



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΥΥΒΔΑΣ

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

ΚΑΡΥΩΤΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

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

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

«ΠΕΝΕΔ 2003 – Διερεύνηση της επίδρασης των κορτικοστεροειδών, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και αναστολέων τους στη διαπερατότητα του περιτοναίου και του υπεζωκότα προβάτου»

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Γουργουλιάνης Κων/νος
Κωδικός Έργου: ΠΕΝΕΔ 2003-03ΕΔ782

Το έργο συγχρηματοδοτείται 75% της Δημοσίας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό κοινοτικό ταμείο το 25% της Δημοσίας Δαπάνης από το ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό τομέα, στο πλαίσιο του μέτρου 8.3 του Ε.Π Ανταγωνιστικότητα - ΈΓ κοινοτικό πλαίσιο στήριξης.

Στον μικρό μου πρίγκιπα,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη χρονική περίοδο 2006-2009, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Στεφανίδη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους εκείνους τους ανθρώπους που το διάστημα των τελευταίων τεσσάρων περίπου ετών με υποστήριξαν, καθοδήγησαν, συμβούλεψαν και με εμπιστεύτηκαν. Είμαι πεπεισμένη ότι χωρίς την πολύτιμη συμβολή τους δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της μελέτης. Ευχαριστώ,

❖ Τον Αντιπρόεδρο της Ιατρικής Σχολής και Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Στεφανίδη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα μελέτη. Η αμέριστη εμπιστοσύνη, συμπαράσταση και βοήθεια προς το πρόσωπό μου υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωσή της. Η επιστημονική του σκέψη και υπόσταση με έχουν επηρεάσει ανεξίτηλα.

❖ Τον Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής που μου εμπιστεύτηκε τη διεκπεραίωσή της. Η επαγρύπνηση, η σφαιρική αντιμετώπιση των επιστημονικών ερωτημάτων, οι καίριες υποδείξεις και η διδασκαλία του υπήρξαν υποδειγματικές.

❖ Την Επίκουρο Καθηγήτρια Χρυσή Χατζόγλου που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διατριβή. Η συνεχής επιτήρηση και η μεθοδική της παρουσία με βοήθησαν να διεκπεραιώσω εργαστηριακά, επιστημονικά και συγγραφικά την εργασία αυτή. Η συμβολή της ήταν καθοριστική.

❖ Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου της Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πασχάλη – Αδάμ Μολυβδά για την επιστημονική αρωγή και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του.

- ❖ Την Επίκουρο Καθηγήτρια Ευφροσύνη Παρασκευά για την αμέριστη συμπαράστασή της. Η επιστημονική και εργαστηριακή καθοδήγηση στο κεφάλαιο που αναφέρεται στα κύτταρα ήταν καθοριστικής σημασίας.
- ❖ Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Χατζηευθυμίου Αποστολία για τις χρήσιμες συμβουλές και την επιστημονική βοήθεια.
- ❖ Τον Καθηγητή Χειρουργικής του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας Κωνσταντίνο Χατζηθεοφίλου και ιδιαίτερα την Λέκτορα Αντιγόνη Πουλτσίδα για την άποψη συνεργασία και βοήθεια στην παροχή ανθρώπινου πειραματικού υλικού.
- ❖ Τον Λέκτορα Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Βασίλη Λιακόπουλο για τη συνεργασία του. Οι επιστημονικές του παρεμβάσεις στη συγγραφή των άρθρων και της διατριβής υπήρξαν πολύτιμες.
- ❖ Τον επιστημονικό συνεργάτη στο βαθμό του Λέκτορα (Π.Δ. 407/80) Φυσιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και φίλο Σωτήρη Ζαρογιάννη για την αμέριστη συμπαράσταση, συνεργασία και επιστημονική του κατάρτιση.
- ❖ Τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εξαιρετική τεχνική υποστήριξη και συνεργασία.
- ❖ Την εταιρεία Σφαγεία Λάρισας Α.Ε. και όλους τους εργαζόμενους σε αυτή. Ιδιαίτερα τον φίλο μου πλέον Σάκη Πουρνάρα για την ανιδιοτελή και πολύτιμη βοήθεια στην παροχή του πειραματικού υλικού.

- ❖ Τους συνεργάτες και φίλους Ροδόπη Σταματίου, Φιλίτσα Δεληγιώργη, Γιώτα Κούρτη, Κώστα Βογιατζίδη, Τέλη Φιλιπίδη, Γώγου Ευδοξία, Ελένη Αποστολίδη, Ελένη Χανίκα, Ματίνα Τσαπουρνιώτη για την πολύπλευρη συμπαράσταση και υποστήριξή τους.
- ❖ Τους υποψήφιους διδάκτορες και το επιστημονικό προσωπικό στον τομέα της Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την αμέριστη συμπαράσταση και συνεργασία.
- ❖ Την οικογένειά μου που μου συμπαραστέκεται και υπομένει καρτερικά.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (επιβλέπων)

*Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ

*Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (επιβλέπων)

*Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*

ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ

*Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

ΜΟΥΥΒΔΑΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ – ΑΔΑΜ

Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

Καθηγητής Καρδιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ ΕΥΤΥΧΙΑ

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ

*Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Αγγελική

Επίθετο: Καρυώτη του Μενελάου

Ημερομηνία γέννησης: 4/12/1975

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Διεύθυνση Κατοικίας: Καποδιστρίου1/ 41222 Λάρισα

Τηλ: 2410621358/ 2410534406/ 6947312566

E-mail: akarioti@med.uth.gr/ angiekarioti@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 1993 Απολυτήριο Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης 1^ο Λύκειο Λάρισας (18^{9/11})
- 1995-1998 Φοίτηση στον 1^ο κύκλο σπουδών DEUG SV (Sciences de la vie) στο Université de la Méditerranée Faculté des Sciences de Luminy Marseille, France
- 1999-2004 Πτυχίο «Βιοχημεία» ΠΣΕ Πανεπιστήμιου Ιωαννίνων με βαθμό «Λίαν Καλώς» (6^{20/32})
- 2005-2007 Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Μοριακή Ιατρική» Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2006- σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

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

Άριστη γνώση Γαλλικών: Diplôme Approfondi de Langue Française (DALF)

Γνώσεις Η/Υ

Πτυχίο ECDL

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Karioti A**, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Liakopoulos V, Kourti P, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I. Rapid effect of dexamethasone on the permeability of visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial.* 2008;24:2-6.
- **Karioti A**, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Kourti P, Giannopoulou M, Arampatzis S, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I. Spironolactone increases permeability of visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial.* 2009;25:16-9.
- Liakopoulos V, Zarogiannis S, Kourti P, Hatzoglou C, **Karioti A**, Arampatzis S, Giannopoulou M, Musso C, Gourgoulianis K, Molyvdas P-A, Stefanidis I. Effect of cimetidine on the electrophysiologic profile of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial.* 2009;25:20-3.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Διεθνή Συνέδρια:

- 10^ο Διεθνές Συνέδριο Aegean Retina. Ρόδος, 6-8 Ιουλίου 2007. Mutational analysis of retinal genes in retinitis pigmentosa patients by selective gene sequencing and DNA microarrays. Kamakari S, **Karioti A**, Panagiotoglou T, Anastasakis A, Anagnou NP, Tsilimbaris M.
- 28th Annual Dialysis Conference. Orlando, Florida, March 2-4 2008. Rapid effect of dexamethasone on the permeability of the visceral sheep peritoneum. **Karioti A**, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Liakopoulos V, Kourti P, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.
- 29th Annual Dialysis Conference. Houston, Texas. March 8-10 2009. Spironolactone increases permeability of the visceral sheep peritoneum. **Karioti A**, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Giannopoulou M, Arampatzis S, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.
- 29th Annual Dialysis Conference. Houston, Texas. March 8-10 2009. The effect of cimetidine on the electrophysiological profile of isolated sheep visceral peritoneum. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, **Karioti A**, Arampatzis S, Giannopoulou M, Musso C, Gourgoulianis K, Molyvdas P-A, Stefanidis I.

Ελληνικά Συνέδρια:

- 1^ο Πανελλήνιο και Διεθνές Συνέδριο Υαλοειδούς-Αμφιβληστροειδούς. Αθήνα, 13-15 Ιανουαρίου 2006. Τράπεζα γενετικού υλικού για εκφυλιστικά - κληρονομικά νοσήματα αμφιβληστροειδή. Τσιλιμπάρης Μ, Καμακάρη Σ, Αναστασάκης Α, **Καρυώτη Α**, Παναγιώτογλου Θ, Χαρίσης Σ, Χριστοδουλάκης Ε.
- 3ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Αθήνα, 12-13 Μαΐου 2006. Ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στο γονίδιο της ροδοψίνης σε Έλληνες ασθενείς με Μελαγχρωστική Αμφιβληστροειδοπάθεια. Καμακάρη Σ, Τσιλιμπάρης Μ, Ανάγνου Π Ν, **Καρυώτη Α**.
- 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ηράκλειο Κρήτης, 2-5 Νοεμβρίου 2006. Η επίδραση της λοπεραμίδης και της ναλοξόνης στην διαπερατότητα του περισπλάχνιου υπεζωκότα προβάτου. Κ. Βογιατζίδης, Χ. Χατζόγλου, Σ. Ζαρογιάννης, Ι. Στεφανίδης **Α. Καρυώτη**, Β. Λιακόπουλος, Κ. Ι. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς.
- 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υαλοειδούς Αμφιβληστροειδούς. Αθήνα, 12 -13 Ιανουαρίου 2007. Ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στο γονίδιο της ροδοψίνης σε Έλληνες ασθενείς με Μελαγχρωστική Αμφιβληστροειδοπάθεια. **Καρυώτη Α**, Τσιλιμπάρης Μ, Καμακάρη Σ.
- 40^ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο Αθήνα 23-26 Μαΐου 2007 Ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε Έλληνες ασθενείς με Μελαγχρωστική Αμφιβληστροειδοπάθεια με επιλεκτική αλληλούχιση και μικροσυστοιχίες DNA. Καμακάρη Σ, **Καρυώτη Α**, Παναγιώτογλου Θ, Αναστασάκης Α, Ανάγνου Ν, Τσιλιμπάρης Μ.
- 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007. Η δεξαμεθαζόνη αυξάνει τη διαπερατότητα της κορυφαίας επιφάνειας του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου μέσω της αντιμεταφοράς $\text{Na}^+ - \text{H}^+$. Τ. Δεληγιώργη, Χ. Χατζόγλου, Σ. Ζαρογιάννης, **Α. Καρυώτη**, Ι. Στεφανίδης, Κ. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς.
- 4^ο Πανελλήνιο και Διεθνές Συνέδριο Υαλοειδούς-Αμφιβληστροειδούς. Αθήνα, 16-17 Ιανουαρίου 2009. Κατασκευή του πρώτου γενετικού χάρτη αμφιβληστροειδοπαθειών στην Ελλάδα. Καμακάρη Σ., Σταματίου Π., **Καρυώτη Α**, Παναγιώτογλου Θ, Τσίκα Χ, Αναστασάκης Α, Τσιλιμπάρης Μ.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Διεθνή Συνέδρια:

- AACC Annual Meeting, Los Angeles, CA, July 25-29 2004. Proton nuclear magnetic resonance lipid profiles of HDL and non-HDL lipoprotein fractions. E. Bairaktari, **A. Karioti**, N. Psychogios, V. Tzovaras, M. Elisaf, K. Seferiadis.
- S. Kamakari, **A.Karioti**, H.F. Mendes, N. Waseem, T. Panagiotoglou, A. Anastasakis, M.E. Cheetham, M.K. Tsilimbaris. Rhodopsin Screening in Greek Patients With Retinitis Pigmentosa and Identification of a Novel Rhodopsin Mutation, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007 48: E-Abstract 1661
- 17th ERS (European Respiratory Society), Stockholm, September 15-19 2007. Dexamethasone increases sheep visceral and parietal pleura permeability. T. Deligiorgi, C. Hatzoglou, S. Zarogiannis, **A. Karioti**, I. Stefanidis, K. Gourgoulianis, P.-A. Molyvdas.
- S. Kamakari, **A. Karioti**, T. Panagiotoglou, P. Stamatiou, NP. Anagnou, M. Tsilimbaris. Mutational Analysis Of Usher Greek Patients By Selective Gene Sequencing And DNA Microarrays, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008 49: E-Abstract 461
- 12th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis, Istanbul, June 20-24 2008. Effect of dexamethasone on the electrophysiologic profile of visceral sheep peritoneum. **A. Karioti**, V. Liakopoulos, S. Zarogiannis, C. Hatzoglou, T. Deligiorgi, E. Oikonomidou, K. Gourgoulianis, P.-A. Molyvdas, I. Stefanidis.
- 12th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis, Istanbul, June 20-24 2008. Effect of cimetidine on the transmesothelial resistance of isolated sheep peritoneum. V. Liakopoulos, S. Zarogiannis, P. Koutri, C. Hatzoglou, **A. Karioti**, C. Musso, K. Gourgoulianis, P.-A. Molyvdas, I. Stefanidis.

Ελληνικά Συνέδρια:

- 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα 2-4 Δεκεμβρίου 2004. Ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων των HDL και non-HDL λοποπρωτεϊνών δυσλιπιδαιμικών ασθενών με φασματοσκοπία ¹H-NMR. **A. Καρυώτη**, Ν. Ψυχογιός, Χ. Κωσταρά, Β. Τζοβάρας, Κ. Σεφεριάδης, Μ. Ελισάφ, Ε. Μπαϊρακτάρη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟ	5
Περιγραφή.....	5
Ανατομία.....	6
Ιστολογία	10
Τα αιμοφόρα αγγεία – Τριχοειδική κυκλοφορία.....	14
Τα λεμφικά αγγεία – Λεμφική κυκλοφορία.....	15
Περιτοναϊκό υγρό.....	17
ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	18
Εισαγωγή	18
Οργανίδια των περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων.....	19
Μικρολάχνες.....	19
Κυστίδια.....	19
Στόματα.....	20
Πυρήνες.....	21
Λοιπά οργανίδια.....	21
Κυτταρικές Συνδέσεις.....	21
Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων.....	22
Προστατευτικός φραγμός.....	22
Παρουσίαση αντιγόνου.....	22
Προσκόλληση και ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων.....	23
Μεταφορά διαλυτών και κυττάρων.....	23
Έναρξη και λύση της φλεγμονής και ιστική επιδιόρθωση.....	23
Πήξη και ινωδόλυση.....	24
Σύνθεση κολλαγόνου.....	24
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ	25
Το περιτόναιο ως διηθητικό όργανο.....	25
Επιφάνεια περιτοναίου.....	25
Διάμεσος ιστός.....	25
Τριχοειδική ροή αίματος.....	25
Λεμφική ροή.....	26

Τριχοειδική μεταφορά ουσιών.....	27
Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά ουσιών.....	27
Μηχανισμοί μεταφοράς.....	29
ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ.....	33
Ορισμός – επιδημιολογικά στοιχεία.....	33
Αιτιολογία.....	34
Παθογένεια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.....	35
Συμπτωματολογία και επιπλοκές - Παθοφυσιολογική προσέγγιση.....	36
Θεραπεία.....	36
ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ.....	37
Περιγραφή της μεθόδου.....	37
Περιτοναϊκή κοιλότητα.....	38
Μοντέλα διαπερατότητας του περιτοναίου.....	39
Μοντέλο των τριών πόρων.....	39
Μοντέλο κατανομής.....	40
Φυσιολογία της περιτοναϊκής μεταφοράς.....	42
Διάχυση.....	42
Υπερδιήθηση (ultrafiltration).....	42
Απορρόφηση υγρού.....	42
Απώλεια της υπερδιήθησης.....	43
ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	46
Βασικοί μηχανισμοί διακυτταρικής μεταφοράς.....	46
Διάχυση.....	46
Ενεργητική μεταφορά.....	46
Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων.....	47
Μελέτη Διαπερατότητας Βιολογικών Μεμβρανών – Μέθοδος Ussing System.....	48
Μετρήσεις με του θαλάμους του Ussing: Αντίσταση R.....	50
ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	53
Γλυκοκορτικοειδή.....	53
Δεξαμεθαζόνη.....	54
Μιφεπριστόνη και Σπιρονολακτόνη.....	54
Αμιλορίδη και ΕΙΡΑ.....	55
Ουαμπαΐνη.....	56

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).....	56
Αναστολείς των υποδοχέων του VEGF (SU5416 & SU1498).....	58
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	60
ΜΕΡΟΣ 1 ^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΙΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟΥ.....	60
Συλλογή και Προετοιμασία ιστού.....	60
Πειραματική Διαδικασία Διαπερατότητας.....	61
ΜΕΡΟΣ 2 ^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	65
Απομόνωση και Καλλιέργεια.....	65
Ανοσοφθορισμός.....	68
Καλλιέργεια Ανθρώπινων Περιτοναϊκών Μεσοθηλιακών Κυττάρων σε Φίλτρα.....	69
Πειραματική Διαδικασία Διαπερατότητας Κυττάρων.....	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
ΜΕΡΟΣ 1 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΕ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΙΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟΥ.....	74
Επίδραση της Δεξαμεθαζόνης στο Περιτόναιο.....	74
Επίδραση της Μιφεπριστόνης και της Σπιρονολακτόνης στη δράση της δεξαμεθαζόνης.....	79
Επίδραση της αμιλορίδης και του ΕΙΡΑ στη δράση της δεξαμεθαζόνης.....	84
Επίδραση της ουαμπαΐνης στη δράση της δεξαμεθαζόνης.....	88
Επίδραση του VEGF στο Περιτόναιο Προβάτου.....	91
Επίδραση του SU1498 στη δράση του VEGF.....	96
Επίδραση του SU1498 στη δράση του VEGF.....	99
ΜΕΡΟΣ 2 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	102
Καλλιέργεια και Ταυτοποίηση.....	102
Καλλιέργεια των κυττάρων στα Snapwells.....	103
Πειράματα διαβατότητας με (HPMC).....	105
Επίδραση της Δεξαμεθαζόνης σε HPMC.....	105
Επίδραση της Αμιλορίδης στη δράση της Δεξαμεθαζόνης.....	106
Επίδραση της Ουαμπαΐνης στη δράση της Δεξαμεθαζόνης.....	107
Επίδραση του VEGF σε HPMC.....	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	122
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	124
SUMMARY	126
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Χ.Ν.Α.) τελικού σταδίου αυξάνεται συνεχώς σε συχνότητα τα τελευταία χρόνια τόσο παγκοσμίως, όσο και στην Ελλάδα σε μικρότερο όμως βαθμό. Η Χ.Ν.Α. αναπτύσσεται σταδιακά για να καταλήξει σε μια μη αναστρέψιμη καταστροφή των νεφρώνων. Στο τελικό στάδιο, για την επιβίωση απαιτείται μια θεραπεία εξωνεφρικής κάθαρσης, όπως είναι η αιμοκάθαρση. Η περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ) αποτελεί μία εξωνεφρική μέθοδο θεραπείας, η οποία εφαρμόζεται στο 15% περίπου των ασθενών με Χ.Ν.Α. τελικού σταδίου. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι με τον χρόνο εφαρμογής επέρχεται ανεπάρκεια της μεθόδου. Αυτή η ανεπάρκεια οφείλεται σε υποτροπιάζουσες φλεγμονές και συνοδεύεται από μορφολειτουργικές αλλοιώσεις του περιτοναίου.

Κατά τη διάρκεια της ΠΚ η ημιδιαπερατή περιτοναϊκή μεμβράνη χρησιμεύει ως ηθμός. Τα υπέρτονα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στη ΠΚ δεν είναι βιοσυμβατά με τη φυσιολογία του περιτοναίου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μία μορφή χρόνιας περιτονίτιδας, ίνωση και διαταραχές της αγγειογένεσης. Έτσι η περιτοναϊκή μεμβράνη χάνει σταδιακά τις φυσιολογικές της ιδιότητες ώστε κάποια στιγμή να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέον ως βιολογικός ηθμός για την ΠΚ. Το γεγονός αυτό μεταφράζεται με απώλεια της υπερδιήθησης σε ποσοστό 50% των ασθενών που χρησιμοποιούν την ΠΚ για περισσότερο από 6 χρόνια.

Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια διερευνούν την επίδραση φαρμακολογικών, αυξητικών παραγόντων, και άλλων ουσιών στη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης. Σκοπός των μελετών αυτών είναι από τη μία η εύρεση περισσότερο βιοσυμβατών διαλυμάτων και από την άλλη η καλύτερη αντιμετώπιση φλεγμονοδών αντιδράσεων στο περιτόναιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται σε πρόσφατες μελέτες για το μεσοθήλιο και τα μεσοθηλιακά κύτταρα, τα οποία είναι πλέον

αποδεκτό ότι συμμετέχουν ενεργά στη μεταφορά ιόντων, και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού σε καταστάσεις φλεγμονής του περιτοναίου.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη ηλεκτροφυσιολογίας σε περιτόναιο προβάτου της δράσης αφενός της δεξαμεθαζόνης, γνωστού αντιφλεγμονώδους γλυκοκορτικοειδούς (κορτικοστεροειδούς) και αφετέρου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος πιθανολογείται ότι εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της περιτοναϊκής ίνωσης.

Περιτοναϊκός ιστός προβάτου επιλέχθηκε διότι η ανατομία και η φυσιολογία του ομοιάζει με αυτή του ανθρώπινου. Για τα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Ussing, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης (transmesothelial resistance, R_{TM}) και την εξαγωγή συμπερασμάτων για την ιοντική διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Η δεξαμεθαζόνη, ο VEGF και οι αναστολείς τους μελετήθηκαν σε τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο στην κορυφαία και βασεοπλευρική τους επιφάνεια. Για να μελετηθεί η δράση της δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνδυασμός της με τη μifeπριστόνη (αναστολέας των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων), τη σπιρονολακτόνη (αναστολέας των αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων), την αμιλορίδη (αναστολέας των επιθηλιακών διαύλων νατρίου ENaC), την αιθυλισοπροπυλαμίδη (EIPA) (αναστολέας των διαύλων Na^+/H^+) και την ουαμπαΐνη (αναστολέας της αντλίας Na^+/K^+). Ο VEGF επίσης εφαρμόστηκε σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με τους αναστολείς των δύο υποδοχέων του τον R1 και τον R2: ο SU5416 αναστολέας των VEGFR1/R2 υποδοχέων, και ο SU1498 ειδικός αναστολέας του VEGFR2.

Τέλος, δεδομένου της σπουδαιότητας του μεσοθηλίου και των μεσοθηλιακών κυττάρων στη λειτουργία του περιτοναίου επιπλέον στόχος της εργασίας ήταν η

δημιουργία πρωτογενούς σειράς περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων και η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη αυτών στο σύστημα Ussing.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟ

Περιγραφή

Το περιτόναιο παράγεται από το μεσόδεσμα του πλαγίου λεπτού υμένα και είναι ορογόνος συνδετική μεμβράνη που βρίσκεται μεταξύ του κοιλιακού τοιχώματος και των ενδοκοιλιακών σπλάχνων. Ετυμολογικά, *περιτόναιο* σημαίνει «κάτι το τυλιγμένο σφιχτά τριγύρω», το οποίο περιγράφει τέλεια τη θέση αυτής της λεπτής μεμβράνης γύρω από τα κοιλιακά σπλάχνα και οριοθετεί όλες τις άνω κοιλιακές κοιλότητες. Η ελληνική προέλευση της λέξης περιτόναιο εξηγεί την πολύ πρώιμη χρήση του από τους αρχαίους ανατόμους.

