε ένα που προσθέτει αμινο-ομάδες σε πεπτιδικές ορμόνες, αυξάνοντας τη σταθερότητά τους [140].
- Σε ένα που ρυθμίζει το μεταβολισμό της τυροσίνης [141].

Αυτά τα ένζυμα λειτουργούν είτε ως μονοοξυγενάσες είτε ως διοξυγενάσες. Οι μονοοξυγενάσες ενσωματώνουν ένα απλό μόριο οξυγόνου στο υπόστρωμα ντοπαμίνης για τη σύνθεση της νορεπινεφρίνης ή στο τελικό πεπτίδιο της γλυκίνης για την αμίνωση (amidation) των πεπτιδικών ορμονών. Οι διοξυγενάσες ενσωματώνουν δύο μόρια οξυγόνου με δύο διαφορετικούς τρόπους: α) είτε δύο μόρια οξυγόνου σε ένα μόνο προϊόν (μεταβολισμό τυροσίνης) και β) είτε δύο μόρια οξυγόνου



σε δύο διαφορετικές ουσίες διαδοχικά (σύνθεση καρνιτίνης και υδροξυλίωση κολλαγόνου) [134].

#### *Αντιοξειδωτική δράση - Τι ανάγει η βιταμίνη C;*

Οι ουσίες που προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια και ανάγονται από τη βιταμίνη C χωρίζονται στις παρακάτω ομάδες:

1. Ουσίες με μη συζευγμένα ηλεκτρόνια (ελεύθερες ρίζες), όπως ρίζες οξυγόνου [υπεροξειδία ( $\cdot\text{O}_2$ ), ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), θείου, αζώτου ( $\text{NO}\cdot$ )].
2. Ουσίες που είναι δραστικές αλλά δεν είναι ελεύθερες ρίζες, όπως τα υποχλωριώδη ( $\text{HCl}_2$ ), οι νιτροζαμίνες και άλλες νιτρώδεις ουσίες, όπως το νιτρικό οξύ και το όζον.
3. Ουσίες που σχηματίζονται από την αντίδραση των δύο πρώτων ομάδων π.χ. όταν α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) αλληλεπιδρά με εξωγενείς ελεύθερες ρίζες σχηματίζεται α-τοκοφεροξυλικές ρίζες, οι οποίες μπορούν να αναχθούν και πάλι σε α-τοκοφερόλη με τη δράση του ασκορβικού οξέος [142].

Τα οξειδωτικά μπορούν να αντιδρούν με βιολογικά μόρια όπως τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, το DNA και να προκαλούν βλάβη σ' αυτά. Το ασκορβικό οξύ ανάγει τις οξειδωτικές ρίζες και έτσι, μειώνει ή προλαμβάνει την οξείδωση των πρωτεϊνών, την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τη βλάβη του DNA.

### *Συγκέντρωση της βιταμίνης C στο πλάσμα ανθρώπου*

Με ημερήσια δόση  $\geq 400$  mg το πλάσμα είναι πλήρως κορεσμένο, με συγκέντρωση περίπου 80  $\mu\text{M}$  [129,130].

Πλήρης έλεγχος της συγκέντρωσης της βιταμίνης C επιτελείται από την απορρόφηση, τη μεταφορά στους ιστούς και την απέκκρισή της.

- Η απορρόφηση της βιταμίνης C από το έντερο είναι αντιστρόφως ανάλογη με την προσλαμβάνουσα δόση. Μεγαλύτερη δόση, μικρότερη απορρόφηση επιτυγχάνεται π.χ. όταν η δόση είναι 30 mg απορροφάται σχεδόν το 90% αυτής, ενώ όταν η δόση είναι 1250 mg λιγότερο από το μισό της απορροφάται. Αν και μειώνεται το ποσοστό της απορροφούμενης δόσης όταν αυτή αυξάνει πάνω από 50 mg, παρόλα αυτά απορρόφηση συμβαίνει [130].
- Για να μελετηθεί η μεταφορά της βιταμίνης C στους ιστούς, συσχετίστηκε η δόση με τη συγκέντρωσή της στα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα περιέχουν 1-4 mM βιταμίνη C και είναι κορεσμένα με ημερήσια δόση 100-200 mg. Αυτές οι δόσεις παράγουν συγκεντρώσεις πλάσματος όμοιες με αυτές στις οποίες ο κορεσμός των κυττάρων προηγείται του πλάσματος [130].
- Στους νεφρούς η βιταμίνη C διηθείται στο νεφρικό σωμάτιο και επαναρροφάται στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια μέσω των μεταφορέων βιταμίνης C (SVCT1) [143]. Όταν ρυθμός επαναρρόφησης προσεγγίζει τη μέγιστη ταχύτητα, τότε επιπλέον βιταμίνη C δεν μπορεί να απορροφηθεί και χάνεται στα ούρα. Η δόση στην οποία επέρχεται κορεσμός στη λειτουργία της επαναρρόφησης αποτελεί το κατώφλι

δόσης για την απέκκριση της βιταμίνης C και παρατηρείται σε ημερήσιες δόσεις 60-100 mg. Η επαναρρόφηση και η απέκκριση της βιταμίνης C από τους νεφρούς παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της συγκέντρωσής της στο πλάσμα και στους ιστούς σε υγιείς ανθρώπους και ο έλεγχος αυτός δεν υπάρχει σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική νόσο [130].

#### *Ρύθμιση της μεταφοράς της βιταμίνης C*

Συστήματα μεταφοράς που σχετίζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες καθορίζουν την κατανομή της βιταμίνης C στα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια υγρά. Απλή διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση και ενεργητικοί μηχανισμοί μπορεί πιθανώς να συμβάλλουν στη μεταφορά μέσω μεμβρανών της βιταμίνης C [7].

#### *Απλή διάχυση*

Η απλή διάχυση κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών σε φυσιολογικό pH παίζει αμελητέο ρόλο στη συσσώρευση της βιταμίνης C στα κύτταρα [7].

#### *Διευκολυνόμενη διάχυση*

Η διευκολυνόμενη διάχυση προκαλεί μετακίνηση μιας ουσίας μόνο προς την κατεύθυνση της χημικής ή ηλεκτροχημικής κλίσης της ουσίας αυτής, ενώ με την ενεργητική μεταφορά είναι δυνατή η μεταφορά της ουσίας έναντι κλίσης με την κατανάλωση ενέργειας, που προέρχεται από τον κυτταρικό

μεταβολισμό. Και οι δύο μηχανισμοί βεβαίως απαιτούν τη μεσολάβηση πρωτεϊνών για την είσοδο ή έξοδο της ουσίας [7].

#### *Εκροή του ασκορβικού οξέος από τα κύτταρα με διευκολυνόμενη διάχυση*

Δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες σχετικές με το πώς το ασκορβικό οξύ μεταφέρεται έξω από τα κύτταρα. Η εκροή του ασκορβικού οξέος από τα εντερικά κύτταρα και τα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων προς το αίμα είναι απαραίτητη για την εντερική απορρόφηση και τη νεφρική διατήρηση της βιταμίνης C. Επειδή αυτά τα κύτταρα διογκώνονται σημαντικά κατά την διαεπιθηλιακή μεταφορά θρεπτικών ουσιών όπως η γλυκόζη ή αλανίνη, έχει υποτεθεί ότι το ασκορβικό οξύ διαχέεται από το κυτταρόπλασμα προς το εξωκυττάριο υγρό διαμέσου μηχανο-ευαίσθητων διαύλων ανιόντων, που βρίσκονται προς τη βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και στη συνέχεια εισέρχονται στο πλάσμα του αίματος μέσω ανοιγμάτων του τριχοειδικού τοιχώματος. Υπάρχει λειτουργική απόδειξη αυτών των διαύλων, όμως δεν έχει καθοριστεί η μοριακή τους ταυτοποίηση [144]. Αυτοί οι δίαυλοι επίσης μπορεί να μεσολαβούν στην εκροή του ασκορβικού οξέος και σε μη επιθηλιακά κύτταρα. Αδρενεργικά χρωμαφινικά κύτταρα απελευθερώνουν βιταμίνη C, όταν επωάζονται με διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση καλίου, τα οποία προκαλούν μαζί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και διόγκωση των κυττάρων, ενώ μόνο η εκπόλωση των κυττάρων δεν είναι ικανή να διεγείρει την εκροή του ασκορβικού οξέος από αυτά τα κύτταρα [7]. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και σε αστροκύτταρα, δηλαδή διόγκωση αυτών των κυττάρων προκαλεί παροδικά και αντιστρεπτά εκροή ασκορβικού οξέος προς το εξωκυττάριο υγρό. Έτσι, τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν το εξωκυττάριο υγρό

των νευρώνων, απομακρύνοντας το DHA και αντικαθιστώντας το με ασκορβικό οξύ [145-147].

Επίσης, εξωκυττάρωση του ασκορβικού οξέος με εκκριτικά κυστίδια μπορεί να αυξάνει την εξωκυττάρια συγκέντρωσή του [7].

### *Ενεργητική μεταφορά του ασκορβικού οξέος-Συμμεταφορείς Νατρίου-Ασκορβικού*

Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και των εγγύς νεφρικών σωληναρίων η πρόσληψη του ασκορβικού γίνεται διαμέσου συμμεταφορέων νατρίου-ασκορβικού [148,149]. Αποτελεί παράδειγμα δευτερογενούς ενεργητικής μεταφοράς γιατί η μεταφορά του ασκορβικού επιτυγχάνεται με κλίση συγκέντρωσης νατρίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία διατηρείται με τη αντλία Na-K-ATPase. Για κάθε ένα μόριο ασκορβικού οξέος που μεταφέρεται απαιτούνται δύο ιόντα νατρίου [148,150-154].

Τα φλαβονοειδή όπως η κουερσετίνη αναστέλλουν την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος μέσω αυτών των συμμεταφορέων [155-157].

Πολλά μη-επιθηλιακά κύτταρα, επίσης, μπορούν να προσλαμβάνουν ασκορβικό οξύ μέσω αυτών των συμμεταφορέων, όπως οι οστεοβλάστες, τα αστροκύτταρα, τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [147,158-161]. Οι εμφανείς τιμές της  $K_m$  για τη συμμεταφορά ασκορβικού-νατρίου κυμαίνεται από 200  $\mu\text{M}$  ασκορβικού οξέος στα απορροφητικά επιθήλια σε 20  $\mu\text{M}$  ασκορβικού οξέος σε μη-επιθηλιακά κύτταρα (οστεοβλάστες) [151].

Δύο ισόμορφα συμμεταφορέων νατρίου-ασκορβικού έχουν κλωνοποιηθεί και ονομάζονται SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>, και διαθέτουν κοινή

ομολογία αμινοξέων κατά 66% [143,152,162-167]. Κωδικοποιούνται από τα γονίδια  $Slc23_{a1}$  και  $Slc23_{a2}$  αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) στο γονίδιο  $Slc23_{a1}$  είναι εξειδικευμένα ως προς τον πληθυσμό είτε σε αφροαμερικανούς είτε σε καυκάσιους και περιλαμβάνουν 3 ή 4 μη-συνώνυμα SNPs [168]. Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο  $Slc23_{a2}$  είναι κοινοί μεταξύ των αφροαμερικανών και καυκάσιων και δεν υπάρχουν μη-συνώνυμα. Στους ανθρώπους, στους αρουραίους και στα ποντίκια οι  $SVCT_1$  και  $SVCT_2$  έχουν εκτεταμένες ομοιότητες στις ακολουθίες τους αλλά δεν έχουν κοινές δομικές ομολογίες με άλλους τύπους συμεταφορέων νατρίου. Οι δύο ισομορφές αυτών των συμεταφορέων νατρίου-ασκορβικού είναι γλυκοπρωτεΐνες με θέσεις σύνδεσης για ολιγοσακχαρίτες [163]. Αυτές οι δύο ισομορφές λειτουργούν ανεξάρτητα η μία με την άλλη, γιατί η έκφραση του  $SVCT_1$  και οι συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος σε όργανα όπου κυριαρχούν οι  $SVCT_1$  δεν επηρεάζονται από την συγγενή έλλειψη των  $SVCT_2$  [169]. Ποντίκια με συγγενή έλλειψη των  $SVCT_2$  ( $SVCT_2$  knock-out mice) πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση και αυτό δείχνει ότι αυτοί οι μεταφορείς είναι απαραίτητοι για την ομοιόσταση της βιταμίνης C [164]. Οι  $SVCT_1$  έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα για το ασκορβικό οξύ από τους  $SVCT_2$ . Όμως, οι  $SVCT_2$  έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για το ασκορβικό οξύ και παρουσιάζουν 50% κορεσμό στο κατώτερο φυσιολογικό όριο των συγκεντρώσεων αυτού στο πλάσμα [170]. Μια μελέτη έχει δείξει ότι οι  $SVCT_1$  πρωτεΐνες εκφράζονται κυρίως στην κορυφαία επιφάνεια (προς την πλευρά της κοιλότητας) των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, ενώ αντίθετα οι  $SVCT_2$  κυριαρχούν στην βασική επιφάνεια αυτών [167]. Η ανάλυση της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής

αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) έδειξε ότι οι SVCT<sub>2</sub> κυριαρχούν στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, στον σπλήνα, στον προστάτη, στους όρχεις, στις ωοθήκες, στον πλακούντα, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος ενώ οι SVCT<sub>1</sub> στο ήπαρ, στους νεφρούς και σε επιθηλιακούς ιστούς, στο λεπτό έντερο, στο κόλον, στις ωοθήκες, στον προστάτη και στο πάγκρεας [143,162,165,166,169].

#### *Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά του ασκορβικού οξέος μέσω των SVCTs*

- Όταν το ασκορβικό οξύ εξαντλείται ενδοκυτταρίως, τότε αυξάνεται η έκφραση των SVCT<sub>2</sub>, ώστε η απορρόφηση και αποκατάσταση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης να είναι αποτελεσματικότερη. Το αντίθετο συμβαίνει όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος είναι αυξημένη. Επομένως, είναι πιο αποτελεσματική η απορρόφηση της βιταμίνης C όταν χορηγείται σε διακοπτόμενες δόσεις παρά σε συνεχείς.
- Επειδή οι SVCTs μεταφέρουν δύο ιόντα νατρίου για κάθε ανιόν ασκορβικού οξέος συμβαίνουν αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης που επηρεάζουν τη ροή του ασκορβικού οξέος και αυτό γιατί οι αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης μεταβάλλουν την ηλεκτροχημική κλίση των ιόντων νατρίου και την διαθέσιμη ενέργεια του μεταφορικού συστήματος. Έτσι η εκπόλωση της μεμβράνης επιβραδύνει την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος από τα κύτταρα μέσω των SVCTs από τα κύτταρα [148,154].

- Η μεταφορά του ασκορβικού οξέος διά των SVCTs συμβαίνει σε pH περίπου 7.5, ενώ η οξειδωση αναστέλλει αυτή τη μεταφορά [148,152].
- Παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα του κυκλικού AMP σε καλλιέργειες αστροκυττάρων αρουραίων προκαλούν αύξηση των mRNA SVCT<sub>2</sub> και ακολούθως, αυξάνουν το μέγιστο ρυθμό πρόσληψης του ασκορβικού οξέος [147,171].
- Ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας [Transforming growth factor-β (TGF-β)] και τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν το μέγιστο ρυθμό πρόσληψης του ασκορβικού οξέος διά των SVCTs σε οστεοβλάστες [159].

#### *Αναστολή μεταφοράς ασκορβικού οξέος στα κύτταρα μέσω των SVCTs*

- Όταν το υπόστρωμα δεν περιέχει νάτριο μειώνεται σημαντικά η πρόσληψη του ασκορβικού οξέος μέσω των SVCTs.
- Τα φλαβονοειδή, και κυρίως η κουερσετίνη, αναστέλλουν την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος διά των SVCTs.
- Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και η ιντερλευκίνη 1-β (IL-1β) αναστέλλουν την πρόσληψη του ασκορβικού σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν SVCT<sub>2</sub> [172].
- Σε σηπτική προσβολή αστροκυττάρων (π.χ. επώαση με λιποπολυσακχαρίδη και ιντερφερόνη-γ) αναστέλλεται η αναγωγή του DHA και η πρόσληψη του ασκορβικού οξέος μέσω των SVCT<sub>2</sub>, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του [146].



Λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί στη επίδραση του ασκορβικού οξέος στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση των ιστών, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που αφορούν μεσοθηλιακά κύτταρα.

### ***Δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA)***

Όταν το ασκορβικό οξύ χορηγεί δύο ηλεκτρόνια, κατά την αντιοξειδωτική του δράση, μετατρέπεται σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Η φυσιολογική συγκέντρωση του DHA στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλή και κυμαίνεται σε 0-2  $\mu\text{M}$ , ή περίπου 1-2% της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος [173-178]. Η συγκέντρωση αυτή αυξάνεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως σε μη ελεγχόμενο σακχαρώδη διαβήτη και στο κάπνισμα [175,179]. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του DHA μετρήθηκε σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και βρέθηκε ότι είναι 20% της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος [174]. Αφού η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στα ανθρώπινα μονοκύτταρα του αίματος είναι της τάξεως των  $\text{mmol/l}$ , η συγκέντρωση του DHA σ' αυτά πρέπει να είναι σταθερή και, έτσι, αποτελεί μια σημαντική πηγή για την ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος, κυρίως υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες [180].

### ***Διευκολυνόμενη διάχυση για το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA)***

Όταν το ασκορβικό οξύ ενεργεί ως αντιοξειδωτικό ή ως ενζυματικός συμπαράγοντας, οξειδώνεται σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Αυτό το προϊόν οξείδωσης παίζει φυσιολογικά σημαντικό ρόλο γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα ώστε να αναπαραχθεί το ασκορβικό οξύ και έτσι άμεσα ή έμμεσα να αλλάξει η οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού [173,174].

Πολλά κύτταρα είναι ικανά να χρησιμοποιούν το εξωκυττάριο DHA και σ' αυτά περιλαμβάνονται τα λιποκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα ερυθροκύτταρα, τα κοκκιώδη κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, οι οστεοβλάστες και τα λεία μυικά κύτταρα [181-187].

Το DHA ανταγωνίζεται τη γλυκόζη για τη μεταφορά του στα κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT<sub>1</sub>, GLUT<sub>3</sub> και GLUT<sub>4</sub> [186,188,189]. Οι GLUT πρωτεΐνες δε μεταφέρουν ασκορβικό οξύ και όταν αυξηθεί η δραστηριότητα αυτών των μεταφορέων, αυξάνεται και ο αρχικός ρυθμός πρόσληψης του DHA. Αυτό το φαινόμενο προκαλείται από την ινσουλίνη και τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης I (Insulin-like growth factor I) στους οστεοβλάστες, από τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης και τη ωοθηλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) στα κοκκιώδη κύτταρα, και από παράγοντες διέγερσης αποικιακών κυττάρων (colony-stimulating factors) στα ουδετερόφιλα [161,184,186].

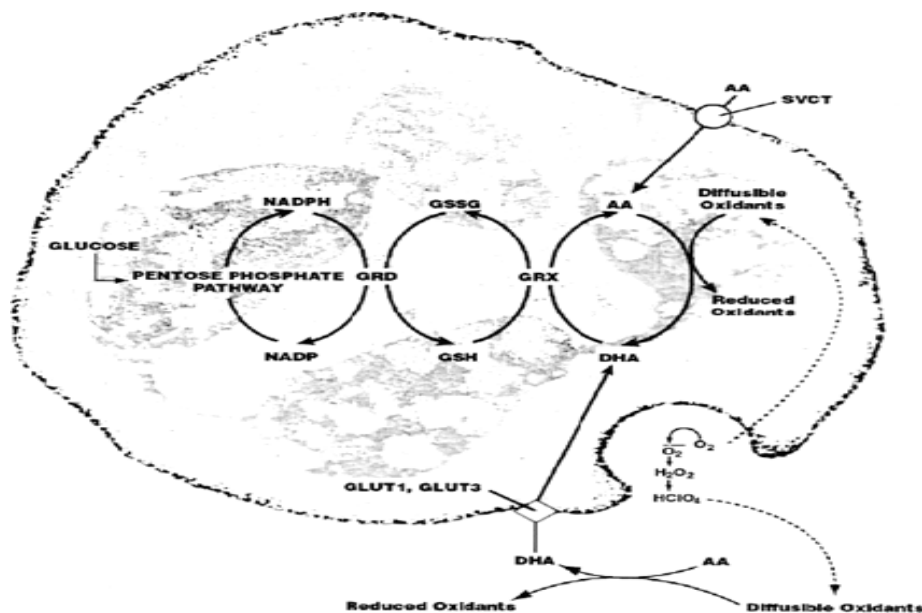
Υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (>20 mM) και τα φλαβονοειδή, κυρίως η κουερσετίνη, αναστέλλουν την πρόσληψη του DHA μέσω των GLUTs [173].

Τα πιο σημαντικά ένζυμα για την αναγωγή του DHA είναι η θειορεδοξίνη (thioredoxin), η ισομεράση της δισουλφιδικής πρωτεΐνης (protein disulfide isomerase) και η αναγωγάση της θειορεδοξίνης (thioredoxin reductase). Επιπλέον, η 3-υδροξυ-στεροειδική δεϋδρογενάση (3-hydroxysteroid dehydrogenase) ανάγει το DHA στα ηπατοκύτταρα. Η δράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6PD) παρέχει την nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate (NADPH), που είναι πηγή αναγωγικών ουσιών [7].

Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (εκτιθέμενα σε βακτήρια) παράγουν οξειδωτικά που οξειδώνουν το εξωκυττάριο ασκορβικό οξύ σε DHA. Αυτό, στη συνέχεια, μπορεί να εισέρχεται σ' αυτά τα κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT<sub>1</sub> και GLUT<sub>3</sub> [133,189,190]. Ενδοκυτταρίως το DHA αμέσως ανάγεται σε ασκορβικό οξύ με τη δράση της πρωτεΐνης, που εξαρτάται από τη γλουταθειόνη, γλουταρεδοξίνη, έτσι αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος κατά 10 φορές μέσα σε λίγα λεπτά [133,190]. Μια μελέτη έχει δείξει ότι τα gram-θετικά, τα gram-αρνητικά βακτήρια και κάποιοι μύκητες (*Candida Albicans*) προκαλούν την ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος στα ουδετερόφιλα, όμως τα ίδια δεν το ανακυκλώνουν γιατί δε διαθέτουν σύστημα μεταφοράς του DHA [190]. Η ανακύκλωση του ασκορβικού οξέως δε γίνεται μόνο στα ουδετερόφιλα αλλά και σε άλλα κύτταρα όπως μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά, αστροκύτταρα [174,190-193]. Η ανακύκλωση αυτή του ασκορβικού οξέος είναι πολύ σημαντική γιατί αποτρέπει την εξάντληση των αποθεμάτων του κατά τη διάρκεια φλεγμονής και προστατεύει τα ίδια τα κύτταρα αλλά και τους παρακείμενους ιστούς από την οξειδωτική βλάβη (Εικόνα 3) [6].

Λίγες μελέτες έχουν αναφερθεί στη επίδραση του DHA στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση των ιστών, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που αφορούν μεσοθηλιακά κύτταρα.



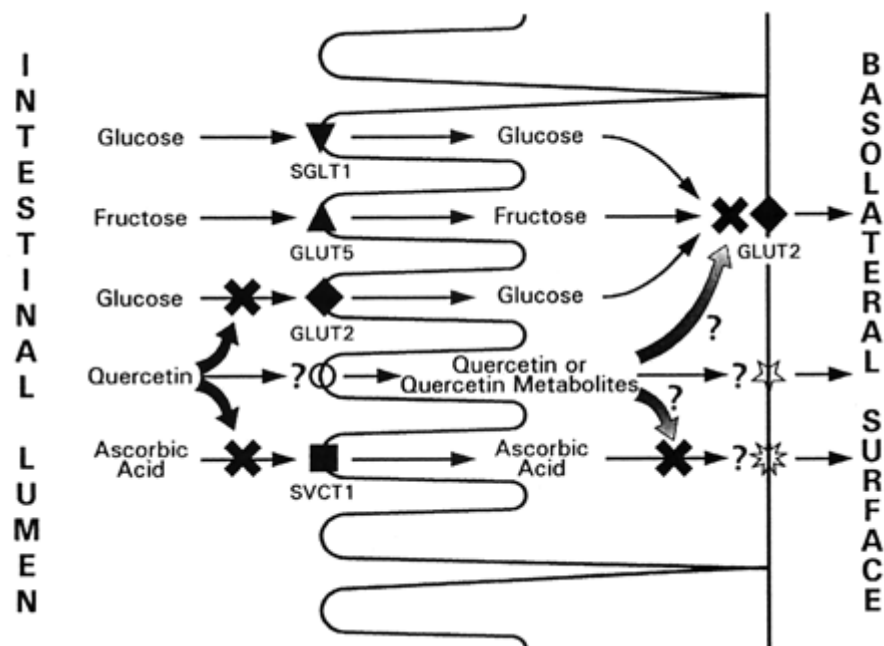
**Εικόνα 3.** Η ανακύκλωση του DHA στα ουδετερόφιλα.