Αποτελεί το μεγαλύτερο των ορογόνων υμένων, ο οποίος αφενός μεν επαλείφει τα τοιχώματα της κοιλίας (περίτονο πέταλο ή τοιχωματικό περιτόναιο), αφετέρου περιβάλλει τα διάφορα σπλάχνα (περισπλάχνιο πέταλο ή σπλαχνικό περιτόναιο). Τα δύο αυτά πέταλα σε πολλές θέσεις ανακάμπουν μεταξύ τους, σχηματίζοντας διπέταλες πτυχές του περιτοναίου που ονομάζονται *σύνδεσμοι*.

Οι σύνδεσμοι αυτοί αφενός μεν στηρίζουν τα διάφορα σπλάχνα, αφετέρου δε επιτρέπουν τις κινήσεις τους, ενώ συγχρόνως αποτελούν και τους φορείς των αγγείων και νεύρων.

Μεταξύ των δύο πετάλων του περιτοναίου σχηματίζεται σχισμοειδής κοιλότητα με ορώδες υγρό που ονομάζεται *περιτοναϊκή*.

Το *τοιχωματικό περιτόναιο* που έχει την υφή μεμβράνης, αφορίζει το κατώτερο στρώμα της κοιλιακής κοιλότητας και την επιφάνεια του μεσεντερίου. Η μεμβράνη αυτή φέρει αγγεία, που προέρχονται από το φυτικό και εγκεφαλονωτιαίο σύστημα (μεσοπλεύρια, λαγονοϋπογάστριο, λαγονοβουβωνικό). Η παραπάνω νεύρωση εξηγεί τη μεγάλη ευαισθησία αυτού και τους αντανεκλαστικούς πόνους όταν παρατηρηθεί περιτοναϊκός ερεθισμός. Το διαφραγματικό περιτόναιο νευρώνεται από το φρενικό

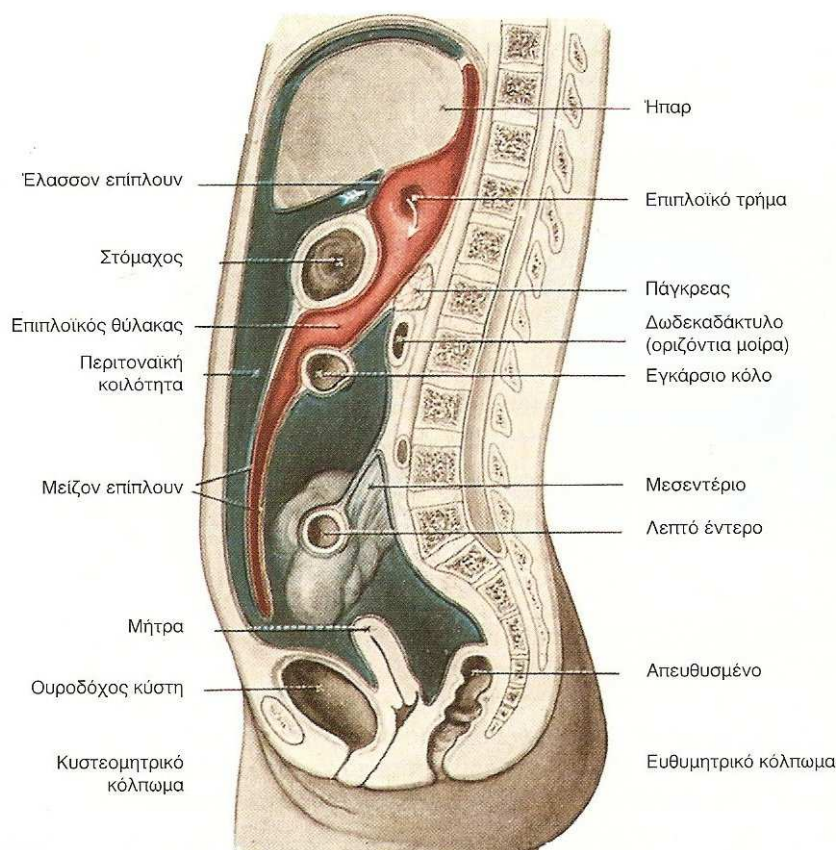
νεύρο και γι' αυτό το λόγο αντανακλάται στο επίπεδο του ώμου, όταν υπάρχουν υποφρενικά ερεθίσματα.

Το σπλαχνικό περιτόναιο είναι λείο, με λεπτά στρώματα, ημιδιαφανές και ιδιαίτερα ανθεκτικό. Καλύπτει όλα τα ενδοπεριτοναϊκά σπλάγχνα και πρέπει να υπολογίζεται ως αναπόσπαστο μέρος του σπλαχνικού τοιχώματος. Η αγγείωσή του προέρχεται από τα αγγεία των διαφόρων σπλάχνων και δεν έχει δική του νεύρωση. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η περιτοναϊκή κοιλότητα στην ουσία δεν υπάρχει και δημιουργείται μόνο με την εισαγωγή αέρα μέσα στα δύο πέταλα (πνευμοπεριτόναιο), ή κατά τη λαπαροτομία, αφού ανοιχθεί το τοιχωματικό πέταλο (1).

Ανατομία

Το ελάσσον επίπλου (Εικόνα 1) είναι μια διπέταλη πτυχή του περιτοναίου, η οποία εκτείνεται από τις πύλες του ήπατος έως το ελάσσον τόξο του στομάχου και την αρχική μοίρα (πρώτα 2εκ.) του δωδεκαδακτύλου. Τα δύο πέταλά του είναι η συνέχεια των περιτοναϊκών πετάλων που καλύπτουν αντίστοιχα την πρόσθια και την οπίσθια επιφάνεια του στομάχου και τα οποία διαμορφώνουν τον ορογόνο χιτώνα αυτού του οργάνου. Η πρόσφυση του ελάσσονος επίπλου στο ήπαρ έχει το σχήμα του λατινικού J, διότι μετά τις πύλες εκτείνεται προς τα πίσω, ακολουθώντας την αριστερή οβελιαία αύλακα της σπλαχνικής επιφάνειας του ήπατος, ώστε το προς τα αριστερά όριό της να φτάνει μέχρι το διάφραγμα συνδέοντας έτσι την αρχική μοίρα του στομάχου με το διάφραγμα· αποτελεί δηλαδή μέρος του γαστροφρενικού συνδέσμου. Εδώ τα δύο πέταλά του απομακρύνονται το ένα από το άλλο και συνεχίζουν επαλείφοντας, από εμπρός και από πίσω ανάλογα, την κοιλιακή μοίρα του οισοφάγου. Το προς τα δεξιά πέρας του ελάσσονος επιπλόου διαμορφώνει χείλος το οποίο ορίζει από τα πρόσω το επιπλοϊκό τρήμα. Το πάχος του ποικίλλει, ανάλογα με

το ποσό του λιπώδη συνδετικού ιστού που περιλαμβάνεται ανάμεσα στα δύο πέταλά του.



Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση της περιτοναϊκής κοιλότητας (με κyanούν χρώμα η μείζων και με κόκκινο η ελάσσων)

Το μείζον επίπλων (Εικόνα 1) είναι η μεγαλύτερη από τις πτυχές του περιτοναίου. Σχηματίζεται από την αναδίπλωση μιας διπέταλης πτυχής που διαμορφώνεται από την αναδίπλωση του αρχέγονου ραχιαίου περιτοναίου των εμβρύων, με αποτέλεσμα να συνιστάται από τέσσερις περιτοναϊκές στιβάδες. Η πρόσθια διπέταλη πτυχή εκπορεύεται από το μείζον τόξο του στομάχου και την προσκείμενη μοίρα του δωδεκαδακτύλου και άγεται προς τα κάτω, πίσω από το πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Σε άλλοτε άλλη απόσταση από το σημείο της έκφυσής του αναδιπλώνεται προς τα

πίσω και άνω διαμορφώνοντας έτσι την οπίσθια διπέταλη πτυχή, η οποία στη συνέχεια φτάνει στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, όπου προσφύεται αμέσως πιο πάνω από την πρόσφυση του εγκάρσιου μεσοκόλου. Η περιγραφή αυτή αντιστοιχεί στη μορφή που έχει το μείζον επίπλουν κατά την εμβρυϊκή και τη νεογνική ηλικία.

Μετά τη νεογνική ηλικία, το μεσοθήλιο στις επιφάνειες των πετάλων του περιτοναίου που έρχονται σε επαφή, δηλαδή αυτό που βρίσκεται μεταξύ της πρόσθιας και της οπίσθιας πτυχής του μείζονος επίπλου καθώς και αυτό που βρίσκεται μεταξύ του οπίσθιου πετάλου της οπίσθιας πτυχής του μείζονος επίπλου και του άνω πετάλου του εγκάρσιου μεσοκόλου, εξαφανίζεται και στη θέση του αναπτύσσεται ινώδης συνδετικός ιστός, ο οποίος προσκολλά τις επιφάνειες που εφάπτονται. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα αφενός τη διαμόρφωση στον ενήλικα δύο ανατομικών δομών, το μείζον επίπλουν και το εγκάρσιο μεσοκόλο, τα οποία συνίστανται από τέσσερις περιτοναϊκές μονοστιβάδες και αφετέρου τον σχηματισμό του γαστροκολικού συνδέσμου.

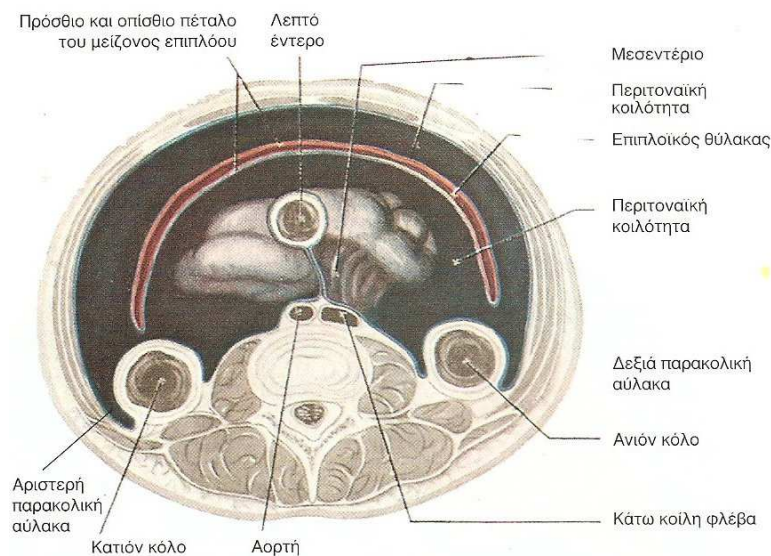
Το μείζον επίπλουν είναι συνήθως λεπτό, κατά τόπους θυριδωτό και περιέχει άλλοτε άλλη ποσότητα λίπους, που είναι και ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει τον όγκο του. Μεταξύ των δύο περιτοναϊκών στιβάδων της πρόσθιας πτυχής υπάρχουν εκτός από λεμφαγγεία και νεύρα και ένας μεγάλος αριθμός από εξαιρετικώς ευκίνητα πολυμορφοπύρηννα μακροφάγα κύτταρα. Τα τελευταία, κατά τόπους συρρέουν και σχηματίζουν τις υποστρόγγυλες ή ωοειδείς γαλακτοειδείς κηλίδες.

Το μεσεντέριο (Εικόνα 2) του λεπτού εντέρου ή ιδίως μεσεντέριο είναι μια πλατιά και ριπιδοειδούς σχήματος πτυχή του περιτοναίου, που ανάμεσα στα δύο πέταλά της περιέχει τις έλικες του ελικώδους εντέρου, τις οποίες έτσι αναρτά από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Χρησιμεύει εκτός από την ανάρτηση των ενηλίκων και ως φορέας

των αγγείων και των νεύρων του ελικώδους εντέρου. Το εύρος του (απόσταση από τη ρίζα έως το εντερικό χείλος) μπορεί να φτάσει στο μέσον του τα 20εκ. περίπου, ενώ είναι πιο κοντό στην αρχή και το πέρας του.

Το εγκάρσιο μεσόκολο είναι μια πλατιά διπέταλη πτυχή του περιτοναίου από την οποία κρέμεται το εγκάρσιο κόλο. Έχει μεγαλύτερο πλάτος (απόσταση από τη ρίζα μέχρι το ελεύθερο χείλος) στο μέσον του (περίπου 10-16εκ.) και μικρότερο στα άκρα του (2-3 εκ.).

Το μεσεντερίδιο είναι μια διπέταλη πτυχή του περιτοναίου που έχει σχήμα τριγώνου και η οποία εκπορεύεται από την αριστερή (οπίσθια) επιφάνεια του κάτω πέρατος του μεσεντερίου (βάση του τριγώνου), κοντά στην ειλεοτυφική συμβολή (2).



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση της περιτοναϊκής κοιλότητας σε μια εγκάρσια διατομή στο ύψος του τέταρτου οσφυϊκού σπονδύλου. Επισημαίνεται ότι ο επιπλοϊκός θύλακας που παριστάνεται με κόκκινο χρώμα επεκτείνεται και μεταξύ των πετάλων του μείζονος επίπλου που δεν έχουν ακόμη συγκολληθεί.

Ένας άλλος τρόπος περιγραφής του περιτοναίου γίνεται με τη διάκρισή του στις εξής μοίρες:

α) Το πρόσθιο τοιχωματικό περιτόναιο (υπερομφάλιος μοίρα του περιτοναίου) Βρίσκεται γύρω από τον ομφαλό. Η μορφή αυτής της κατασκευής σε αντίθεση με τις υπόλοιπες περιτοναϊκές περιοχές, παριστά μια σχετικά απλή πτυχή του περιτοναίου. Γύρω από τον ομφαλό υπάρχουν έξι πτυχές, από τις οποίες οι τέσσερις συγκλίνουν και οι δύο είναι πλάγιες, μια πάνω από τον ομφαλό και πέντε από κάτω. Η μοίρα αυτή καλύπτει εν μέρει το ήπαρ, σχηματίζει δρεπανοειδή και στεφανιαίο σύνδεσμο του ήπατος, καλύπτει το οπίσθιο τοίχωμα της χοληδόχου κύστης, το στόμαχο και την πρώτη μοίρα του δωδεκαδακτύλου, τη μοίρα του εγκαρσίου μεσόκολου, το σπλήνα και εν μέρει τον αριστερό νεφρό.

β) Το περιτόναιο της πυελικής κοιλότητας (υπομφάλιος μοίρα του περιτοναίου) Η μοίρα αυτή καλύπτει εν μέρει το τυφλό, την οπίσθια επιφάνεια της ουροδόχου κύστης, τη μήτρα, το απευθυσμένο, την οπίσθια επιφάνεια του κόλπου, τα εξαρτήματα της μήτρας, σχηματίζοντας το μεσεντέριο και στη συνέχεια καλύπτει τα διάφορα τμήματα του παχέος εντέρου.

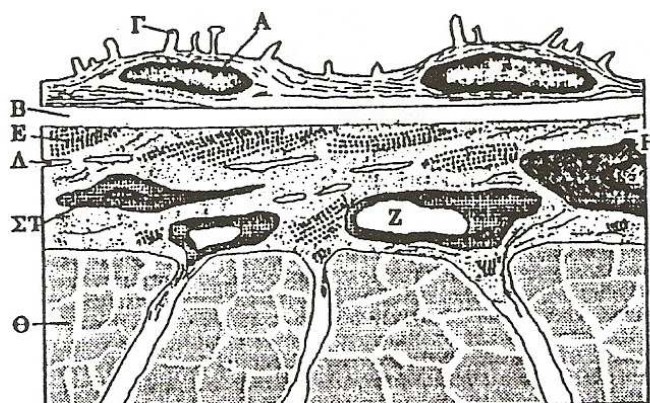
γ) Ο επιπλοϊκός θύλακας

Παριστά ευμέγεθες κόλπωμα του περιτοναίου, που βρίσκεται πίσω από το στόμαχο και το ελάσσον επίπλουν. Καλύπτει εν μέρει το ήπαρ, το εγκάρσιο κόλον και το πάγκρεας (1).

Ιστολογία

Το περιτόναιο είναι μεμβράνη που καλύπτεται από μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο από επίπεδα ή πολυγωνικά κατά το πλείστον κύτταρα, που παρουσιάζουν ψηκτροειδή παρυφή, τα οποία επικάθονται σε λεπτή βασική μεμβράνη (Σχήμα 1).

Η μεμβράνη αυτή οριοθετεί τη στοιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων από το υποκείμενο υπόστρωμα από συνδετικό ιστό, που αποτελείται κυρίως από ποικιλότροπα διαπλεκόμενα κολλαγόνα ινίδια και ελαστικές ίνες. Το πάχος του συνδετικού υποστρώματος στο τοιχωματικό περιτόναιο κυμαίνεται από 90- 130μ, ενώ το σπλαχνικό 45- 70μ. Μέσα στο συνδετικό υπόστρωμα πορεύονται τα αγγεία και νεύρα (1).

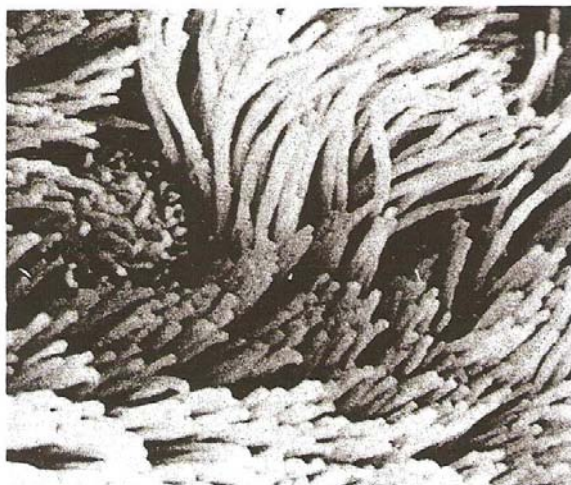


Σχήμα 1 Σχηματική αναπαράσταση φυσιολογικού περιτοναίου. *A: μεσοθηλιακό κύτταρο, B: βασική μεμβράνη μεσοθηλίου, Γ: μικρολάχνη, Δ: ελαστικός ιστός, E: κολλαγόνοι ίνες, ΣΤ: ινοβλάστης, Ζ: τριχοειδές, Η: μακροφάγο, Θ: μυϊκός ιστός*

Η επιφάνεια του περιτοναίου στον ενήλικο άνθρωπο κυμαίνεται μεταξύ 2,08 έως 1,72 m². Το εντερικό μεσοθήλιο και το μεσεντέριο μαζί αποτελούν το 49% της συνολικής επιφάνειας του μεσοθηλίου (3).

Το πάχος του περιτοναίου δεν είναι το ίδιο και ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή που εξετάζεται. Η μέτρηση του πάχους παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της μεγάλης ποσότητας συνδετικού ιστού ακόμη και λίπους σε ορισμένες περιοχές στο τοιχωματικό και διαφραγματικό περιτόναιο· στο σπλαχνικό περιτόναιο λόγω της στενής σύνδεσης με τον υποκείμενο ιστό. Το μεσεντέριο φαίνεται να είναι η πιο κατάλληλη περιοχή και στα κουνέλια είναι μεταξύ 30 και 38μm (3).

Το μεσοθήλιο αποτελείται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα που επικάθονται σε λεπτή βασική μεμβράνη πάχους 22 μm . Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΣΗΜ) η μεσοθηλιακή στοιβάδα εμφανίζεται ως συνεχής επιφάνεια καλυμμένη από πολυάριθμες μικρολάχνες (Εικόνα 3), ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΗΜ) φαίνεται ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν συνεχές στρώμα πολυγωνικών κυττάρων που έχουν την τάση να υπερκαλύπτει το ένα το άλλο. Οι μικρολάχνες εμφανίζονται ως κυτταροπλασματικές προεκβολές. Στη μεσοκυττάρια ουσία των μικρολαχνών διακρίνονται μικρά νημάτια διαμέτρου 4,9 μm με διάταξη παράλληλη στο μεγάλο άξονα (1).



Εικόνα 3 Μικρολάχνες στην επιφάνεια του μεσοθηλίου όπως εμφανίζονται στο ΣΗΜ.

Τα μήκη, οι διάμετροι και η σχετική πυκνότητα των μικρολαχνών διαφέρουν σημαντικά, ανάλογα με τις μεσοθηλιακές επιφάνειες που καλύπτουν διάφορα εσωτερικά όργανα. Τα μήκη ποικίλλουν από 0,04- 2,6 μm , οι διάμετροι από 0,04- 4,08 μm και οι πυκνότητες των μικρολαχνών από 200/10 μm^2 στην ουροδόχο κύστη έως 600/10 μm^2 πάνω στη μεμβράνη που καλύπτει το διάφραγμα και την καρδιά. Στο ήπαρ, στο έντερο και το στόμαχο, η πυκνότητα είναι περίπου 360/10 μm^2 . Μερικές περιοχές μπορεί να είναι τελείως γυμνές από μικρολάχνες (1).

Οι λειτουργικές ιδιαιτερότητες των μικρολαχνών δεν είναι ξεκάθαρες, μπορεί να αυξάνουν την επιφανειακή περιοχή και να διευκολύνουν την ανταλλαγή μεταξύ των κυττάρων και της σωματικής κοιλότητας. Άλλη γνωστή υπόθεση είναι ότι ενεργούν συγκροτημένα με ένα ορώδες εξίδρωμα, ώστε να προστατεύουν την επιφάνεια του μεσοθηλίου από την τριβή (1).

Στη βάση των μικρολαχνών, στην έξω επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, παρατηρούνται πόροι που θεωρείται ότι είναι ανοίγματα των μικροπινοκυττωτικών κυστιδίων, που όπως πιστεύεται συμμετέχουν στη διακυταρική μεταφορά ουσιών. Παρόμοιοι πόροι παρατηρούνται στην έξω και στην έσω επιφάνεια των κυττάρων (1).

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους, σε άλλα σημεία με πλήρη συγχώνευση ή στενή σύζευξη των κυτταρικών μεμβρανών ή με τοπικά ινίδια. Ο ρόλος των πολύπλοκων συνδέσεων των μεσοθηλιακών κυττάρων δεν είναι πλήρως γνωστός. Πιθανολογείται ότι έτσι σχηματίζεται σταθερός διηθητικός φραγμός και αυξάνεται επίσης η εκτατική επιφάνεια των κυττάρων (1).

Η βασική μεσοθηλιακή κυτταρική επιφάνεια διαχωρίζεται από τον υποκείμενο ιστό από μεμβράνη, η οποία αποτελείται από τρεις στοιβάδες: την έσω και την έξω, πυκνής υφής και την ενδιάμεση, από μόρια λιποειδούς αραιάς υφής περιοχή. Αυτές οι τρεις επιφάνειες έχουν εύρος 50 nm περίπου. Σε μερικές περιπτώσεις, μικρά κυστίδια ή σφαιρίδια, είναι ενωμένα με αυτή τη μεμβράνη. Συχνά, μικρές προσεκβολές κυτταροπλάσματος των μεσοθηλιακών κυττάρων καταδύονται βαθιά μέσα στο συνδετικό ιστό (1). Εμφανίζεται φυσιολογικά κάτω από τη μεσοθηλιακή στιβάδα του σπλαχνικού, τοιχωματικού και διαφραγματικού περιτόναιου. Εξαίρεση αποτελεί το μείζον επίπλουν ποντικών και ανθρώπων, στο μεσοθήλιο των οποίων λείπει η βασική μεμβράνη, χωρίς να υπάρχει ερμηνεία έως σήμερα (3). Κάτω από τη βασική μεμβράνη υπάρχει στρώμα από πολύ λεπτά ινίδια συνδετικού ιστού.