### **Κουερσετίνη (Quercetin)**

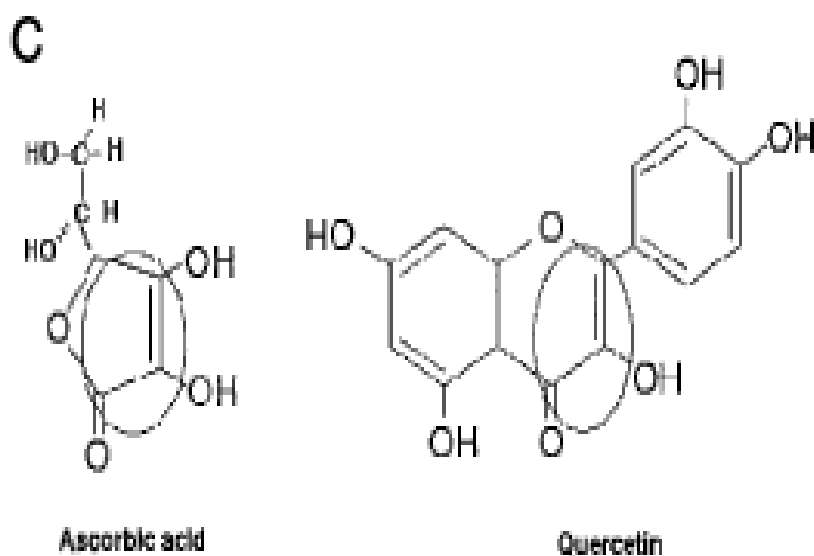
Η κουερσετίνη είναι αντιοξειδωτική ουσία και συγκεκριμένα ανήκει στις φλαβονόλες, που είναι μια από τις ομάδες των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινόλες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες [193]. Αναφέρονται ως αναστολείς πρόσληψης γλυκόζης στα κύτταρα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κουερσετίνη αναστέλλει την πρόσληψη του DHA από τα κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT<sub>1</sub>, GLUT<sub>3</sub>), αλλά και την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος από τα κύτταρα μέσω των συμμεταφορέων νατρίου (SVCT<sub>1</sub>, SVCT<sub>2</sub>) (Εικόνα 4) [193]. Το ανασταλτικό αποτέλεσμα προκύπτει από τα δομικά χαρακτηριστικά της κουερσετίνης και όχι από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές της. Επιπλέον, η αναστολή στο ασκορβικό οξύ δεν ερμηνεύεται από την οξείδωση αυτού γιατί η κουερσετίνη δε μειώνει τη σταθερότητά του. Είναι άγνωστος ο μηχανισμός μεταφοράς της κουερσετίνης μέσα στα κύτταρα, όμως ο μεταφορέας SVCT<sub>1</sub>(h) δεν τη

μεταφέρει και υπάρχουν δομικές ομοιότητες ανάμεσα στο ασκορβικό οξύ, το DHA, τη γλυκόζη και τις φλαβονόλες (Εικόνα 5). Η φλαβονόλη κουερσετίνη είναι αποτελεσματικός αναστολέας, αντίθετα οι γλυκοζυλιωμένες φλαβονόλες, όπως η ρουτίνη δεν είναι. Σε μελέτη, που χρησιμοποιήθηκαν λεμφοκύτταρα HL-60, U937 και Jurkat cells, η σύγχρονη επώαση ασκορβικού οξέος και φλαβονοειδών προκάλεσε μεγάλη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος και το πιο αποτελεσματικό φλαβονοειδές ήταν η κουερσετίνη [193]. Σε ωάρια κινέζικου χάμστερ (Chinese hamster ovary cells), που υπερεκφράζουν GLUT<sub>1</sub>, GLUT<sub>3</sub>, η αναστολή του DHA από την κουερσετίνη προέκυψε από τα δομικά χαρακτηριστικά και όχι από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές της [156].

Δεν υπάρχουν μελέτες σχετικές με την επίδραση της κουερσετίνης μόνη της ή μαζί με τη βιταμίνη C σε μεσοθηλιακά κύτταρα.



**Εικόνα 4.** Η Κουερσετίνη αναστέλλει την είσοδο του ασκορβικού οξέος, της γλυκόζης (και του δεϋδροασκορβικού οξέος) στα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα μέσω των μεταφορέων SVCT1 και GLUT5 αντίστοιχα.



**Εικόνα 5.** Δομικές ομοιότητες μεταξύ ασκορβικού οξέος και κουερσετίνης.

### ***Krebs-Ringer χωρίς Νάτριο***

Είναι γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ συμμετεφέρεται με νάτριο στα κύτταρα μέσω των  $SVCT_1$ ,  $SVCT_2$  και μάλιστα για κάθε μόριο ασκορβικού οξέος απαιτούνται δύο ιόντα νατρίου. Έτσι, αντικαταστάθηκε το νάτριο με χολίνη στο Krebs-Ringer που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, ώστε να διευκρινιστεί καλύτερα η δράση του ασκορβικού οξέος. Πολλές μελέτες που έχουν γίνει σε καλλιέργειες κυττάρων με τη χρήση του ασκορβικού οξέος έδειξαν ότι όταν στο υπόστρωμα δεν υπάρχει νάτριο μειώνεται σημαντικά η συγκέντρωση του ασκορβικού ενδοκυτταρίως [166].

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

### *Συλλογή και Προετοιμασία Ιστού*

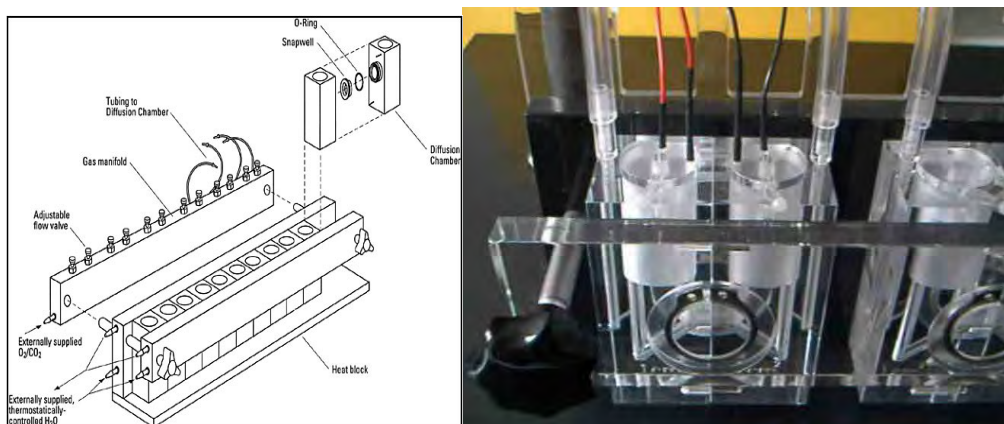
Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα θωρακικού και διαφραγματικού τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα από 168 ενήλικα πρόβατα, θηλυκά και αρσενικά. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο σφαγείο αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου (χρόνος απομόνωσης λιγότερο από 1 λεπτό). Ο ιστός αμέσως μετά την απομόνωσή του τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), στους 4 °C και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών από το θάνατο του ζώου. Ελήφθησαν μέτρα ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης να υποστεί όσο το δυνατό λιγότερους χειρισμούς. Τα τμήματα του υπεζωκότα αμέσως μετά την αφαίρεση του υποκείμενου ιστού διατηρήθηκαν σε διάλυμα Krebs-Ringer, του οποίου η σύνθεση (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. Στο διάλυμα διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Ο υπεζωκότας μαζί με μικρά τμήματα υποκείμενου ιστού μπορούσε να διατηρηθεί σε διάλυμα Krebs-Ringer στους 4 °C έτσι ώστε από ένα μόνο ζώο να γίνουν πολλά πειράματα.

Τμήματα περισπλάχνιου υπεζωκότα αποκολλήθηκαν προσεκτικά από τον υποκείμενο ιστό και εξετάστηκαν οπτικά για την ύπαρξη οπών ή εναπομείναντος προσκολλημένου πνευμονικού ιστού. Η λήψη των τμημάτων έγινε από τους άνω, μέσους και κάτω λοβούς του αριστερού και του δεξιού πνεύμονα. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας προέρχονταν από τον θώρακα. Η απομόνωσή του πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και του περισπλάχνιου υπεζωκότα [14,54].

## 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 υγρό Krebs-Ringer (Εικόνα 6). Κατά την τοποθέτηση του ιστού ελήφθη μέριμνα για την ελάχιστη καταπόνηση του ιστού κατά τη διαδικασία. Κάθε ημιθάλαμος περιείχε 4 ml υγρού εξασφαλίζοντας την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, ενώ συνεχώς διοχετευόταν στο κάθε ημιθάλαμο αέριο σύστασης 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Η επιφάνεια του εκτεθειμένου στο υγρό ιστού, ήταν 1 cm<sup>2</sup>. 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) διαμέσου του υπεζωκότα εκφραζόμενης 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 ανοιχτού κυκλώματος. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, γινόταν νέα μέτρηση της  $R_{TM}$  κάθε ένα λεπτό. Πραγματοποιούνταν παράλληλα 3 πειράματα κάθε φορά σε αντίστοιχους θαλάμους και η καταγραφή γινόταν μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά την τοποθέτηση του ιστού ακολουθούσε στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, μια περίοδος ηρεμίας του ιστού διάρκειας 30-40 λεπτά. Πριν την τοποθέτηση του ιστού είχε υπολογισθεί από το σύστημα η αντίσταση του υγρού, η οποία αυτομάτως αφαιρούνταν κατά τη μέτρηση της  $R_{TM}$  του ιστού.



**Εικόνα 6.** Αντλία τύπου *Ussing* που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Για να καθοριστεί η  $R_{TM}$  σε συνθήκες σύνδεσης ρεύματος, χορηγήθηκε συνεχές ρεύμα έντασης 50  $\mu A$  και διάρκειας 200ms, ανά 6 δευτερόλεπτα από μια 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 περισπλάχνιου ή τοιχωματικού υπεζωκότα, καταγράφονταν οι τιμές της  $R_{TM}$  για χρονικό διάστημα μισής ώρας και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (1°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° λεπτό).

Το πειραματικό διάλυμα που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια του υπεζωκότα που *in vivo* είναι εκτεθειμένη στο υπεζωκοτικό υγρό στο εξής θα αναφέρεται ως **ορώδες διάλυμα**. Το διάλυμα που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια του υπεζωκότα που *in vivo* είναι εκτεθειμένη στο διάμεσο ιστό, θα αναφέρεται ως **διάμεσο διάλυμα**. Αντίστοιχα οι μεσοθηλιακές επιφάνειες του

υπεζωκότα ορίζονται ως **κορυφαία** (εκτεθειμένη στο υγρό) και **βασική** (εκτεθειμένη στο διάμεσο ιστό).

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν αμέσως πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, θερμαίνονταν στους 37 °C και ακολουθούσε συνεχής οξυγόνωση με μείγμα αερίων 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>.

Διεξήχθησαν 180 πειράματα αναφοράς στον περισπλάχνιο υπεζωκότα και 180 πειράματα αναφοράς τοιχωματικό υπεζωκότα, μόνο με διάλυμα Krebs εκατέρωθεν της μεμβράνης. Επίσης, διεξήχθησαν 48 πειράματα αναφοράς στον περισπλάχνιο υπεζωκότα και 48 πειράματα αναφοράς τοιχωματικό υπεζωκότα με διάλυμα Krebs χωρίς νάτριο εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι μετρήσεις άρχισαν 30-40 λεπτά μετά την τοποθέτηση της κάθε μεμβράνης και είχαν διάρκεια 1 ώρας. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά από την αρχική τιμή της R<sub>TM</sub> κατά τη διάρκεια της 1 ώρας.

Πραγματοποιήθηκαν από 6 ως 10 πειράματα και στη στατιστική ανάλυση υπολογίστηκαν τα αποτελέσματα 6 πειραμάτων σε κάθε συγκέντρωση (N=6) της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε.

Στην πρώτη ομάδα των πειραμάτων προστέθηκε ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 10<sup>-3</sup> M στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε με ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις 10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M και 10<sup>-7</sup> M.

Η διθειοθρεϊτόλη (DTT) είναι ένας τεχνητός αναγωγικός παράγοντας, ο οποίος προστατεύει το ασκορβικό οξύ από την οξειδωσή του σε δεϋδροασκορβικό οξύ, για πάνω από 4 ώρες [193]. Για να προληφθεί η οξειδωση του ασκορβικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με

διθειοθρεϊτόλη σε συγκέντρωση 0.1 mmol/l μόνη της, καθώς και μαζί με ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M και  $10^{-4}$  M.

Είναι γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ συµμεταφέρεται µε νάτριο στα κύτταρα, µέσω των συµμεταφορέων νατρίου-ασκορβικού, SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος όταν στο krebs-διάλυµα δεν υπάρχει νάτριο, πραγµατοποιήθηκαν πειράµατα µε ασκορβικό οξύ  $10^{-5}$  M σε krebs-διάλυµα χωρίς νάτριο (το νάτριο αντικαταστάθηκε µε χολίνη) στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωµατικού υπεζωκότα. Το ίδιο έγινε και µε τον ίδιο αριθµό πειραµάτων για κάθε επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωµατικού υπεζωκότα µε ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση  $10^{-3}$  M. Το διάλυµα Krebs-Ringer χωρίς νάτριο περιείχε (σε mM): 20 Hepes, 117.5 choline chloride, 1.15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.65 KCl, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 2.52 CaCl<sub>2</sub>, και 5.55 γλυκόζη και σε αυτό το διάλυµα διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης 99.9% O<sub>2</sub> ώστε να µην επηρεαστεί το pH του διαλύµατος.

Κατά το επόµενο στάδιο της πειραµατικής διαδικασίας, µελετήθηκε η επίδραση του δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) στη διαµεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα. Το DHA είναι µεταβολίτης του ασκορβικού οξέος που παράγεται όταν αυτό χορηγεί δύο ηλεκτρόνια, κατά την αντιοξειδωτική του δράση. Το DHA σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωµατικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεµάχια ιστού. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε µε DHA σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M και  $10^{-7}$  M.

Η κουερσετίνη είναι µια φλαβονόλη, που ανήκει στην ευρύτερη οµάδα των φλαβονοειδών, µε αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επίσης, είναι γνωστό ότι

αυτή η ουσία αναστέλλει την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος αλλά και του DHA από τα κύτταρα μέσω των νατριο-εξαρτώμενων μεταφορέων (SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>) αλλά και μέσω νατριο-ανεξάρτητων μεταφορέων γλυκόζης (GLUT<sub>1</sub> και GLUT<sub>3</sub>), αντίστοιχα. Έτσι, διεξήχθησαν πειράματα κατά τα οποία ασκορβικό οξύ  $10^{-5}$  M και κουερσετίνη  $10^{-3}$  M προστέθηκαν στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού. Το ίδιο έγινε με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω με το DHA  $10^{-5}$  M και κουερσετίνη  $10^{-3}$  M.

Στην τελευταία σειρά των πειραμάτων, για να διαπιστωθεί αν η κουερσετίνη σε συγκέντρωση  $10^{-3}$  M είχε κάποια επίδραση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα, προστέθηκε η ουσία αυτή στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα, σε διαφορετικά τεμάχια ιστού. Καθώς η κουερσετίνη διαλύθηκε σε NaOH, το ίδιο έγινε με διάλυμα NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M προστιθέμενο στην κορυφαία επιφάνεια, καθώς επίσης και στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα.

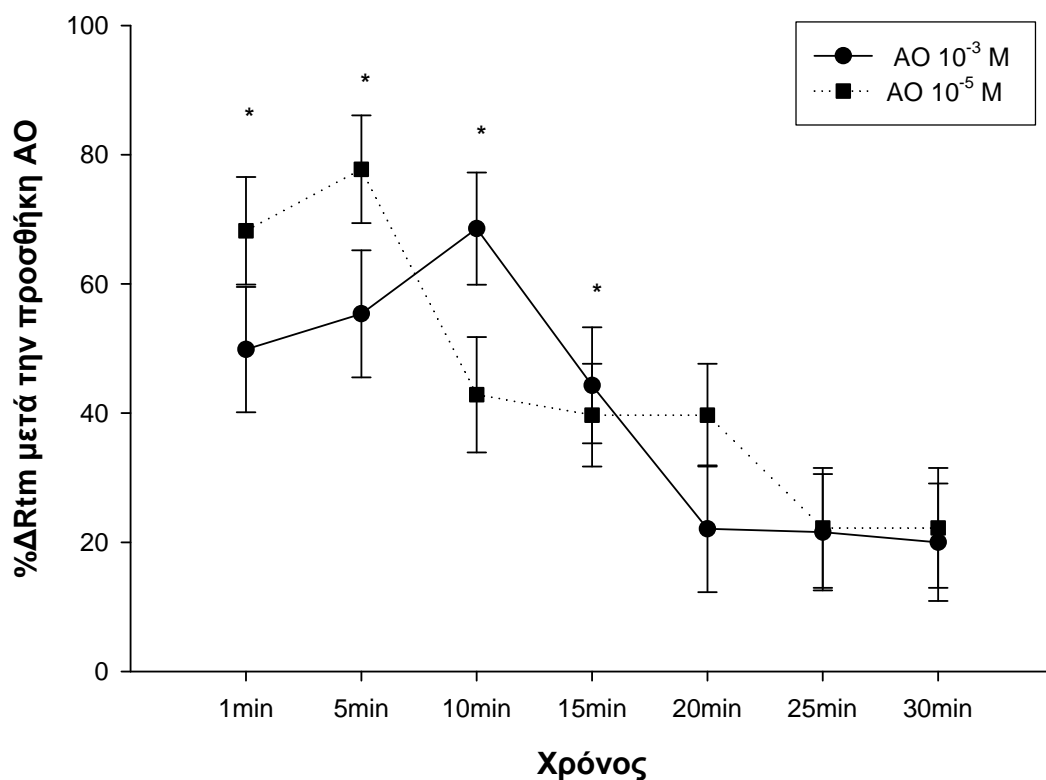
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοσης 10.0 για Windows. Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων εκφράσθηκαν σαν μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) (Standard Error Mean), έξι διαφορετικών πειραμάτων σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με paired *t*-test και με ANOVA test. Τιμές που ανταποκρίθηκαν σε  $P < 0.05$  έγιναν αποδεκτές ως στατιστικά σημαντικές. Τα διαγράμματα έγιναν με τα στατιστικά πακέτα Sigma Plot 2001.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Αποτελέσματα του Ασκορβικού οξέος σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση*

Με βάση τα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα κατά το πρώτο λεπτό της μετρούμενης περιόδου (0-30 λεπτά) για όλες τις συγκεντρώσεις. Ενώ, για ορισμένες συγκεντρώσεις ( $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  μέχρι και το 15<sup>ο</sup> λεπτό της μετρούμενης περιόδου. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού υπεζωκότα παρατηρήθηκε στο 5<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M.

Όταν το ασκορβικό οξύ, σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M, προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε αύξηση της  $R_{TM}$  από το 1<sup>ο</sup> λεπτό, με μεγαλύτερη στο 5<sup>ο</sup> που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 77.74\% \pm 8.32\%$  και στη συνέχεια σταδιακή μείωση τείνοντας να μείνει υψηλότερη από την αντίσταση αναφοράς μέχρι και το 30<sup>ο</sup> λεπτό, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικά από το 15<sup>ο</sup> λεπτό και μετά (Διάγραμμα 1). Για τη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M, υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια μετρήθηκε στο 10<sup>ο</sup> λεπτό (με στατιστικά σημαντική αύξηση μέχρι και το 15<sup>ο</sup> λεπτό) και ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 68.55\% \pm 8.68\%$ , παραμένοντας υψηλή μέχρι και το 30<sup>ο</sup> λεπτό χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική από το 20<sup>ο</sup> λεπτό και μετά (Διάγραμμα 1).

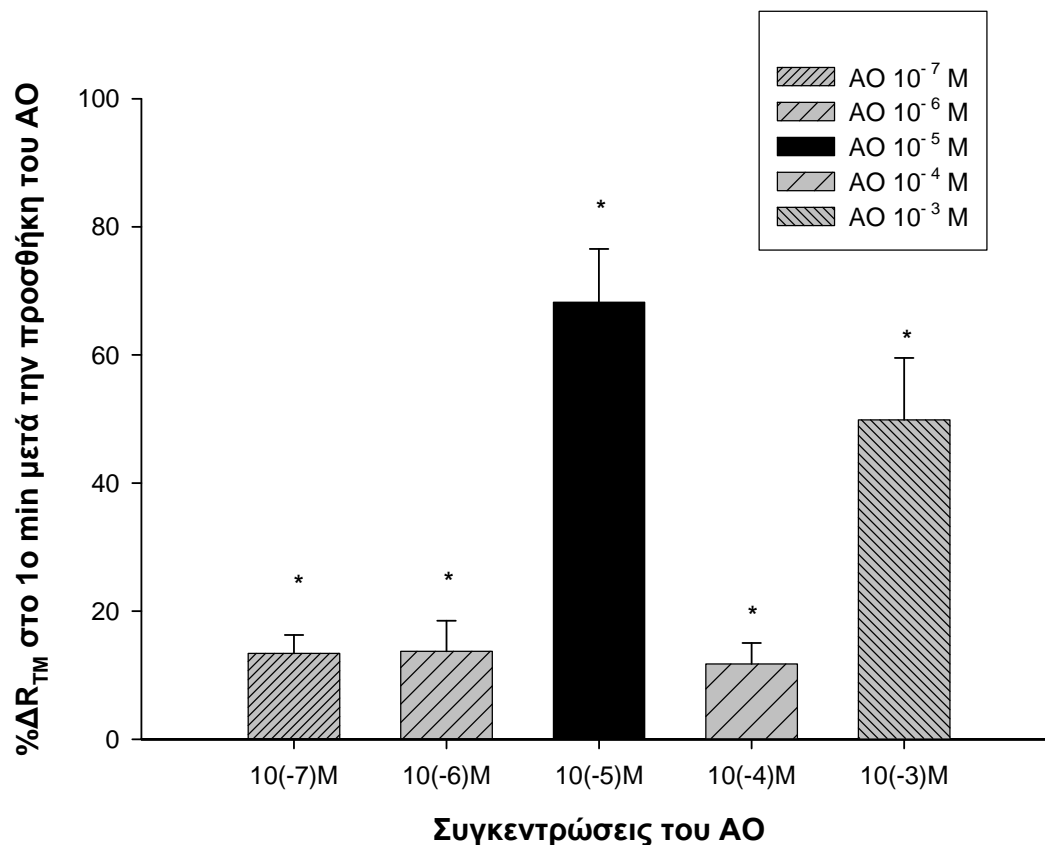


**Διάγραμμα 1.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 2. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 68.21\% \pm 8.31\%$ , ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-4}$  M που ήταν



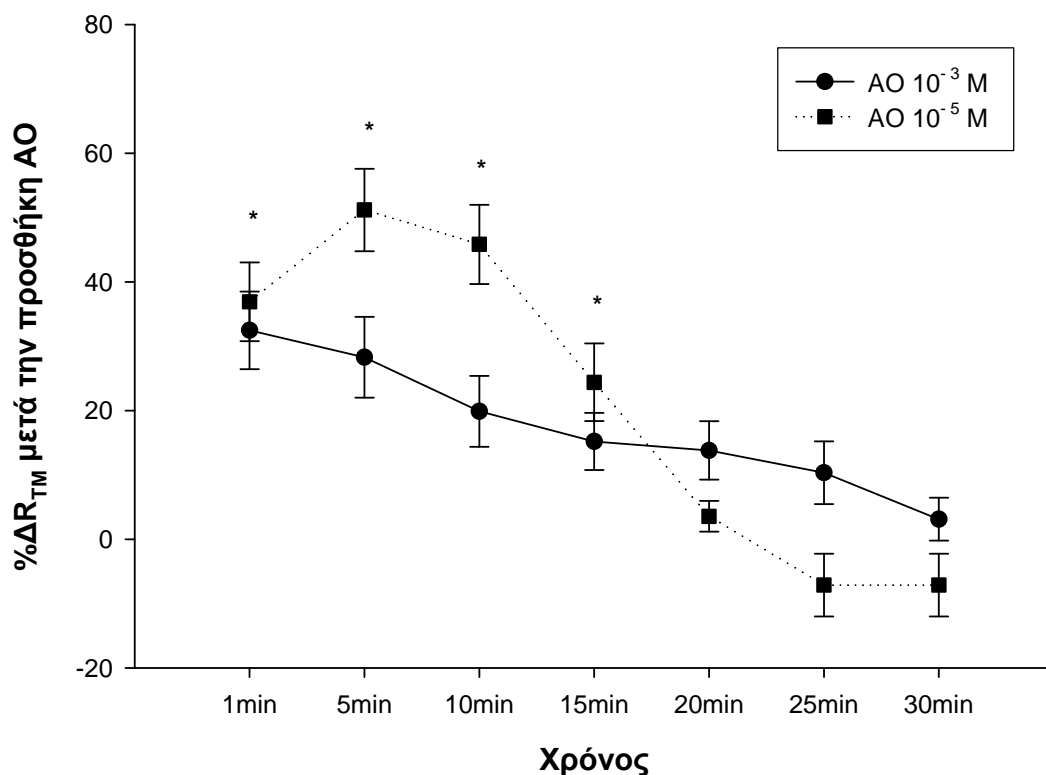
$\% \Delta R_{TM} = 11.75\% \pm 3.26\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με καλύτερο αποτέλεσμα στις συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M.