Ο διάμεσος συνδετικός ιστός αποτελείται από παχιές, ποικιλότροπα, διατεταγμένες, δέσμες κολλαγόνων ινών που επικάθονται σε άμορφη ουσία από βλεννοπολυσακχαρίτες με υαλουρονικό οξύ και χονδροϊτίνη. Χωρίζεται από το μεσοθήλιο με λεπτή δέσμη ελαστικού ιστού. Στο διάμεσο ιστό υπάρχουν άφθονοι ινοβλάστες και μακροφάγα κύτταρα, τα οποία συχνότερα βρίσκονται κοντά σε τριχοειδικό δίκτυο από τριχοειδή διαμέτρου 3- 10 μm (1).

Τα αιμοφόρα αγγεία – Τριχοειδική κυκλοφορία

Το δίκτυο των τριχοειδών του περιτοναίου έχει τη μεγαλύτερη σημασία για τη διακίνηση ουσιών και νερού κατά την περιτοναϊκή κάθαρση. Η ακριβής αιματική ροή στα τριχοειδή του περιτοναίου, που συμμετέχουν στην ανταλλαγή ουσιών κατά την περιτοναϊκή κάθαρση, δεν είναι γνωστή. Η ολική σπλαχνική ροή αίματος, σε ενήλικα φθάνει τα 1200 ml/min. Το μεγαλύτερο μήκος της αιματικής ροής αφορά την αιμάτωση των σπλάγχων και όχι τα μικρά αγγεία του περιτοναίου. Έμμεσα έχει προσδιοριστεί η αιματική ροή στα τριχοειδή και είναι περίπου 60-100 ml/min.

Τα τριχοειδή αποτελούνται από στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων εσωτερικά και από τη βασική μεμβράνη. Το ενδοθήλιο των τριχοειδών παρουσιάζει διάφορες μορφές κατά περιοχές. Οι τρεις πιο χαρακτηριστικές μορφές στην περιτοναϊκή μεμβράνη είναι: το συνεχές ενδοθήλιο, το ενδοθήλιο με πόρους και το διακεκομμένο ενδοθήλιο. Τα περισσότερα τριχοειδή του περιτοναίου έχουν συνεχές ενδοθήλιο παρόμοιο με αυτό των αρτηριολίων όπου υπάρχουν πινοκυττωτικά κυστίδια ή διακυτταρικά χάσματα. Τα πινοκυττωτικά κυστίδια υπάρχουν στην αυλική και στη βασική επιφάνεια, αλλά και μέσα στα κύτταρα και παίζουν ρόλο στη διακίνηση ουσιών.

Το πορώδες ενδοθήλιο βρίσκεται στις εντερικές λάχνες και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη θυρίδων, που είναι πόροι διαμέτρου περίπου 50 μ. Τα αντίστοιχα φλεβικά τριχοειδή έχουν περισσότερες θυρίδες. Η διακίνηση των ουσιών γίνεται μέσω πόρων, κυρίως σε αυτόν τον τύπο του ενδοθηλίου, παρά μέσω των διακυτταρικών χασμάτων.

Το διακεκομμένο ενδοθήλιο βρίσκεται στην περιοχή του ήπατος και του σπληνός και είναι άγνωστη η συμμετοχή του στη διακίνηση ουσιών κατά την περιτοναϊκή κάθαρση.

Τα μετατριχοειδικά φλεβίδια έχουν παρόμοια ανατομική κατασκευή με τα τριχοειδή. Τα τελικά αρτηριόλια έχουν διακεκομμένο μυϊκό χιτώνα κατά περιοχές και μικροπινοκυττωτικά κυστίδια και φαίνεται ότι συμμετέχουν στη διακίνηση ουσιών κατά την περιτοναϊκή κάθαρση (1).

Τα λεμφικά αγγεία – Λεμφική κυκλοφορία

Η περιτοναϊκή κοιλότητα διαθέτει εκτεταμένο λεμφικό σύστημα, το οποίο συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης των ουσιών και του νερού στο διάμεσο ιστό. Τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού περιτοναίου (μεσεντέριο, επίπλουν), εκβάλλουν σε πολύπλοκο πλέγμα σπλαχνικών λεμφαδένων, από όπου η λέμφος απάγεται προς τους λεμφαδένες του τοιχωματικού περιτοναίου, για να επιστρέψει τελικά στη συστηματική κυκλοφορία, μέσω του θωρακικού πόρου.

Ειδικότερα, τα λεμφαγγεία του διαφράγματος σχηματίζουν δύο πλέγματα, στην περιτοναϊκή και την υπεζωκοτική επιφάνεια, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα λεμφαγγεία αυτά βρίσκονται κάτω από το περιτόναιο με πορεία παράλληλη με τις μυϊκές ίνες. Εγκαταλείποντας το διάφραγμα, η λέμφος εισέρχεται σε μεγάλους αθροιστικούς πόρους, οι οποίοι συνοδευόμενοι από τα έσω μαστικά αγγεία εκατέρωθεν του στέρνου, καταλήγουν στους λεμφαδένες του πρόσθιου ημιθωρακίου,

στο ύψος του θύμου. Από το σημείο αυτό η λέμφος απάγεται προς το δεξιό λεμφικό πόρο.

Ο θωρακικός πόρος φαίνεται να έχει μικρό ρόλο στη λεμφική απαγωγή της περιτοναϊκής κοιλότητας, σε αντίθεση με την παραπάνω οπισθοστερνική οδό, η οποία αποτελεί τη βασική οδό με απαγωγή 80% της περιτοναϊκής λεμφικής ροής. Επίσης μερικά από τα λεμφαγγεία του διαφράγματος εκβάλλουν στους βρογχικούς λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, ενώ άλλα εκβάλλουν είτε απευθείας στο θωρακικό πόρο, είτε σε λεμφαδένες του οπισθοπεριτοναϊκού λίπους ή του μεσεντερίου και στη συνέχεια στη χυλοφόρο δεξαμενή.

Εκτός από τις επικοινωνίες αυτές, οι λεμφικές οδοί έχουν πλήθος τελικών καναλιών και σχισμών που αναστομώνονται μεταξύ τους και βρίσκονται αμέσως κάτω από το μεσοθηλιακό στρώμα της περιτοναϊκής επιφάνειας του διαφράγματος. O von Recklinghausen περιέγραψε πρώτος την παρουσία ειδικών ανοιγμάτων (stomata) του περιτοναίου (η ύπαρξη των οποίων επιβεβαιώθηκε με το σαρωτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο), που ανοίγουν όταν εξισώνονται οι πιέσεις εκατέρωθεν του διαφράγματος. Η επιφάνεια των στομάτων αποτελείται από μονό στρώμα μεσοθηλιακών κυττάρων, μεταξύ των οποίων παρατηρούνται επίσης χάσματα, που αντιστοιχούν στο έδαφος των λεμφικών σχισμών. Τα χάσματα και τα στόματα απαντούν μεταξύ των πλαγίων επιφανειών των μεσοθηλιακών κυττάρων, ενώ κατά μήκος των στομάτων με την ένωση των μεσοθηλιακών κυττάρων και ενδοθηλιακών σχηματίζονται κανάλια, τα οποία οδηγούν από την περιτοναϊκή κοιλότητα στον αυλό των λεμφικών σχισμών. Από διάφορες παρατηρήσεις προκύπτει ότι τα στόματα πληθαίνουν όταν το διάφραγμα υφίσταται χάλαση, ή όταν αυξάνει η ενδοπεριτοναϊκή πίεση, ενώ ελαττώνονται σε σύσπαση του διαφράγματος.

Το στρώμα των μεσοθηλιακών κυττάρων χωρίζεται από τα υποκείμενα λεμφικά αγγεία με λεπτή ομοιογενή βασική μεμβράνη, η οποία παρουσιάζει πόρους. Ο υπομεσοθηλιακός συνδετικός ιστός διακόπτεται επίσης στα σημεία των στομάτων, με την κατασκευή του να προσαρμόζεται στο σχηματισμό των καναλιών (1).

Περιτοναϊκό υγρό

Είναι στην ουσία μία υγρή επίστρωση που καλύπτει το περιτόναιο σαν λεπτό φιλμ (5 μm) που δεν ξεπερνά τα 50 ml. Το περιτοναϊκό υγρό περιέχει νερό, ηλεκτρολύτες και άλλες ουσίες που προέρχονται από το διάμεσο υγρό των γειτονικών οργάνων και από το πλάσμα του αίματος. Ακόμη βρεθήκαν σε αυτό πρωτεΐνες και κύτταρα που ο τύπος, το ποσό και η αναλογία τους ποικίλλει από φυσιολογικά μέχρι και παθολογικά επίπεδα. Τα κύτταρα που βρίσκονται είναι φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα που αποφολλιδώνονται από το περιτόναιο, μακροφάγα, βασεόφιλα, ινοβλάστες, λεμφοκύτταρα και μερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα ανήκουν σε δύο ανοσοποιητικά συστήματα, το κυτταρικό και το χυμικό και τα μακροφάγα έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύσουν ελεύθερα μέσα από την περιτοναϊκή μεμβράνη και έτσι, όταν χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά στοιχείο, μπορεί να μεταφερθεί οπουδήποτε μέσα στον οργανισμό. Η υγρή αυτή περιτοναϊκή επίστρωση είναι αναπόσπαστο μέρος της ανατομίας του περιτοναίου και της περιτοναϊκής κοιλότητας. Επιτρέπει στα σπλάχνα να παραμένουν κινητά, παράγοντας λιπαντική ουσία, έτσι ώστε να αποφεύγονται οι συμφύσεις (1).

ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εισαγωγή

Το μεσοθήλιο προέρχεται από το μεσόδερμα και αναπτύσσεται μεταξύ της 8^{ης} και 18^{ης} μέρας κύησης, ανάλογα με το είδος. Στους ανθρώπους εμφανίζεται γύρω στην 14^η μέρα, με τα κύτταρα να διαφοροποιούνται σταδιακά από στρογγυλά και κυβοειδή σε επιμήκη επιπλατυσμένα, ώστε να οριοθετούν τις κοιλότητες (4).

Το μεσοθήλιο εκτείνεται ως μία μονοστοιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων γύρω από ολόκληρη την επιφάνεια των τριών ορογόνων κοιλοτήτων (περιτόναιο, υπεζωκότας και περικάρδιο). Το μεσοθήλιο που καλύπτει τα εσωτερικά όργανα ονομάζεται σπλαγχνικό, ενώ το τοιχωματικό εδρεύει στο τοίχωμα. Μορφολογικές και ιστοχημικές μελέτες συνάδουν ότι το μεσοθήλιο των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων αρουραίων, ποντικών, ινδικών χοιριδίων, σκύλων, κουνελιών, αλόγων, προβάτων και ανθρώπων ομοιάζει με ελάχιστες εξαιρέσεις (5-7).

Διακρίνονται δύο τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων. Τα επίπεδα και επιμήκη των οποίων το κυτταρόπλασμα εκτείνεται γύρω από έναν κεντρικό στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα και αντιπροσωπεύουν τον κύριο κυτταρικό τύπο του μεσοθηλίου. Τα κυβοειδή, πολυγωνικά μεσοθηλιακά κύτταρα παρατηρούνται σε περιοχές, όπως το διαφραγματικό περιτόναιο και το μείζον επίπλουν και μοιάζουν μορφολογικά σε κύτταρα που εμφανίζονται ύστερα από τραυματισμό ή διέγερση των ορογόνων επιφανειών (4).

Υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα επιμήκη και τα κυβοειδή κύτταρα. Ο πυρήνας στα κυβοειδή είναι μεγαλύτερος και περιέχει κάτι σαν πυρηνίσκο, έχει άφθονα μιτοχόνδρια και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER), μία καλά αναπτυγμένη συσκευή Golgi, μικροσωληνίσκους και συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό μιροϊνιδίων, προσδίνοντας έτσι μεγαλύτερο μεταβολικά ενεργό δυναμικό (4, 8).

Σε πρόσφατες μελέτες έχουν βρεθεί και ενδιάμεσοι τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων. Το στοιχείο αυτό έρχεται να συγκλίνει με την άποψη ότι τα αρχικά μεσοθηλιακά κύτταρα είναι επίπεδα και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε κυβοειδή μέσω των ενδιάμεσων μορφών και έτσι γίνονται μεταβολικά ενεργά (9).

Οργανίδια των περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων

Μικρολάχνες

Οι μικρολάχνες απαντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα στο σπλαχνικό από το τοιχωματικό περιτόναιο, η κατανομή τους ποικίλλει και κυμαίνεται από άφθονα έως τελείως απόντα. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι μικρολάχνες είναι οργανίδια ιδιαίτερος ευαίσθητα σε τραυματισμούς και στην ξηρότητα. Από την άλλη, η μείωση του αριθμού τους, όπως συμβαίνει σε ασθενείς σε συνεχή περιτοναϊκή κάθαρση είναι ένα πρώτο σημάδι επικείμενης απόπτωσης.

Στην κατηγορία των τροφτικών, οι μικρολάχνες εμφανίζονται με μήκος 0,42 ως 2,7 μm και μέση διάμετρο 0,1 μm . Παρόμοιες μετρήσεις βρέθηκαν για τους ενήλικες ανθρώπους. Σε ανθρώπινα έμβρυα (5^{ης}-7^{ης} εβδομάδας κύησης) οι μικρολάχνες φτάνουν σε μήκος μέχρι και 3,5 μm .

Εκτιμάται ότι οι μικρολάχνες αυξάνουν την επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου κατά 20 φορές. Κατά συνέπεια θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι οι μικρολάχνες αυξάνουν τη συνολική επιφάνεια του περιτοναίου σε 40 m^2 (3).

Κυστίδια

Τα κυστίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι σαφώς παρόντα στα μεσοθηλιακά κύτταρα, τόσο στη βασική, όσο και στην κορυφαία πλευρά, καθώς επίσης κοντά στον πυρήνα. Έχουν κατά μέσο όρο διάμετρο περίπου 0,717 μm .

Σε μερικές περιπτώσεις τα πινοκυτταρικά κυστίδια εμφανίζονται ομαδοποιημένα και να επικοινωνούν μεταξύ τους. Μπορούν επίσης να σχηματίζουν διακυτταρικούς διαύλους που επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ των δύο πλευρών, παρόμοιους με αυτούς που έχουν αναφερθεί για τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα τριχοειδή των αγγείων. Αυτοί οι διάυλοι μπορούν να αποτελούνται από μία αλυσίδα μερικών τέτοιων κυστιδίων ή από δύο μόνο γειτνιάζοντα κυστίδια.

Συχνά τα κυστίδια αυτά φαίνονται να ανοίγουν χώρο στην κορυφαία ή βασική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά ταυτόχρονα και στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των κυττάρων. Τα ανοίγματα αυτά έχουν μέση διάμετρο αντίστοιχα 0,176 και 0,028 μm . Το τοιχωματικό περιτόναιο έχει λιγότερα κυστίδια από το σπλαχνικό (3).

Στόματα

Τα στόματα προσδιορίζουν διαμεσοθηλιακά ανοίγματα που επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ της κοιλιακής κοιλότητας και των λεμφαγγείων που βρίσκονται στην υπομεσοθηλιακή διαφραγματική περιοχή. Το μονοπάτι αυτό άνοιξε το δρόμο για μεταγγίσεις αίματος μέσω του περιτοναίου, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε έμβρυα, ενήλικες ανθρώπους, αρουραίους, ποντίκια, σκύλους και αρνιά. Παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανέδειξαν ότι τα ανοίγματα αυτά έχουν μέση διάμετρο μεταξύ 4 και 12 μm και περιβάλλονται από κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα.

Η παρουσία των στομάτων έχει πρόσφατα ανιχνευτεί στο μεσοθήλιο ποντικίου που καλύπτει το μεσεντέριο, το μείζον επίπλου την άνω επιφάνεια του ήπατος και το ανώτερο κοιλιακό τοίχωμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα αυτά τα ανοίγματα συμβάλλουν στη συνολική απορροφητική ικανότητα του περιτοναίου.

Στα στόματα αποδίδεται η οδός που προτιμάται για να επιτευχθεί η απομάκρυνση υγρών, κυττάρων, σωματιδίων και βακτηρίων από την κοιλιακή κοιλότητα. Είναι

πολύ πιθανό ότι το πέρασμα αυτό μέσω των στομάτων να εξαρτάται όχι μόνο από το μοριακό βάρος, το μέγεθος και το σχήμα, αλλά και από το ηλεκτρικό φορτίο. Στα στόματα τέλος αποδίδεται και η επικοινωνία μεταξύ περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας (3).

Πυρήνες

Οι πυρήνες των μεσοθηλιακών κυττάρων βρίσκονται κεντρικά μέσα στο κύτταρο και μπορεί να είναι επιμήκεις, ωοειδείς, ή σε σχήμα νεφρού. Περιστασιακά εμφανίζονται ανωμαλίες στο περίγραμμά τους και μερικές φορές προεξοχές. Η χρωματίνη είναι λεπτή και κατανέμεται ομοιόμορφα σχηματίζοντας ένα πυκνό δίκτυο γύρω από την πυρηνική μεμβράνη. Στο φυσιολογικό περιτόναιο 2% των κυττάρων είναι διπύρηνια. Οι πυρηνίσκοι είναι από 6-8 σε αριθμό, αν και υπήρχαν μελέτες για έλλειψη αυτών (3).

Λοιπά οργανίδια

Αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και ριβοσώματα είναι διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα. Μιτοχόνδρια και σύμπλεγμα Golgi βρίσκονται κυρίως σε περιοχές γύρω από τον πυρήνα. Βλεφαρίδες παρατηρούνται σπάνια, αλλά πιο συχνά στο τμήμα του μεσοθηλίου που καλύπτει τον σπλήνα και η λειτουργική τους σημασία δεν είναι ακόμη γνωστή (3).

Κυτταρικές συνδέσεις

1) σφιχτές συνδέσεις: είναι σημαντικές για την ανάπτυξη της πολικότητας της επιφάνειας καθώς και για την εδραίωση και διατήρηση του βιολογικού φραγμού, β) συνδέσεις προσκόλλησης: δημιουργούν το δομικό υπόβαθρο για την προσκόλληση της κυτταρικής στοιβάδας, και γ) χασμοσυνδέσεις: υδατικά μεσοκυττάρια κανάλια (4).

Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων

Αν και παλιότερα επικρατούσε η άποψη ότι επρόκειτο για έναν απλοϊκό ιστό με μοναδική λειτουργία να προσδίδει μία ολισθηρή, μη κολλώδης και προστατευτική επιφάνεια που να διευκολύνει την κίνηση των οργάνων στην κοιλιακή χώρα, νεότερες μελέτες αναγνωρίζουν το μεσοθήλιο ως μία δυναμική κυτταρική μεμβράνη με πολλές και σημαντικές λειτουργίες (4, 10, 11)

Προστατευτικός φραγμός

Το μεσοθήλιο συνιστά ένα προστατευτικό φραγμό κατά των τραυματισμών και της δυνητικής εισβολής μικροοργανισμών. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω των σφιχτών συνδέσεων και εκκρίνουν στην επιφάνειά τους γλυκοζαμίνες, κυρίως υαλουρονικό οξύ, το οποίο συναθροίζεται παρακυτταρικά 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 με το να εμποδίζει τον σχηματισμό συμφύσεων και τη διασπορά καρκινικών κυττάρων (12-14)

Παρουσίαση αντιγόνου

Η αντιγονική παρουσία και η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι τα πρώτα βήματα για την παραγωγή ανοσολογικής απάντησης. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου του ανθρώπου, όταν διεγείρονται από ιντερφερόνη γ (INF- γ) επάγουν τον πολλαπλασιασμό των CD4+ βοηθητικών T 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. Υπό την παρουσία INF- γ , τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-15 (IL-15), μια πλειοτροπική κυτταροκίνη, η οποία πιθανόν να συνεργάζεται με την ιντερλευκίνη-2 (IL-2) στο έναυσμα της ανοσολογικής απόκρισης (14, 15).

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 στις θέσεις που τραυματίζεται το μεσοθήλιο ευνοείται η προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων, πιθανότατα λόγω της σύνδεσής τους στο επίστρωμα υαλουρονικού οξέος των μεσοθηλιακών κυττάρων (16). Ωστόσο πειραματικά έχει αποδειχτεί ότι το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ προερχόμενο από την καλλιέργεια μεσοθηλιακών κυττάρων απέτρεψε την προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων σε αυτά, πιθανότατα λόγω της σύνδεσής του με τα μόρια CD44 (17).

Μεταφορά διαλυτών και κυττάρων

Το μεσοθήλιο εμπλέκεται ενεργά στη διακίνηση και μεταφορά υγρού και κυττάρων στις ορογόνες κοιλότητες διαμέσου της ενεργητικής μεταφοράς ηλεκτρολυτών, των πινοκυτταρικών κυστιδίων, των ενδοκυτταρικών συνδέσμων και των στομάτων (18-21).

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 πήξεως, κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων, προσταγλανδινών, ανιοξειδωτικών ενζύμων και μορίων του εξωκυττάρου στρώματος (4, 8). Η ρύθμιση των παραγόντων αυτών είναι μείζονος σημασίας για τραύματα που δημιουργούνται έπειτα από χειρουργική επέμβαση, μόλυνση ή κατά την περιτοναϊκή κάθαρση. Η ισορροπία των παραγόντων αυτών οδηγεί στην αναγέννηση του ιστού και διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας. Σε αντίθετη περίπτωση παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα, οίδημα, σχηματισμός

εξιδρωμάτων πλούσιων σε πρωτεΐνη, και τελικά σχηματισμός συμφύσεων και ίνωση (14, 22).

Πήξη και ινωδολύση

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εναπόθεση και διάσπαση της 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 ορογόνων μεμβρανών (8).

Σύνθεση κολλαγόνου

Σε καλλιέργειες τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν κολλαγόνο τύπου I,II και IV, ελαστίνη, φμπρονεκτίνη και λαμινίνη, καθώς και να εκφράζουν ενδιάμεσα ινίδια τυπικά για επιθηλιακά κύτταρα και ινιβλάστες (23).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

Το περιτόναιο ως διηθητικό όργανο

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το περιτόναιο έχει αποδειχτεί ότι δρα ως διηθητικό όργανο, επιτρέποντας τη διακίνηση νερού, ηλεκτρολυτών, οξυγόνου και διαφόρων άλλων ουσιών. Ήδη από το 1984 οι Simon M. and Piestrzynska T. χαρακτήρισαν το περιτόναιο με τον όρο "leaky", ως μια στιβάδα δηλαδή με σφιχτές συνδέσεις και πλευρικά κενά (24). Η ικανότητά του αυτή έχει άμεση σχέση με την ιδιαίτερη ανατομική κατασκευή του σε ότι αφορά την έκταση της επιφανείας του, τη σύσταση του διαμέσου ιστού, την αιμάτωσή του και το σύστημα λεμφικής παροχέτευσης.

Επιφάνεια περιτοναίου

Η συνολική επιφάνεια του τοιχωματικού και περισπλάχνιου πετάλου της περιτοναϊκής μεμβράνης είναι περίπου ίση με την εξωτερική επιφάνεια του σώματος, δηλαδή περίπου 1,5-2 m². Οι μικρολάχνες των μεσοθηλιακών κυττάρων αυξάνουν την επιφάνεια μέχρι και τα 40 m².

Διάμεσος ιστός

Ο διάμεσος ιστός, όπως και σε κάθε άλλο όργανο, συνιστάται από δέσμες ινών κολλαγόνου και ινιδίων πρωτεογλυκάνης σε μορφή γέλης. Τα ινίδια της πρωτεογλυκάνης σχηματίζουν ένα λεπτό δικτυωτό σχηματισμό που γεμίζει όλους τους χώρους μεταξύ των ινών κολλαγόνου. Στους ελάχιστους σχισμοειδείς χώρους μεταξύ των μικροινιδίων εγκλωβίζεται το διάμεσο υγρό. Το υγρό αυτό δεν είναι στατικό και επιτρέπει τη μεταφορά με διάχυση ή παθητικά, μορίων ηλεκτρολυτών, οξυγόνου, CO, θρεπτικών ουσιών κ.ά.

Τριχοειδική ροή αίματος

Το αίμα των τριχοειδών του περιτοναίου αποτελεί την κύρια πηγή ουσιών που διακινούνται κατά τη λειτουργία του ως διηθητικού οργάνου.

Η απόλυτη τιμή του αίματος που δέχονται τα περιτοναϊκά τριχοειδή είναι άγνωστη. Υπολογίζεται ότι η συνολική αιμάτωση των σπλάχνων πρέπει να ξεπερνά τα 1200 ml/λεπτό, μικρό όμως ποσοστό αυτής της ποσότητας κατευθύνεται προς τα μικρά αγγεία του περιτοναίου. Η ροή του αίματος στα τριχοειδή του περιτοναίου υπολογίζεται στα 60-70 ml/λεπτό. Ακόμη φαίνεται ότι δε συμμετέχει όλο το δίκτυο των περιτοναϊκών τριχοειδών στη διηθητική λειτουργία του περιτοναίου. Μόνο μέρος αυτών και κυρίως αυτά που βρίσκονται κοντά στα μεσοθηλιακά κύτταρα της ελεύθερης επιφάνειας, συμμετέχουν στη διηθητική διαδικασία.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των περιτοναϊκών τριχοειδών σχηματίζουν συνεχές στρώμα που επικάθεται στη βασική μεμβράνη. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί το ενδοθήλιο να είναι θυριδωτό.

Ιδιαίτερη πρακτική αξία για τη διηθητική λειτουργία του περιτοναίου αποκτά το γεγονός ότι το αίμα του τοιχωματικού περιτοναίου απάγεται στο σύστημα της κάτω κοίλης, ενώ του υπόλοιπου στο σύστημα της πυλαίας φλέβας.

Η ροή του αίματος στα τριχοειδή του περιτοναίου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Εκείνοι που στην καθημερινή πράξη έχουν ιδιαίτερη σημασία είναι η θερμοκρασία, η ύπαρξη ξένου σώματος, η φλεγμονή και η σωματική άσκηση.

Λεμφική ροή

Η παροχέτευση της λέμφου από την περιτοναϊκή κοιλότητα γίνεται κατά κύριο λόγο από εξειδικευμένα λεμφικά στόματα που βρίσκονται στην υποδιαφραγματική μοίρα του περιτοναίου. Τα λεμφικά αγγεία της περιτοναϊκής κοιλότητας λειτουργούν σαν σύστημα μονόδρομου για την επαναφορά της περίσσειας περιτοναϊκού υγρού και λευκώματος στη συστηματική κυκλοφορία.

Τα λεμφαγγεία που παροχετεύουν τον εντερικό βλεννογόνο, αν και διασχίζουν το μεσεντέριο, δε συμβάλλουν παρά σε μικρό ποσοστό στην απορρόφηση του υγρού της περιτοναϊκής κοιλότητας.

Τα λεμφαγγεία συμβάλλουν επίσης στους αμυντικούς μηχανισμούς της περιτοναϊκής κοιλότητας (25).

Τριχοειδική μεταφορά ουσιών

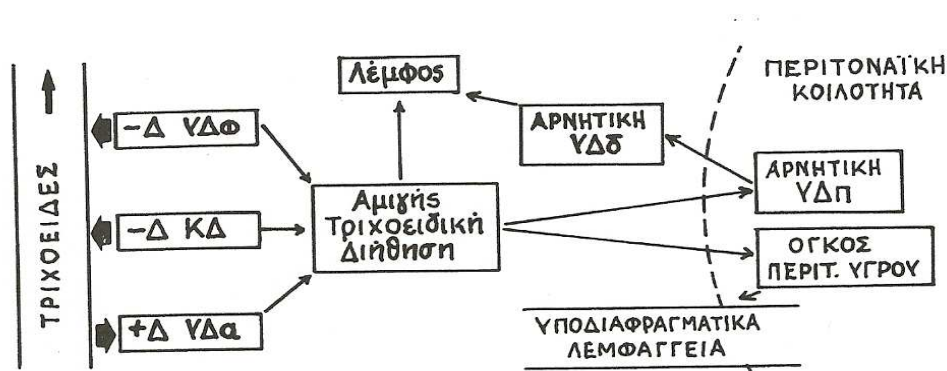
Τα τριχοειδή που συμμετέχουν στη διακίνηση ουσιών μπορούν να διακριθούν στα εγγύς, δηλαδή εκείνα που βρίσκονται στις περιοχές που το μεσεντέριο και τα μεγάλα εντερικά αγγεία ανακάμπουν προς τις αγκύλες του εντέρου και τα άπω, που εντοπίζονται στην ελεύθερη επιφάνεια των εντερικών ελίκων. Τα άπω είναι μικρότερης διαμέτρου (<10μ) και συμβάλλουν κατά κύριο λόγο στη διάχυση ουσιών και είναι υψηλής διαβατότητας, ενώ τα εγγύς έχουν κυρίως σχέση με την υπερδιήθηση και έχουν μικρότερη διαβατότητα στις διαλυτές ουσίες (25).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά ουσιών

Όπως και σε κάθε άλλο δίκτυο τριχοειδών, έτσι και στα τριχοειδή του περιτοναίου, τέσσερις κύριες δυνάμεις καθορίζουν την κίνηση του υγρού. Αυτές είναι η ενδοαυλική υδροστατική πίεση, η κολλοειδωσμοτική πίεση του πλάσματος, η υδροστατική πίεση στο διάμεσο ιστό, και τέλος η κολλοειδωσμοτική πίεση του διάμεσου υγρού.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ενδοαυλική υδροστατική πίεση στα τριχοειδή της περιτοναϊκής μεμβράνης, είναι ασφαλώς μεγαλύτερη της κολλοειδωσμοτικής του πλάσματος. Έτσι δημιουργείται μια καθαρή οδηγός πίεση που προκαλεί συνεχή διαφυγή του διηθήματος εκτός τριχοειδών (Σχήμα 2). Αυτό αποτελεί το ελεύθερο διάμεσο υγρό και περιέχει ηλεκτρολύτες, άλλες διαλυτές ουσίες και πρωτεΐνες.

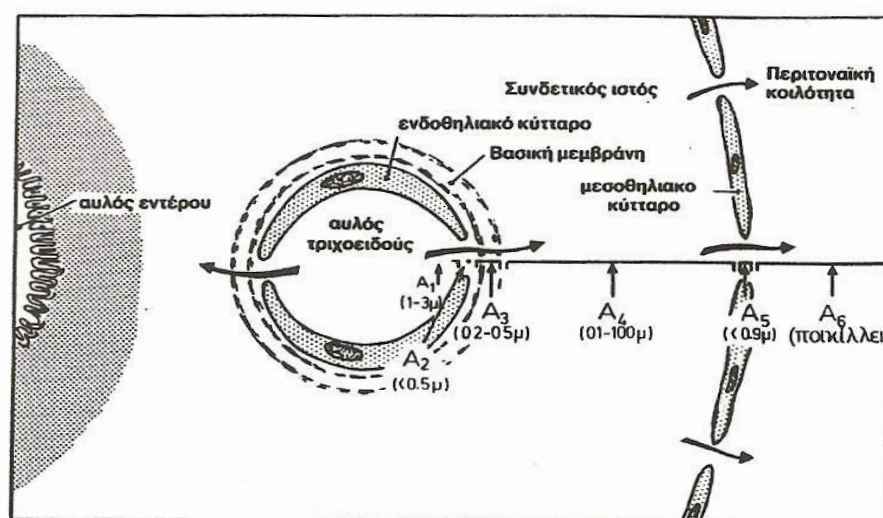
Μέρος αυτού απάγεται σαν λέμφος. Το μεγαλύτερο μέρος του διάμεσου υγρού, αλλά χωρίς τις πρωτεΐνες του παλιρροφάται στο άπω άκρο του τριχοειδούς και στα φλεβίδια. Τέλος, μικρά ποσά εισέρχονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα συμβάλλοντας στη λίπανση της επιφάνειας του μεσοθηλίου. Ο όγκος του υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα διατηρείται σταθερά μικρός επειδή το υγρό απάγεται από τα υποδιαφραγματικά λεμφικά αγγεία (25).



Σχήμα 2 Αλληλεπιδράσεις παραγόντων που συμβάλλουν στην τριχοειδική διήθηση (ΥΔα: Υδροστατική πίεση αρτηριακού άκρου τριχοειδούς, ΥΔφ: Υδροστατική πίεση φλεβιακού άκρου τριχοειδούς, ΚΔ: Κολλοειδωσμοτική πίεση, ΥΔπ: Υδροστατική πίεση περιτοναϊκής κοιλότητας, ΥΔδ: Υδροστατική πίεση διάμεσου ιστού

Στη λειτουργία της περιτοναϊκής μεμβράνης ως διηθητικό όργανο παρεμβάλλονται πολλαπλά σημεία αντίστασης στη διακίνηση υγρού ή διαλυτών ουσιών, που σχηματίστηκαν από τον Nolph et al (26). Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, πρόκειται για 6 σημεία που καθορίζονται ως Α1 έως και Α6. Το Α1 αντιπροσωπεύει τη στοιβάδα του αίματος μειωμένης ροής που συνέχεια με το ενδοθήλιο του τριχοειδούς, ενώ το δεύτερο σημείο (Α2) είναι το ενδοθήλιο και το τρίτο (Α3) είναι η βασική μεμβράνη του. Ο παρεμβαλλόμενος διάμεσος ιστός (Α4) αποτελεί μείζονος σημασίας παράγοντα στη διηθητική λειτουργία του περιτοναίου. Το στρώμα των

μεσοθηλιακών κυττάρων (A5) αποτελεί το επόμενο σημείο αντίστασης, ενώ η στοιβάδα μη διακινούμενου περιτοναϊκού υγρού, που επαλείφει τα μεσοθηλιακά κύτταρα (A6) αποτελεί το τελευταίο εμπόδιο. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αντίσταση που δημιουργούν οι ελάχιστα ή μη διακινούμενες στοιβάδες υγρού στα σημεία A1 και A6 (25).



Σχήμα 3 Σημεία αντίστασης (A) της περιτοναϊκής μεμβράνης διήθησης στη διακίνηση υγρού και διαλυτών ουσιών.

Μηχανισμοί μεταφοράς

Η διακίνηση των ουσιών από την περιτοναϊκή μεμβράνη γίνεται με διάχυση ή με παθητική μεταφορά μάζας, καθώς και με πινοκύττωση.

1. Διάχυση

Η μεταφορά των μικρομοριακών ουσιών γίνεται κατά κύριο λόγο με διάχυση. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά συγκέντρωσης της ουσίας, τόσο και το καθαρό ποσοστό διάχυσής της είναι μεγαλύτερο. Όσο μικρότερη είναι η τετραγωνική ρίζα

του μοριακού βάρους της ουσίας, τόσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής διάχυσης της διαμέσου της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Ουσίες όπως το O_2 , το CO_2 , η αλκοόλη και τα λιπαρά οξέα που είναι υδατο- και λιποδιαλυτές ουσίες, μπορούν και διαχέονται από το λιποειδικό τμήμα των βιολογικών μεμβρανών. Ο βαθμός μεταφοράς τους από την περιτοναϊκή μεμβράνη είναι περίπου διπλάσιος εκείνης του νερού.

Το νερό και οι υδατοδιαλυτές ουσίες διέρχονται μέσα από όχι καλά διευκρινισμένες παρακυτταρικές οδούς ή/ και παρακυτταρικά ανοίγματα (χάσματα). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν πόρους, η διακίνηση ουσιών γίνεται κυρίως μέσω των πόρων. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός «μικρών» παρακυτταρικών πόρων ακτίνας 40-55 Å και ένας μικρός αριθμός «ευρέων» πόρων ακτίνας 200-300 Å. Ουσίες με ακτίνα μορίου μικρότερη των 25 Å διέρχονται την περιτοναϊκή μεμβράνη με διάχυση δια των μικρών πόρων, ενώ διαλυτές ουσίες με ακτίνα πάνω από 40 Å περνούν προς την περιτοναϊκή κοιλότητα σχεδόν αποκλειστικά και μονοδρομικά μέσα από τους ευρείς πόρους. Το νερό φαίνεται να μεταφέρεται με διακυτταρικούς «μικροπόρους» ακτίνας μικρότερης των 8 Å. Μόρια ακτίνας μεγαλύτερης των 25-30 Å (μοριακού βάρους περίπου 25000) φαίνεται ότι απορροφώνται από την περιτοναϊκή κοιλότητα, αποκλειστικά και ανεξάρτητα από το μέγεθός τους με τη λεμφική κυκλοφορία.

Σημαντικό ρόλο στη διάχυση παίζουν τα ηλεκτρικά φορτία. Υπάρχει αφθονία αρνητικών φορτίων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών και μεσοθηλιακών κυττάρων, καθώς και στο διάμεσο ιστό. Αντίστοιχα, ηλεκτρικό φορτίο έχουν και οι διακινούμενες ουσίες. Οι αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρικών φορτίων επηρεάζουν ευνοϊκά ή αρνητικά τη δυνατότητα διέλευσής τους από τις διακυτταρικές ή μεσοκυττάρια οδούς.

2. Πινοκύττωση

Η πρόσληψη και μεταφορά ουσιών με τα μικροπινοκυττωσικά κυστίδια των μεσοθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μεταφοράς κυρίως μεγαλομοριακών ουσιών. Έτσι μικρά ποσά πρωτεϊνών του πλάσματος μπορεί να διαφεύγουν από τα φλεβίδια προς την περιτοναϊκή κοιλότητα. Πάντως, δεν έχει επιβεβαιωθεί εάν οι μεγαλομοριακές ουσίες μπορούν να επιστρέψουν στη συστηματική κυκλοφορία δια του περιτοναίου.

3. Παθητική μεταφορά ουσιών

Η παθητική μεταφορά ουσιών είναι σημαντικός μηχανισμός διακίνησης κατά την εφαρμογή της περιτοναϊκής κάθαρσης με τη χρήση ωσμωτικής δρώντων παραγόντων και στηρίζεται στις δημιουργούμενες διαφορές υδροστατικής ή/και οσμωτικής πίεσης. Έτσι επιτυγχάνεται μεταφορά ύδατος ή μεγαλομοριακών ουσιών σε ρυθμούς πολύ μεγαλύτερους από αυτούς που θα μπορούσαν να επιτευχθούν με μόνο την απλή διάχυση. Ουσίες με μοριακά βάρη τόσο μεγάλα που είναι αδύνατο να κινηθούν δια των λειτουργικά δραστικών πόρων της διηθητικής μεμβράνης, οδηγούν στην ανάπτυξη οσμωτικής πίεσης. Αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μαζική μεταφορά ύδατος διά των πόρων (υπερδιήθηση – ultrafiltration).

Μαζί με τη διακίνηση ύδατος συµμεταφέρεται νάτριο, του οποίου όμως η συµπύκνωση στο υπερδιήθηµα είναι πολύ µικρότερη εκείνης του εξωκυττάρου χώρου. Αυτό υποδηλώνει ότι η µεµβράνη δρα σαν ηθµός. Αυτή η ειδική επίδραση της µεµβράνης (sieving) στη διακίνηση των ηλεκτρολυτών κατά την παθητική µεταφορά, µπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση των ελεύθερων ηλεκτρικών φορτίων των ηλεκτρολυτών και των επιφανειών των παρακυτταρικών πόρων και ανοιγµάτων ή της γέλης της διάµεσης ουσίας.

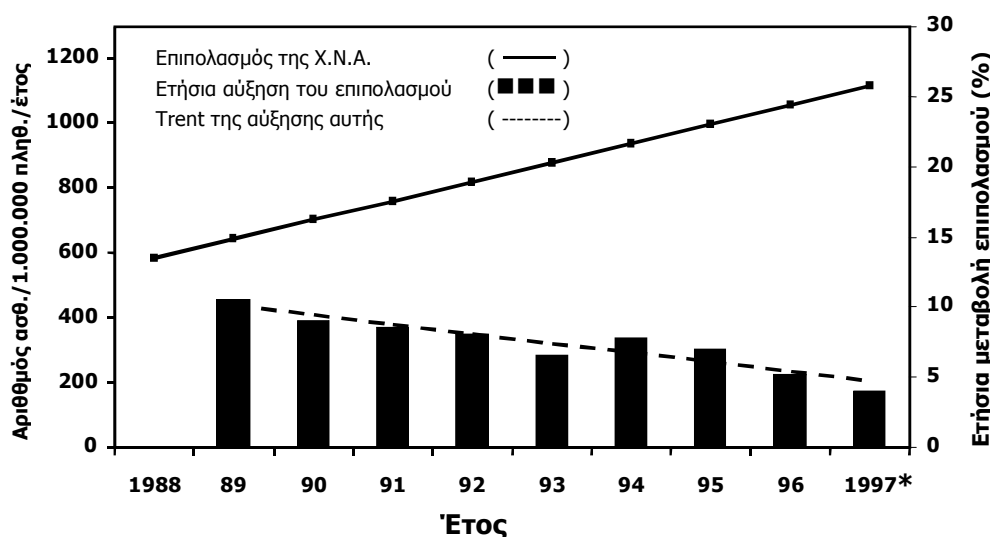
Ακόμη μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διακίνησης του ύδατος από πολύ μικρής διαμέτρου οδούς, όπως συμβαίνει στα εγγύς περιτοναϊκά τριχοειδή.

Η διάχυτη και η παθητική μεταφορά είναι δύο μηχανισμοί που δρουν ο ένας ανεξάρτητα από τον άλλο. Παρ' όλα αυτά, η ύπαρξη δραστικού ηθμού επί των ηλεκτρολυτών, κατά την υπερδιήθηση ύδατος, δημιουργεί διαφορές πυκνοτήτων για του ηλεκτρολύτες που επεκτείνουν την αμιγή μεταφορά τους με διάχυση. Αντίθετα, η διάχυση μπορεί να περιορίζει την υπερδιήθηση κυρίως με την απορρόφηση της γλυκόζης και τη μείωση της διαφοράς της οσμωτικής πίεσης (25).

ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Ορισμός – επιδημιολογικά στοιχεία

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η επακόλουθη παθολογική κατάσταση μιας προοδευτικής, και μη αναστρέψιμης καταστροφής νεφρώνων που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση όλων των απεκκριτικών (σπειραματικών, σωληναριακών) και των ενδοκρινικών λειτουργιών των νεφρών, η οποία αναπτύσσεται βαθμιαία σε χρονικό διάστημα μηνών ή ετών.



Εικόνα 4 Ο επιπολασμός της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου (Χ.Ν.Α.) από το 1988 μέχρι το 1997 στις Η.Π.Α.. Εκεί παρατηρήθηκε μια συνεχής αύξηση του επιπολασμού της νόσου από περίπου 600 ασθενείς/1.000.000 πληθυσμού το 1989 σε 1.100 ασθενείς/1.000.000 πληθυσμού το 1997.

Η τακτική κεντρικής καταγραφής των ασθενών με Χ.Ν.Α. τελικού σταδίου (δηλαδή ασθενών σε αιμοκάθαρση, σε περιτοναϊκή κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρού) που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια σε Ευρώπη (αρχείο E.D.T.A.) και Η.Π.Α. (αρχείο U.S.R.D.S.) επιτρέπει με σχετική ακρίβεια την επιδημιολογική ανάλυση της Χ.Ν.Α. Η ετήσια επίπτωση της νόσου ανέρχεται στις Η.Π.Α. στους 250

ασθενείς ανά 1.000.000 πληθυσμού και ο επιπολασμός περίπου στους 1100 ασθενείς ανά 1.000.000 πληθυσμού (Εικόνα 4).

Παρόλο που ο επιπολασμός στην Ευρώπη και στην Ελλάδα είναι σε σύγκριση μικρότερη από ότι στις Η.Π.Α. φαίνεται ότι και εδώ ο συνολικός αριθμός των αρρώστων με Χ.Ν.Α. τελικού σταδίου αυξάνεται συνεχώς. Αυτή η αύξηση οφείλεται αφενός στην καλύτερη ποιότητα των θεραπειών υποκατάστασης και τη μεταμόσχευση με συνέπεια την μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών και αφετέρου στην συχνή πλέον εφαρμογή τους και σε υπερήλικες (27).

Αιτιολογία

Κάθε πάθηση που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη καταστροφή νεφρικού παρεγχύματος προκαλεί χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Τα αίτια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι επομένως ποικίλα και συμπεριλαμβάνουν ομάδες παθήσεων όπως οι σπειραματοπάθειες, διάμεσες νεφροπάθειες, συστηματικές παθήσεις, παθήσεις των αγγείων, αποφρακτική ουροπάθεια και συγγενείς νεφροπάθειες. Η διαβητική νεφροπάθεια έχει εξελιχθεί στη συχνότερη αιτία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, που πριν από την εποχή της ινσουλίνης ήταν η σπειραματονεφρίτιδα. Υπάρχει επίσης μια σχετικά μεγάλη ομάδα ασθενών που δεν μπορούν να καταταγούν αιτιολογικά, επειδή έρχονται στο νοσοκομείο με προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια και ρικνούς νεφρούς, οπότε δεν υπάρχει τρόπος να καθορισθεί η πρωτοπαθής νόσος (27).

Παθογένεια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας

Ανεξάρτητα από την αιτιολογία της νεφρικής βλάβης φαίνεται ότι υπάρχει ένας κοινός παθογενετικός μηχανισμός για την προοδευτική εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας προς το τελικό στάδιο.

Σε προχωρημένα στάδια έχει αποδειχθεί ότι οι μορφολογικές αλλοιώσεις αφορούν εξίσου όλα τα τμήματα του νεφρώνα (σπείραμα και σωληνάριο), τα αγγεία και το διάμεσο ιστό. Η νεφρική βλάβη οδηγεί επομένως σε καταστροφή ολόκληρου του νεφρώνα και σε προοδευτική μείωση του αριθμού των λειτουργούντων νεφρώνων (θεωρία του άθικτου νεφρώνα του Bricker, 1969, «intact nephron hypothesis»).