**Διάγραμμα 2.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όσο αφορά τη δράση του ασκορβικού οξέος στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, η υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στο 5<sup>ο</sup> λεπτό κατά την επίδραση του ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M, η οποία ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 51.18\% \pm 6.42\%$  (Διάγραμμα 3).

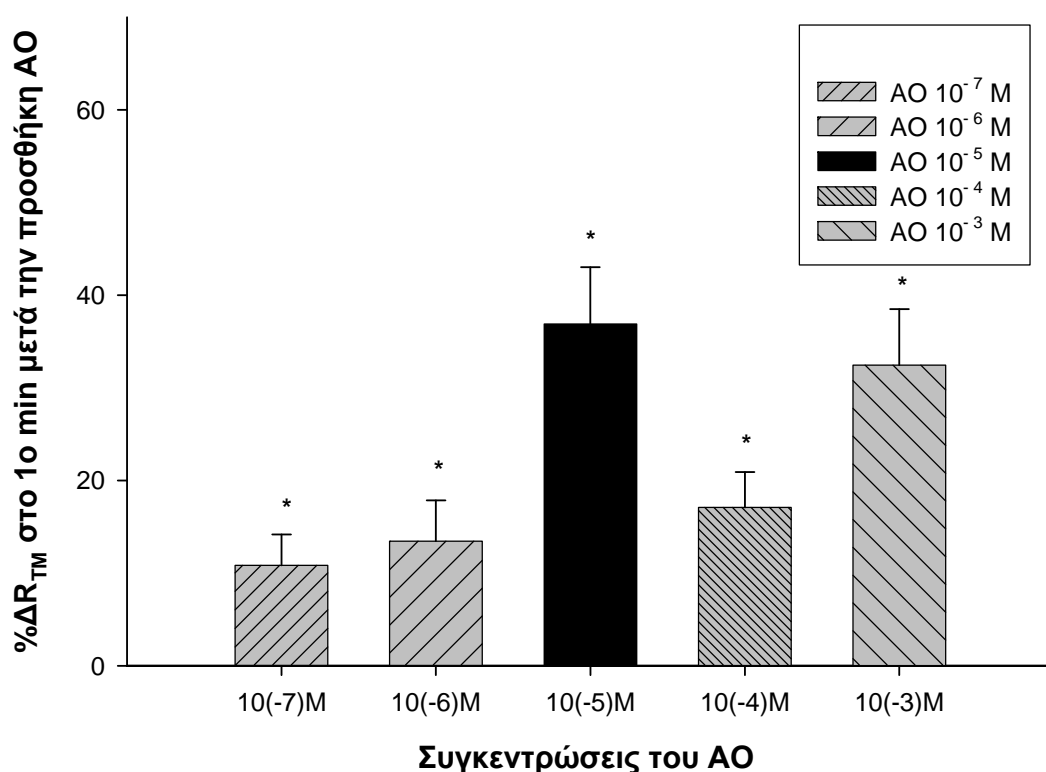
Ακολούθως, η  $R_{TM}$  παρουσίασε σταδιακή μείωση ώστε στο 30<sup>ο</sup> λεπτό να φτάσει στην τιμή αναφοράς. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M με μόνη διαφορά ότι η μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  μετρήθηκε στο 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του ασκορβικού οξέος (Διάγραμμα 3).



**Διάγραμμα 3.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στην βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα,

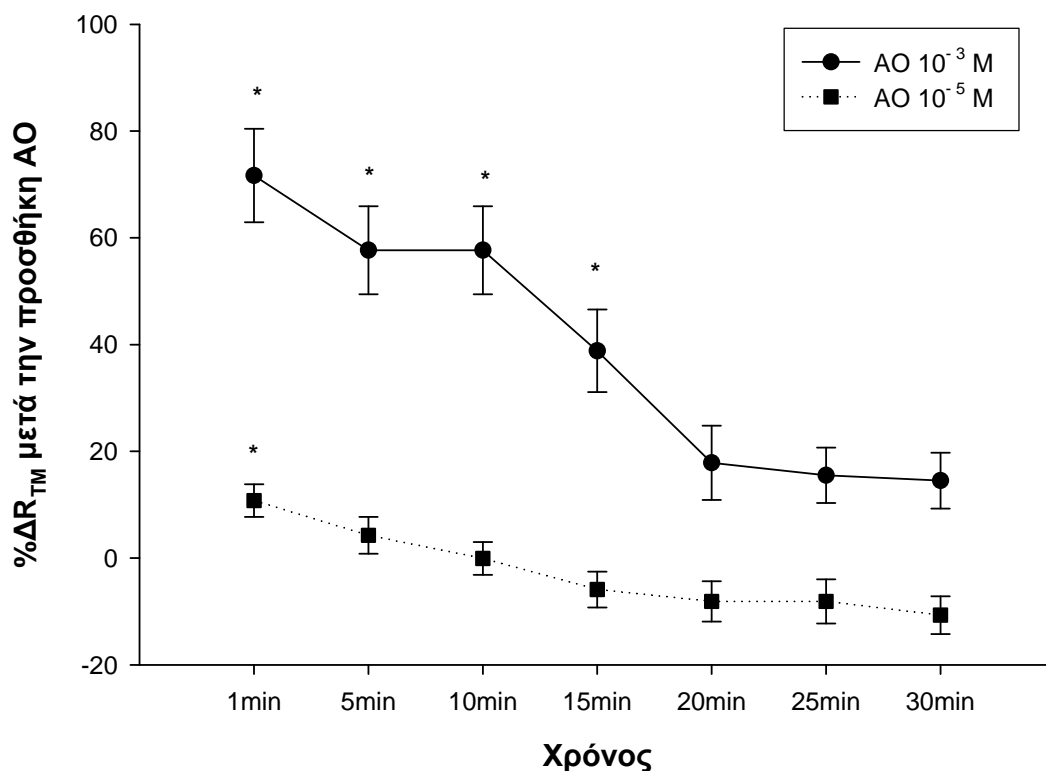
φαίνεται στο διάγραμμα 4. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 36.90\% \pm 6.12\%$ , ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-7}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 10.83\% \pm 3.35\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με καλύτερο αποτέλεσμα στις συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M.



**Διάγραμμα 4.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ).  $*P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όταν το ασκορβικό οξύ προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της

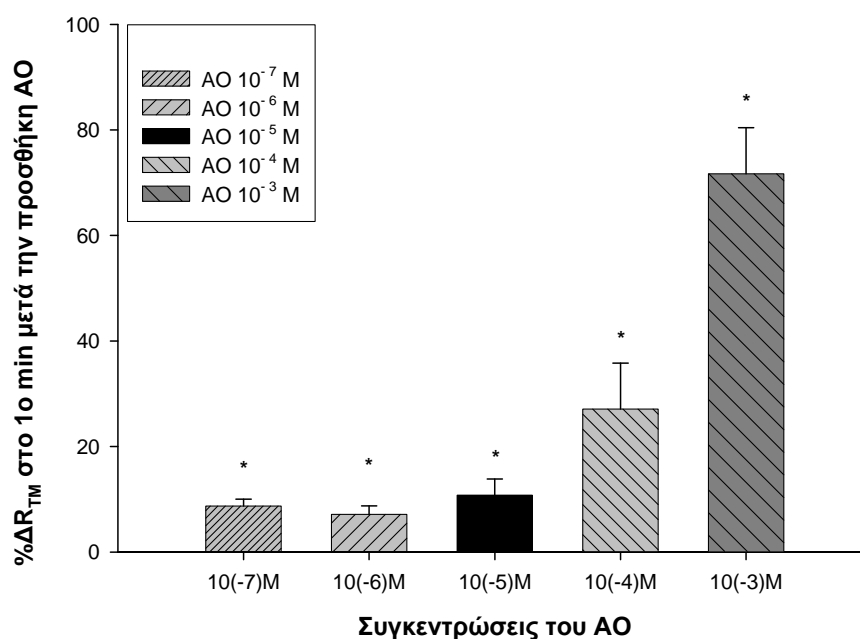
$R_{TM}$  στο 1<sup>ο</sup> λεπτό και στη συνέχεια σταδιακή μείωση σε όλες τις συγκεντρώσεις. Η υψηλότερη και πιο σταθερή αύξηση (μέχρι το 30<sup>ο</sup> λεπτό αλλά στατιστικά σημαντική ως το 15<sup>ο</sup>) μετρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M και ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 71.66\% \pm 8.75\%$  (Διάγραμμα 5).



**Διάγραμμα 5.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα,

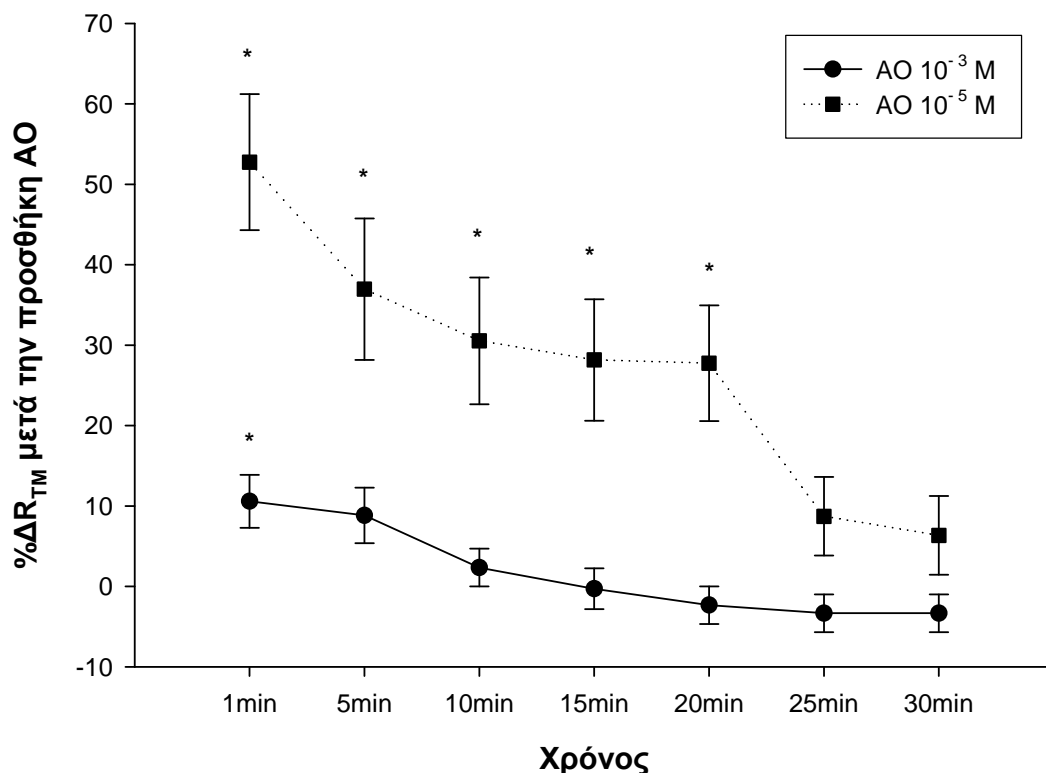
φαίνεται στο διάγραμμα 6. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 71.66\% \pm 8.75\%$ , ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-6}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 7.12\% \pm 1.61\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με καλύτερο αποτέλεσμα στη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M.



**Διάγραμμα 6.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα η υψηλότερη ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M και ήταν στο 1<sup>ο</sup> λεπτό  $\% \Delta R_{TM} = 52.76\% \pm 8.46\%$  (στατιστικώς σημαντική αύξηση μέχρι και το 20<sup>ο</sup> λεπτό) με σταδιακή μείωση στη συνέχεια με διατήρηση της αύξησης μέχρι το τέλος της μετρούμενης περιόδου (Διάγραμμα 7). Ενώ, στη

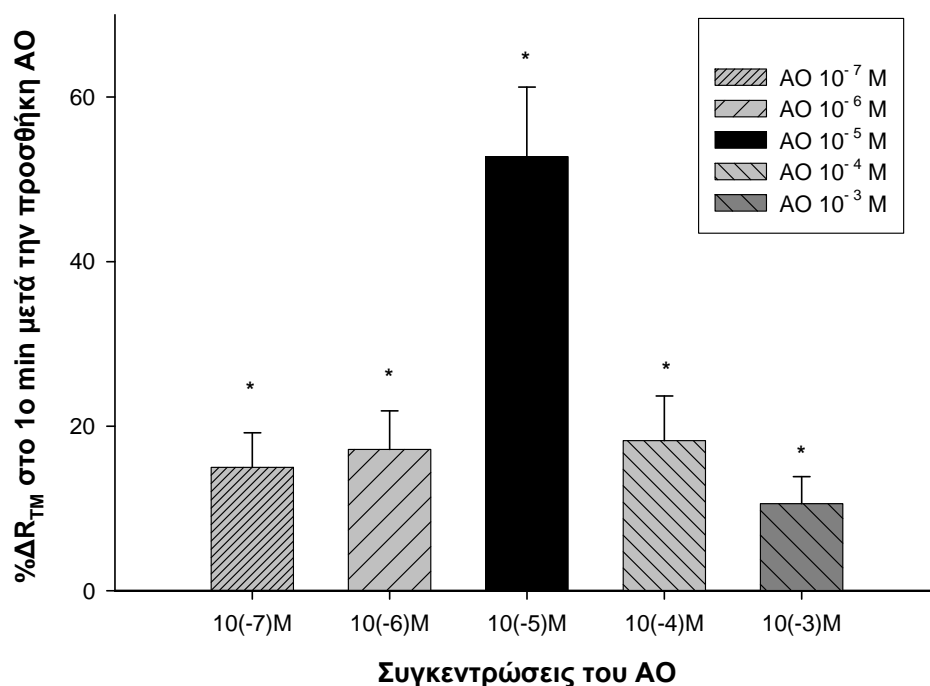
συγκέντρωση  $10^{-3}$  M η αύξηση της  $R_{TM}$  ήταν μικρή στο 1<sup>ο</sup> λεπτό και από το 10<sup>ο</sup> λεπτό και μετά δε διέφερε από την τιμή αναφοράς (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 8. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 52.76\% \pm 8.46\%$ ,

ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-3}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 10.58\% \pm 3.30\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με καλύτερο αποτέλεσμα στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M.



**Διάγραμμα 8.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-3}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Τ.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6).  
\* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

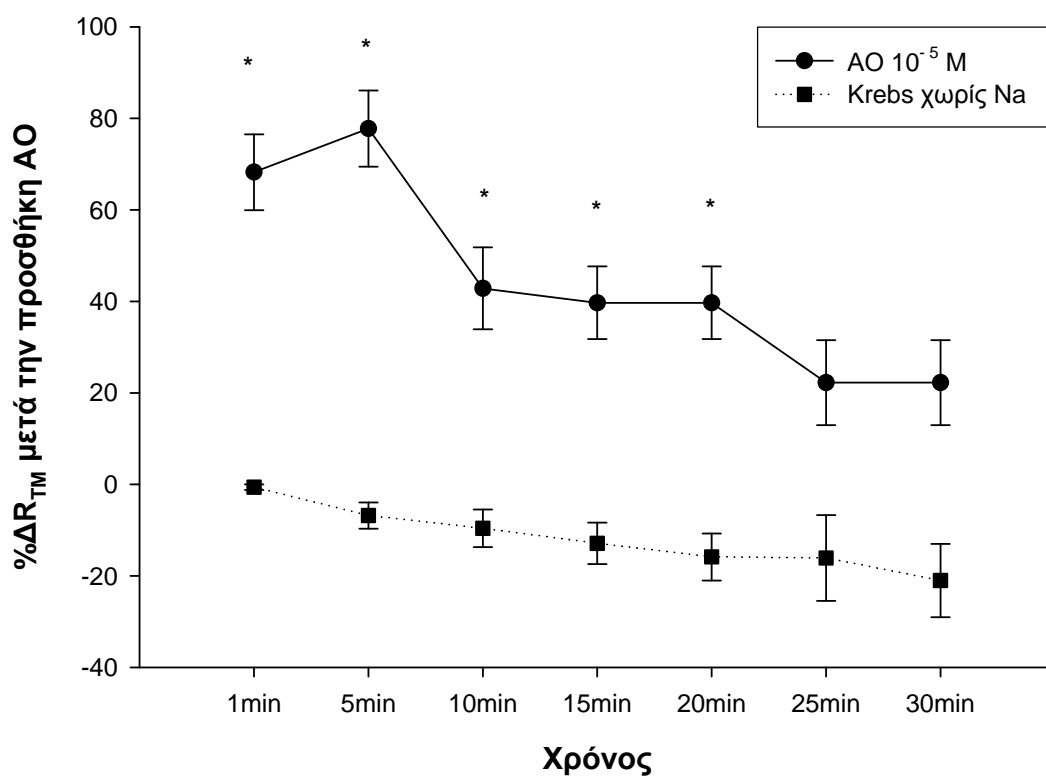
Η διθειοθρεϊτόλη (DTT) είναι ένας τεχνητός αναγωγικός παράγοντας, ο οποίος προστατεύει το ασκορβικό οξύ από την οξειδωσή του σε δεϋδροασκορβικό οξύ, για πάνω από 4 ώρες [193]. Για να προληφθεί η οξειδωση του ασκορβικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διθειοθρεϊτόλη σε συγκέντρωση 0.1 mmol/l και ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M και  $10^{-4}$  M. Παρατηρήθηκαν ίδιες αλλαγές στην

διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα, στον τοιχωματικό και στον περισπλάχνιο, με αυτές που παρατηρήθηκαν στα πειράματα, όπου δε χρησιμοποιήθηκε διθειοθρεϊτόλη (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται). Επίσης, διεξήχθησαν πειράματα μόνο με τη διθειοθρεϊτόλη 0.1 mmol/l η οποία δεν προκάλεσε καμιά αλλαγή στη  $R_{TM}$  του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

### ***Αποτελέσματα του Ασκορβικού οξέος με Krebs χωρίς Νάτριο σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση***

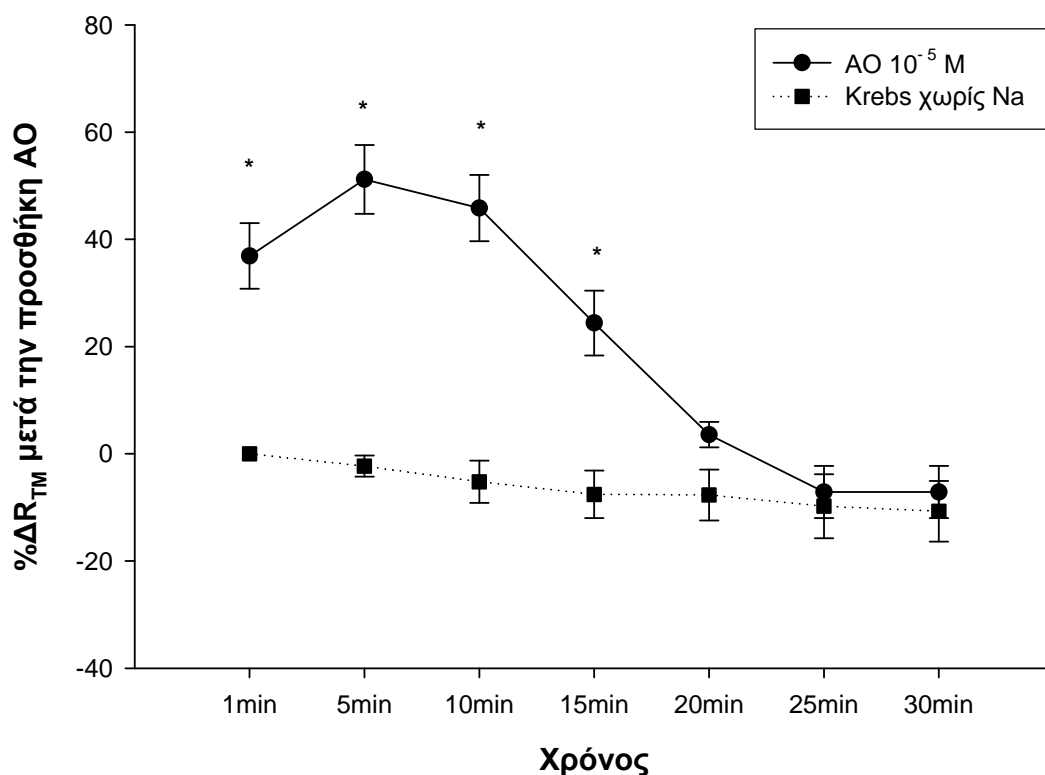
Αφού το ασκορβικό οξύ συµµεταφέρεται µε νάτριο µέσα στα κύτταρα διαµέσου των συµµεταφορέων νατρίου-ασκορβικού οξέος (SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>), πραγµατοποιήθηκαν πειράµατα όπου χρησιµοποιήθηκε ασκορβικό οξύ σε συγκεντρώσεις  $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M µε Krebs χωρίς νάτριο (το νάτριο αντικαταστάθηκε µε χολίνη). Τα αποτελέσµατα του ασκορβικού οξέος στην  $R_{TM}$  του τοιχωµατικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου αναστάλθηκαν πλήρως, όταν το νάτριο αντικαταστάθηκε µε χολίνη στο διάλυµα Krebs και το ασκορβικό οξύ ήταν σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Στο Διάγραμμα 9 φαίνεται η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωµατικού υπεζωκότα, όταν στο krebs το νάτριο αντικαθίσταται από χολίνη. Η  $R_{TM}$  είναι περίπου ίδια µε την αντίσταση αναφοράς του τοιχωµατικού υπεζωκότα, ή χωρίς στατιστικώς σηµαντική διαφορά, όταν το ασκορβικό οξύ είναι διαλυµένο σε krebs χωρίς νάτριο.