Οι εναπομείναντες μορφολογικά και λειτουργικά άθικτοι νεφρώνες, λόγω του μειωμένου αριθμού τους, υπερδιηθούνται αντιρροπιστικά. Είναι επίσης γνωστό ότι η υπερδιήθηση επιτείνεται από την αρτηριακή υπέρταση, που σχεδόν πάντα συνοδεύει τη νεφρική πάθηση, και από υπερβολική πρόσληψη λευκωμάτων. Η αντιρροπιστική υπερδιήθηση συνδέεται με αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης και διήθηση πρωτεϊνών προς την κάψα του Baumann και το μεσάγγειο. Βαθμιαία προκαλείται υπερτροφία, ίνωση, σκλήρυνση (σπειραματοσκλήρυνση) και τελικά καταστροφή των νεφρώνων αυτών. Η αυξημένη διήθηση και συσσώρευση πρωτεϊνών στο μεσάγγειο στα πλαίσια της υπερδιήθησης θεωρείται αποφασιστικής σημασίας για την παθογένεια της προοδευτικής ίνωσης στο σπείραμα. Με τον παραπάνω μηχανισμό, δηλαδή της υπερδιήθησης με σταδιακή καταστροφή των νεφρώνων, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οδηγείται βαθμιαία προς το τελικό στάδιο. Η εξέλιξη αυτή παρατηρείται ακόμη και σε περιπτώσεις που η αρχική πάθηση έχει υποχωρήσει ή βρίσκεται σε ύφεση. Η παραπάνω υπόθεση για την προοδευτική εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας διατυπώθηκε από το Brenner στη λεγόμενη θεωρία της υπερδιήθησης («hyperfiltration hypothesis» του Brenner, 1982) (27).

Συμπτωματολογία και επιπλοκές -- Παθοφυσιολογική προσέγγιση

Η κλινική συμπτωματολογία στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προκαλείται από:

1. Ανεπαρκή απεκκριτική λειτουργία των νεφρών με διαταραχές στην ομοιόσταση ύδατος (H₂O), ηλεκτρολυτών και την οξεοβασική ισορροπία,
2. Διαταραχές στην παραγωγή και έκκριση ορμονών όπως η ερυθροποιητίνη και ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D (1,25 Διυδροξυχοληκαλσιφερόλη)
3. Σε προχωρημένα στάδια, την τοξική επίδραση στον οργανισμό των συσσωρευμένων προϊόντων του καταβολισμού των λευκωμάτων (το ουραιμικό σύνδρομο ή ουραιμία) (27).

Θεραπεία

Η *συντηρητική αγωγή* της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας αφορά τα αρχικά στάδια της νόσου ενώ στο τελικό στάδιο της ουραιμίας υπάρχει ένδειξη για *θεραπεία εξωνεφρικής κάθαρσης* ή για *μεταμόσχευση νεφρού*.

Οι κυριότερες σύγχρονες θεραπείες εξωνεφρικής κάθαρσης είναι η αιμοκάθαρση, η συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ), η αιμοδιήθηση και η αιμοδιαδιήθηση. Ο σκοπός κάθε μιας από τις παραπάνω θεραπείες είναι:

1. Η απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών για την πρόληψη της ουραιμίας.
2. Η χορήγηση ρυθμιστικού (διτανθρακικών η οξείκου) για την αντιμετώπιση της μεταβολικής οξέωσης.
3. Η απομάκρυνση των κατακρατημένων υγρών για την αντιμετώπιση της υπερυδάτωσης (27).

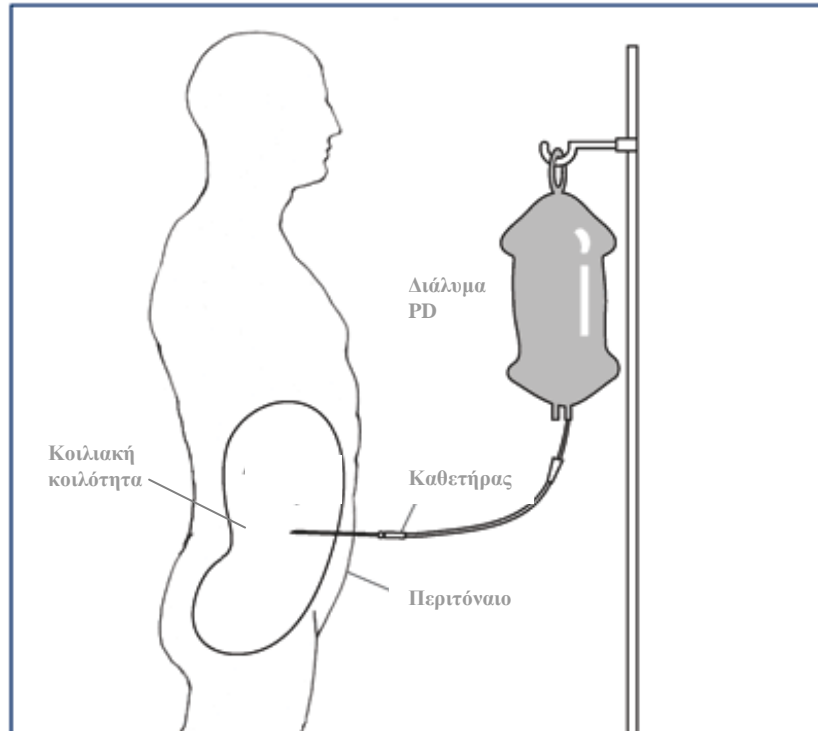
ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ

Περιγραφή της μεθόδου

Η περιτοναϊκή κάθαρση (peritoneal dialysis, PD) είναι μία μορφή εξωνεφρικής κάθαρσης. Η μεμβράνη του περιτοναίου διαχωρίζει τα δύο διαμερίσματα, που είναι 1) το αίμα των τριχοειδών αγγείων που στην περίπτωση της νεφρικής ανεπάρκειας περιέχει μεγάλες ποσότητες ουρίας, κρεατινίνης και άλλων ουσιών και 2) το διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης στην περιτοναϊκή κοιλότητα, το οποίο περιέχει ηλεκτρολύτες (π.χ. Na^+ , Cl^- , Ca^{+2}), γαλακτικά ή διττανθρακικά που χρησιμεύουν ως ρυθμιστικά διαλύματα και γλυκόζη που παίζει τον ρόλο οσμωτικού παράγοντα.

Κατά τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης, τρεις διαδικασίες λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα: διάχυση, υπερδιήθηση, και απορρόφηση. Το ποσοστό της κάθαρσης και ο βαθμός απομάκρυνσης του υγρού εξαρτάται από την ποσότητα του υγρού κάθαρσης που εγχέεται, πόσο συχνά αυτό το διάλυμα αλλάζει και τη συγκέντρωση του οσμωτικού παράγοντα.

Η χρόνια περιτοναϊκή κάθαρση διακρίνεται σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) (Σχήμα 4) και αυτοματοποιημένη περιτοναϊκή κάθαρση (automated peritoneal dialysis, APD). Στη συνεχή πραγματοποιούνται τέσσερις αλλαγές καθημερινά 2,0-2,5 L με κάθε μία να διαρκεί από 4-8 ώρες. Στην αυτοματοποιημένη 3-10 αλλαγές γίνονται τη νύχτα με τη βοήθεια μιας αυτοματοποιημένης συσκευής. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ο ασθενής συνήθως μεταφέρει κάποια ποσότητα υγρού, το οποίο απομακρύνεται τη νύχτα πριν αρχίσουν οι προγραμματισμένοι κύκλοι (28).



Σχήμα 4 Σχηματική απεικόνιση συνεχούς φορητής περιτοναϊκής κάθαρσης (CAPD).

Περιτοναϊκή κοιλότητα

Κατά τη φυλογένεση η περιτοναϊκή κοιλότητα με τη μορφή του αρχέγονου σπλαχνικού κοιλώματος επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον και χρησιμεύει ως απεκκριτικό (παραγωγή ούρων) και γεννητικό (παραγωγή γεννητικών κυττάρων) όργανο. Στη συνέχεια οι λειτουργίες αυτές επιτελούνται σε ιδιαίτερα όργανα (νεφροί και γεννητικοί αδένες) οπότε η σπλαχνική κοιλότητα συγκλείεται και έχει ως κύρια λειτουργία τη διευκόλυνση της κινητικότητας των σπλάχνων. Η αυξημένη διαπερατότητα του περιτοναίου έχει άμεση σχέση με την αρχέγονη λειτουργία του ως απεκκριτικού οργάνου.

Το σπλαχνικό περιτόναιο καταλαμβάνει το 80% περίπου της συνολικής περιτοναϊκής επιφάνειας και τροφοδοτείται με αίμα από το άνω μεσεντέριο, ενώ

διοχετεύει φλεβικό αίμα μέσω του συστήματος των τριχοειδών αγγείων. Σε αντίθεση, το τοιχωματικό περιτόναιο, το οποίο παίζει μάλλον πιο σημαντικό ρόλο κατά την περιτοναϊκή κάθαρση λαμβάνει αίμα από την οσφυϊκή, επιγαστρική και μεσοπλευρίες αρτηρίες και διοχετεύει στην κάτω κοίλη. Η συνολική ροή αίματος από το περιτόναιο δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα, αλλά εκτιμάται έμμεσα ότι είναι μεταξύ 50 και 100 mL το λεπτό. Το κύριο σύστημα λεμφικής παροχέτευσης από το περιτόναιο και από την περιτοναϊκή κοιλότητα γίνεται μέσω των στομάτων του διαφραγματικού περιτοναίου, επιπρόσθετα όμως από τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού και τοιχωματικού περιτοναίου (28).

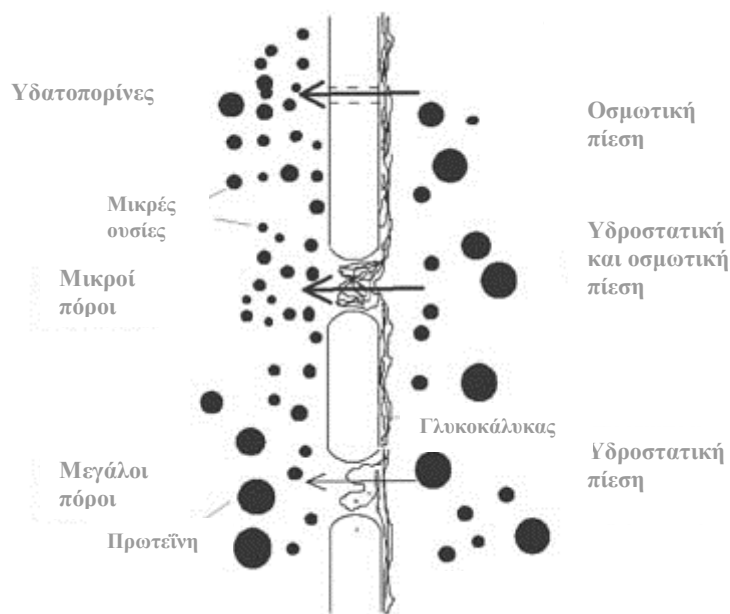
Μοντέλα διαπερατότητας του περιτοναίου

Δύο θεωρητικά μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη μεταφορά ουσιών μέσω του περιτοναίου. Τα μοντέλα αυτά δεν αποκλείουν το ένα το άλλο και τα δύο δε τονίζουν τη σημασία της αγγείωσης του περιτοναίου και του διάμεσου ιστού. Είναι το μοντέλο των τριών πόρων (three-pore model), που βοήθησε στην ερμηνεία του πώς ουσίες διαφορετικού μεγέθους και μόρια νερού μεταφέρονται και το μοντέλο κατανομής (distributed model), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να εξελίξει τη θεωρία της λειτουργικής περιτοναϊκής επιφάνειας (effective peritoneal surface area).

Μοντέλο των τριών πόρων. Το μοντέλο αυτό, το οποίο έχει πιστοποιηθεί με κλινικές παρατηρήσεις, υποστηρίζει ότι τα τριχοειδή του περιτοναίου αποτελούν τον βασικό φραγμό της περιτοναϊκής μεταφοράς και ότι η διακίνηση ουσιών και νερού επιτυγχάνεται μέσω πόρων τριών διαφορετικών μεγεθών (Σχήμα 5). Οι πόροι είναι:

α. Μεγάλοι πόροι (large pores) με ακτίνα μεταξύ 20-40 nm. Μακρομόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με μεταγωγή μέσω των πόρων αυτών που μοιάζουν με μεγάλες σχισμές στο ενδοθήλιο.

β. Μικροί πόροι (small pores) με ακτίνα 4-6 nm. Υπάρχει μεγάλος αριθμός και επίσης είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν σχισμές ενδιάμεσα του ενδοθηλίου. Ευθύνονται για τη μεταφορά μικρών ουσιών, όπως είναι η ουρία, η κρεατινίνη, το νάτριο και το κάλιο μαζί με νερό.

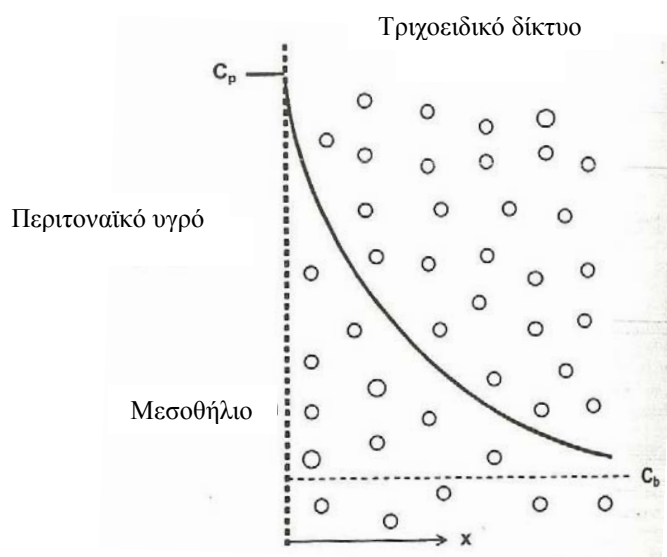


Σχήμα 5 Διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου των τριών πόρων της περιτοναϊκής μεταφοράς (Προσαρμοσμένο από Flessner MF. *Peritoneal transport physiology: insights from basic research. J Am Soc Nephrol* 1991; 2:122)

γ. Υπερμικροί πόροι (Ultra-small pores) με ακτίνα <0,8 nm. Είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά του νερού και μόνο και θεωρείται ότι αντιστοιχούν στις υδατοπορίνες (aquaporins) που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων των τροχοειδών του περιτοναίου. Τελευταία δεδομένα έχουν δείξει ότι οι υδατοπορίνες υπάρχουν και στο μεσοθήλιο του περιτοναίου (29). Σε αυτούς του πόρους καταλογίζεται το φαινόμενο του “κοσκινίσματος” από την περιτοναϊκή μεμβράνη.

Μοντέλο κατανομής. Σε αυτή τη θεωρία τονίζεται η σημασία που έχει η κατανομή των τροχοειδών στην περιτοναϊκή μεμβράνη και της απόστασης που έχουν να

διανύσουν το νερό και οι ουσίες από τα τριχοειδή μέσω του διάμεσου ιστού στο μεσοθήλιο (Σχήμα 6). Η μεταφορά εξαρτάται από την επιφάνεια που καταλαμβάνουν τα τριχοειδή του περιτοναίου και όχι από τη συνολική επιφάνεια που καταλαμβάνει το ίδιο το περιτόναιο. Επίσης, η απόσταση του κάθε τριχοειδούς από το μεσοθήλιο καθορίζει τη σχετική συνεισφορά του. Η αθροιστική συνεισφορά όλων των τριχοειδών του περιτοναίου καθορίζει τη λειτουργική επιφάνεια και τις ιδιότητες της μεμβράνης ως προς την αντίσταση που φέρει. Από αυτό το μοντέλο προέκυψε η έννοια της *λειτουργικής επιφάνειας του περιτοναίου*. Είναι η περιοχή που η επιφάνεια του περιτοναίου βρίσκεται κοντά στα τριχοειδή, ώστε να παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη μεταφορά ουσιών (28).



Σχήμα 6 Μοντέλο κατανομής, όπου φαίνεται η κατανομή των τριχοειδών του περιτοναίου στον ενδιάμεσο ιστό και οι αποστάσεις από το μεσοθήλιο (κάθετη στικτή γραμμή). C_p αντιστοιχεί στην απόδοση της μεταφοράς (Προσαρμοσμένο από Flessner MF. *Peritoneal transport physiology: insights from basic research*. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:122)

Φυσιολογία της περιτοναϊκής μεταφοράς

Όπως ειπώθηκε πρωτότερα κατά την περιτοναϊκή μεταφορά τρεις διαδικασίες λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα: διάχυση, υπερδιήθηση, και απορρόφηση.

Διάχυση

Οι ουραιμικές διαλυμένες ουσίες και το κάλιο διαχέονται από το αίμα των τριχοειδών αγγείων προς το διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης, ενώ η γλυκόζη, το γαλακτικό ή τα HCO_3^- και το ασβέστιο σε μικρότερο βαθμό διαχέονται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η περιτοναϊκή διάχυση εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: 1) κλίση συγκέντρωσης, 2) λειτουργική περιτοναϊκή επιφάνεια, 3) ενδογενής αντίσταση της περιτοναϊκής μεμβράνης, 4) το μοριακό βάρος της εκάστοτε ουσίας

Υπερδιήθηση (ultrafiltration)

Εμφανίζεται σαν αποτέλεσμα της διαφοράς οσμωτικότητας μεταξύ του υπέρτονου διαλύματος και του σχετικά υπότονου αίματος των τριχοειδών του περιτοναίου. Οδηγείται από την ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης και εξαρτάται από τα ακόλουθα:

- 1) κλίση συγκέντρωσης του οσμωτικά δραστικού παράγοντα,
- 2) λειτουργική επιφάνεια περιτοναίου,
- 3) υδραυλική αγωγιμότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης: αντανακλά πιθανότατα την πυκνότητα των μικρών και των πολύ μικρών πόρων στα περιτοναϊκά τριχοειδή, όπως επίσης και την κατανομή των τριχοειδών στο μεσοθήλιο,
- 4) συντελεστής ανάκλασης του οσμωτικά δραστικού παράγοντα: μετράει πόσο αποτελεσματικά διαχέεται ο οσμωτικά δραστικός παράγοντας από το διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης προς τα περιτοναϊκά τριχοειδή,

5) κλίση υδροστατικής πίεσης: φυσιολογικά η πίεση στα τριχοειδή (περίπου 20mmHg) είναι υψηλότερη από την ενδοπεριτοπναϊκή (περίπου 7 mmHg) και θα έπρεπε να ευνοεί την υπερδιήθηση,

6) κλίση ωσμωτικής (κολλοειδωσμοτικής πίεσης) πίεσης: ευνοεί τη διατήρηση υγρών στον αγγειακό χώρο, άρα είναι αντίθετη στην υπερδιήθηση,

7) *φιλτράρισμα (sieving)*: ένα ποσοστό της διαλυμένης ουσίας που διέρχεται μαζί με νερό μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης κατακρατείται ή “φιλτράρεται”, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο υπερδιήθημα να είναι χαμηλότερη από τη συγκέντρωσή της στο αρχικό διάλυμα.

Απορρόφηση υγρού

Λαμβάνει χώρα μέσω των λεμφαγγείων με σχετικά σταθερό ρυθμό. Δε γίνεται καθόλου ή πολύ λίγο κοσκίνισμα. Μια μικρή ποσότητα της απορρόφησης γίνεται άμεσα στα λεμφαγγεία του διαφράγματος. Το υπόλοιπο γίνεται μέσω του τοιχωματικού περιτοναίου στους ιστούς του κοιλιακού τοιχώματος και εκεί λαμβάνεται από τα τοπικά λεμφαγγεία και ίσως τα περιτοναϊκά τριχοειδή. Κατά μέσο όρο η απορρόφηση υγρού από το περιτόναιο έχει ρυθμό 1-2 mL/λεπτό, από τα οποία 0,2-0,4 mL/λεπτό απορροφώνται άμεσα από τα λεμφαγγεία. Εξαρτάται από 1) *την ενδοπεριτοναϊκή υδροστατική πίεση*: όσο υψηλότερη είναι, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του απορροφώμενου υγρού και 2) *την αποτελεσματικότητα των λεμφαγγείων*: μπορεί να διαφέρει σημαντικά από άτομο σε άτομο (28).

Απώλεια της υπερδιήθησης

Η περιτοναϊκή κοιλότητα δεν σχεδιάστηκε για να χρησιμοποιηθεί ως συσκευή περιτοναϊκής κάθαρσης. Η εφαρμογή του καθετήρα και η έγχυση μη βιοσυμβατών διαλυμάτων σε καθημερινή βάση και πολλές φορές ημερησίως μεταβάλλουν τη

φυσιολογία του περιτοναίου. Σε κάποιους ασθενείς η καθημερινή εφαρμογή της περιτοναϊκής κάθαρσης οδηγεί σε απώλεια της υπερδιήθησης (ultrafiltration failure). Εμφανίζεται σε ποσοστό μέχρι 50% σε ασθενείς που χρησιμοποιούν τη μέθοδο αυτή για περισσότερο από 6 χρόνια (30). Η απώλεια της υπερδιήθησης είναι επομένως μια βασική επιπλοκή της περιτοναϊκής κάθαρσης, ιδίως στους μακροχρόνια ασθενείς. Η συνεχής έκθεση στα μη βιοσυμβατά διαλύματα της περιτοναϊκής κάθαρσης και η περιτονίτιδα προκαλούν φλεγμονή στην περιτοναϊκή μεμβράνη, η οποία σταδιακά εμφανίζει ίνωση και αγγειογένεση και τελικά επέρχεται απώλεια της υπερδιήθησης (31).

Έχει βρεθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στον χρόνο εφαρμογής της περιτοναϊκής κάθαρσης, του πάχους του περιτοναίου και της αγγειοπάθειας. Επίσης, τα προϊόντα αποδόμησης της γλυκόζης (GDPs, glucose degradation products) συμβάλλουν στην περιτοναϊκή αγγειοπάθεια και ίνωση. Ο καθετήρας από την άλλη αυξάνει τη φλεγμονώδη απόκριση της περιτοναϊκής μεμβράνης και επάγει ίνωση, αγγειογένεση και μεταφορά ουσιών από αυτή (31).

Πρόσφατα ευρήματα υποστηρίζουν ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι ικανά να αλλάζουν κυτταρικό φαινότυπο ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο απαντώνται. Μπορούν να μετατραπούν σε μυοϊνοβλάστες ή ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Κατά την οργανογένεση τα πρόδρομα μεσοθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λεία μυϊκά γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία. Η επιθηλιακή - μεσεγχυματική μετάβαση των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι ένας σημαντικός μηχανισμός της περιτοναϊκής ίνωσης (32). Ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β1 (TGFβ1) είναι ο κύριος ρυθμιστής της μετάβασης αυτής στην περιτοναϊκή μεμβράνη. Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και τα προϊόντα αποδόμησης της γλυκόζης προέρχονται από το διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης και επάγουν την παραγωγή του TGFβ1 και του αγγειακού

ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Η λεπτίνη και ο υποδοχέας των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs, advanced glycation end-products) επάγουν επίσης τη μετάβαση σε μυοϊνοβλάστες μέσω της ενεργοποίησης του TGFβ1 σηματοδοτικού μονοπατιού (31).