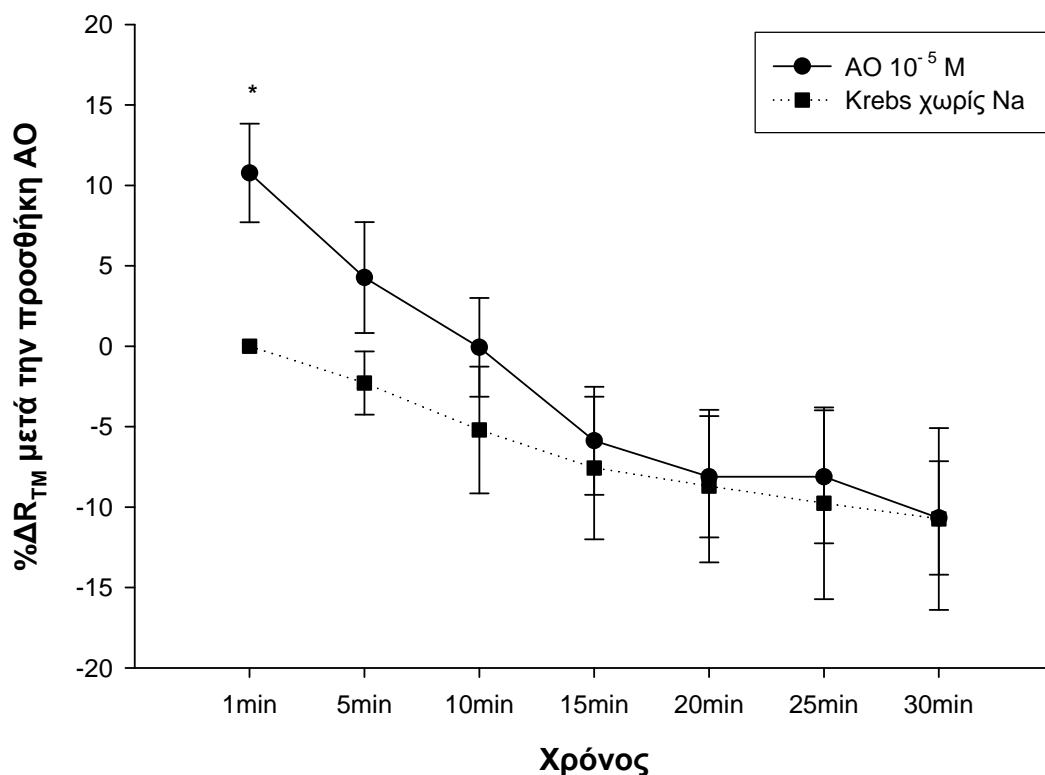
**Διάγραμμα 9.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο. Είναι εμφανής η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος όταν στο krebs το νάτριο αντικαθίσταται από χολίνη. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη  $R_{TM}$  της βασικής επιφάνειας του τοιχωματικού υπεζωκότα μετά από προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο (Διάγραμμα 10).



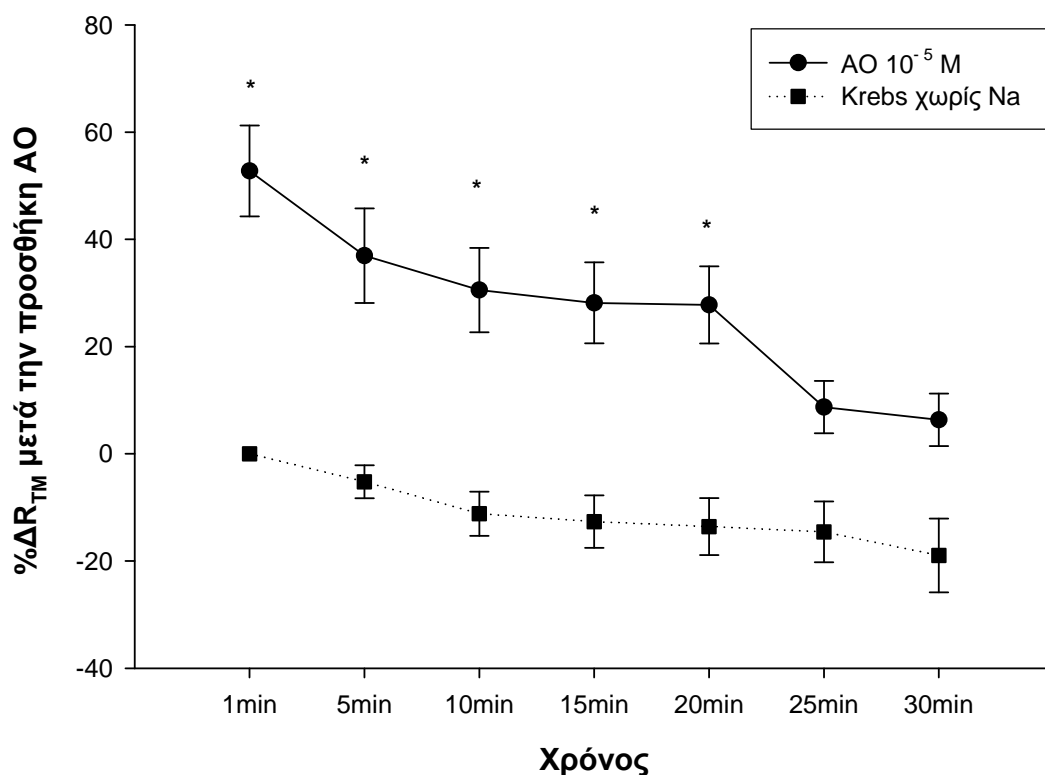
**Διάγραμμα 10.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο. Είναι εμφανής η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος όταν στο krebs το νάτριο αντικαθίσταται από χολίνη. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \* $P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση, που προκάλεσε στη  $R_{TM}$  της κορυφαίας επιφάνειας του περισπλάχνιου υπεζωκότα το ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M, αναστάλθηκε πλήρως όταν στο krebs δεν υπήρχε νάτριο (Διάγραμμα 11).



**Διάγραμμα 11.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο. Είναι εμφανής η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος όταν στο krebs το νάτριο αντικαθίσταται από χολίνη. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ). \* $P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη  $R_{TM}$  της βασικής επιφάνειας του περισπλάχνιου υπεζωκότα μετά από προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο (Διάγραμμα 12).



**Διάγραμμα 12.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M σε krebs χωρίς νάτριο. Είναι εμφανής η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος όταν στο krebs το νάτριο αντικαθίσταται από χολίνη. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων ασκορβικού οξέος σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

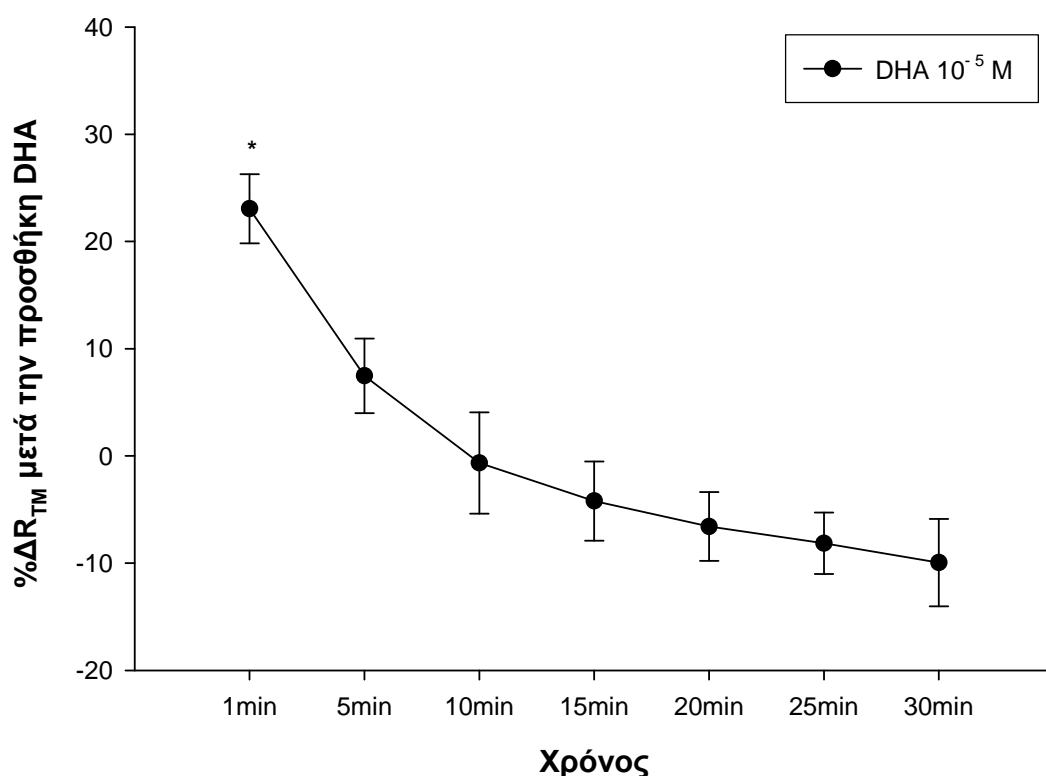
Η αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος στη  $R_{TM}$  τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού και περισπλάχνιου

υπεζωκότα ήταν εμφανής και όταν χρησιμοποιήθηκε ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση  $10^{-3}$  M με krebs χωρίς νάτριο (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

### ***Αποτελέσματα του Δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε σχέση με το χρόνο και τη συγκέντρωση***

Το αποτέλεσμα της δράσης του DHA στον τοιχωματικό και περισπλάχνιο υπεζωκότα προβάτου μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Το DHA αυξάνει σημαντικά την  $R_{TM}$  υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του σε όλες τις συγκεντρώσεις. Το καλύτερο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M και στις δύο επιφάνειες (κορυφαία και βασική) των δύο πετάλων του υπεζωκότα.

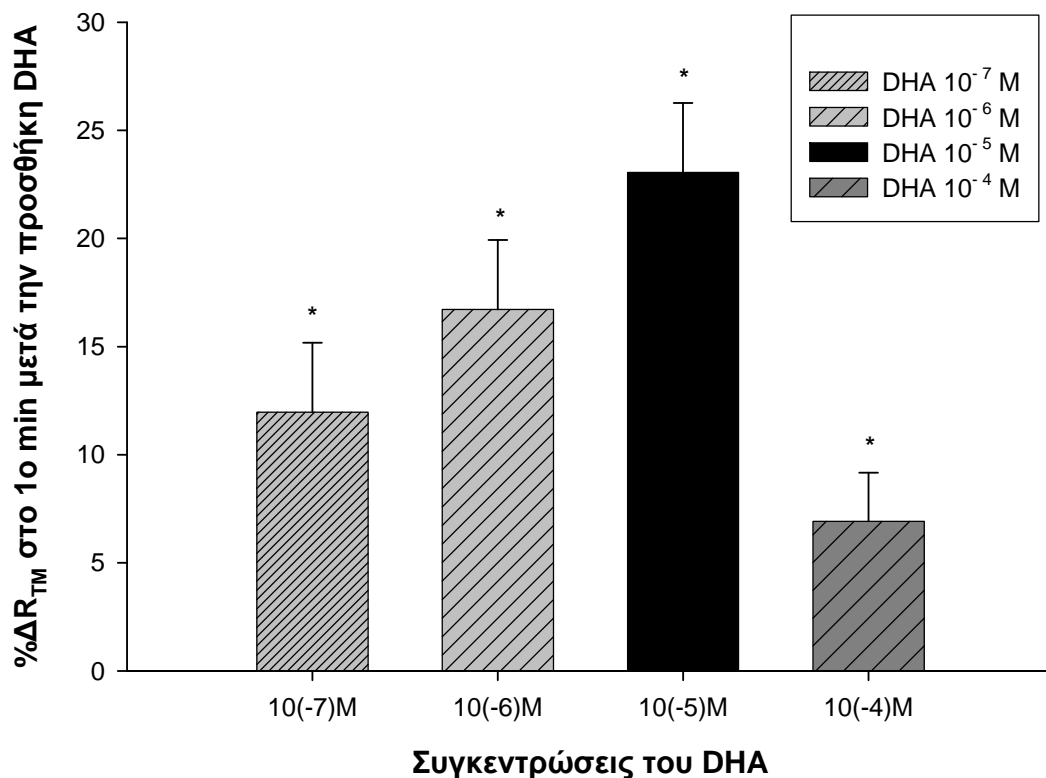
Πιο συγκεκριμένα, στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα το DHA στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του προκάλεσε ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 23.05\% \pm 3.22\%$  (Διάγραμμα 13). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στο 10<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του DHA η  $R_{TM}$  έγινε σχεδόν ίση με την αντίσταση αναφοράς και στη συνέχεια ελαττώθηκε μη στατιστικώς σημαντικά (Διάγραμμα 13).



**Διάγραμμα 13.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε αυτή τη συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 14. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 23.05\% \pm 3.22\%$ , ενώ η μικρότερη στη συγκέντρωση  $10^{-4}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 6.91\% \pm 2.26\%$ . Στατιστικώς

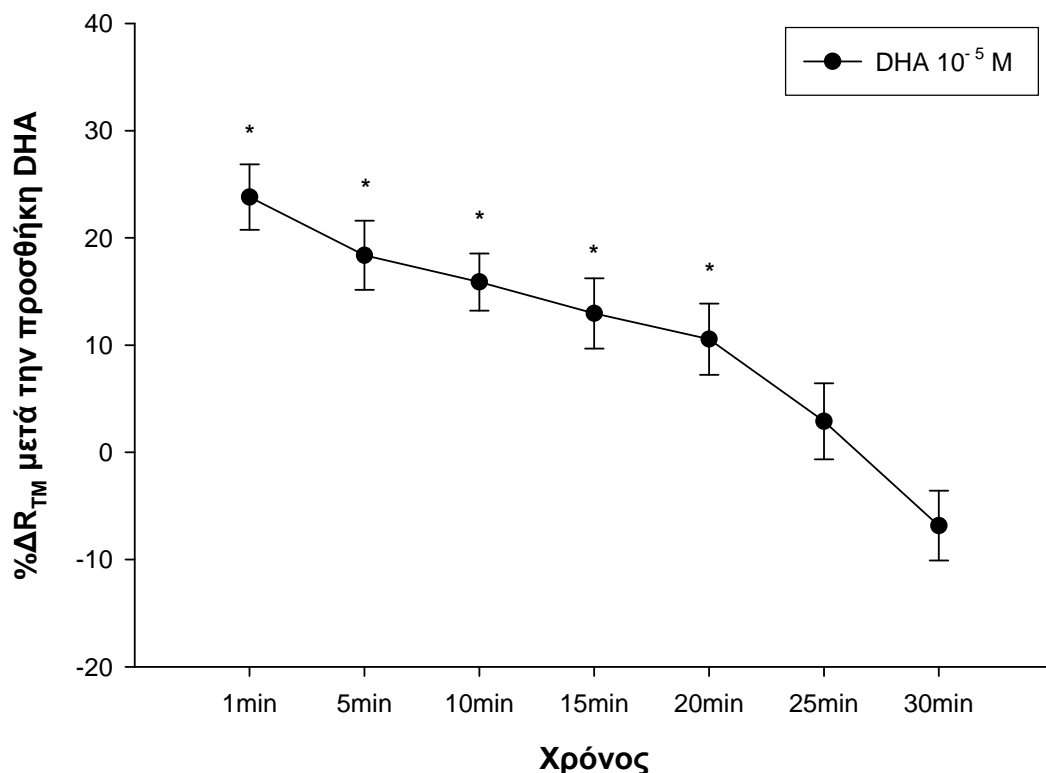
σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με μεγαλύτερη τιμή στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M (Διάγραμμα 14).



**Διάγραμμα 14.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ).  $*P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα το DHA σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  στο 1<sup>ο</sup> λεπτό που ήταν  $\% \Delta R_{TM}=23.81\% \pm 3.05\%$ , η οποία διατηρήθηκε στατιστικώς αυξημένη ως το 20<sup>ο</sup> λεπτό, φτάνοντας στη συνέχεια στην τιμή αναφοράς της

$R_{TM}$  με μικρή, μη στατιστικώς σημαντική, μείωση στο τέλος της μετρούμενης περιόδου (Διάγραμμα 15).

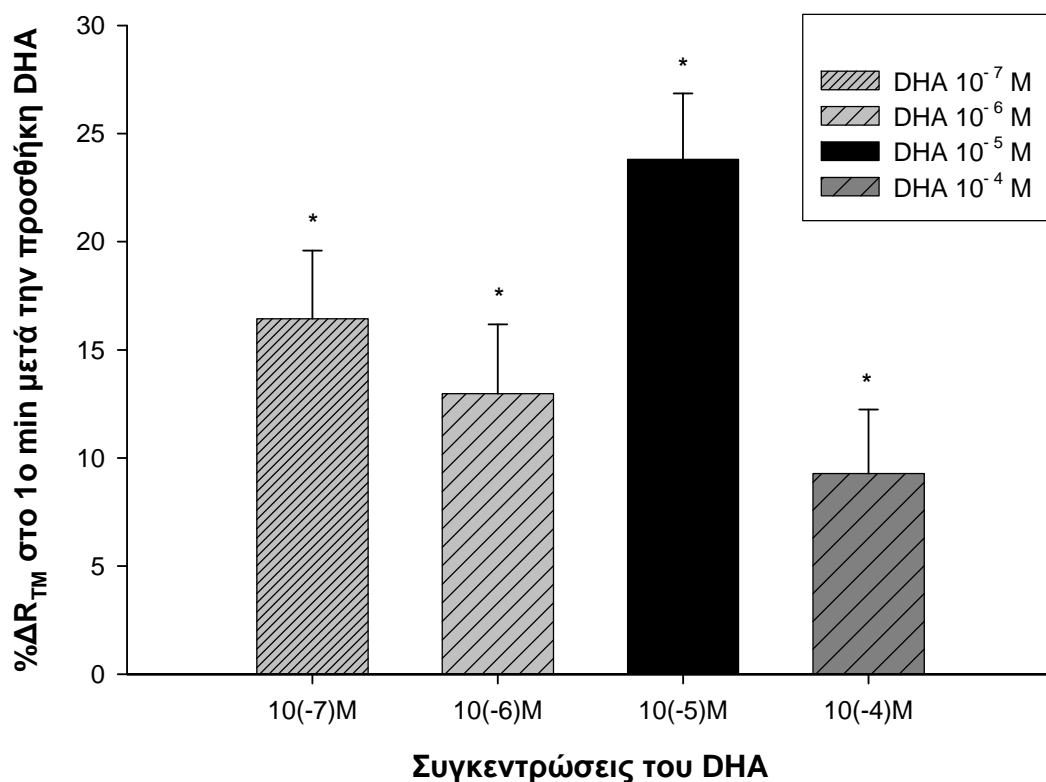


**Διάγραμμα 15.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε αυτή τη συγκέντρωση ( $N=6$ ). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 16. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 23.81\% \pm 3.05\%$ , ενώ η μικρότερη



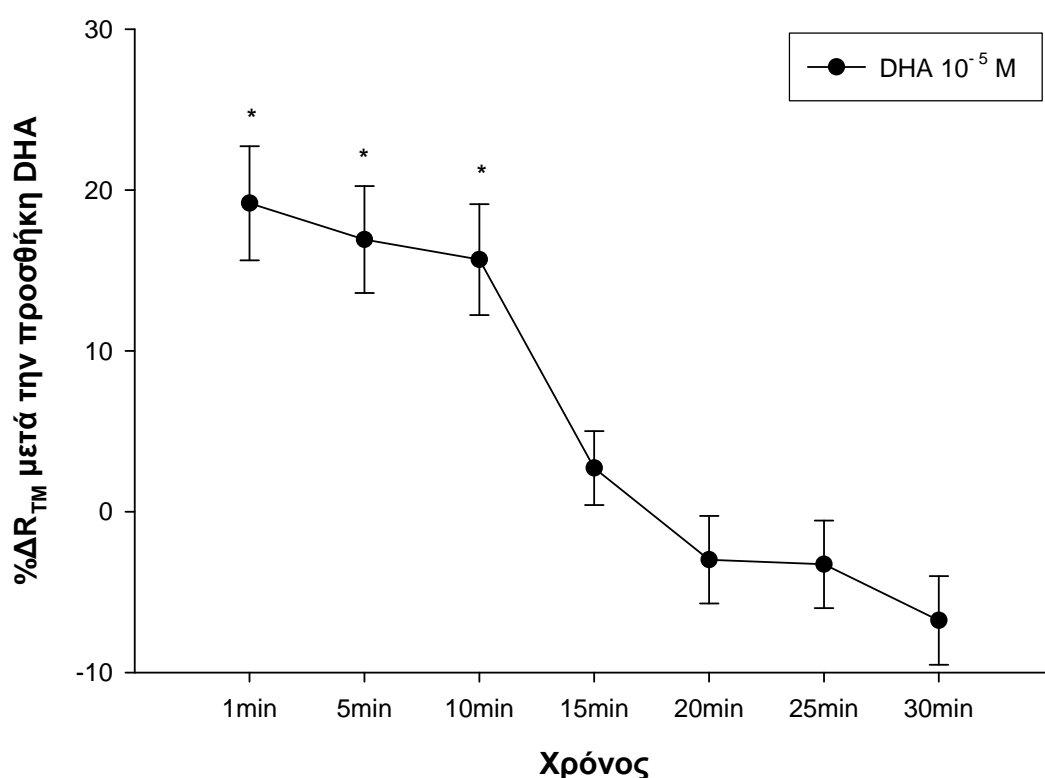
αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-4}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 9.28\% \pm 2.96\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με μεγαλύτερη τιμή στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M (Διάγραμμα 16).



**Διάγραμμα 16.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ). \* $P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όσο αφορά τη δράση του DHA σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του, που ήταν

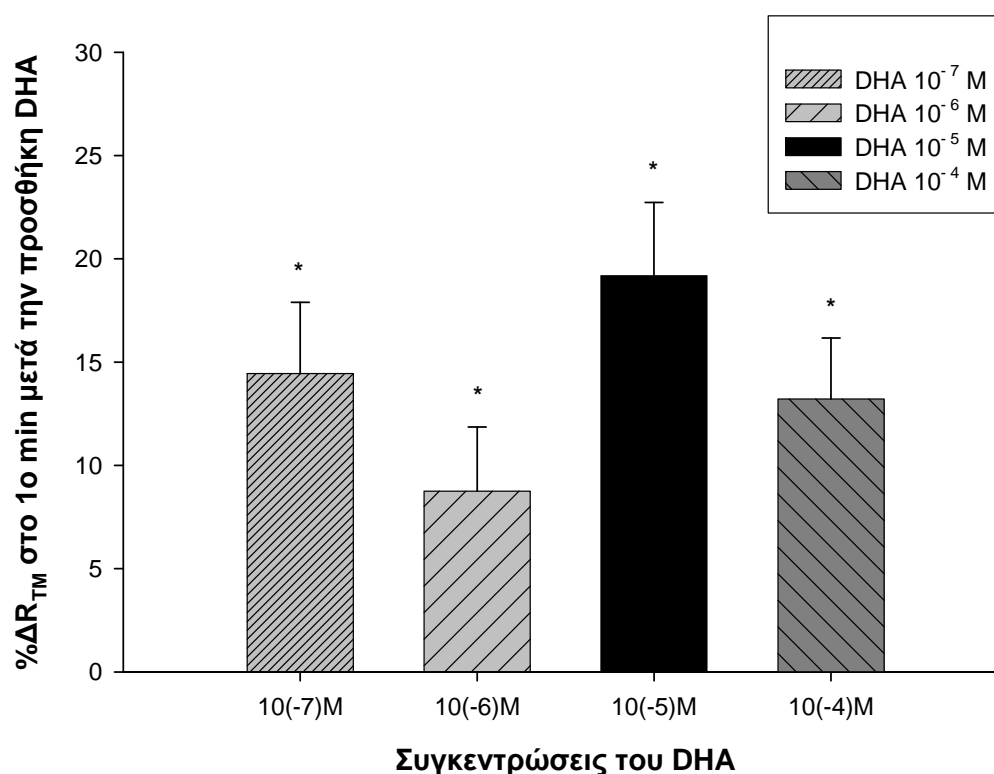
$\% \Delta R_{TM} = 19.18\% \pm 3.55\%$  (Διάγραμμα 17). Η αύξηση παρέμεινε στατιστικώς σημαντική μέχρι το 10<sup>ο</sup> λεπτό, για να φτάσει σχεδόν την τιμή αναφοράς της στο 15<sup>ο</sup> λεπτό και στη συνέχεια μειώθηκε ελάχιστα, χωρίς να είναι στατιστικώς σημαντική, ως το τέλος της μετρούμενης περιόδου (Διάγραμμα 17).



**Διάγραμμα 17.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε αυτή τη συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε όλες

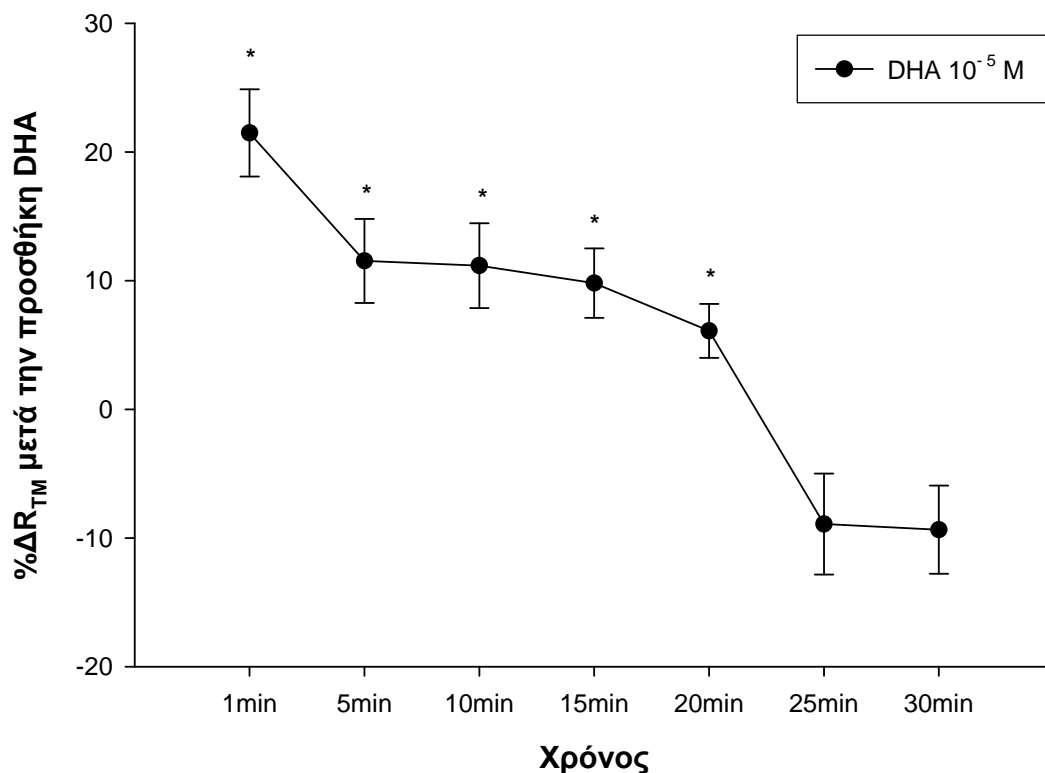
τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 18. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 19.18\% \pm 3.55\%$ , ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-6}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 8.75\% \pm 3.11\%$ . Στατιστικώς σημαντικές ήταν όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με μεγαλύτερη τιμή στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M (Διάγραμμα 18).



**Διάγραμμα 18.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε κάθε συγκέντρωση ( $N=6$ ). \* $P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα το DHA σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  στο 1<sup>ο</sup> λεπτό που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 21.48\% \pm 3.38\%$ , η οποία διατηρήθηκε στατιστικώς

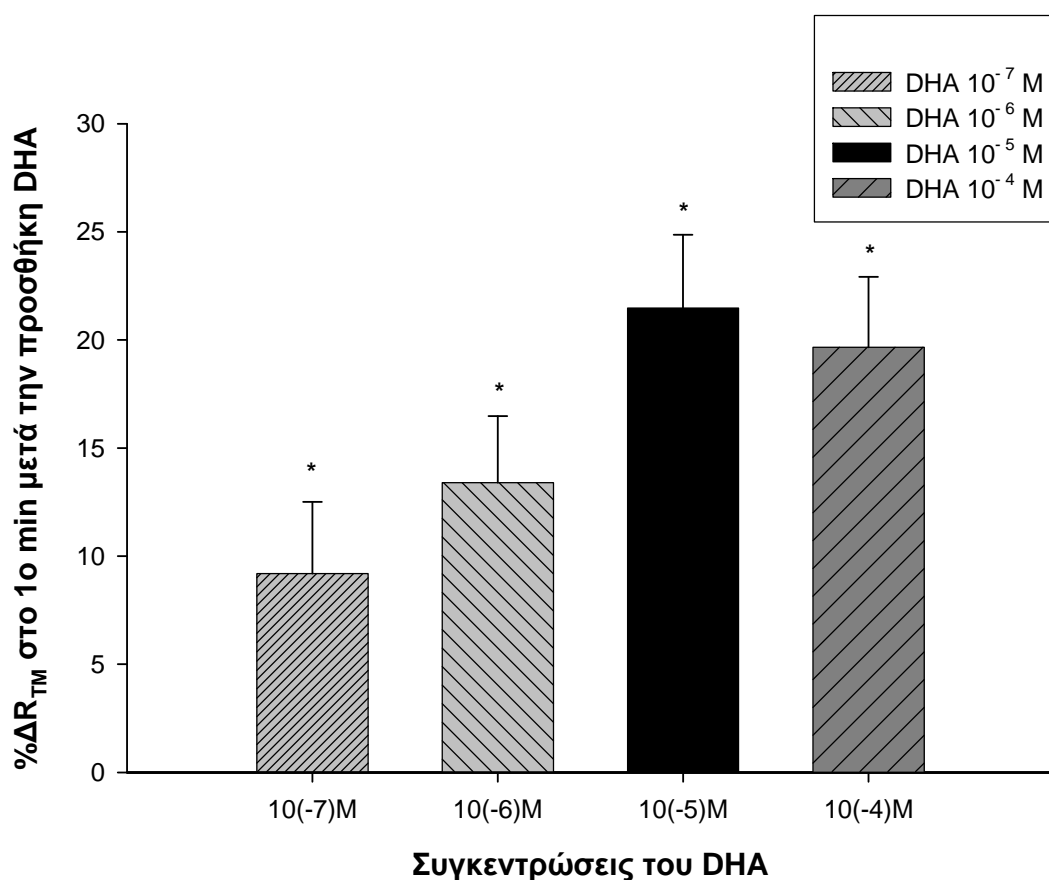
αυξημένη ως το 20<sup>ο</sup> λεπτό, με μικρή μη στατιστικώς σημαντική μείωση στη συνέχεια ως το 30<sup>ο</sup> λεπτό (Διάγραμμα 19).



**Διάγραμμα 19.** Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $\% \Delta R_{TM}$  στην βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου σε σχέση με το χρόνο μετά την προσθήκη δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε αυτή τη συγκέντρωση (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$ , στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, φαίνεται στο διάγραμμα 20. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 21.48\% \pm 3.38\%$ , ενώ η μικρότερη αύξηση στη συγκέντρωση  $10^{-7}$  M που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 9.19\% \pm 3.32\%$ .

Στατιστικώς σημαντικές είναι όλες οι αυξήσεις της  $R_{TM}$  με μεγαλύτερη τιμή στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M (Διάγραμμα 20).

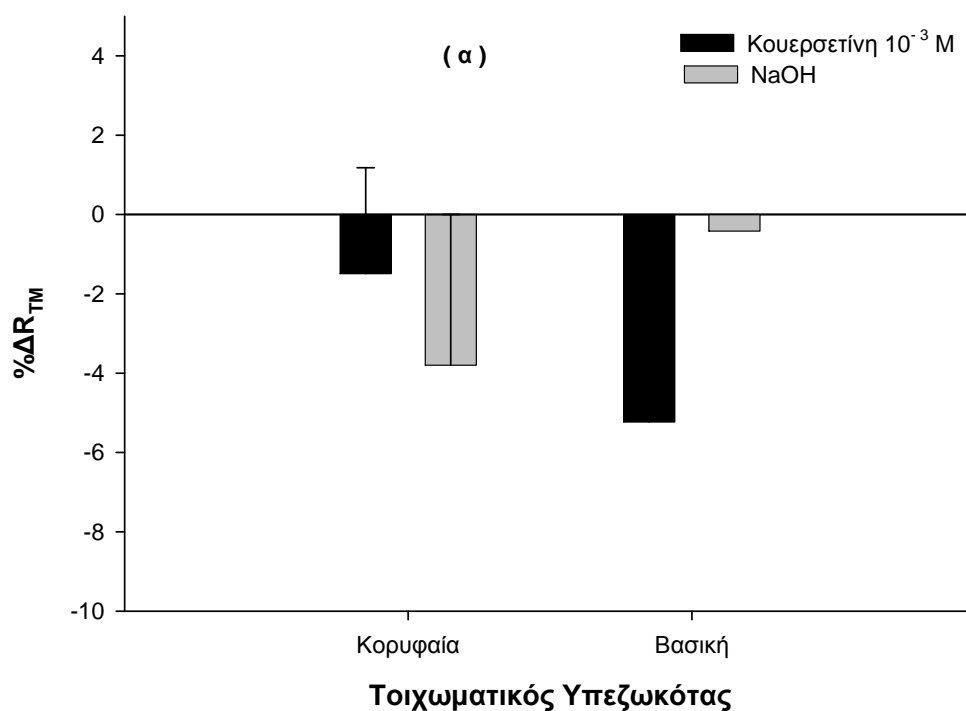


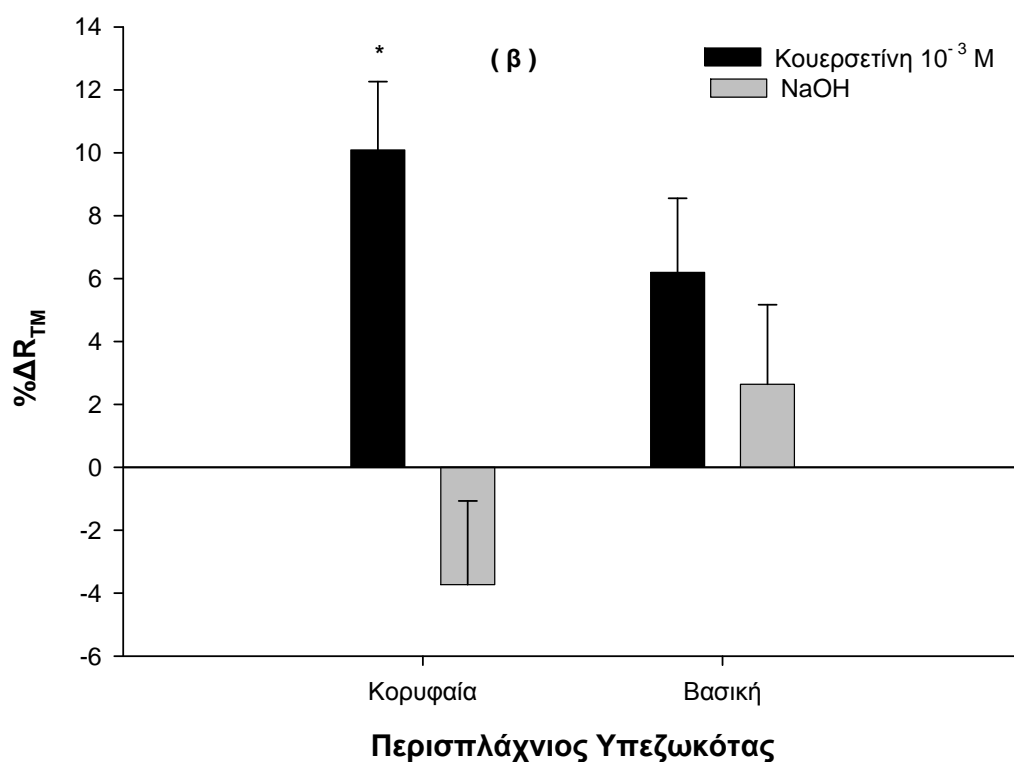
**Διάγραμμα 20.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  (% $\Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του DHA σε συγκεντρώσεις από  $10^{-7}$  M ως  $10^{-4}$  M. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων DHA σε κάθε συγκέντρωση (N=6).  $P<0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

### Επίδραση της κουερσετίνης με το ασκορβικό οξύ στον υπεζωκότα

Η κουερσετίνη είναι φλαβονόλη, η οποία αναστέλλει την είσοδο του ασκορβικού οξέος μέσα στα κύτταρα μέσω των συμμεταφορέων νατρίου-ασκορβικού οξέος (SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>). Μελετήθηκε η δράση της στον

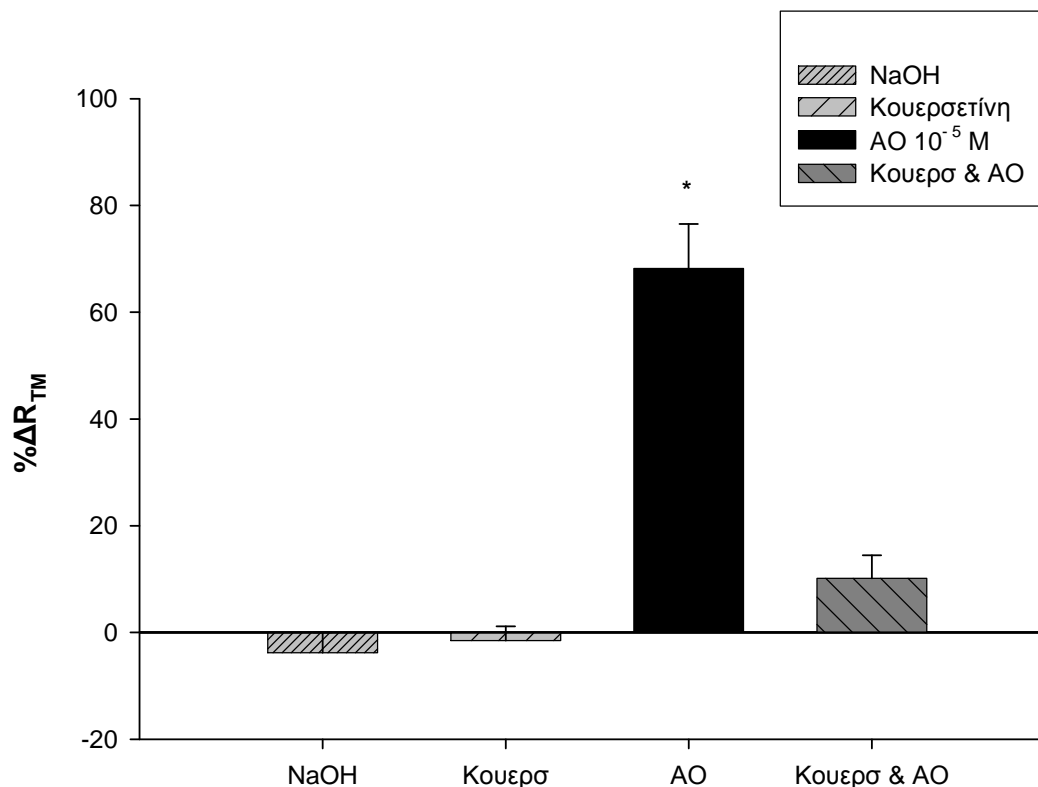
τοιχωματικό και περισπλάχνιο υπεζωκότα μόνη της και μαζί με το ασκορβικό οξύ. Για να χρησιμοποιηθεί η κουερσετίνη διαλύθηκε σε NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, έτσι διερευνήθηκε και η δράση του NaOH στον υπεζωκότα. Δεν υπήρξε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα του NaOH στον τοιχωματικό και στον περισπλάχνιο υπεζωκότα κατά το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του (Διάγραμμα 21). Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την κουερσετίνη, εκτός από την κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, όπου προκάλεσε μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική αύξηση στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη της, που ήταν  $\% \Delta R_{TM} = 10.09\% \pm 2.17\%$  (Διάγραμμα 21β).





**Διάγραμμα 21.** Η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  του υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη κουερσετίνης  $10^{-3}$  M ή NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M στη κορυφαία και βασική επιφάνεια του τοιχωματικού (α) και περισπλάχνιου (β) υπεζωκότα προβάτου. Η κουερσετίνη προκάλεσε μικρή αύξηση της  $R_{TM}$  μόνο στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, ενώ το NaOH δεν παρουσίασε καμιά σημαντική μεταβολή στην  $R_{TM}$  κατά το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων κουερσετίνης και NaOH σε κάθε συγκέντρωση (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

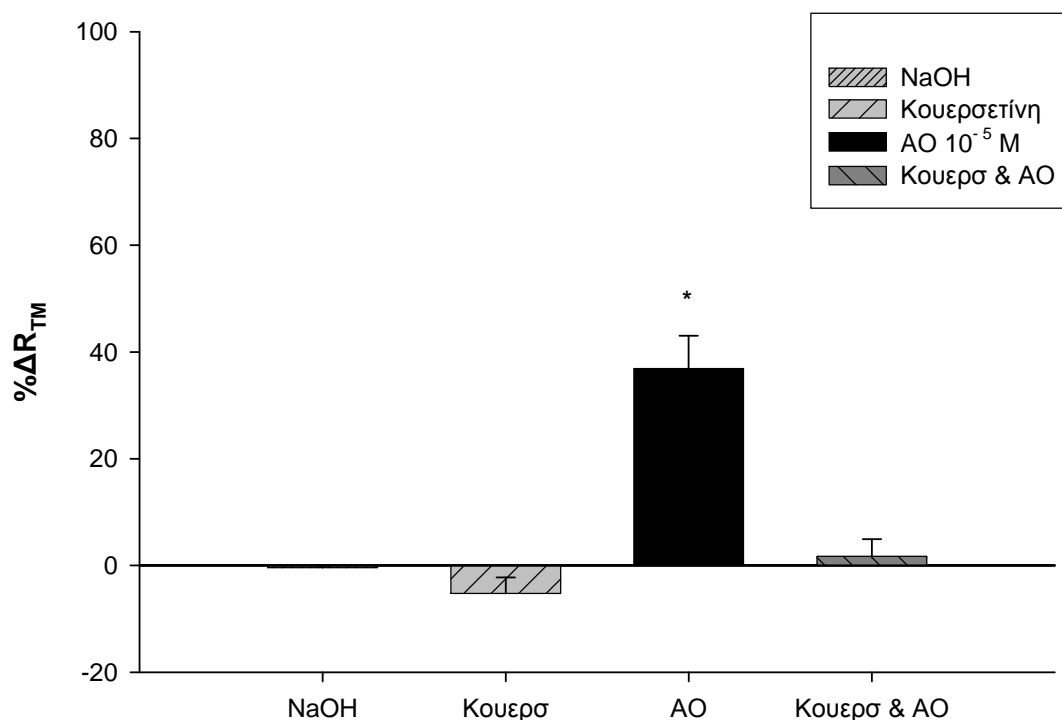
Το ανασταλτικό αποτέλεσμα της κουερσετίνης στην επίδραση του ασκορβικού οξέος στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα φαίνεται στο διάγραμμα 22.



**Διάγραμμα 22.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  (%Δ $R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με ασκορβικό οξύ στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



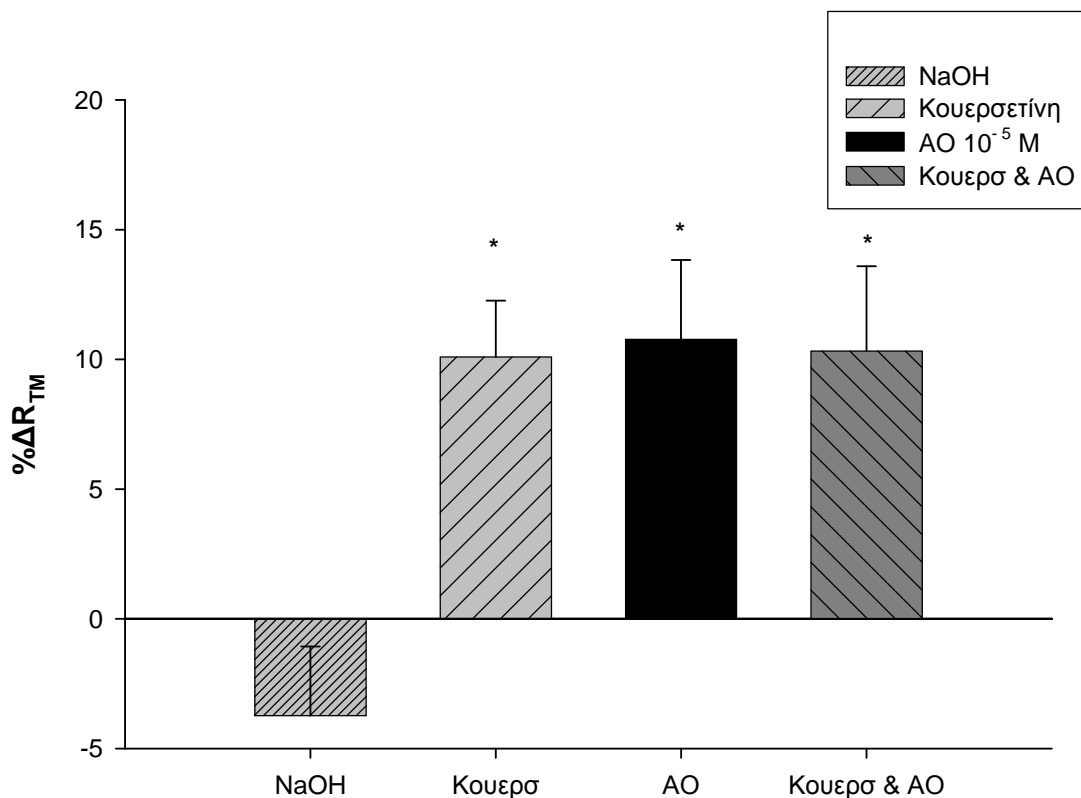
Στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η κουερσετίνη επίσης αναστέλλει τη δράση του ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και αυτό φαίνεται στο διάγραμμα 23.



**Διάγραμμα 23.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με ασκορβικό οξύ στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

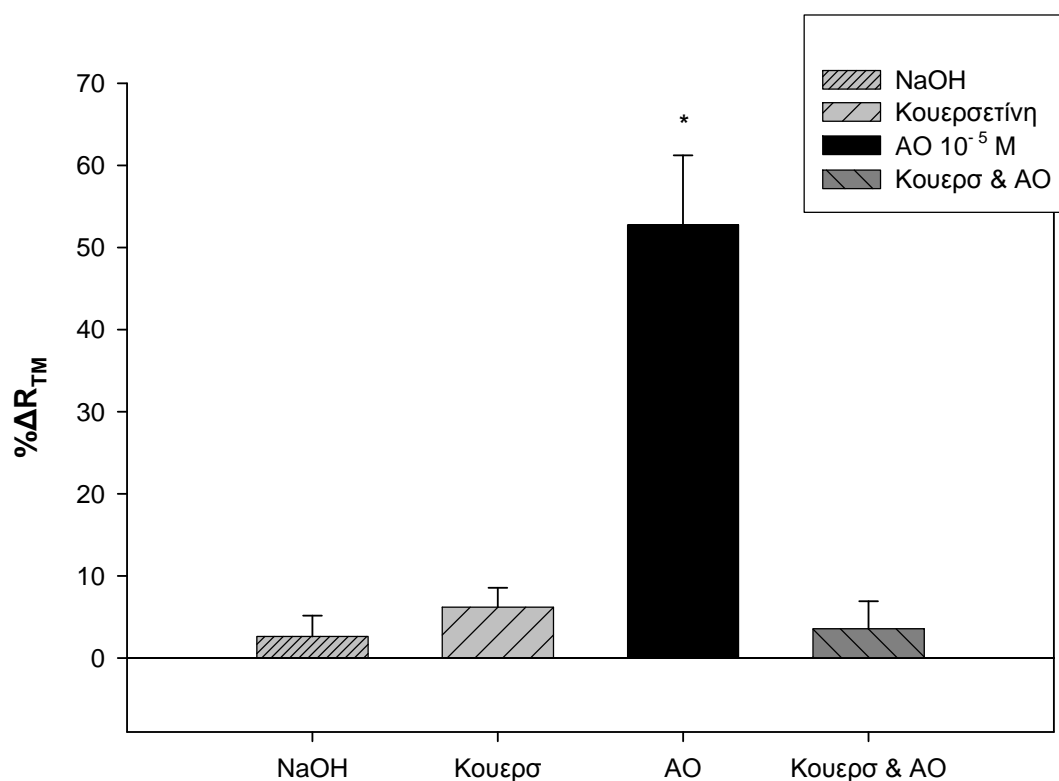
Στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα η ποσοστιαία μεταβολή της  $R_{TM}$  με τη δράση της κουερσετίνης, του ασκορβικού οξέος και της κουερσετίνης μαζί με το ασκορβικό οξύ ήταν σχεδόν ίδια  $\% \Delta R_{TM} = 10.09\% \pm 2.17\%$ ,  $\% \Delta R_{TM} = 10.77\% \pm 3.06\%$ ,  $\% \Delta R_{TM} = 10.32\% \pm 3.27\%$ ,

αντίστοιχα (Διάγραμμα 24). Δεν υπάρχει αναστολή αλλά ούτε και συνεργική δράση μεταξύ κουερσετίνης και ασκορβικού οξέος στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα.