Ένας άλλος λόγος που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της υπερδιήθησης είναι η μείωση της οσμωτικής αγωγιμότητας και η ταυτόχρονη αύξηση της μεταφοράς ουσιών. Αυτή η κατάσταση είναι πιθανόν να προκαλείται από τη λειτουργική απώλεια των υδατοπορινών (AQPs, aquaporins). Κατά τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης η AQP1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαπερατότητα της μεμβράνης στο νερό και στην υπερδιήθηση με το να ρυθμίζει διεργασίες, όπως είναι η διαπερατότητα του ενδοθηλίου και η αγγειογένεση. Φαίνεται μάλιστα ότι μέσω των υδατοπορινών διεξάγεται το 50% της υπερδιήθησης (31).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταβλητότητα της μεταφοράς ουσιών μέσω του περιτοναίου στον μεγαλύτερο βαθμό της δεν μπορεί να ερμηνευτεί. Σε αυτό το σημείο η γενετική δύναται να παίζει ρόλο, καθώς μάλιστα πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά μέσω της περιτοναϊκής μεμβράνης έχουν ήδη ταυτοποιηθεί (31).

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 (33) (34). 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 (34). Έκτοτε πολλές μελέτες μας έδωσαν την δυνατότητα να γνωρίζουμε σήμερα τους βασικούς μηχανισμούς διαμεμβρανικής μεταφοράς ύδατος και ουσιών.

Βασικοί μηχανισμοί διακυτταρικής μεταφοράς

Διάχυση

Με τη διάχυση επιτελείται 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 γίνεται με τη συνήθη κινητική ενέργεια της ύλης. Τα ιόντα διαχέονται με τον ίδιο 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 (34).

Ενεργητική μεταφορά

Η ενεργητική μεταφορά συνιστάται σε μετακίνηση ιόντων ή άλλων ουσιών διαμέσου της μεμβράνης, με τη συμμετοχή μιας πρωτεΐνης φορέα. Επιπλέον μπορεί να

πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πρηνές, όπως από χαμηλή συγκέντρωση προς υψηλή, διεργασία για την οποία απαιτείται επιπρόσθετη ενέργεια εκτός από την κινητική για την πραγματοποίηση της μετακίνησης (33, 34).

Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων

Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολικότητα στις μεταφορικές τους ιδιότητες. 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 βλέπουν προς την άλλη.

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 οθροφόρου σωληναρίου διαφέρει ως προς την σύσταση των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας της μεμβράνης του κυττάρου. Οι σφιχτές 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 διαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι υπάρχουν δύο τύποι οδών μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: α) διακυτταρικές οδοί, μέσα από τα κύτταρα και β) παρακυττάρια οδοί, μεταξύ των κυττάρων (35).

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που αναφερθήκαν. Η διακίνηση μέσω των παρακυττάρια οδών περιορίζεται από τις στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (35). Η παρακυττάρια οδός θεωρούνταν παθητική, κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών

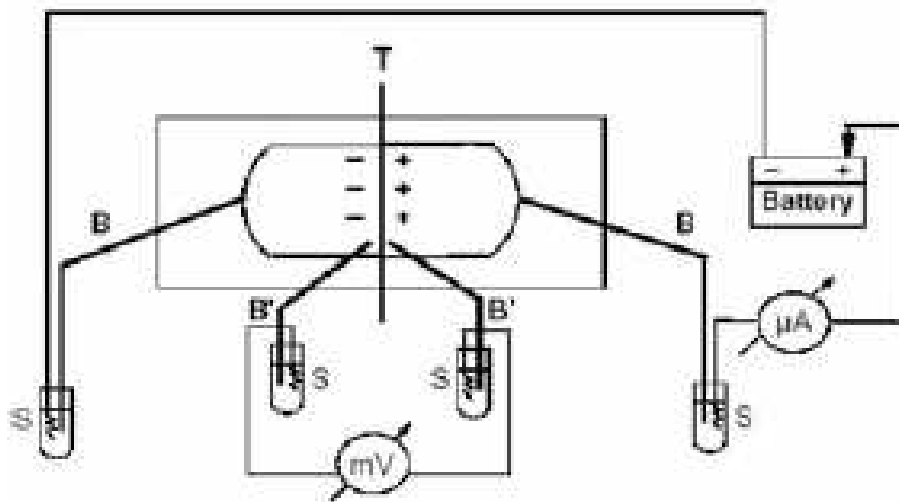
ή κλίσης ιόντων που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά ιόντων (36, 37). Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται και ενεργά (38, 39).

Μελέτη Διαπερατότητας Βιολογικών Μεμβρανών – Μέθοδος Ussing System

Η μέθοδος Ussing System αποτελεί μια κλασσική μέθοδος μελέτης διαπερατότητας βιολογικών μεμβρανών. 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 (40). Ο θάλαμος σχεδιάστηκε αρχικά προκειμένου να μελετηθεί η ενεργητική μεταφορά ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχου. Από τότε ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες διεξάγονται στη συσκευή αυτή προκειμένου να διερευνηθούν οι λειτουργικές ιδιότητες των βιολογικών μεμβρανών. Η μέθοδος χρησιμοποιείται σε μια ποικιλία εφαρμογών από την ακεραιότητα των κυτταρικών στρωμάτων έως και τη μελέτη της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και σε μελέτες απορρόφησης φαρμάκων (41, 42). Ο Mark Simon χρησιμοποίησε τη συσκευή σε περιτόναιο αρουραίου για να δείξει με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας ότι η περιτοναϊκή μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φραγμός κατά την περιτοναϊκή κάθαρση (43).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου φαίνεται στο Σχήμα 7. 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 (μA), το ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον

ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B**, **B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3cm από την επιφάνεια του ιστού.



Σχήμα 7 Σχηματική αναπαράσταση του Ussing System. **B**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (**S**) για την χορήγηση του ρεύματος. **B'**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (**S**) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. **mV**: μιλιβολτόμετρο. **μA**: μικροαμπερόμετρο. **Battery**: Μπαταρία. **T**: Ιστός. (Stefanidis et al, 2005)

Το Ussing System στη βασική του μορφή αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη. Το ένα από αυτά είναι ο θάλαμος, 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. Με την πάροδο του χρόνου έχουν αναπτυχθεί αρκετές παραλλαγές του συστήματος του Ussing, ούτως ώστε σήμερα να είναι δυνατή η μέτρηση όχι μόνο της διαφοράς δυναμικού, της έντασης του ρεύματος, της αντίστασης του δείγματος και η μέτρηση παραμέτρων όπως είναι η χωρητικότητα και η εμπέδιση του συστήματος.

Η αρχική σχεδίαση της διάταξης Ussing επέτρεπε στον εφευρέτη να μελετά το δέρμα βατράχου που είναι ιστός με μεγάλη αντοχή και ελαστικότητα. Αν ο θάλαμος είχε περιοριστεί στον αρχικό σχεδιασμό του, δεν θα είχε την μετέπειτα επιτυχία σε διάφορα ερευνητικά κέντρα. Ωστόσο, η ανάπτυξη θαλάμων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ακόμη και τα μικρότερα κομμάτια ζωντανού ιστού μέσω εφαρμογής μικροχειρουργικών επεμβάσεων, καθώς και η δυνατότητα ορισμένων οργάνων να μελετούν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες κυτταρικών σειρών που έχουν αναπτυχθεί πάνω σε ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους, έχουν αναδείξει το σύστημα του Ussing σε ένα από τα πιο διαδεδομένα και αξιόπιστα 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 λειτουργία τους. Οι 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 και βασικής

επιφάνειας του επιθηλίου. Με τον όρο συνοχή του ιστού αναφερόμαστε στο μέτρο της ακεραιότητας και της αντίστασης τόσο σε ηλεκτρικές όσο και μηχανικές καταπονήσεις, όπως αυτό προκύπτει από το σχηματισμό πρωτεϊνικών συνδέσεων γνωστές ως σφιχτές συνδέσεις. Οι σύνδεσμοι αυτοί διαχωρίζουν τις δύο επιθηλιακές επιφάνειες και η πυκνότητά τους καθορίζει την συνοχή του ιστού ως μετρήσιμο μέγεθος.

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

$$R = \rho \times l / A$$

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

Προκειμένου να μετρηθεί η συνολική αντίσταση της μεμβράνης με τη χρήση του συστήματος Ussing, είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη ροή του ρεύματος σε αυτή. Καθώς δημιουργείται το ηλεκτρικό πεδίο, οι ηλεκτρολύτες και τα διάφορα ιοντικά στοιχεία των κυτταρικών μεμβρανών συμμετέχουν στην παραγωγή του ρεύματος κατά τη φορά που καθορίζει το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Σύνδεση Δυναμικού (Voltage Clamp) (41).

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 στη φυσιολογική κατάσταση που επικρατεί στο κύτταρο, υπό κανονικές συνθήκες. Επίσης, η ένταση του ρεύματος που διαπερνά την μεμβράνη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής συνοχής ή απλά τη βλάβη πρωτεϊνών 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* (41).

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 ηλεκτρικού ρεύματος σε διαφορά δυναμικού (41).

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (κορτικοστεροειδή) είναι μια σημαντική κατηγορία φαρμάκων γνωστή για την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική τους ιδιότητα και χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη σε διάφορες δόσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως ανοσοκατασταλτικά για την θεραπεία μολύνσεων του αεραγωγού, ενώ σε μεγαλύτερες σε οξεία περιστατικά. Μέχρι πρόσφατα οι φαρμακολογικές τους δράσεις αποδίδονταν μόνον στο κλασσικό γενομικό μονοπάτι, το οποίο προϋποθέτει σύνδεση με ειδικό κυτταροπλασματικό υποδοχέα, μετακίνηση στον πυρήνα και ενεργοποίηση ή καταστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Οι δράσεις αυτές χαρακτηρίζονται από καθυστέρηση στον χρόνο έναρξης που μπορεί να φτάσει τις κάποιες ώρες ή μέρες (44).

Πολλές μελέτες σε διαφορετικούς ιστούς περιγράφουν πλέον την άμεση, μη γενομική δράση των γλυκοκορτικοειδών που μπορεί να ξεκινά μέσα σε λίγα λεπτά και τις φαρμακολογικές επιδράσεις που μπορεί να έχουν (45, 46). Το 1998 στο «1^ο Διεθνές Συμπόσιο για τις Ταχείες Αποκρίσεις των Στεροειδών Ορμονών» έγινε μια προσπάθεια κατηγοριοποίησης των γλυκοκορτικοειδών (ταξινόμηση Mannheim) με βάση τον τρόπο δράσης τους σε άμεσο ή έμμεσο, ειδικό ή μη. Στην άμεση δράση η ορμόνη δρα μόνη της, ενώ στην έμμεση εμπλέκεται κι ένας συναγωνιστής. Η ειδική δράση περιλαμβάνει την πρόσδεση σε έναν κλασσικό ή μη υποδοχέα, ενώ η μη ειδική δεν περιλαμβάνει υποδοχείς, αλλά αλλαγές στην ιοντική κατανομή της κυτταρικής μεμβράνης (44). Η μη γενομική δράση των γλυκοκορτικοειδών πάντως δεν αποκλείει

την συνύπαρξη ή ακόμη και την αλληλεπίδραση με τον γενομικό μηχανισμό δράσης τους.

Δεξαμεθαζόνη

Η δεξαμεθαζόνη είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές (αγωνιστής), και είναι 25 φορές πιο δραστική από την κορτιζόλη. Χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο άσθμα και στην έρευνα ως μοντέλο για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των γλυκοκορτικοειδών ορμονών (47).

Αρκετές εργασίες μέχρι σήμερα έχουν ασχοληθεί με την άμεση δράση της δεξαμεθαζόνης σε ποικίλους ιστούς και κυτταρικές σειρές (48-52). Δύο παλιότερες ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη μειώνει την αντίσταση της μεμβράνης στην οποία ασκείται (53, 54).

In vivo μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη προάγει τη διαπερατότητα του νερού και την υπερδιήθηση, χωρίς να επηρεάζει την οσμωτική βαθμίδωση και τη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης στις μικρές διαλυτές ουσίες (55, 56). Επίσης, κλινικές μελέτες και μελέτες σε ζώα ήδη δοκιμάζουν την αποτελεσματικότητα των γλυκοκορτικοειδών στην περιτοναϊκή ίνωση που εμφανίζεται συχνά στους ασθενείς που ακολουθούν περιτοναϊκή κάθαρση (57-59).

Μιφεπριστόνη και Σπιρονολακτόνη

Η μιφεπριστόνη, ή αλλιώς γνωστή ως RU486 θεωρείται ανταγωνιστής των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων της δεξαμεθαζόνης. Η συγγένεια του για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι δύο έως τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη της δεξαμεθαζόνης. Είναι επίσης και ειδικός ανταγωνιστής των υποδοχέων της

προγεστερόνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την ανταγωνιστική (49, 50), αλλά και αγωνιστική δράση της ουσίας αυτής (60, 61). Σήμερα πιστεύεται ότι η συγγένεια, η σταθερότητα και η ενεργότητα των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων παρουσία στεροειδούς ορμόνης εξαρτάται από τα κύτταρα και/ ή από τον ιστό (62).

Η σπιρονολακτόνη είναι ανταγωνιστής των αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων. Σαν φάρμακο είναι γνωστό και χορηγείται στον υπεραλδοστερονισμό και στην υπέρταση. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν τους αλατοκορτικοειδικούς υποδοχείς (62).

Αμιλορίδη και EIPA

Η αμιλορίδη είναι ειδικός αναστολέας των διαύλων Na^+ . Η ύπαρξη των διαύλων αυτών στο περιτόναιο (63, 64) και σε άλλες ορογόνες μεμβράνες όπως είναι ο υπεζωκότας (65, 66) έχει δείχτει σε προγενέστερες ηλεκτοφυσιολογικές μελέτες. Η αμιλορίδη, ανάλογα με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται ενεργοποιεί και διαφορετικούς μηχανισμούς μεταφοράς ιόντων Na^+ . Σε συγκεντρώσεις μM ευνοεί την ανταλλαγή ιόντων Na^+ με ιόντα H^+ . Παρουσιάζει επίσης υψηλή συγγένεια στους επιθηλιακούς διαύλους Na^+ (ENaC) (67). Οι διάυλοι αυτοί εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα πολλών ιστών και εμπλέκονται στην απορρόφηση ιόντων νατρίου και νερού (68, 69).

Το ανάλογο της αμιλορίδης, η αιθυλισοπροπυλαμίδη (ethylisopropylamide, EIPA) είναι ειδικός αναστολέας των διαύλων $\text{Na}^+ - \text{H}^+$. Θεωρείται ότι έχει μεγαλύτερη συγγένεια από την αμιλορίδη (70). Σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα η μη γενομική δράση της αλδοστερόνης φαίνεται να ρυθμίζεται από τους διαύλους αυτούς ύστερα από την επίδραση με EIPA (71).

Ουαμπαΐνη

Η ουαμπαΐνη είναι ειδικός αναστολέας της αντλίας Na^+/K^+ . Η Na^+/K^+ ΑΤΡάση είναι αναπόσπαστη πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οσμωτικής και ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης (72). Βρίσκεται συνήθως στη βασεοπλευρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Έχει βρεθεί όμως και στην κορυφαία επιφάνεια επιθηλιακών κυττάρων της χοριοειδούς μεμβράνης (73) και του αμφιβληστροειδή χιτώνα (74). Υπάρχει ακόμη η ένδειξη σε πειράματα με ουαμπαΐνη σε υπεζωκότα κουνελιού (75, 76) και προβάτου (65) ότι υπάρχουν δύο υπότυποι μεσοθηλιακών κυττάρων. Στον ένα τύπο κυττάρων η Na^+/K^+ ΑΤΡάση βρίσκεται στη βασεοπλευρική και στον άλλο στην κορυφαία (68).

Ήδη πειράματα στο Ussing έχουν δείξει την ύπαρξη των πρωτεϊνών αυτών και στη μεμβράνη του περιτοναίου (77). Η δεξαμεθαζόνη έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης σε πνευμονικά επιθηλιακά (48), και σε ηπατικά κύτταρα (78).

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Όταν αναφερόμαστε στον VEGF, στην ουσία αναφερόμαστε στον VEGF -A που ανήκει σε μια στενά συνδεδεμένη οικογένεια αυξητικών παραγόντων, στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι VEGFs B, C, D, E και ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (PlGF). Το ανθρώπινο VEGF -A γονίδιο αποτελείται από 8 εξόνια και με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτουν 4 διαφορετικές ισομορφές (VEGF_{121} , VEGF_{165} , VEGF_{189} , VEGF_{206}). Στη φύση, ο VEGF είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 45 kDa. Οι ιδιότητες του αντιστοιχούν σε μεγάλο βαθμό στην ισομορφή VEGF_{165} , η οποία είναι και η επικρατέστερη (79, 80).

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας είναι σημαντικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως κατά την εμβρυογένεση, την σκελετική ανάπτυξη και στις αναπαραγωγικές λειτουργίες. Είναι ακόμη γνωστός και ως αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας, λόγω της ικανότητάς του να επάγει την αγγειακή χάλαση (79).

Θεωρείται ότι εμπλέκεται επίσης στην παθολογική αγγειογένεση που σχετίζεται με όγκους και με ασθένειες σχετικές με νεοαγγειογένεση. Η ικανότητά του να επάγει τη διαπερατότητα τον καθιστά σημαντικό παράγοντα σε καταστάσεις φλεγμονής και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Σε ασθενείς που ακολουθούν περιτοναϊκή κάθαρση, η μορφολογία και λειτουργία της περιτοναϊκής μεμβράνης μεταβάλλονται με τον χρόνο αγωγής. Αποτελέσματα από αρκετές έρευνες δείχνουν ότι ο VEGF παράγεται τοπικά στα ενδοθηλιακά και περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα (81, 82). Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, προϊόντων αποδόμησης και τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης προκαλούν τοπική παραγωγή VEGF (83, 84). Τα ιστολογικά ευρήματα είναι πάχυνση του αγγειακού τοιχώματος και νεοαγγειογένεση (85). Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τον VEGF στην αλλαγή της διαπερατότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης (86).

Σε ενδοθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδή η άμεση δράση του VEGF αποδόθηκε στη γρήγορη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των σφιχτών συνδέσεων (zonula occluden 1) (87). Μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα έδειξαν ότι ο VEGF αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μονοστοιβάδας (88, 89). Και άλλες μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου συνηγορούν στην άποψη αυτή (89).

Αναστολείς των υποδοχέων του VEGF (SU5416 & SU1498)

Δύο υποδοχείς κινάσης τυροσίνης έχουν ταυτοποιηθεί για τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF. Ο VEGFR1, γνωστός και ως Flt-1 και ο VEGFR2 (KDR/Flk-1), οι οποίοι παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία σε ποσοστό ~ 44% και έχουν παρόμοια δομή. Στην κυτταροπλασματική περιοχή βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο, ενώ αποτελούνται από μία διαμεμβρανική υδρόφοβη περιοχή και επτά εξωκυττάρειες περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη (79).

Αν και ο Flt-1 είναι ο πρώτος που ταυτοποιήθηκε δεν γνωρίζουμε πολλά στοιχεία για τον ρόλο του. Ο VEGFR2 είναι κυρίως υπεύθυνος για την μιτογόνο, αγγειογόνο δράση και την επαγόμενη διαπερατότητα που προκαλεί ο VEGF (80).

Ο SU5416, γνωστό ως Semaxinib είναι αναστολέας κινάσης τυροσίνης και για τους δύο υποδοχείς του VEGF (90). Ο SU1498 (tyrphostin) αναστέλλει ειδικά τη φωσφορυλίωση των VEGFR2 υποδοχέων (90).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

ΜΕΡΟΣ 1^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΙΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

Συλλογή και Προετοιμασία ιστού

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου ενήλικων προβάτων. Ο Breborowicz et al. έχουν δείξει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης ανάλογως της προελεύσεως του ιστού (91). Η συλλογή του ιστού γίνεται αμέσως μετά τη σφαγή των ζώων στο χώρο του τοπικού νομαρχιακού σφαγείου «Σφαγεία Λάρισας Α.Ε. Βιομηχανικά Σφαγεία». Δείγματα ιστού από τοιχωματικό περιτόναιο απομονώνονται από το διάφραγμα του ζώου επί τόπου. Το σπλαχνικό περιτόναιο προέρχεται από το μείζον επίπλουν του προβάτου και η απομόνωσή του γίνεται στο εργαστήριο. Οι ιστοί που συλλέχτηκαν μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), σε θερμοκρασία 4 °C.

Το σπλαχνικό περιτόναιο είναι μια λεπτή μεμβράνη που περιβάλλει και είναι προσκολλημένη στον λιπώδη ιστό του μείζον επίπλουν. Με μεγάλη προσοχή αποκολλάται το σπλαχνικό περιτόναιο από τον υποκείμενο ιστό και τα δείγματα διατηρούνται και αυτά στο θρεπτικό μέσο DMEM, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Καθ' όλη τη διαδικασία συλλογής και απομόνωσης του ιστού, ο χειρισμός των μεμβρανών έγινε με ιδιαίτερη προσοχή και τα απομονωμένα τμήματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη οπών και υπολειμμάτων συνδετικού ή λιπώδους ιστού.

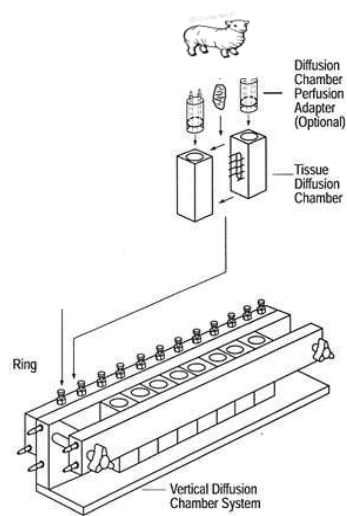
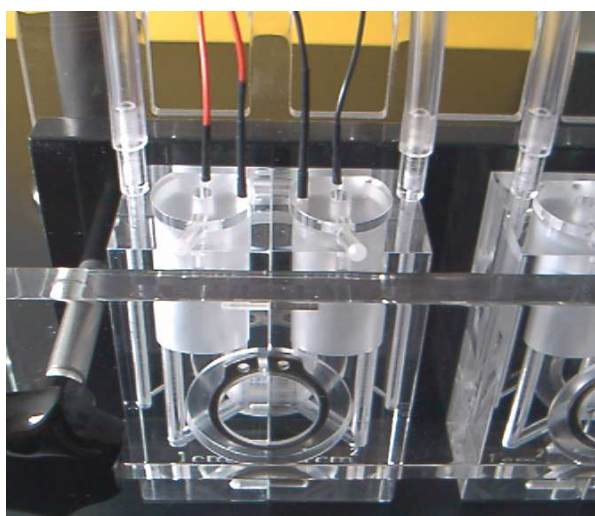
Πειραματική Διαδικασία Διαπερατότητας

Τα τμήματα περιτοναίου τοποθετήθηκαν ως επίπεδη, μονήρης μεμβράνη μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (Dipl.–Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) (Εικόνα 5). Οι ημιθάλαμοι προσαρτώνται και σχηματίζουν ένα ενιαίο σύστημα συγκοινωνούντων δοχείων, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται η ημιδιαπερατή περιτοναϊκή μεμβράνη επιφάνειας 1 cm^2 . Στους δύο ημιθαλάμους προστίθενται με την ίδια υδροστατική πίεση 4 ml διαλύματος Krebs, σύστασης 117,5 mmol/L NaCl, 1,15 mmol/L NaH_2PO_4 , 24,99 mmol/L NaHCO_3 , 5,65 mmol/L KCl, 1,18 mmol/L MgSO_4 , 2,52 mmol/L CaCl_2 , και 5,55 mmol/L γλυκόζης. Το διάλυμα έχει παρόμοια σύσταση με αυτή του μεσοκυττάριου υγρού του προβάτου, pH 7,4, ενώ κατά την πειραματική διαδικασία διοχετευόταν αέριο μείγμα σύνθεσης 95% O_2 / 5% CO_2 . Το όλο σύστημα διατηρείται μέσω δύο μεταλλικών πλακών σε θερμοκρασία 37°C , λόγω του ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Ο συγκεκριμένος τύπος Ussing chambers επιτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή έξι πειραμάτων.

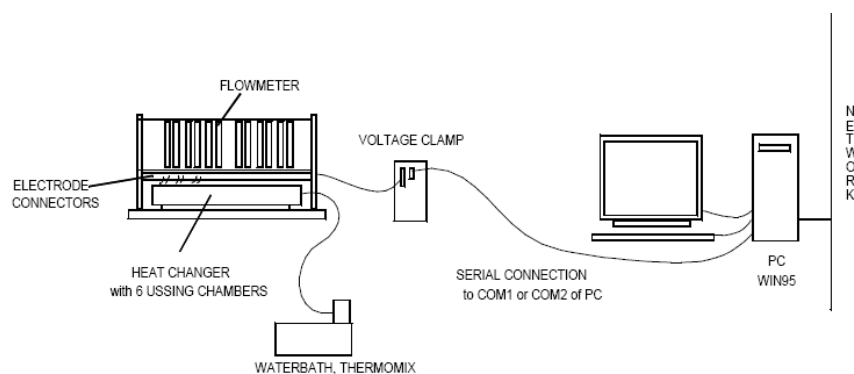
Πριν ξεκινήσει το πείραμα, το σύστημα βαθμονομείται, σύμφωνα με δύο παραμέτρους αντίστασης και τάσης (R_f/dPe). Οι ημιθάλαμοι και οι συνθήκες είναι οι ίδιες που περιγράφηκαν, μόνο που αντί του ιστού, τοποθετείται ένας δακτύλιος (O Ring) με επιφάνεια του 1 cm^2 .

Ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl, τοποθετημένο σε απόσταση 3mm εκατέρωθεν της μεμβράνης μετρούσε την διαμεσοθηλιακή αντίσταση (R_{TM} , Transmesothelial Resistance) σε $\Omega \cdot \text{cm}^2$, σε συνθήκες ανοιχτού κυκλώματος (open circuit). Η μέτρηση γινόταν κάθε ένα λεπτό και η καταγραφή μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά τις πρώτες ενδείξεις για την βιωσιμότητα του ιστού, το κύκλωμα άλλαζε σε συνθήκες

σύνδεσης ρεύματος (current clamp). Με τη βοήθεια ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων Ag/AgCl σε απόσταση 3 cm εκατέρωθεν της μεμβράνης, χορηγήθηκε δηλαδή συνεχές ρεύμα έντασης 50 μA και διάρκειας 200 ms, κάθε 6 δευτερόλεπτα από μια συσκευή Voltage/Current Clamp (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) (Σχήμα 7).



Εικόνα 5 Αντλία τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διαπερατότητας



Σχήμα 7 Το σύστημα Ussing που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διαπερατότητας

Η μεσοθηλιακή κυτταρική μεμβράνη που *in vivo* είναι εκτεθειμένη στο περιτοναϊκό υγρό ορίζεται ως **κορυφαία** (apical) και ως **βασεοπλευρική** (basolateral) η εκτεθειμένη στον διάμεσο ιστό. Αντίστοιχα, το διάλυμα που περιλούζει την κορυφαία επιφάνεια του περιτοναίου αναφέρεται ως **ορώδες διάλυμα** (serosal solution), ενώ τη βασεοπλευρική ως **διάμεσο διάλυμα** (mucosal solution).

Για 30- 40 λεπτά, πριν την προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών αναμένεται να σταθεροποιηθεί η καταγραφόμενη αντίσταση. Οι ουσίες παρασκευάζονταν αμέσως πριν τη διεξαγωγή της ηλεκτροφυσιολογικής μελέτης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες κλειστού κυκλώματος και η R_{TM} καταγράφηκε για μια ώρα μετά την προσθήκη των ουσιών σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (1°, 3°, 5°, 10°, 15°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60° λεπτό).

Η πρώτη σειρά πειραμάτων αφορά την επίδραση της δεξαμεθαζόνης (DEX) στο περιτόναιο προβάτου. Μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, και $10^{-9}M$ στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο στην κορυφαία επιφάνεια και βασεοπλευρικά.

Για να διαπιστωθεί αν η δράση της δεξαμεθαζόνης πραγματοποιείται μέσω των κλασσικών υποδοχέων της χρησιμοποιήθηκαν η μίφεπριστόνη (SU486, MIF) και η σπιρονολακτόνη (SLN). Η μίφεπριστόνη είναι γνωστός αναστολέας των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων και πειράματα διεξήχθησαν προσθέτοντας τον αναστολέα μόνο του σε συγκέντρωση $10^{-5}M$, αλλά και σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση της τελευταίας $10^{-6}M$. Όμοια και με την σπιρονολακτόνη που είναι αναστολέας των αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων της δεξαμεθαζόνης πειράματα έγιναν, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συγκεντρώσεις που αναφέρονται πριν. Η μελέτη περιλαμβάνει την επίδραση των ουσιών στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου.

Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης της δεξαμεθαζόνης είναι μέσω των διαύλων Na^+ . Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η αμιλορίδη (10^{-5}M) που είναι ο πιο ειδικός αναστολέας των επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC) και ο αναστολέας των διαύλων Na^+-H^+ , EIPA (ethylisopropylamide) (10^{-4}M) που είναι ανάλογο της αμιλορίδης. Οι ουσίες προστέθηκαν στο ορώδες και στο διάμεσο διάλυμα, κορυφαία και βασεοπλευρικά μόνες και σε συνδυασμό η κάθε μία χωριστά με τη δεξαμεθαζόνη (10^{-6}M).

Τέλος, για να διαπιστωθεί αν η δεξαμεθαζόνη δρα και μέσω της αντλίας Na^+/K^+ , χρησιμοποιήθηκε η ουαμπαΐνη, η οποία είναι γνωστός αναστολέας αυτής της αντλίας (92, 93). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη της μεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης στο περιτόναιο, χρησιμοποιώντας την ουαμπαΐνη σε συγκέντρωση 10^{-3}M (64). Στα πειράματα που διεξήχθησαν για την παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση 10^{-4}M του αναστολέα της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης, ήταν ικανή να δώσει αποτέλεσμα.

Ο δεύτερος κύκλος πειραμάτων αφορά την επίδραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις 1ng/ml , 5ng/ml , 10ng/ml και 20ng/ml στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου στην κορυφαία επιφάνεια και βασεοπλευρικά.

Για να διαπιστωθεί, αν η δράση του επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω των υποδοχέων VEGF R1/R2, χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς τους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο μη ειδικός αναστολέας SU4516 και ο ειδικός αναστολέας SU1498 των VEGFR2 υποδοχέων σε συγκέντρωση 10^{-6}M .

Διεξήχθησαν τουλάχιστον 6 πειράματα για κάθε συνθήκη και οι τιμές των αποτελεσμάτων εκφράστηκαν ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (mean \pm SE). Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το InStat 3 (GraphPad Inc., San Diego, USA). Για

την στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το ANOVA (one way και two way) με διόρθωση κατά Bonferonni. Τιμές $P < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Τα διαγράμματα έγιναν με το πακέτο γραφικών Sigma Plot 11.

ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Απομόνωση και Καλλιέργεια

Το πρωτόκολλο απομόνωσης ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων βασίστηκε στη μέθοδο που προτάθηκε στο άρθρο της Stylianou et al. (94).

- Φυσιολογικό τμήμα μείζον επίπλουν (σπλαχνικό περιτόναιο) αφαιρέθηκε σε χειρουργείο του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας από την κοιλιακή χώρα ασθενούς με τη σύμφωνη συγκατάθεσή του. Μεταφέρθηκε στο εργαστήριο σε φωσφατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) στους 4 °C. Η απομόνωση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε άμεσα και σε στείρες συνθήκες.

(Στείρες συνθήκες: Όλα τα διαλύματα γίνονται με αποστειρωμένο νερό και τα τελικά διαλύματα φιλτράρονται πριν χρησιμοποιηθούν τελικά στην απομόνωση. Τα εργαλεία της απομόνωσης είναι και αυτά αποστειρωμένα.)

- Το τμήμα ιστού ξεπλύθηκε διαδοχικά τρεις φορές ή παραπάνω με διάλυμα PBS (4 °C), ώστε να απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα.
- Ο ιστός αποτελείται από διαφανή περιτοναϊκή μεμβράνη και από λιπώδη ιστό που παρεμβάλλεται. Διαχωρίστηκε σε τμήματα επιφάνειας 5-7 cm², όσο γίνεται πιο διαφανή, απαλλαγμένα δηλαδή από λιπώδη ιστό και τριχοειδή αγγεία.

- Ξεπλύθηκαν τα επιλεγμένα τμήματα του ιστού προς απομόνωση, όπως προηγουμένως.
- Ακολούθησε επώαση (ενζυμική πέψη) σε 15 ml προθερμασμένου διαλύματος PBS που περιέχει 0.125% (wt/vol) τρυψίνη, 0.01% (wt/vol) EDTA και 0.1% (wt/vol) γλυκόζη για 20 λεπτά στους 37 °C με συνεχή ανάδευση.
- Το διάλυμα της πέψης (και ο ιστός, αν το μέγεθος το επιτρέπει) φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο (και ο ιστός).
- Το ίζημα που προέκυψε (μεσοθηλιακά κύτταρα) ξεπλένεται με κρύο θρεπτικό μέσο M199* και φυγοκεντρείται, όπως πριν.

*Το M199 εμπλουτίζεται με L-γλουταμίνη (2 mM), τρανσφερρίνη 5 μg/mL, ινσουλίνη 5μg/mL, υδροκορτιζόνη 0,4 μg/mL, πενικιλίνη 100 U/mL, στρεπτομυκίνη 100 mg/mL και 10% (vol/vol) ορό εμβρυϊκού μόσχου. Η L-γλουταμίνη και η υδροκορτιζόνη προστίθενται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί η εκάστοτε ποσότητα του θρεπτικού.

- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 5 ml προθερμασμένου διαλύματος M199 και τοποθετήθηκε σε φλάσκα εμβαδού 25 cm² για επώαση στους 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% O₂.
- Μετά από 2 μέρες το θρεπτικό αφαιρέθηκε, μαζί με ερυθροκύτταρα ή νεκρά κύτταρα που εναιωρούνται σε αυτό, και αντικαθίσταται από φρέσκο. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα βρίσκονταν προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας.
- Το θρεπτικό της καλλιέργειας αντικαθίσταται κάθε 2-3 μέρες. Τα κύτταρα ήταν επιμήκη αρχικά.

- Στις 10 ± 2 μέρες η επιφάνεια της φλάσκας ήταν κορεσμένη από ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα, οπότε και απέκτησαν πολυγωνικό σχήμα. Τα κύτταρα ήταν έτοιμα για πείραμα ή ανακαλλιέργεια.
- Αφαιρέθηκε το θρεπτικό και ξεπλύθηκαν μια φορά με διάλυμα PBS.
- Η φλάσκα επώαστηκε για 4-5 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου με 2mL προθερμασμένου διαλύματος ίδιας σύστασης με το διάλυμα πέψης. Αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος, διατηρώντας μια λεπτή στρώση στην επιφάνεια της φλάσκας να επωαστεί για 15 λεπτά στους 37°C , ώσπου τα κύτταρα να αποκολληθούν.
- Τα ελεύθερα κύτταρα εναιωρήθηκαν στο M199 και φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C .
- Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε με την πλάκα Neubauer.
- Για την ανακαλλιέργεια απαιτείται η πυκνότητα των κυττάρων να κυμαίνεται από 1 έως 2×10^4 κύτταρα/cm². Είναι δυνατόν να ανακαλλιεργηθούν τα ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα μέχρι τρεις φορές το πολύ. Από εκεί και πέρα αλλάζει η μορφολογία των κυττάρων, χάνουν τις ιδιότητές τους και παρατηρείται σημαντικός αριθμός γερασμένων και νεκρών κυττάρων. Φυσικά, όπως και σε κάθε απομόνωση κυττάρων πρωτογενούς σειράς, είναι δυνατό να υπάρξουν αποκλίσεις αναλόγως το δείγμα.

Η μέθοδος απομόνωσης ακολουθήθηκε ως έχει, ενώ χρειάστηκε να γίνουν ή προέκυψαν μερικές προσαρμογές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά φλάσκες με επίστρωση κολλαγόνου για την καλύτερη προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν απαραίτητη η παρουσία κολλαγόνου, καθώς η καλλιέργεια αναπτυσσόταν φυσιολογικά και χωρίς την επίστρωση αυτού. Δυσκολία προέκυψε με τον χειρισμό του ιστού, γιατί ήταν αναγκαίο να καθαριστεί από το λίπος για να απομονωθεί η διαφανής μεσοθηλιακή

μεμβράνη. Το λίπος θεωρείται ότι εμποδίζει την ενζυμική πέψη. Αυτό δεν ήταν εφικτό κάθε φορά, καθώς η μεμβράνη ήταν ιδιαίτερος εύθραυστη, παρ' όλα αυτά τελικά δεν επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό η αποδοτικότητα της απομόνωσης. Τέλος, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται εξ' ολοκλήρου τη δεύτερη μέρα από τη στιγμή της απομόνωσης και όχι την πρώτη και κατά το ήμισυ, όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο της Stylianou. Έτσι, απομακρύνθηκαν τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα εγκαίρως, διατηρήθηκε όμως ταυτόχρονα ένας πληθυσμός κυττάρων ικανός να πολλαπλασιαστεί και να σχηματίσει σφιχτές συνδέσεις μεταξύ τους. Η μόλυνση από ινοβλάστες υπήρξε ως ενδεχόμενο. Η αποφυγή έγκειται στον χρόνο πέψης, στο χειρισμό της μεμβράνης, και είναι ιδιαίτερης σημασίας ο χρόνος συλλογής του στο χειρουργείο (95).

Ανοσοφθορισμός

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεσοθηλιακών κυττάρων γίνεται με τη χρήση αντισώματος κατά της κυτοκερατίνης (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού). Αρχικά κύτταρα από το πρώτο πέρασμα τοποθετούνται σε τριβλία τα οποία περιέχουν καλυπτρίδες από γυαλί (διαμέτρου 12mm). Τα κύτταρα προσκολλώνται στις καλυπτρίδες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα βήματα της πειραματικής διαδικασίας.

- Αφαίρεση θρεπτικού μέσου
- Πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS
- Μονιμοποίηση των κυττάρων σε διάλυμα PBS-3% φορμαλδεΐδη, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση με PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά για να απομακρυνθεί η φορμαλδεΐδη

- Επώαση σε διάλυμα PBS-1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4 °C, ώστε η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή.
- Πλύση με PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Μπλοκάρισμα σε διάλυμα PBS-0.1% Triton 20-3% BSA για 1 ώρα στους 4°C
- Μεταφορά των καλυπτρίδων σε πιάτο 24 θέσεων
- Επώαση με το 1^ο αντίσωμα (Ιμονοκλωνικό αντίσωμα ποντικίου) σε αραιώση 1:50 και 1:100 : προσθήκη 35μl διαλύματος PBS-Tween 20-1%BSA/αντισώματος, για μια ώρα στους 4 °C
- Πλύσιμο 3 φορές με διάλυμα PBS-0.1%Tween 20-1%BSA
- Επώαση με 2^ο αντίσωμα (αντίσωμα κατά της IgG ποντικίου συζευγμένο με FITC) σε αραιώση 1:50 προσθήκη 25 μl διαλύματος PBS-Tween 20/1%BSA/αντισώματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύσιμο 3 φορές με διάλυμα PBS-0.1%Tween 20-1%BSA. Δεν αφαιρείται το τελευταίο ξέπλυμα
- Πλύσιμο με νερό
- Στέγνωμα των καλυπτρίδων
- Τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω από μία σταγόνα (2μl) Vectashield, το οποίο περιέχει DAPI (20μg/μl) για χρώση DNA
- Σφράγισμα των καλυπτρίδων με βερνίκι νυχιών
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού

Καλλιέργεια Ανθρώπινων Περιτοναϊκών Μεσοθηλιακών Κυττάρων σε Φίλτρα

Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε περιβάλλον τριών διαστάσεων (3D) πάνω σε πορώδεις μεμβράνες (φίλτρα), οι οποίες ήταν τοποθετημένες σε ειδικά διαμορφωμένα πηγάδια **Transwell Permeable Supports** (Corning) που επιτρέπουν τη μεταφορά

ουσιών από την κορυφαία προς την βασεοπλευρική πλευρά και το αντίθετο. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι πολωμένα και έχουν να επιδείξουν επιλεκτική έκφραση των κυτταρικών υποδοχέων της μεμβράνης. Οι σφιχτές συνδέσεις είναι σημαντικές δομές του επιθήλιου και είναι υπεύθυνες να διατηρούν την κορυφαία-βασική πολικότητα και τη δημιουργία φυσιολογικού φραγμού που αποτρέπει το μη φυσιολογικό πέρασμα μέσω της παρακυττάριας οδού (96).

Χρησιμοποιήθηκαν πολυεστερικές διαφανείς μεμβράνες 6 θέσεων, οι οποίες επιτρέπουν την παρατήρηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας στο ανάστροφο μικροσκόπιο με χαρακτηριστικά: διάμετρος μεμβράνης 12mm, μέγεθος πόρων 0,4 μm , πυκνότητα 4×10^6 πόροι/ cm^2 και επιφάνεια ανάπτυξης 1,12 cm^2 . Τα Transwell που χρησιμοποιήθηκαν είναι μια ειδική κατηγορία πηγαδιών που ονομάζονται **Snapwell** των οποίων η μεμβράνη, πάνω στην οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα, βρίσκεται σε μετακινούμενο δαχτυλίδι το οποίο έχει τη δυνατότητα να μεταφερθεί για πείραμα σε ειδικές αντλίες του Ussing chamber System (Σχήμα 3). Το πάνω πηγάδι (transwell insert) που βρίσκεται η μεμβράνη έχει χωρητικότητα 0,5 ml, ενώ το κάτω πηγάδι (plate well) στο οποίο στηρίζεται 2,5 ml.

- Προστέθηκε M199 στο πάνω και κάτω πηγάδι μια μέρα ή τουλάχιστον 2 ώρες πριν μεταφερθούν τα κύτταρα, για την καλύτερη προσκόλληση στη μεμβράνη.
- Αφαιρέθηκε το θρεπτικό και προστέθηκαν τα κύτταρα σε πυκνότητα 5×10^4 κύτταρα/ cm^2 στο πάνω πηγάδι. Είναι σημαντικό να προστίθεται το θρεπτικό πρώτα στο πάνω πηγάδι και μετά στο κάτω. Αναλόγως, να αφαιρείται το θρεπτικό πρώτα από το κάτω πηγάδι και μετά από το πάνω, ώστε να διατηρείται η δυναμική στα κύτταρα θετική, για να μην αποκολληθούν από την μεμβράνη.
- Το θρεπτικό αντικαθίσταται ανά 2 μέρες.

- Σε μια εβδομάδα περίπου φάνηκε στο μικροσκόπιο τα κύτταρα να αρχίζουν να έχουν την όψη μονοστοιβάδας.

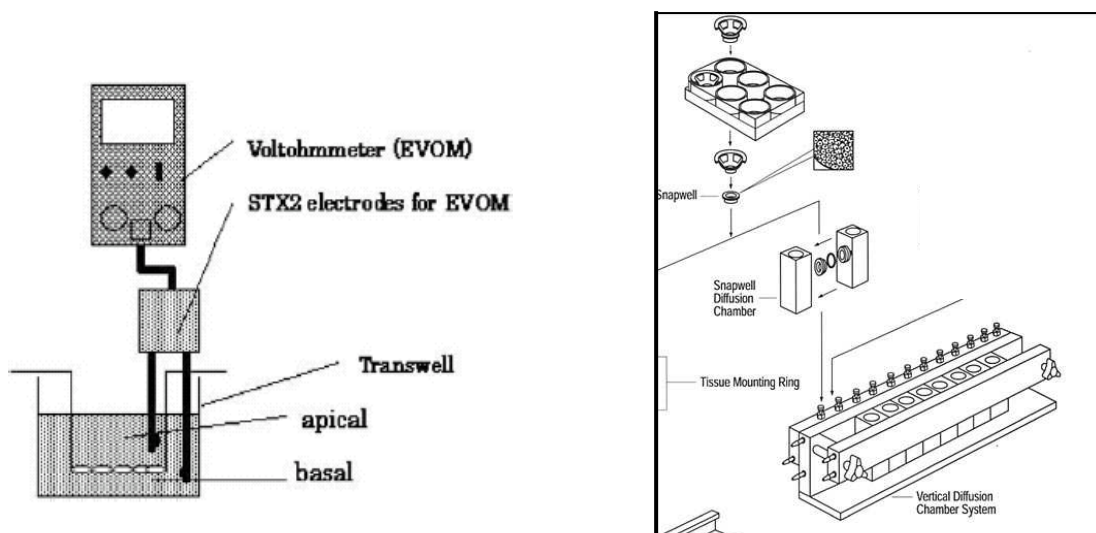
Γίνονταν καθημερινά μετρήσεις της αντίστασης (Ωcm^2) της κυτταρικής μονοστοιβάδας με τη συσκευή EVOMX και το ηλεκτρόδιο STX2 (World Precision Instruments, WPI) (Σχήμα 8). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής.

- Μεταφέρθηκε το πιάτο που περιείχε τα έξι πηγάδια των Snapwells έξω από κλίβανο σε στείρες συνθήκες, να στεθεροποιηθεί το θρεπτικό σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Πάντα διατηρείται η ίδια χρονική περίοδος, γιατί η θερμοκρασία επηρεάζει την ενεργητική μεταφορά ιόντων.
- Αποστειρώθηκαν τα ηλεκτρόδια σε διάλυμα αιθανόλης 70%.
- Μετρήθηκε η διαμεσοθηλιακή αντίσταση σε κάθε πηγάδι που περιείχε κύτταρα και σε ένα που δεν είχε και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό.

Ο υπολογισμός της αντίστασης έγινε με την παρακάτω εξίσωση

Αντίσταση ανά μονάδα επιφάνειας = Αντίσταση (Ω) x Λειτουργική μονάδα επιφάνειας (cm^2). Η πραγματική αντίσταση υπολογίζεται αν αφαιρεθεί η αντίσταση του τυφλού.

Όταν η τιμή της αντίστασης έφτασε σε πλατώ, τότε οι μεμβράνες με τα κύτταρα ήταν σκόπιμο να μεταφερθούν στους ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους του Ussing για πειράματα διαπερατότητας.