**Διάγραμμα 24.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  (% $\Delta R_{TM}$ ) στη κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με ασκορβικό οξύ στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα η κουερσετίνη αναστέλλει τη δράση του ασκορβικού οξέος (Διάγραμμα 25).

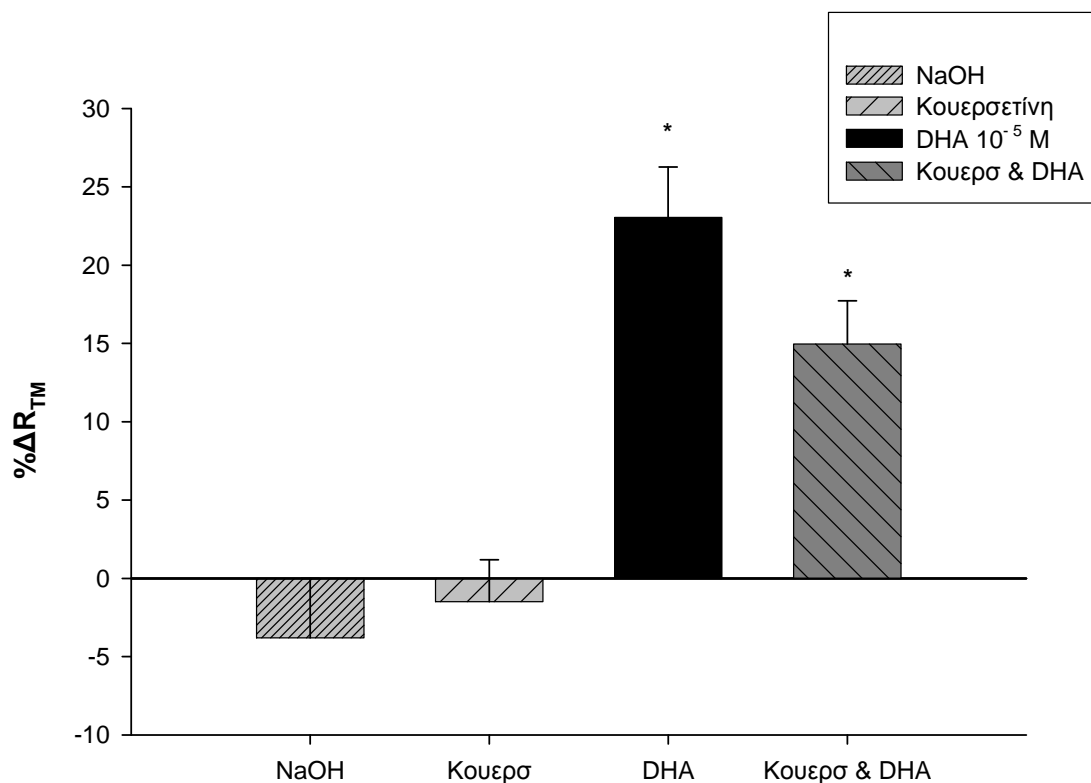


**Διάγραμμα 25.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  (%Δ $R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με ασκορβικό οξύ στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

### **Επίδραση της κουερσετίνης με το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) στον υπεζωκότα**

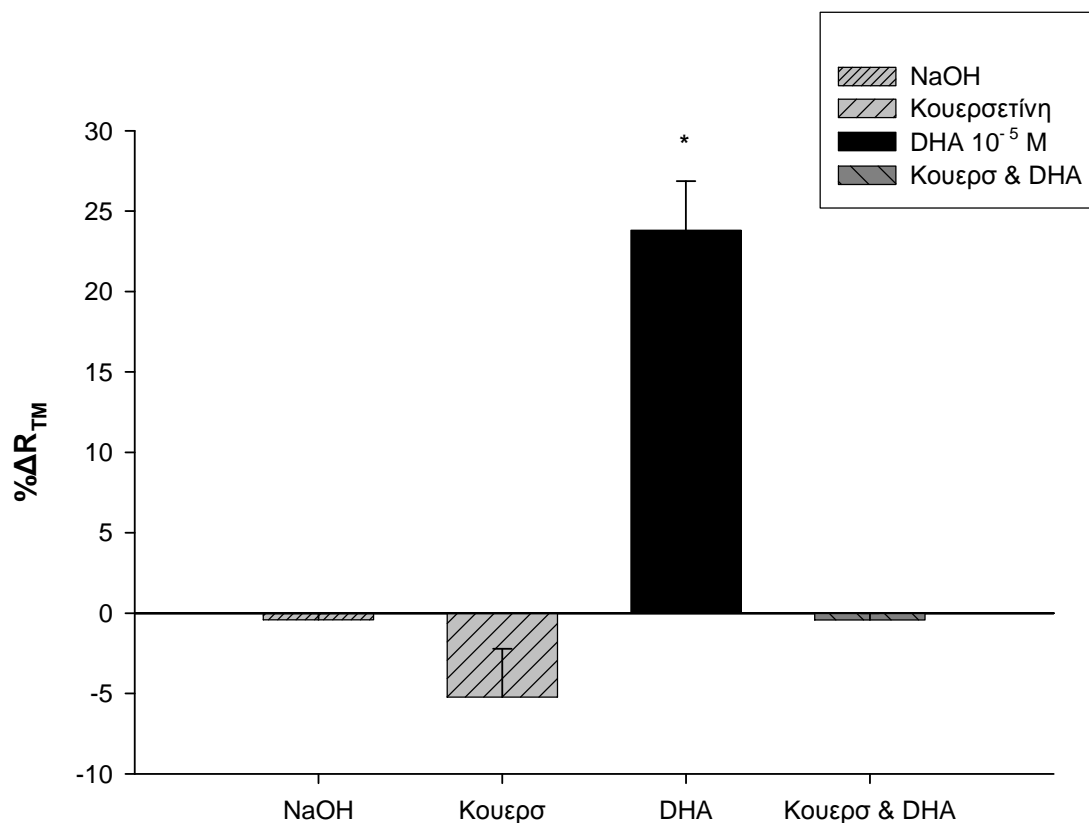
Η κουερσετίνη αναστέλλει την είσοδο του δεϋδροασκορβικού οξέος στα κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT<sub>1</sub> και GLUT<sub>3</sub>). Μελετήθηκε η επίδραση της κουερσετίνης  $10^{-3}$  M στη δράση του δεϋδροασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα. Όταν η κουερσετίνη προστέθηκε στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού ή και του περισπλάχνιου υπεζωκότα προκάλεσε πλήρη αναστολή της δράσης του DHA, ενώ η αναστολή ήταν μερική όταν η κουερσετίνη επέδρασε στην κορυφαία επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα.

Πιο συγκεκριμένα, μερική αναστολή προκάλεσε η κουερσετίνη στη δράση του DHA στην  $R_{TM}$  της κορυφαίας επιφάνειας του υπεζωκότα, η οποία φαίνεται στο διάγραμμα 26.



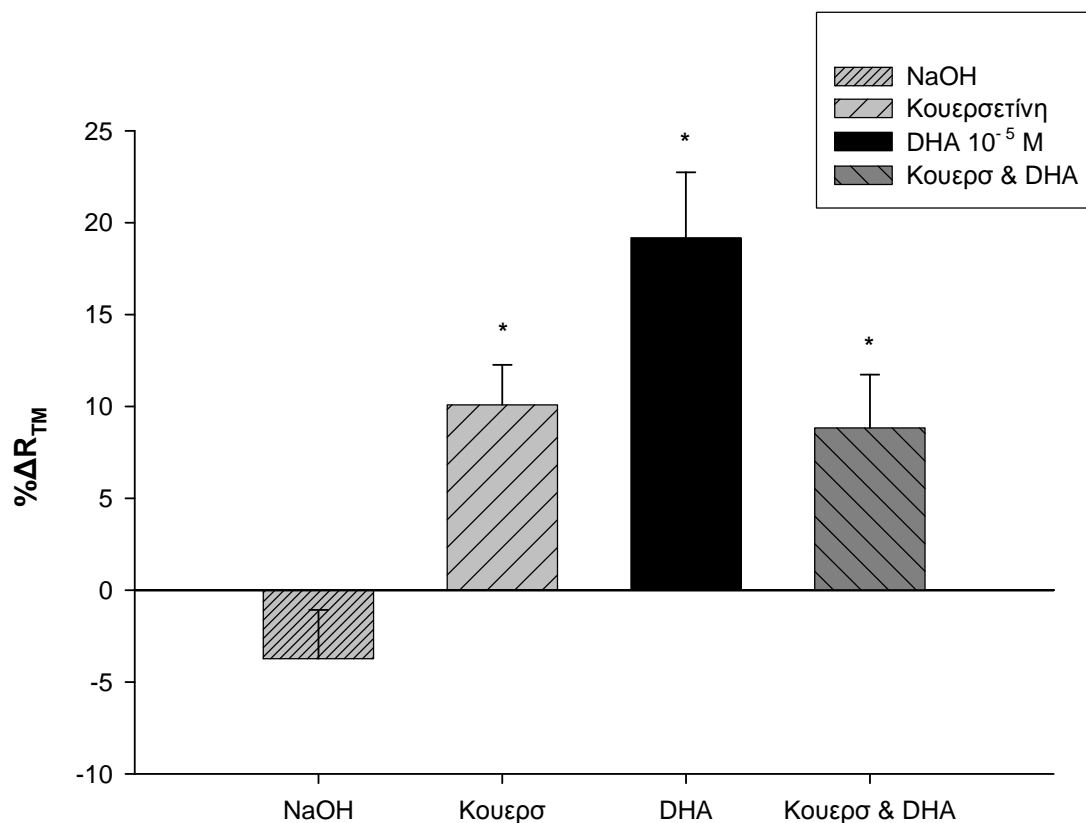
**Διάγραμμα 26.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, DHA  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με DHA στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \*  $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η κουερσετίνη προκάλεσε πλήρη αναστολή της δράσης του DHA, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 27.



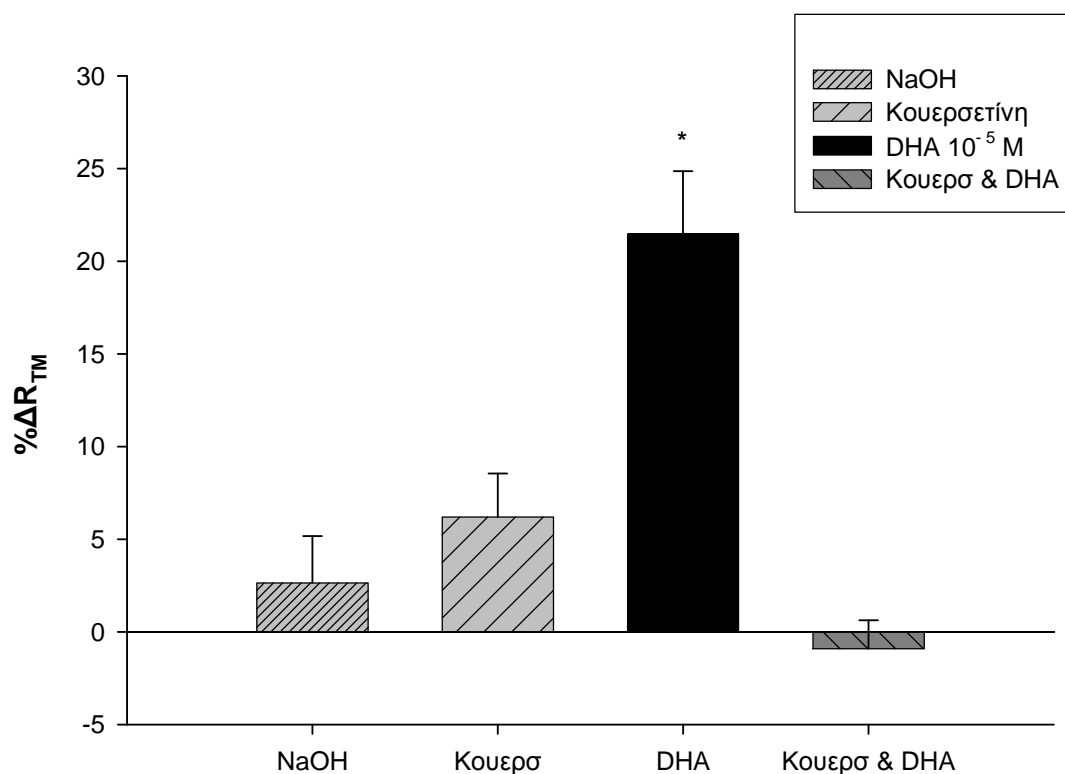
**Διάγραμμα 27.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  (%Δ $R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, DHA  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με DHA στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Όσο αφορά το αποτέλεσμα της κουερσετίνης στη δράση του DHA στην  $R_{TM}$  της κορυφαίας επιφάνειας του περισπλάχνιου υπεζωκότα, αυτή προκάλεσε μερική αναστολή, η οποία είναι εμφανής στο διάγραμμα 28.



**Διάγραμμα 28.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, DHA  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με DHA στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

Στην βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, η κουερσετίνη προκάλεσε πλήρη αναστολή της δράσης του DHA, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 29.



**Διάγραμμα 29.** Σύγκριση των ποσοστιαίων αυξήσεων της  $R_{TM}$  ( $\% \Delta R_{TM}$ ) στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα στο 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη του NaOH  $1.25 \cdot 10^{-2}$  M, κουερσετίνης  $10^{-3}$  M, DHA  $10^{-5}$  M, κουερσετίνης μαζί με DHA στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  T.Σ. (τυπικό σφάλμα) 6 πειραμάτων για κάθε ουσία και τον συνδυασμό τους (N=6). \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου αυξάνεται από τη δράση της βιταμίνης C, είτε με τη μορφή του ασκορβικού οξέος, είτε με τη μορφή του μεταβολίτη της δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA). Πλήρης αναστολή της δράσης του ασκορβικού οξέος παρατηρήθηκε, όταν στο Krebs το νάτριο αντικαταστάθηκε από χολίνη, καθώς και όταν προστέθηκε κουερσετίνη, εκτός από την κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, όπου μόνο εκεί παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της  $R_{TM}$  από τη δράση της κουερσετίνης. Η κουερσετίνη είναι μια φλαβονόλη με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, που αναστέλλει την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος και DHA από τα κύτταρα μέσω νάτριο-εξαρτώμενων και νάτριο-ανεξάρτητων συστημάτων μεταφοράς, τους SVCTs και GLUTs αντίστοιχα. Τέλος, μερική αναστολή της δράσης του DHA παρατηρήθηκε όταν προστέθηκε κουερσετίνη στην κορυφαία επιφάνεια, των δύο πετάλων του υπεζωκότα, ενώ πλήρη αναστολή της δράσης του όταν η κουερσετίνη προστέθηκε στη βασική επιφάνεια αυτών των πετάλων.

Πιο συγκεκριμένα **αύξηση της  $R_{TM}$**  παρατηρήθηκε:

1. Από το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του ασκορβικού οξέος και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού υπεζωκότα. Όσο αφορά τις συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκε το καλύτερο αποτέλεσμα ( $10^{-5}$  M και  $10^{-3}$  M) , το ασκορβικό οξύ προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση (μέχρι και το 15<sup>ο</sup> λεπτό) δρώντας στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα παραμένοντας αυξημένη ως 30<sup>ο</sup> λεπτό, ενώ

στη βασική επιφάνεια η αύξηση διατηρήθηκε μέχρι το 15<sup>ο</sup> λεπτό και στη συνέχεια έφτασε την τιμή αναφοράς της  $R_{TM}$ .

2. Από το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του ασκορβικού οξέος και στις δύο επιφάνειες του περισπλάχνιου υπεζωκότα. Στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα η μεγαλύτερη αύξηση της  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση ασκορβικού οξέος  $10^{-3}$  M (στατιστικά σημαντική ως το 15<sup>ο</sup> λεπτό), ενώ στη βασική επιφάνεια σε συγκέντρωση ασκορβικού οξέος  $10^{-5}$  M (στατιστικά σημαντική ως το 20<sup>ο</sup> λεπτό).
3. Από το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του DHA και στις δύο επιφάνειες των πετάλων του υπεζωκότα. Το DHA προκάλεσε την ίδια σχεδόν αύξηση της  $R_{TM}$  δρώντας σε κάθε επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα, με μεγαλύτερη τιμή στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M. Η αύξηση ήταν πιο παρατεταμένη όταν το DHA επέδρασε στη βασική επιφάνεια (μέχρι το 20<sup>ο</sup> λεπτό στατιστικώς σημαντική) των δύο πετάλων.
4. Κατά το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης της κουερσετίνης  $10^{-3}$  M μόνο στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα (μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση).

**Η αύξηση της  $R_{TM}$  αναστάληκε** (πλήρως ή μερικώς):

1. Όταν το ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M ή  $10^{-3}$  M προστέθηκε σε οποιαδήποτε επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα και στο krebs δεν υπήρχε νάτριο (το νάτριο αντικαταστάθηκε από χολίνη) δεν αυξήθηκε η  $R_{TM}$  - Πλήρης αναστολή της δράσης του.
2. Όταν το ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M μαζί με την κουερσετίνη προστέθηκε σε κάθε επιφάνεια του υπεζωκότα, εκτός από

την κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου, όπου σημειώθηκε μικρή αύξηση της  $R_{TM}$ , ίδια με αυτή που προκάλεσε η κουερσετίνη μόνη της.

3. Όταν το DHA σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M μαζί με κουερσετίνη προστέθηκαν στην κορυφαία επιφάνεια και των δύο πετάλων του υπεζωκότα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της  $R_{TM}$  -Μερική αναστολή.
4. Όταν το DHA σε συγκέντρωση  $10^{-5}$  M μαζί με κουερσετίνη προστέθηκαν στη βασική επιφάνεια και των δύο πετάλων του υπεζωκότα δεν αυξήθηκε η  $R_{TM}$  -Πλήρη αναστολή.

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η βιταμίνη C, είτε ως ασκορβικό οξύ είτε ως δεϋδροασκορβικό οξύ, δρα στον υπεζωκότα προβάτου και μειώνει τη διαπερατότητά του. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, αν λάβουμε υπόψη τον προστατευτικό ρόλο της βιταμίνης C, ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, κατά τη διάρκεια των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι παραπνευμονικές συλλογές αποτελούν επιπλοκές των πνευμονικών λοιμώξεων ή των υποϋπεζωκοτικών φλεγμονών (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που συμβαίνουν στον τοιχωματικό υπεζωκότα, όπως σε χρόνια περικαρδίτιδα, σε παγκρεατίτιδα και υποδιαφραγματικά αποστήματα) και αναπτύσσονται εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου των τριχοειδών και του μεσοθηλίου του υπεζωκότα. Αυτές οι συλλογές είναι κυρίως εξιδρωματικές με αυξημένο αριθμό ουδετεροφίλων, τα οποία μπορούν να ανακυκλώνουν τη βιταμίνη C, ώστε να προστατευτούν τα ίδια τα κύτταρα και οι γύρω ιστοί από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, ο προστατευτικός ρόλος της βιταμίνης C δεν αποδίδεται μόνο στην ικανότητά της να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες αλλά και στο γεγονός ότι μειώνοντας τη

διαπερατότητα του υπεζωκότα συμβάλλει στην ακεραιότητα της λειτουργίας του μεσοθηλιακού φραγμού.

Η παρούσα μελέτη προτείνει την ύπαρξη επίδρασης του ασκορβικού οξέος στην ιοντική διαπερατότητα του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου, που γίνεται λιγότερο διαπερατός σε ιόντα μετά την επίδραση του ασκορβικού οξέος. Τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Το καλύτερο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στα ουδετερόφιλα του ανθρώπου καθώς και στην εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στον εγκέφαλο και τον οφθαλμό του ανθρώπου ( $10^{-3}$  M) και επίσης, στη χαμηλότερη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα του αίματος ( $10^{-5}$  M) [194,195]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαπερατότητα του μεσοθηλίου σε μικρού μοριακού βάρους διαλυμένες ουσίες είναι παρόμοια με αυτή του ενδοθηλίου των τριχοειδών [2], αυτά τα δεδομένα είναι σε συνάφεια με άλλες μελέτες, που αναφέρονται στην επίδραση του ασκορβικού οξέος στη διαπερατότητα του ενδοθηλίου. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι το ασκορβικό οξύ μειώνει τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών διεγείροντας τη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού, διαμέσου των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του καθώς επίσης και με τη διέγερση σύνθεσης του κολλαγόνου [196-198]. Πιο συγκεκριμένα, μια μελέτη, που αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, έχει δείξει ότι η οξειδάση NADPH σε αυτά τα κύτταρα, που είναι εκτεθειμένα σε σηπτική προσβολή, παράγει ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) που προκαλούν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και το ασκορβικό οξύ μειώνει τη δραστηριότητα αυτής της οξειδάσης και τις

ενδογενείς ενεργές ρίζες οξυγόνου, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλιακού φραγμού [198]. Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, η εφαρμογή αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως του ασκορβικού οξέος, μείωσε την απελευθέρωση των ενεργών ριζών οξυγόνου σε διεγερμένα με fMLP (formyl-Met-Leu-Phe-OH) ουδετερόφιλα και εμπόδισε την αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών [191].

Τα κύτταρα μπορούν να προσλαμβάνουν ασκορβικό οξύ διαμέσου νάτριο-εξαρτώμενων μεταφορέων (SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>). Οι SVCTs (Sodium Vitamin C Transporters) συμμεταφέρουν ασκορβικό οξύ και νάτριο μέσα στα κύτταρα. Για τη μεταφορά κάθε μορίου ασκορβικού οξέος μέσω αυτών των συμμεταφορέων απαιτούνται κατά προσέγγιση δύο ιόντα νατρίου [7,147,150,158,195]. Αυτοί οι μεταφορείς αναστέλλονται όταν στο υπόστρωμα δεν υπάρχει νάτριο, επίσης από την ουαμπαΐνη ή τις φλαβονόλες, κυρίως την κουερσετίνη [156,158,181,193]. Ο Boyer και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι οι SVCT<sub>1</sub> εντοπίζονται κυρίως στην κορυφαία επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου, ενώ οι SVCT<sub>2</sub> στη βασική επιφάνεια αυτού, και επιπλέον οι SVCT<sub>1</sub> έχουν μικρότερη συγγένεια για το ασκορβικό οξύ συγκρινόμενη με αυτή των SVCT<sub>2</sub> [167]. Δεν έχει αποδειχθεί αν οι SVCT<sub>2</sub>, οι οποίοι μπορούν να μεταφέρουν το ασκορβικό οξύ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, είναι πιο ευπαθείς και μη λειτουργικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος.

Με βάση τα πειράματα, όπου χρησιμοποιήθηκε krebs χωρίς νάτριο, η ύπαρξη αυτών των μεταφορέων εμμέσως επιβεβαιώθηκε, αφού το αποτέλεσμα του ασκορβικού οξέος αναστάλθηκε πλήρως και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου. Ο Wang Y και οι συνεργάτες του, με τη μέθοδο voltage-clamped, έδειξαν ότι σε

ωοκύτταρα *Xenopus*, που υπερεκφράζουν τους μεταφορείς SVCT<sub>1</sub>, το ασκορβικό οξύ συµμεταφέρεται µε νάτριο µέσα στα κύτταρα µέσω των SVCT<sub>1</sub> και προκαλεί ροή ιόντων (ρεύµατα) πάνω από -150 nA µε την παρουσία εξωκυτταρίου νατρίου [166]. Επιπλέον, σε αυτά τα κύτταρα αναστάλθηκε πλήρως η πρόσληψη του ασκορβικού οξέος όταν το εξωκυττάριο νάτριο αντικαταστάθηκε από χολίνη [166]. Τα ευρήµατα αυτά συµφωνούν µε τα αποτελέσµατα της παρούσας µελέτης, αφού το ασκορβικό οξύ προκάλεσε αύξηση της διαµεσοθηλιακής αντίστασης του υπεζωκότα και η δράση αυτή αναστάλθηκε πλήρως, όταν στο υπόστρωµα (krebs) δεν υπήρχε νάτριο. Αυτό δείχνει, εµμέσως, ότι τα µεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου διαθέτουν σύστηµα µεταφοράς του ασκορβικού οξέος, που περιλαµβάνει τους νάτριο-εξαρτώµενους μεταφορείς SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub>.

Σύµφωνα µε τα αποτελέσµατα, αυτοί οι μεταφορείς είναι οµοιόµορφα κατανεµηµένοι στην κορυφαία και βασική επιφάνεια των µεσοθηλιακών κυττάρων του τοιχωµατικού υπεζωκότα, αλλά στον περισπλάχνιο υπεζωκότα η κατανοµή των SVCTs στην κορυφαία και βασική επιφάνεια θα πρέπει να είναι διαφορετική. Το καλύτερο αποτέλεσµα που παρατηρήθηκε στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα σε χαµηλή συγκέντρωση ασκορβικού οξέος φαίνεται εκ πρώτης όψεως παράδοξο, όµως αυτό θα µπορούσε να ερµηνευτεί λειτουργικά. Παράδειγµα, σε υποϋπεζωκοτικές φλεγµονές παράγονται φλεγµονώδεις κυτοκίνες και ελεύθερες ρίζες και έτσι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος µειώνεται, αφού αυτό εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Στη συνέχεια, το ασκορβικό οξύ σε χαµηλές συγκεντρώσεις µπορεί να ενεργεί στη βασική επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα µειώνοντας τη διαπερατότητα και µε αυτόν τον τρόπο να συµβάλλει στη

διατήρηση της ακεραιότητας του μεσοθηλιακού φραγμού, εμποδίζοντας τη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα και την επέκταση της φλεγμονής.

Όταν το ασκορβικό οξύ εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες και χορηγεί δύο ηλεκτρόνια οξειδώνεται σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Το DHA στη συνέχεια μπορεί να μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT<sub>1</sub> και GLUT<sub>3</sub> [173]. Αυτό μέσα στα κύτταρα μπορεί να αναχθεί και πάλι σε ασκορβικό οξύ με τη δράση της γλουταθειόνης (GSH) [6,130]. Αυτό το μοντέλο ανακύκλωσης του DHA λειτουργεί ως ένα αποτελεσματικό σύστημα για τη διατήρηση της βιταμίνης C και την αποφυγή εξάντλησης των αποθεμάτων της και επιπλέον, εφοδιάζει τα κύτταρα με αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασκορβικού οξέος με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες [6].

Το DHA, επίσης, μειώνει τη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου, αφού αυξάνει τη διαμεσοθηλιακή του αντίσταση ( $R_{TM}$ ) κατά το 1<sup>ο</sup> λεπτό της δράσης του σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Η ποσοστιαία αύξηση της  $R_{TM}$  ήταν σχεδόν ίδια σε κάθε επιφάνεια του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα, αλλά μικρότερη από αυτή που προκάλεσε το ασκορβικό οξύ. Επίσης, το αποτέλεσμα διαρκούσε περισσότερο στην βασική επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα από ότι στην κορυφαία. Η μεγαλύτερη αύξηση της  $R_{TM}$  διαπιστώθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M, η οποία αντιστοιχεί σε αυτή που αναμένεται να έχει το DHA σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες [173]. Η συγκέντρωση του DHA στο πλάσμα κυμαίνεται περίπου σε 0-2  $\mu$ M ή περίπου 1-2% της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος [6,130,173,199]. Η συγκέντρωση του DHA στο πλάσμα

αυξάνεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως μη ελεγχόμενο σακχαρώδη διαβήτη και κάπνισμα [7,173]. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, συμπεραίνεται ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου διαθέτουν νάτριο-ανεξάρτητους μεταφορείς γλυκόζης GLUTs, οι οποίοι είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι στην κορυφαία και βασική επιφάνεια. Βεβαίως, αυτά τα ευρήματα είναι σε συνάφεια με το γεγονός ότι αυτοί οι μεταφορείς εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς, αφού δε μεταφέρουν μόνο DHA αλλά και γλυκόζη. Η δράση αυτών των μεταφορέων αναστέλλεται από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (πάνω από 20 mM), όμως στο krebs που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 5.55 mM, έτσι δεν υπήρξε ανασταλτικό αποτέλεσμα από τη γλυκόζη στα πειράματα αυτά [184,194].

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κουερσετίνη, μια φλαβονόλη με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, είναι σημαντικός αναστολέας της πρόσληψης του ασκορβικού και του δεϋδροασκορβικού οξέος από τα κύτταρα [156,193,200,201]. Αυτή η αναστολή είναι αποτέλεσμα των δομικών χαρακτηριστικών της κουερσετίνης και όχι λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της και επιπλέον, αυτή η αναστολή δεν ερμηνεύεται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος, γιατί η κουερσετίνη δε μειώνει τη σταθερότητα του ασκορβικού οξέος. Η κουερσετίνη είναι αποτελεσματικός αναστολέας της μεταφοράς του ασκορβικού οξέος και του DHA, ενώ οι γλυκοζυλιωμένες φλαβονόλες, όπως η ρουτίνη δεν είναι. Ο μηχανισμός μεταφοράς της κουερσετίνης είναι άγνωστος και οι SVCT<sub>1</sub> δε τη μεταφέρουν. Υπάρχουν δομικές ομοιότητες μεταξύ του ασκορβικού οξέος, του DHA, της γλυκόζης και των φλαβονολών [156,193].



Η κουερσετίνη δεν είχε αξιόλογη δράση στον υπεζωκότα εκτός από μια μικρή αύξηση της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα κατά το 1<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη της. Είναι γνωστό ότι η κουερσετίνη αναστέλλει τη μεταφορά του ασκορβικού οξέος και του DHA στα κύτταρα μέσω των SVCTs και GLUTs, αντίστοιχα [156,193]. Η δράση του ασκορβικού οξέος και του DHA αναστάλθηκε πλήρως όταν η κουερσετίνη προστέθηκε στη βασική επιφάνεια του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα, ενώ η αναστολή ήταν μερική όταν η κουερσετίνη προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Όσο αφορά το αποτέλεσμα της δράσης της κουερσετίνης μαζί με το ασκορβικό οξύ ή μαζί με το DHA στην κορυφαία επιφάνεια του περισπλάχνιου υπεζωκότα, αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη δράση της κουερσετίνης μόνο, γιατί η κουερσετίνη σε αυτήν την επιφάνεια μόνο προκάλεσε μια μικρή αύξηση της  $R_{TM}$ . Αν υπήρχε συνεργική δράση αυτών θα αναμένονταν μεγαλύτερη αύξηση της  $R_{TM}$ . Αυτά τα αποτελέσματα εμμέσως επιβεβαιώνουν την ύπαρξη των μεταφορέων ασκορβικού οξέος και DHA (SVCTs και GLUTs αντίστοιχα) στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου, οι οποίοι μπλοκάρονται από την κουερσετίνη, έτσι δεν αθροίζεται το ασκορβικό οξύ ή το DHA μέσα σε αυτά και η δράση τους αναστέλλεται.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα και τα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων των νεφρών έχουν όμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά, όπως η μεταφορά κατιόντων π.χ. διάλυοι  $Na^+$ , αντλία  $Na^+-K^+-ATPase$  και αντιμεταφορείς  $Na^+-H^+$  [202]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το νάτριο μεταφέρεται στα μεσοθηλιακά κύτταρα, αφού η ουαμπαΐνη και η αμιλορίδη αυξάνουν την  $R_{TM}$  στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του

περισπλάχνιου υπεζωκότα και του περιτοναίου [35,116,203,204]. Στην παρούσα μελέτη το ασκορβικό οξύ πιθανώς να εισέρχεται στα κύτταρα μαζί με ιόντα νατρίου (αφού οι μεταφορείς του είναι νάτριο-εξαρτώμενοι) με αποτέλεσμα να αυξάνει η ενδοκυττάρια συγκέντρωση αυτού. Η άθροιση του ασκορβικού οξέος μέσα στα κύτταρα πιθανώς να είναι υπεύθυνη για τη αύξηση της  $R_{TM}$  στον υπεζωκότα. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, προτείνεται η ύπαρξη συστήματος μεταφοράς, που περιλαμβάνει ειδικό μεταφορέα που ανήκει στην οικογένεια των SVCT, για την πρόσληψη του ασκορβικού οξέος από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου. Αυτό, βέβαια, φαίνεται λογικό, γιατί είναι γνωστό ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι ενεργά και μπορούν να συνθέτουν κολλαγόνο, μια διαδικασία η οποία απαιτεί το ασκορβικό οξύ ως συμπ παράγοντα. Οι SVCT<sub>1</sub> και SVCT<sub>2</sub> μοιάζουν λειτουργικά, έτσι δεν είναι δυνατό να αναγνωριστεί αν η πρόσληψη του ασκορβικού οξέος από τα μεσοθηλιακά κύτταρα γίνεται με τη μεσολάβηση και των δύο μεταφορέων ή του ενός από αυτούς [192,195,200]. Οι μεταφορείς αυτοί έχουν δομικές διαφορές σε γενετικό επίπεδο, έτσι για την ταυτοποίησή τους είναι απαραίτητη η εφαρμογή της RT-PCR [195].

Με βάση τα παραπάνω πειράματα, μπορεί να υποτεθεί ότι η δράση του ασκορβικού οξέος και του DHA στην διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα οφείλεται στην αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος, αφού το DHA μπορεί να αναχθεί σε ασκορβικό οξύ ενδοκυτταρίως. Ως εκ τούτου, η βιταμίνη C, είτε ως ασκορβικό οξύ είτε ως DHA, αυξάνοντας τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση και διατηρώντας την ακεραιότητα του μεσοθηλιακού φραγμού, δρα προστατευτικά στον υπεζωκότα.

Θα ήταν πολύ σημαντικό, αν η βιταμίνη C είχε τα ίδια αποτελέσματα στον ανθρώπινο υπεζωκότα, κάτι πολύ πιθανό, αφού ο υπεζωκότας του ανθρώπου και του προβάτου έχουν πολλές ομοιότητες. Κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες εξουδετερώνονται από το ασκορβικό οξύ και έτσι σχηματίζεται το DHA. Επίσης, η οξέωση και οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες αναστέλλουν τη μεταφορά του ασκορβικού οξέος μέσα στα κύτταρα. Επομένως συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση του DHA αυξάνεται στο εξωκυττάριο υγρό, όπως επίσης και σε εξιδρωματικές συλλογές και μάλλον θα υπάρχει και ποσότητα ασκορβικού οξέος, λόγω της αναστολής της μεταφοράς του μέσα στα κύτταρα. Αυξημένα επίπεδα ασκορβικού οξέος ή/και DHA σε υπεζωκοτικές συλλογές μπορούν να δρουν στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα και να μειώνουν τη διαπερατότητα. Το ασκορβικό οξύ μπορεί να εξουδετερώνει οξειδωτικές ρίζες, που παράγονται κατά τη φαγοκυττάρωση, προστατεύοντας έτσι τα ουδετερόφιλα και τους γύρω ιστούς από την οξειδωτική βλάβη. Στην υπεζωκοτική κοιλότητα κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων, το ασκορβικό οξύ έχει διπλό ρόλο: α) προστατεύει τα μεσοθηλιακά κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη και β) μειώνοντας τη διαπερατότητα, διατηρεί την ακεραιότητα του μεσοθηλιακού φραγμού και προστατεύει την υπεζωκοτική κοιλότητα από τη αύξηση συσσώρευσης υγρού, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της φλεγμονής και στην πρόληψη της επέκτασής της.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν υπέρ των ακόλουθων συμπερασμάτων:

1. Ο τοιχωματικός και περισπλάχνιος υπεζωκότας προβάτου παρουσιάζουν μείωση της διαπερατότητας μετά από έκθεση στη βιταμίνη C, είτε με τη μορφή του ασκορβικού οξέος είτε του μεταβολίτη της δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA).
2. Η δράση του ασκορβικού οξέος και DHA είναι ταχεία και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα προβάτου, ενώ η μείωση της διαπερατότητας είναι πολύ μεγαλύτερη και παρατεταμένη κατά τη δράση του ασκορβικού οξέος.
3. Το DHA έχει πιο παρατεταμένη δράση στη βασική επιφάνεια (μέχρι το 20<sup>ο</sup> λεπτό) των δύο πετάλων του υπεζωκότα απ' ότι στην κορυφαία επιφάνεια.
4. Η βιταμίνη C, είτε ως ασκορβικό οξύ είτε ως δεϋδροασκορβικό οξύ, συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του μεσοθηλιακού φραγμού και δρα προστατευτικά στον υπεζωκότα, αφού μειώνει σημαντικά τη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου.
5. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου διαθέτουν σύστημα μεταφοράς της βιταμίνης C, νάτριο-εξαρτώμενο ή νατριο-ανεξάρτητο, SVCTs και GLUTs αντίστοιχα.
6. Η κατανομή των νάτριο-εξαρτώμενων μεταφορέων του ασκορβικού οξέος (SVCTs) φαίνεται να είναι ομοιόμορφη στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού υπεζωκότα (παρόμοιες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις του ασκορβικού οξέος), ενώ

στις επιφάνειες του περισπλάχνιου υπεζωκότα η κατανομή αυτών των μεταφορέων πιθανώς να είναι διαφορετική.

7. Η κατανομή των νάτριο-ανεξάρτητων μεταφορέων γλυκόζης (GLUTs) είναι ομοιόμορφη στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου (παρόμοιες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις του DHA) και ίσως μεγαλύτερος ο αριθμός αυτών στη βασική επιφάνεια των δύο πετάλων.
8. Η αναστολή της μεταφοράς του ασκορβικού οξέος ή του DHA στα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου ανέστειλε τη δράση αυτών. Πιθανώς η δράση τους να οφείλεται στην ενδοκυττάρια συσσώρευση του ασκορβικού οξέος και τα μεσοθηλιακά κύτταρα ενδεχομένως να διαθέτουν σύστημα αναγωγής του DHA σε ασκορβικό οξύ (Glutaredoxin ή NADPH).
9. Ενδεχόμενη αύξηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης C στο πλάσμα ή στο υπεζωκοτικό υγρό, κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων, θα μπορούσε να συμβάλλει στη διατήρηση του μεσοθηλιακού φραγμού και στην πρόληψη των επιπλοκών της πνευμονικής λοίμωξης και των υποϋπεζωκοτικών φλεγμονών.

Τέλος, αν αυτά τα ευρήματα αποδειχθούν στον ανθρώπινο υπεζωκότα, οι επιστήμονες θα μπορούσαν να προσανατολιστούν σε παρεμβάσεις, οι οποίες να αυξάνουν την εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος ώστε να βελτιώσουν τις ενζυματικές, μη-ενζυματικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της βιταμίνης C κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε παραπνευμονικές συλλογές αθροίζονται πολυμορφοπύρρηνα στο υγρό της υπεζωκοτικής κοιλότητας, όπου τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μπορούν να ανακυκλώνουν την οξειδωμένη μορφή του ασκορβικού οξέος, να αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του, ώστε να προστατευτούν τα ίδια και τα κύτταρα των γύρω ιστών από την οξειδωτική βλάβη. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί αν η βιταμίνη C επιδρά στη διαπερατότητα του περισπλάχνιου και τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα υπεζωκότα προβάτου, τα οποία διατηρούνταν σε διάλυμα Krebs-Ringer 4<sup>o</sup> C και μεταφέρονταν στο εργαστήριο μέσα σε 30 λεπτά από τη σφαγή του ζώου. Στη συνέχεια προσαρμόζονταν σε Ussing-type chambers και πραγματοποιούνταν ηλεκτρικές μετρήσεις. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 456 πειράματα στις δύο επιφάνειες των πετάλων του υπεζωκότα προβάτου. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση από 10<sup>-7</sup> M ως 10<sup>-3</sup> M και δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) σε συγκέντρωση από 10<sup>-7</sup> M ως 10<sup>-4</sup> M , καθώς επίσης και διαλύματα με ουσίες που αναστέλλουν τη μεταφορά τους μέσα στα κύτταρα (κουερσετίνη και krebs χωρίς νάτριο). Η βιταμίνη C, είτε ως ασκορβικό οξύ είτε ως DHA, μειώνει σημαντικά την διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου. Το ασκορβικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ αυξάνουν σημαντικά την διαμεσοθηλιακή αντίσταση από το 1<sup>o</sup> λεπτό μετά την προσθήκη τους. Το καλύτερο αποτέλεσμα για το ασκορβικό οξύ παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 10<sup>-5</sup> M και 10<sup>-3</sup> M, αυτές είναι παρόμοιες με την ελάχιστη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα και στο εξωκυττάριο υγρό καθώς και με την ενδοκυττάρια

συγκέντρωση των ουδετεροφίλων, αντίστοιχα. Το καλύτερο αποτέλεσμα για το DHA παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση  $10^{-5}$  M, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του DHA στο εξωκυττάριο υγρό υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Το DHA έχει πιο παρατεταμένη δράση στη βασική επιφάνεια των δύο πετάλων του υπεζωκότα, αλλά το ασκορβικό οξύ προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση της  $R_{TM}$  από το δεϋδροασκορβικό οξύ. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου διαθέτουν σύστημα μεταφοράς της βιταμίνης C, νάτριο-εξαρτώμενο και νάτριο-ανεξάρτητο SVCTs και GLUTs, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας ουσίες που μπλοκάρουν τους νάτριο-εξαρτώμενους μεταφορείς του ασκορβικού οξέος SVCTs (krebs χωρίς νάτριο και κουερσετίνη), η δράση του αναστάλθηκε. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με το DHA, χρησιμοποιώντας κουερσετίνη που εμποδίζει τη μεταφορά του στα κύτταρα μέσω των νάτριο-ανεξάρτητων μεταφορέων γλυκόζης (GLUTs). Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι η δράση της βιταμίνης C στα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορεί να αποδοθεί στην συσσώρευση του ασκορβικού οξέος μέσα στα κύτταρα και επομένως στην αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του. Οι επιπλοκές των πνευμονικών λοιμώξεων θα μπορούσαν να αποφευχθούν αν η βιταμίνη C είχε την ίδια δράση στον ανθρώπινο υπεζωκότα, αφού μειώνοντας τη διαπερατότητα του υπεζωκότα το υγρό παραμένει σταθερό στην υπεζωκοτική και η φλεγμονή μπορεί να περιοριστεί.

## SUMMARY

When parapneumonic effusion is developed, neutrophils are accumulated in pleural space where activated neutrophils can recycle oxidized extracellular ascorbic acid (AA) and achieve an increased intracellular concentration of it, in order to protect themselves and surrounding cells from oxidative damage. The main purpose was to study if vitamin C had any effect on the permeability of sheep visceral and parietal pleura. Specimens of intact pleura from adult male and female sheep were used. The samples were transferred to the laboratory within 30 min after death of the animal in Krebs-Ringer solution at 4°C and then, they mounted as planar sheet in Ussing-type chambers, and electrical measurements were made. At least, 456 experiments were carried out on both surface of parietal and visceral sheep pleura. Solutions of AA at concentration from  $10^{-7}$  M to  $10^{-3}$  M and dehydroascorbic acid (DHA) at concentration from  $10^{-7}$  M to  $10^{-4}$  M, as well as with substances which inhibit their transportation into cells were used (quercetin and krebs without sodium). Vitamin C, either as AA or DHA, decreases significantly the permeability of sheep pleura. Ascorbic acid and DHA significantly increase the transmesothelial resistance of sheep pleura in the 1<sup>st</sup> minute after their addition. The best effect for ascorbic acid was observed at concentrations  $10^{-5}$  M and  $10^{-3}$  M, which match the lower concentration of ascorbic acid in plasma and extracellular fluid and the intracellular concentration of neutrophils, respectively. The best effect for DHA was observed at concentration  $10^{-5}$  M, which matches the DHA concentration in extracellular fluid under oxidative stress conditions. DHA has prolonged effect on the basolateral surface of two segments of pleura, but ascorbic acid



causes higher increase of  $R_{TM}$  than DHA. These data suggest that mesothelial cells of sheep pleura are provided with vitamin C transporting system, sodium-dependent or sodium-independent, SVCTs and GLUTs respectively. Using substances which block the sodium-dependent transporters SVCTs of ascorbic acid (krebs without sodium and quercetin), the action of AA was inhibited. The same was observed with DHA, using quercetin which blocks its transportation into cells through the sodium-independent glucose transporters (GLUTs). Hence, it can be concluded that the action of vitamin C on mesothelial cells is attributed to the accumulation of AA into cells and, consequently, the increased AA intracellularly. The complications of pulmonary infections could be avoided if vitamin C had the same effect on human pleura, since decreasing the permeability of pleura the influx and efflux of fluid is detained in pleural space and the inflammation could be restricted.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Light RW. Anatomy of the pleura. In: Light RW (ed) *Pleural Diseases*. 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001: 1-8.
2. Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev* 2004, 84: 385-410.
3. Engelberg J, Radin J. Tracheal-vascular and vascular-pleural potential in the rat lung. *Respir Physiol* 1977, 34: 253-263.
4. Zocchi L. Physiology pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 2002, 20: 1545-1558.
5. Kamal MA, 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-L125.
6. Nualart FJ, Rivas CI, Montecinos VP, Godoy AS, Guaiquil VH, Golde DW et al. Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 2003, 278: 10128-10133.
7. Wilson JX. Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 2005, 25: 105-125.
8. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-Antioxidant Balance in Acute Lung Injury. *Chest* 2002, 122: 314S-320S.
9. Castranova V, Wright JR, Colby HD, Miles PR. Ascorbate uptake by isolated rat alveolar macrophages and type II cells. *J Appl Physiol* 1983, 54: 208-214.
10. Castranova V, Jones GS, Wright JR, Colby HD, Bowman L, Miles PR. Transport properties of isolated type II alveolar epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1983, 127: S28-S33.

11. Wright JR, Castranova V, Colby HD, Miles PR. Ascorbate uptake by isolated rat lung cells. *J Appl Physiol* 1981, 51: 1477-1483.
12. Shock BC, Koostra J, Kwack S, Hackman RM, Van Der Vliet A, Cross CE. Ascorbic acid in nasal and tracheobronchial airway lining fluids. *Free Rad Biol Med* 2004, 37: 1393-1401.
13. Miserocchi G., Agostoni E. Contents of the pleural space. *J Appl Physiol* 1971, 30: 208-213.
14. 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.
15. Wang PM, Lai-Fook SJ. Regional pleural filtration and absorption measured by fluorescent tracers in rabbits. *Lung* 1999, 177: 289-309.
16. 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.
17. Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, Staub NC. Clearance of lung edema into the pleural space of volume-loaded anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1990, 68: 2623-2630.
18. Allen S, Gabel J, Drake R. Left atrial hypertension causes pleural effusion formation in anesthetized sheep. *Am J physiol* 1989, 257: H690-H692.
19. Wiener-Kronish JP, Matthay MA, Callen PW, Filly RA, Gamsu G, Staub NC. Relationship of pleural effusions to pulmonary hemodynamics in patients with congestive heart failure. *Am Rev Respir Dis* 1985, 132: 1253-1256.

20. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993, 75: 1661-1669.
21. Wiener-Kronish JP, Broaddus VC. Interrelationship of pleural and pulmonary interstitial liquid. *Ann Rev Physiol* 1993, 55: 209-226.
22. Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, Albertine KH, Gropper MA, Matthay MA, Staub NC. Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1988, 82: 1422-1429.
23. Kinasewitz GT, Groome LJ, Marshall RP, Diana JN. Role of pulmonary lymphatics and interstitium in visceral pleural fluid exchange. *J Appl Physiol* 1984, 56: 355-363.
24. Bernaudin JF, Theven D, Pinchon MC, Brun-Pascaud M, Bellon B, Pocidalo JJ. Protein transfer in hyperoxic induced pleural effusion in the rat. *Exp Lung Res* 1986, 10: 23-38.
25. Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol* 1990, 81: 19-27.
26. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. Liquid volume, Na<sup>+</sup> and mannitol concentration in hypertonic mannitol-ringer hydrothorax. *Respir Physiol* 1992, 89: 341-351.
27. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. Electrolyte transport across the pleura of rabbits. *Respir Physiol* 1991, 86: 125-138.
28. Agostoni E, Zocchi L. Active Na<sup>+</sup> transport and coupled liquid outflow from hydrothoraces of various size. *Respir Physiol* 1993, 92: 101-113.

29. 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.
30. Zocchi L, Agostoni E. Effect of  $\beta$ -adrenergic blockade or stimulation on net rate of hydrothorax absorption. *Respir Physiol* 1994, 97: 347-356.
31. McHale NG, Roddie IC. The effects of catecholamines on pumping activity in isolated bovine mesenteric lymphatics. *J Physiol* 1983, 338: 527-536.
32. Payne DK, Kinasewitz GT, Gonzales E. Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura. *J Appl Physiol* 1988, 65: 2558-2564.
33. Kim KJ, McElroy-Critz A, Crandall ED. Transport of water and solutes across sheep visceral pleura. *Am Rev Respir Dis* 1979, 120: 883-892.
34. D'Angelo E, Heisler N, Agostoni E. Acid-base balance of pleural liquid in dogs. *Respir Physiol* 1979, 37: 137-149.
35. Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol* 2001, 90: 1565-1569.
36. Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Hatzoglou A, Castanas E, Molyvdas PA. Rapid effects of  $17\beta$  estradiol and progesterone on sheep visceral and parietal pleura via a nitric oxide pathway. *J Appl Physiol* 2002, 93: 752-758.
37. Negrini D, Pistolesi M, Miniati M, Bellina CR, Giuntini C, Miserocchi G. Regional protein absorption rate from the pleural cavity in dogs. *J Appl Physiol* 1985, 58:2062-2067.

38. Miniati M, Parker JC, Pistolesi M, Cartledge JT, Martin DJ, Giuntini C et al.  
Reabsorption kinetics of albumin from pleural space of dogs. *Am J Physiol* 1988, 255: H375-H385.
39. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D.  $\beta$ -agonist activation of an amiloride-insensitive transport mechanism in rabbit pleura. *Respir Physiol* 1995, 100: 7-13.
40. Miserocchi G, Negrini D. Contribution of Starling and lymphatic flows to pleural liquid exchanges in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1986, 61: 325-330.
41. Agostoni E, Zocchi L. Starling forces and lymphatic drainage in pleural liquid and protein exchanges. *Respir Physiol* 1991, 86: 271-281.
42. Zocchi L, Raffaini A, Agostoni E. Effect of adrenaline on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits. *Exp Physiol* 1997, 82: 507-520.
43. 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.
44. Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 1997, 10: 219-225.
45. Miserocchi G, Negrini D. Pleural space: pressure and fluid dynamics. In: Crystal RG, West JB (eds) *The Lung: Scientific Foundations*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997: 1217-1225.
46. Negrini D. Integration of capillary, interstitial and lymphatic function in the pleural space In: Reed RK, Mc Hale NG, Bert JL (eds) *Interstitial Connective Tissue and Lymphatics*. London, Portland, 1995: 283-299.

47. Broaddus VC, Light RW. General principles and diagnostic approach In: Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA Jr (eds) *Textbook of Respiratory Medicine*. WB Saunders, 2000: 1995-2112.
48. Jaurand MC, Fleury-Feith J, Bernaudin JF, Bignon J. Pleural mesothelial cells In: Crystal RG, West JB (eds) *The Lung: Scientific Foundations*. Philadelphia, Raven, 1997: 961-969.
49. Wang NS. Anatomy of pleura. *Clin Chest Med* 1998, 19: 229-240.
50. Gil J. Morphological basis of exchanges across the pleura In: Chretien J, Bignon J, Hirsch A (eds) *The pleura in Health and Disease*. New York, Dekker, 1985: 88-99.
51. Agostoni E. Mechanics of the pleura space. *Physiol Rev* 1972, 52: 57-128.
52. Negrini D, Del Fabbro M. Subatmospheric pressure in the rabbit pleural lymphatic network. *J Physiol* 1999, 520: 761-769.
53. Agostoni E, Zocchi L. Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space. *Clin Chest Med* 1998, 19: 241-260.
54. Mariassy AT, Wheeldon EB. The pleura: a combined light microscopic, scanning and transmission electron microscopic study in the sheep. *Exp Lung Res* 1983, 4: 293-313.
55. Wang NS. The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1974, 110: 623-633.
56. Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, Didio LJA. Comparative electron-microscopic study of bovine, porcine, and human parietal pericardium as materials for cardiac valve bioprostheses. *J Submicrosc Cytol* 1986, 18: 53-65.

57. 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.
58. Thomas NW. Embryology and structure of the mesothelium In: Jones JS (ed) *Pathology of mesothelium*. Springer-Verlag, New York, 1987: 1-13.
59. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Albumin transcytosis in mesothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282: 3-11.
60. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol* 2002, 93: 1806-1818.
61. Χατζόγλου Χ, Κυρόπουλος Θ. Υπεζωκοτικές συλλογές. *Ιατρική* 2006, 89: 63-79.
62. Black LF. The pleural space and pleural fluid. *Mayo Clin Proc* 1972, 47: 493-506.
63. Sahn SA. The pleura. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138: 184-234.
64. Judson MA, Sahn SA. The pleural space and organ transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153: 1153-1165.
65. Kinasevitz GT. Transudative effusions. *Eur Respir J* 1997, 10: 714-718.
66. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 1999, 79: 703-761.
67. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972, 77: 505-513.
68. Spring KR. Epithelial fluid transport-A century of investigation. *News in Physiological Sciences* 1999, 14: 92-100.



69. Schultz SG. A century of epithelial transport physiology: from vitalism to molecular cloning. *Am J Physiol* 1998, 43: 13-23.
70. Balabann 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 Membrane Biol* 1979, 49: 363-390.
71. Gumbiner BM. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987, 253: 749-758.
72. Harris BJ, 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: 73-80.
73. Gorodeski GI, Desantis BJ, Goldfarb J, Utian WH, Hopfer U. Osmolar changes regulate the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol* 1995, 269: 870-877.
74. Wright EM, Pietras RJ. Routs of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J Membrane Biol* 1974, 17: 293-312.
75. Gorodeski GI, Goldfarb J. Extracellular ATP regulate transcervical permeability by modulating two distinct paracellular pathways. *Am J Physiol* 1997, 272: 1602-1610.
76. Gorodeski GI, Jin W, Hopfer U. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  directly regulates tight junctional permeability in the human cervical cell line CaSki. *Am J Physiol* 1997, 272: 511-524.

77. Gorodeski GI, Peterson DE, Desantis BJ, Hopfer U. Nucleotide receptor-mediated decrease of tight junctional permeability in cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol* 1996, 270: 1715-1725.
78. Gorodeski GI. The human cervical epithelium: A new model for studying paracellular transport. *J Soc Gynecol Investig* 1996, 3: 267-280.
79. Schultz SG, Leaf A. Hans Ussing memorial issue: Epithelial membrane transport. *J Membrane Biol* 2001, 184: 199-202.
80. Ussing HH, Zerhan K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1950, 23: 110– 127.
81. Li H, Sheppard D, Hug M. Transepithelial electrical measurements with the Ussing Chamber. *J Cystic Fibrosis* 2004, 3: 123-126.
82. Gotoh Y, Kamada N, Momose D. The advantages of the Ussing System in drug absorption studies. *J Biomolecular Screening* 2005, 10: 517-523.
83. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium and its reactions: A review. *Crit Rev Toxicol* 1982, 10: 81–144.
84. Mutsaers SE. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002, 7: 171-191.
85. Hesseldahl H, Larsen JF. Ultrastructure of human yolk sac: Endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat* 1969, 126: 315–335.
86. Tiedemann K. On the yolk sac of the cat. Endoderm and mesothelium. *Cell Tissue Res* 1976, 173: 109–127.

87. Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G. Surface morphology of the human pleura : a scanning electron microscopic study. *Chest* 1988, 92: 149-153.
88. Odor DL. Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. *Am J Anat* 1954, 95:433–456.
89. Fukata H. Electron microscopic study on normal rat peritoneal mesothelium and its changes in absorption of particulate iron dextran complex. *Acta Pathol Jpn* 1963, 13: 309–325.
90. Kluge T, Hovig T. The ultrastructure of human and rat pericardium. I. Parietal and visceral mesothelium. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967, 71: 529–546.
91. Kluge T, Hovig T. The ultrastructure of human and rat pericardium. II. Intercellular spaces and junctions. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967, 71: 547–563.
92. Andrews PM, Porter KR. The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *Anat Rec* 1973, 177: 409–426.
93. Bettendorf U. Lymph flow mechanism of the subperitoneal diaphragmatic lymphatics. *Lymphology* 1978, 11: 111–116.
94. Mironov VA, Gusev SA, Baradi AF. Mesothelial stomata overlying omental milky spots: Scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res* 1979, 201: 327–330.
95. Baradi AF, Rao SN. A scanning electron microscope study of mouse peritoneal mesothelium. *Tissue Cell* 1976, 8: 159–162.

96. 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.
97. Baradi AF, Hope J. Observations on ultrastructure of rabbit mesothelium. *Exp Cell Res* 1964, 34: 33–44.
98. Tsilibary EC, Wissig SL. Absorption from the peritoneal cavity: SEM study of the mesothelium covering the peritoneal surface of the muscular portion of the diaphragm. *Am J Anat* 1977, 149: 127–133.
99. Tyler WS, Gillespie JR, Nowell JA. Modern functional morphology of the equine lung. *Equine Vet J* 1971, 3: 84–94.
100. Salazar H, Kanbour A, Burgess F. Ultrastructure and observations on the histogenesis of mesotheliomas, ‘adenomatoid tumors’, of the female genital tract. *Cancer* 1972, 29: 141–52.
101. Raftery AT. An enzyme histochemical study of mesothelial cells in rodents. *J Anat* 1973, 115: 365–373.
102. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium: A histochemical study of resting mesothelial cells. *J Pathol* 1980, 132: 273–284.
103. Baradi AF, Campbell Jr WG. Exudative peritonitis induced in mice by bovine serum albumin. *Arch Pathol* 1974, 97: 2–12.
104. Gouldstone A, Brown RE, Butler JP, Loring SH. Stiffness of the pleural surface of the chest wall is similar to that of the lung. *J Appl Physiol* 2003, 95: 2345–2349.

105. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: A multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 286: 1213-1228.
106. D' Angelo E, Loring SH, Gioia ME, Pecchiari M, Moscheni C. Friction and lubrication of pleural tissues. *Respir Physiol Neurobiol* 2004, 142: 55-68.
107. Lai J, Gouldstone A, Butler JP, Federspiel WJ, Loring SH. Relative motion of lung and chest wall promotes uniform pleural space thickness. *Respir Physiol Neurobiol* 2002, 131: 233-243.
108. Gouldstone A, Brown RE, Butler JP, Loring SH. Elastohydrodynamic separation of pleural surfaces during breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2003, 137: 97-106.
109. Loring SH, Brown RE, Gouldstone A, Butler JP. Lubrication regimes in mesothelial sliding. *J Biomech* 2005, 38: 2390-2396.
110. Wang PM, Lai-Fook SJ. Effects of ventilation on hyaluronan and protein concentration in pleural liquid of anesthetized and conscious rabbits. *Lung* 1998, 176: 309-324.
111. 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 Intl* 2000, 57: 476–486.
112. Cunliffe WJ, Sugarbaker PH. Gastrointestinal malignancy: Rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surgery* 1989, 76: 1082–1090.

113. Jones LM, Gardner MJ, Catterall JB, Turner GA. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: A natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin and Exp Metastasis* 1995, 13: 373–380.
114. Moe Tang SJ, Lai-Fook SJ. Transport properties of the mesothelium and interstitium measured in rabbit pericardium. *Microvasc Res* 2005, 70: 152-164.
115. Zarogiannis S, Stefanidis I, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA. Effect of adrenaline on the electrophysiologic profile of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial* 2004, 20: 23-26.
116. Zarogiannis S, Kourti P, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultzidi A, Gourgoulisanis KI et al. Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial* 2005, 21: 5-8.
117. Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Kourti P, Poultzidi A et al. Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: ussing-type chamber experiments. *Artif Organs* 2005, 29: 919-922.
118. Vogiatzidis K, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Matafia G, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA.  $\mu$ -Opioid influence on transmesothelial resistance of isolated sheep pleura and parietal pericardium. *Eur J Pharmacol* 2006, 530: 276-280.

119. Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, Matafia G, Vogiatzidis K, Gourgoulisanis KI et al. Effect of adrenaline on transmesothelial resistance of isolated sheep pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2006, 150: 165-172.
120. Wang NS. The performed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975, 111: 12-20.
121. Ohtani O, Ohtani Y, Li RX. Phylogeny and ontogeny of the lymphatic stomata connecting the pleural and peritoneal cavities with the lymphatic system—a review. *Ital J Anat Embryo* 2001, 106: 251–259.
122. Azzali G. The Lymphatic Vessels and the So-Called “Lymphatic Stomata” of the Diaphragm: A Morphologic Ultrastructural and Three-Dimensional Study. *Microvasc Res* 1999, 57: 30-43.
123. Gourgoulisanis KI, Hatzoglou CH, Molyvdas PA. The major route for absorption of fluid from the pleural space. *Lymphology* 2002, 35: 97-98.
124. Li YY, Cheng Li JI. Ultrastructure and three-dimensional study of the lymphatic stomata in the costal pleura of the rabbit. *Microsc Res Tech* 2003, 62: 240-246.
125. Shinohara H. Distribution of lymphatic stomata on the pleural surface of the thoracic cavity and the surface topography of the pleural mesothelium in the golden hamster. *Anat Rec* 1997, 249: 16–23.
126. Shinohara H. Lymphatic system of the mouse diaphragm: Morphology and function of the lymphatic sieve. *Anat Rec* 1997, 249: 6–15.
127. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36: 9-16.

128. Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg Suppl* 1997, 577: 24–31.
129. Padayatty S, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CAMJ* 2001, 164: 353-355.
130. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH et al. Vitamin c as an Antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003, 22: 18-35.
131. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human non-functional gene for L-gulonono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 1994, 269: 13685-13688.
132. Nishikimi M, Yagi K. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell biochem* 1996, 25: 17-39.
133. Washko PW, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 1993, 268: 15531-15535.
134. Levine M, Rumsey SC, Wang Y, Park JB, Daruwala R. Vitamin C In: Stipanuk MH (ed) *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. W B Saunders, Philadelphia, 2000: 541-567.
135. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995, 64: 403-434.
136. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 1135S-1140S.
137. Kivirikko KI, Myllyla R. Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Sci* 1985, 460: 187-201.



138. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 1147S-1152S.
139. Levine M, Dhariwal KR, Washko P, Welch R, Wang YH, Cantilena CC et al. Ascorbic acid and reaction kinetics in situ: a new approach to vitamin requirements. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec* 1992, 169-172.
140. Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci* 1992, 15: 57-85.
141. Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 1986, 6: 365-406.
142. Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for promotion or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1997, 22: 57-71.
143. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y et al. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 1999, 399: 70-75.
144. Furst J, Gschwentner M, Ritter M, Botta G, Jakab M, Mayer M et al. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch* 2002, 444: 1-25.
145. Siushansian R, Dixon SJ, Wilson JX. Osmotic swelling stimulates ascorbate efflux from cerebral astrocytes. *J Neurochem* 1996, 66: 1227-1233.
146. Korcok J, Wu F, Tymk K, Hammond RR, Wilson JX. Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: Intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide

- synthase induction and glutamate uptake inhibition. *J Neurochem* 2002, 81: 185-193.
147. Korcok J, Yan R, Siushansian R, Dixon SJ, Wilson JX. Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 transporter. *Brain Res* 2000, 881: 144-151.
  148. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. *J Nutr* 2000, 130: 63-69.
  149. Oreopoulos DG, Lindeman RD, Vander-Jagt DJ, Tzamaloukas AH, Bhagavan HN, Garry PJ. Renal excretion of ascorbic acid: effect of age and sex. *J Am Coll Nutr* 1993, 12: 537-542.
  150. Franceschi RT, Wilson JX, Dixon SJ. Requirement for Na<sup>+</sup>-dependent ascorbic acid transport in osteoblast function. *Am J Physiol* 1995, 268: C1430-C1439.
  151. Dixon SJ, Wilson JX. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates ascorbate transport activity in osteoblastic cells. *Endocrinology* 1992, 130: 484-489.
  152. Liang WJ, Johnson D, Jarvis SM. Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* 2001, 18: 87-95.
  153. Wilson JX, Dixon SJ. High-affinity sodium-dependent uptake of ascorbic acid by rat osteoblasts. *J Membr Biol* 1989, 111: 83-91.
  154. Wilson JX, Jaworski EM, Dixon SJ. Evidence for electrogenic sodium-dependent ascorbate transport in rat astroglia. *Neurochem Res* 1991, 16: 73-78.

155. Kuo SM, Morehouse HF Jr, Lin CP. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 1997, 116: 131-137.
156. Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB et al. Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and glucose. *J Biol Chem* 2002, 277: 2252-2260.
157. Bates CJ, Jones KS, Bluck LJ. Stable isotope-labeled vitamin C as a probe for vitamin C absorption by human subjects. *Br j Nutr* 2004, 91: 699-705.
158. Holmes ME, Samson SE, Wilson JX, Dixon SJ, Grover AK. Ascorbate transport in pig coronary artery smooth muscle: Na<sup>+</sup> removal and oxidative stress increase loss of accumulated cellular ascorbate. *J Vasc Res* 2000, 37: 390-398.
159. Wilson JX, Dixon SJ. Ascorbate concentration in osteoblastic cells is elevated by transforming growth factor- $\beta$ . *Am J Physiol* 1995, 268: E565-E571.
160. Wilson JX, Dixon SJ, Yu J, Nees S, Tymk K. Ascorbate uptake by microvascular endothelial cells of rat skeletal muscle. *Microcirculation* 1996, 3: 211-221.
161. Zreik TG, Kodaman PH, Jones EE, Olive DL, Behrman H. Identification and characterization of an ascorbic acid transporter in human granulose-lutein cells. *Mol Hum Reprod* 1999, 5: 299-302.

162. Daruwala R, Song J, Koh WS, Rumsey SC, Levine M. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* 1999, 460: 480-484.
163. Liang WJ, Johnson D, Ma LS, Jarvis SM, Wei-Jun L. Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C. *Am J Physiol* 2002, 283: C1696-C1704.
164. Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S et al. Ascorbic acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med* 2002, 8: 514-517.
165. Wang H, Dutta B, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V et al. Human Na<sup>+</sup>-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1461: 1-9.
166. Wang Y, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267: 488-494.
167. Boyer JC, Campbell CE, Sigurdson WJ, Kuo SM. Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 334: 150-156.
168. Eck P, Erichsen HC, Taylor JG, Yeager M, Hughes AL, Levine M et al. Comparison of the genomic structure and variation in the two human sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1 and SLC23A2. *Hum Genet* 2004, 115: 285-294.

169. Kuo SM, MacLean ME, McCormick K, Wilson JX. Gender and sodium-ascorbate transporters determine ascorbate concentrations in mice. *J Nutr* 2004, 134: 2216-2221.
170. Takanaga H, Mackenzie B, Hediger MA. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Arch* 2004, 447: 677-682.
171. Siushansian R, Tao L, Dixon SJ, Wilson JX. Cerebral astrocytes transport ascorbic acid and dehydroascorbic acid through distinct mechanisms regulated by cyclic AMP. *J Neurochem* 1997, 68: 2378-2385.
172. Seno T, Inoue N, Matsui K, Ejiri J, Hirata KI, Kawashima S et al. Functional expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 in human endothelial cells. *J Vasc Res* 2004, 41: 345-351.
173. Wilson JX. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett* 2002, 527: 5-9.
174. May JM, Qu ZC, Neel DR, Li X. Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta-Mol Cel Res* 2003, 1640: 153-161.
175. Banerjee A. Blood dehydroascorbic acid and diabetes mellitus in human beings. *Ann Clin Biochem* 1982, 19: 65-70.
176. Dhariwal KR, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 712-716.
177. Lykkesfeldt J, Loft S, Poulsen HE. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection- are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Anal Biochem* 1995, 229: 329-335.

178. Schorah CJ, Downing C, Piripitsi A, Gallivan L, Al-Hazaa AH, Sanderson MJ et al. Total vitamin C, ascorbic acid and dehydroascorbic acid concentrations in plasma in critically ill patients. *Am J Nutr* 1996, 63: 760-765.
179. Lykkesfeldt J, Loft S, Nielsen JB, Poulsen HE. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *Am J Clin Nutr* 1997, 65: 959-963.
180. Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Dhariwal KR, Klein HG, Levine M. Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J Biol Chem* 1990, 265: 2584-2587.
181. Daskalopoulos R, Korcok J, Tao L, Wilson JX. Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol. *Glia* 2002, 39: 124-132.
182. Holmes ME, Mwanjewe J, Samson SE, Haist JV, Wilson JX, Dixon SJ et al. Dehydroascorbic acid uptake by coronary artery smooth muscle: effect of intracellular acidification. *Biochem J* 2002, 362: 507-512.
183. Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998, 24: 789-797.
184. Qutob S, Dixon SJ, Wilson JX. Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. *Endocrinology* 1998, 139: 51-56.

185. Upston JM, Karjalainen A, Bygrave FL, Stocker R. Efflux of hepatic ascorbate: a potential contributor to the maintenance of plasma vitamin C. *Biochem J* 1999, 342: 49-56.
186. Vera JC, Rivas CI, Zhang RH, Golde DW. Colony-stimulating factors signal for increased transport of vitamin C in human host defense cells. *Blood* 1998, 91: 2536-2546.
187. Wilson JX. Ascorbic acid uptake by a high-affinity sodium-dependent mechanism in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1989, 53: 1064-1071.
188. Rumsey SC, Daruwala R, Al-Hasani H, Zarnowski MJ, Simpson IA, Levine M. Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 2000, 275: 28246-28253.
189. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1997, 272: 18982-18989.
190. Wang Y, Russo TA, Kwon O, Chanock S, Rumsey SC, Levine M. Ascorbate recycling in human neutrophils: Induction by bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94: 13816-13819.
191. Zhu L, Castranova V, He P. fMLP-stimulated neutrophils increase endothelial  $[Ca^{2+}]_i$  and microvessel permeability in the absence of adhesion: role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288: 1331-1338.
192. Castro M, Caprile T, Astuya A, Millan C, Reinicke K, Vera JC et al. High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem* 2001, 78: 815-823.

193. Park JB, Levine M. Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL-60, U937 and Jurkat cells. *J Nutr* 2000, 130: 1297-1302.
194. Ngkeenwong FC, Leong LNG. Two distinct uptake mechanisms for ascorbate and dehydroascorbate in human lymphoblasts and their interaction with glucose. *Biochem J* 1997, 324: 225-230.
195. Talluri RS, Katragadda S, Pal D, Mitra AK. Mechanism of L-Ascorbic acid uptake by rabbit corneal epithelial cells: Evidence for the involvement of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2. *Curr Eye Res* 2006, 31: 481-489.
196. Ashino H, Shimamura M, Nakajima H, Dompou M, Kawanaka S, Oikawa T et al. Novel function of ascorbic acid as an angiostatic factor. *Angiogenesis* 2003, 6: 259-269.
197. Utoguchi N, Ikeda K, Saeki K, Oka N, Mizuguchi H, Kubo K et al. Ascorbic acid stimulates barrier function of cultured endothelial cell monolayer. *J Cell Physiol* 1995, 163: 393-399.
198. Wu F, Schuster DP, Tyml K, Wilson JX. Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2007, 42: 124-131.
199. Levine M, Dhariwal KR, Washko PW, Welch RW, Wang Y. Cellular functions of ascorbic acid: a mean to determine vitamin C requirements. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1993, 2: 5-13.



200. Johnston L, Lavery G. Vitamin C transport and SVCT1 transporter expression in chick renal proximal tubule cells in culture. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, 146: 327-334.
201. Biondi C, Pavan B, Dalpiaz A, Medici S, Lunghi L, Vesce F. Expression characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod* 2007, 13: 77-83.
202. Gourgoulisanis KI, Hatzoglou C, Molyvdas PA. Functional similarities between pleura and the renal proximal tubule-membrane and cellular considerations. *Med Hypothesis* 2005, 64: 83-85.
203. Sarkos S, Hatzoglou Ch, Dahabre J, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2002, 132: 233-237.
204. Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Kourti P, Vogiatzidis K, Potamianos S et al. Effect of sodium-potassium pump inhibition by ouabain on the permeability of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial* 2007, 23: 43-47.