Σχήμα 8 Η συσκευή EVOMX και τα ηλεκτρόδια STX2 (αριστερά). Τα πηγάδια Snapwells και το σύστημα Ussing που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη διαπερατότητας στα κύτταρα (δεξιά)

Πειραματική Διαδικασία Διαπερατότητας Κυττάρων

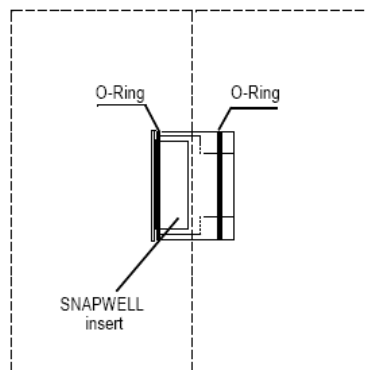
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο σύστημα Ussing chamber με αυτό που έγινε η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη του ιστού. Αυτό που αλλάζει είναι οι ημιθάλαμοι, οι οποίοι είναι έτσι διαμορφωμένοι ώστε να δέχονται τα Snapwells. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των φίλτρων και οι προσαρμογές που έγιναν στη μελέτη διαπερατότητας για τα κύτταρα είναι οι εξής:

- Μία ημέρα πριν το πείραμα το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και προστέθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς υδροκορτιζόνη (κορτικοστεροειδές), ώστε να μην υπάρξει πιθανή παρεμπόδιση των θέσεων που πιθανά να καταληφθούν από τη δεξαμεθαζόνη.
- Αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από τα πηγάδια, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα.

- Ξεπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα Ringer' lactate που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα στο Ussing. Το διάλυμα έχει σύσταση 112 mmol/L NaCl, 4,56 mmol/L KCl, 25 mmol/L NaHCO₃, 0,6 mmol/L MgSO₄, 5,55 mmol/L γλυκόζη και 1 mmol/L γλουταθειόνη που προστίθεται κάθε φορά λίγο πριν διεξαχθεί το πείραμα. Το διάλυμα αυτό είναι διαφορετικής σύστασης, γιατί αποδίδει σταθερότητα στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν (97).
- Πριν αρχίσουν, τα πειράματα το σύστημα είχε βαθμονομηθεί με ένα φίλτρο χωρίς κύτταρα.

Κατά τη συναρμολόγηση των ημιθαλάμων οι δύο δακτύλιοι (O-Ring) παραμένουν.

(Σχήμα 9)



Σχήμα 9 Σχηματική αναπαράσταση των δύο ημιθαλάμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη διαπερατότητας με κύτταρα

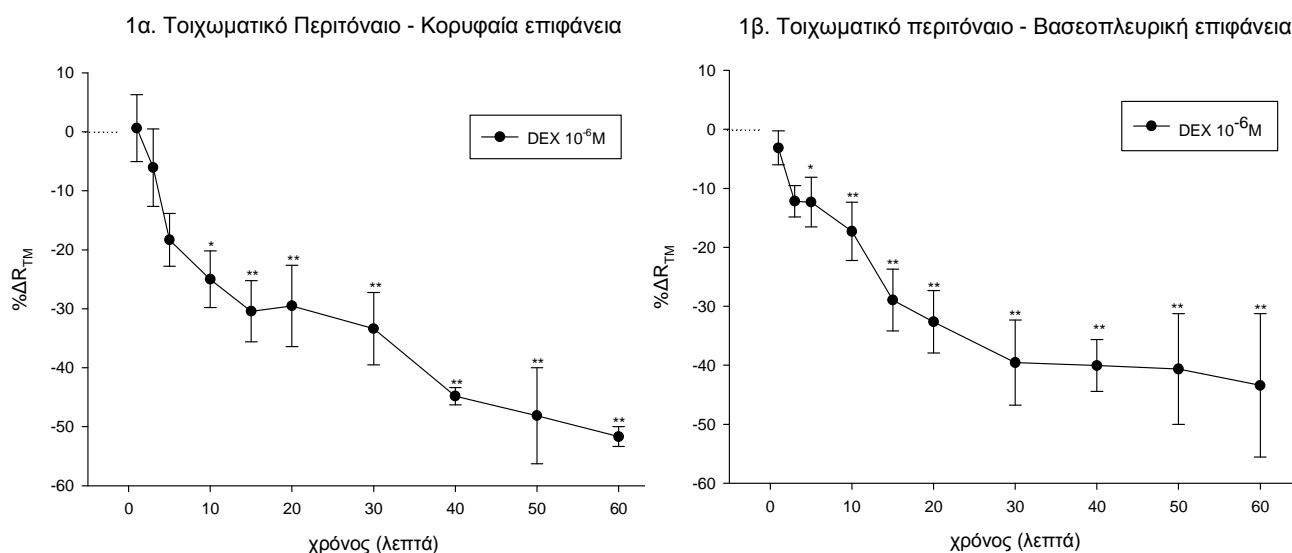
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ 1^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΕ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΙΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

Επίδραση της Δεξαμεθαζόνης στο Περιτόναιο Προβάτου

Σύμφωνα με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η δεξαμεθαζόνη (DEX) σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M$ ως $10^{-9}M$ προκαλεί μείωση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση (R_{TM}) του περιτοναίου προβάτου. Η μείωση ξεκινάει από το πρώτο λεπτό και γίνεται στατιστικώς σημαντική από το 3^ο – 15^ο λεπτό.

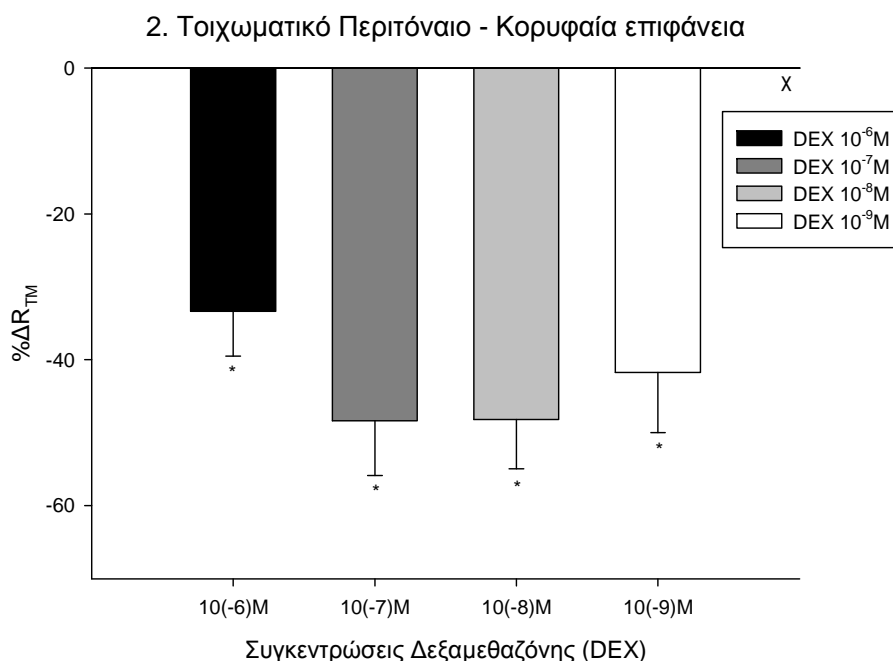
Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη της δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στο τοιχωματικό περιτόναιο η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε στο 60^ο λεπτό και ήταν $51,67 \pm 1,67\%$ για την κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 1α). Στη βασεοπλευρική παρατηρήθηκε και πάλι μέγιστη ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ στο 60^ο λεπτό και είχε τιμή $43,41 \pm 12,16\%$ (Διάγραμμα 1β).



Διάγραμμα 1. Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στην κορυφαία (1α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (1β) στη διάρκεια 1 ώρας.

* $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (**).

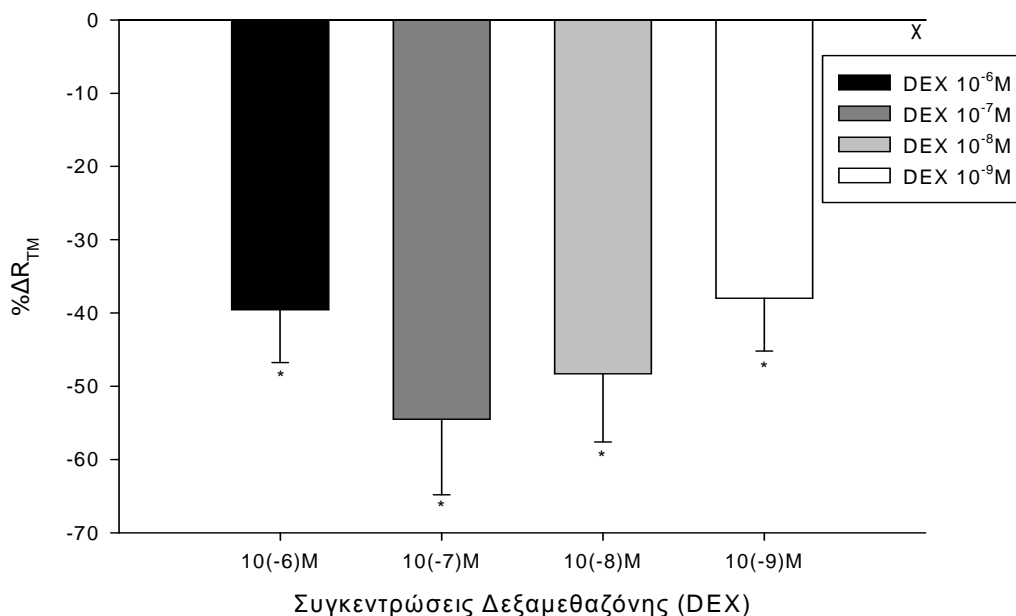
Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2) φαίνεται η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από $10^{-6}M$ έως $10^{-9}M$. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ βρέθηκε στις συγκεντρώσεις $10^{-7}M$ και $10^{-8}M$ με παραπλήσιες τιμές.



Διάγραμμα 2 Σύγκριση των ποσοστιαίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M - 10^{-9}M$. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ το 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από $10^{-6}M$ έως $10^{-9}M$ περιγράφεται στο διάγραμμα 3. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε σε συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης $10^{-7}M$ με ποσοστό $54,48 \pm 10,32\%$.

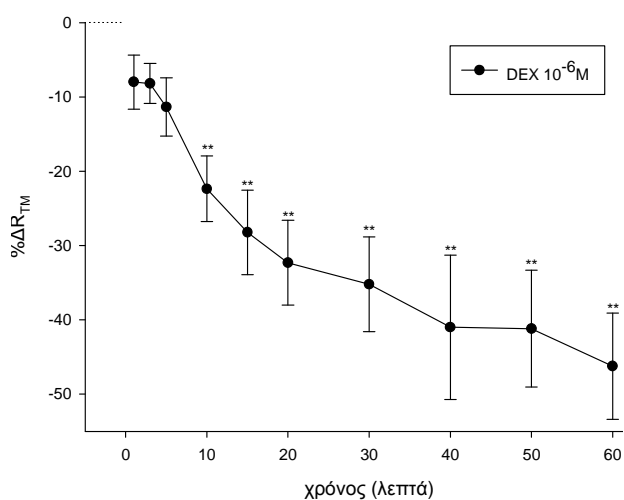
3. Τοιχωματικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



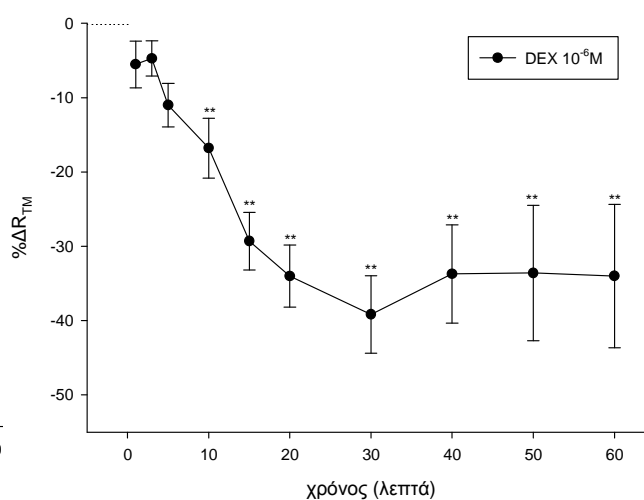
Διάγραμμα 3 Σύγκριση των ποσοστιαίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις 10⁻⁶M - 10⁻⁹M. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στο σπλαχνικό περιτόναιο, η προσθήκη της δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση 10⁻⁶M στην κορυφαία επιφάνεια είχε σαν αποτέλεσμα η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} να καταγραφεί στο 60^ο λεπτό ως 46,23±7,14% (Διάγραμμα 4α). και στο 30^ο λεπτό για τη βασεοπλευρική επιφάνεια ως 39,17±5,21% (Διάγραμμα 4β).

4α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



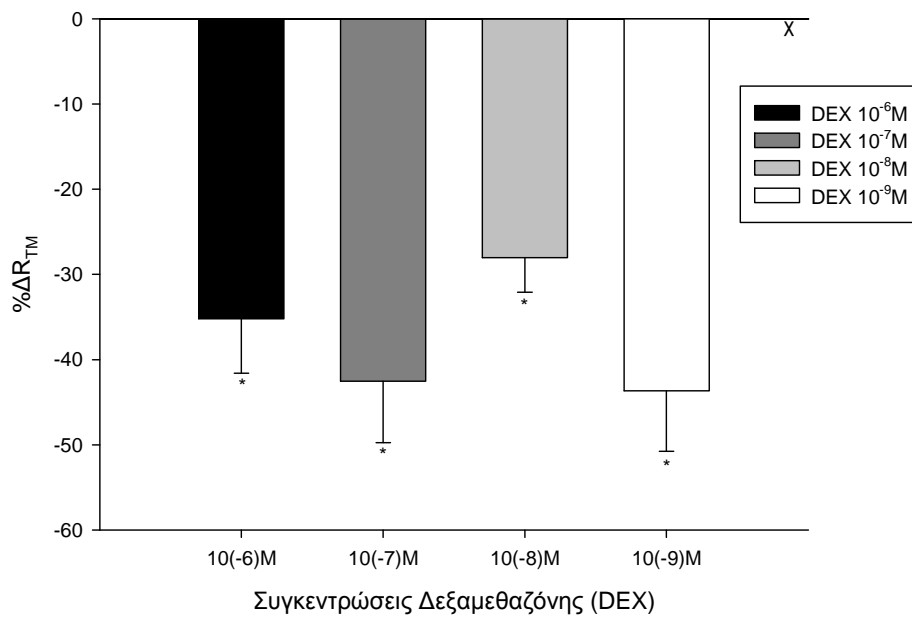
4β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



Διάγραμμα 4. Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στην κορυφαία (4α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (4β) στη διάρκεια 1 ώρας. $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . ("").

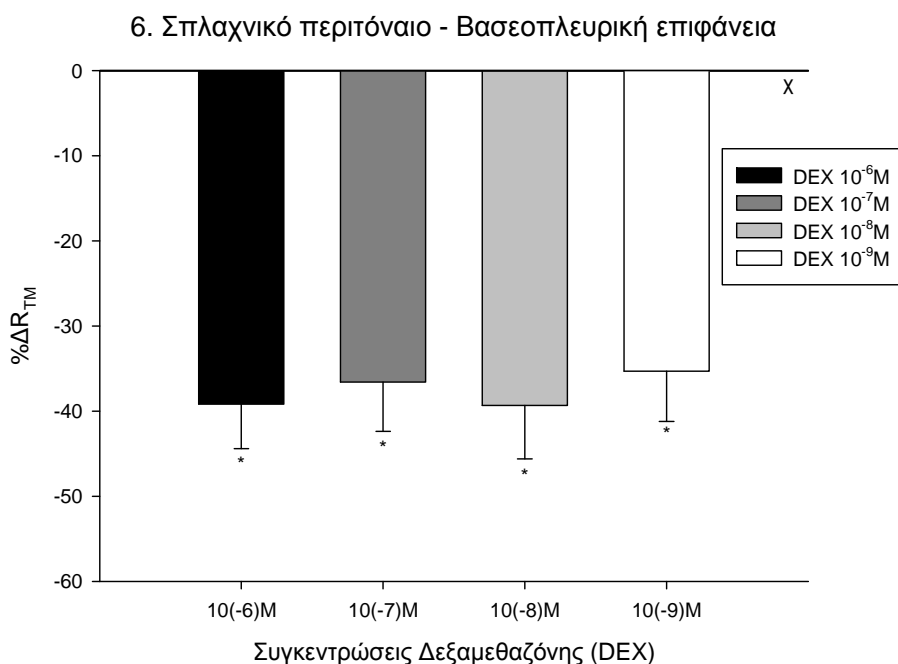
Στο διάγραμμα 5 φαίνεται η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από $10^{-6}M$ έως $10^{-9}M$. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} που καταγράφηκε ήταν $42,52 \pm 7,23\%$ και αντιστοιχεί σε συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης $10^{-7}M$.

5. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



Διάγραμμα 5 Σύγκριση των ποσοστιαίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M - 10^{-9}M$. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στη βασειπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ το 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις από $10^{-6}M$ έως $10^{-9}M$ περιγράφεται στο διάγραμμα 6. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ που καταγράφηκε είχε παρόμοια ποσοστά και στις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της δεξαμεθαζόνης.



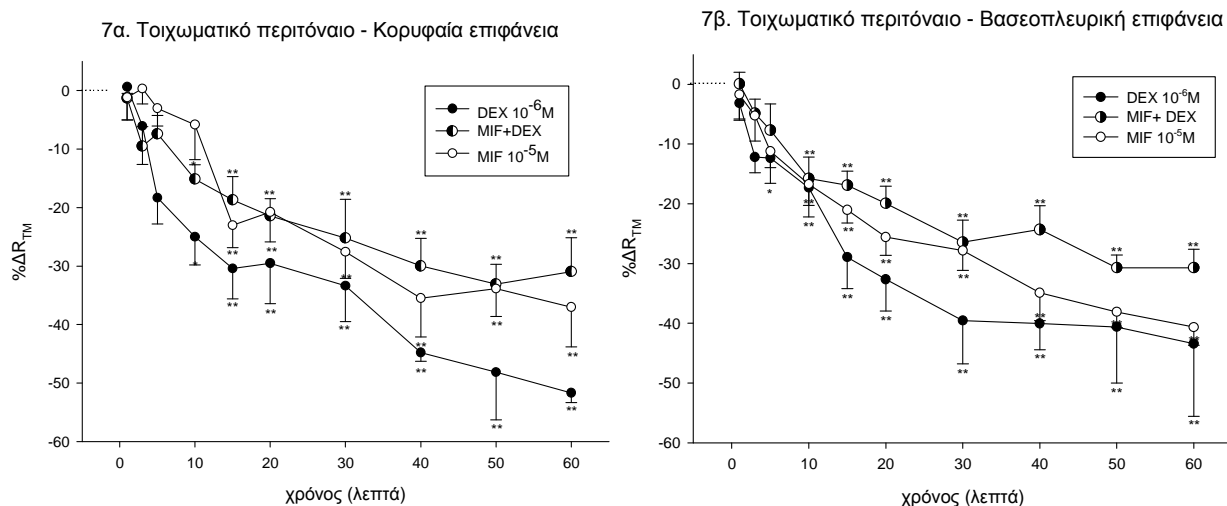
Διάγραμμα 6 Σύγκριση των ποσοστιαίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκεντρώσεις $10^{-6}M - 10^{-9}M$. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Επίδραση της Μιφεπριστόνης και της Σπιρονολακτόνης στη δράση της δεξαμεθαζόνης

Συνολικά, η προσθήκη της μιφεπριστόνης (MIF) σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με την δεξαμεθαζόνη $10^{-6}M$ είχε σαν αποτέλεσμα τη μερική αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης, στατιστικώς σημαντική μέσα στα πρώτα 10 λεπτά. Οι μέγιστες ποσοστιαίες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκαν μετά το 40^ο λεπτό.

Στο τοιχωματικό περιτόναιο το ποσοστό έφτασε την τιμή του $33,08 \pm 3,42\%$ στην κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 7α) και $30,7 \pm 2,11\%$ βασεοπλευρικά (Διάγραμμα 7β) μία ώρα μετά από την προσθήκη του συνδυασμού μιφεπριστόνης και δεξαμεθαζόνης.

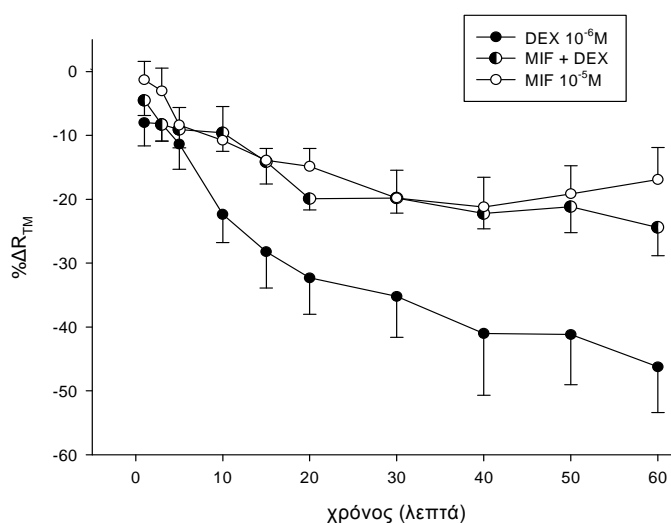
Όταν προστέθηκε ο αναστολέας μόνος του η μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή της R_{TM} ήταν $37 \pm 6,81\%$ στην κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 7α), $40,63 \pm 3,03\%$ βασεοπλευρικά (Διάγραμμα 7β) και καταγράφηκε το 60^ο λεπτό.



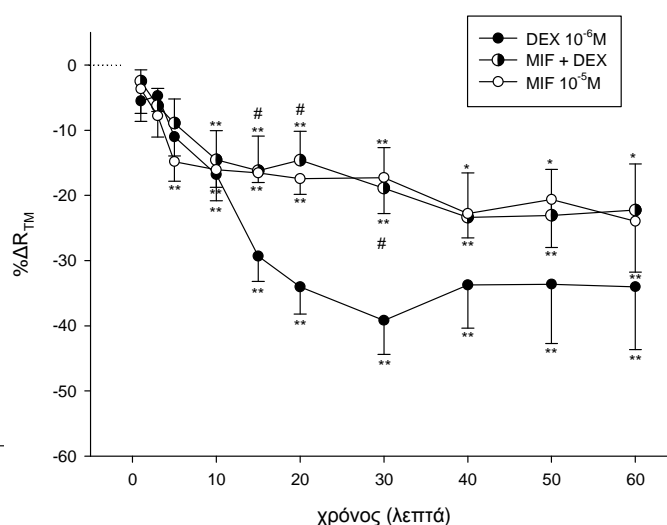
Διάγραμμα 7 Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), μιφεπριστόνης ($10^{-5}M$), και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (7α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (7β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (···)

Στο σπλαχνικό περιτόναιο και στην κορυφαία επιφάνεια η μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή, $\% \Delta R_{TM}$, ήταν $24,39 \pm 4,44\%$ το 60^ο λεπτό, ενώ η δράση του αναστολέα μοναχού του ακολούθησε με $21,19 \pm 4,66\%$ το 40^ο λεπτό (Διάγραμμα 8α). Αντίστοιχα στη βασεοπλευρική επιφάνεια τα ποσοστά πήραν τιμή $23,37 \pm 6,8\%$ το 40^ο λεπτό και $23,96 \pm 7,8\%$ το 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 8β).

8α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



8β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια

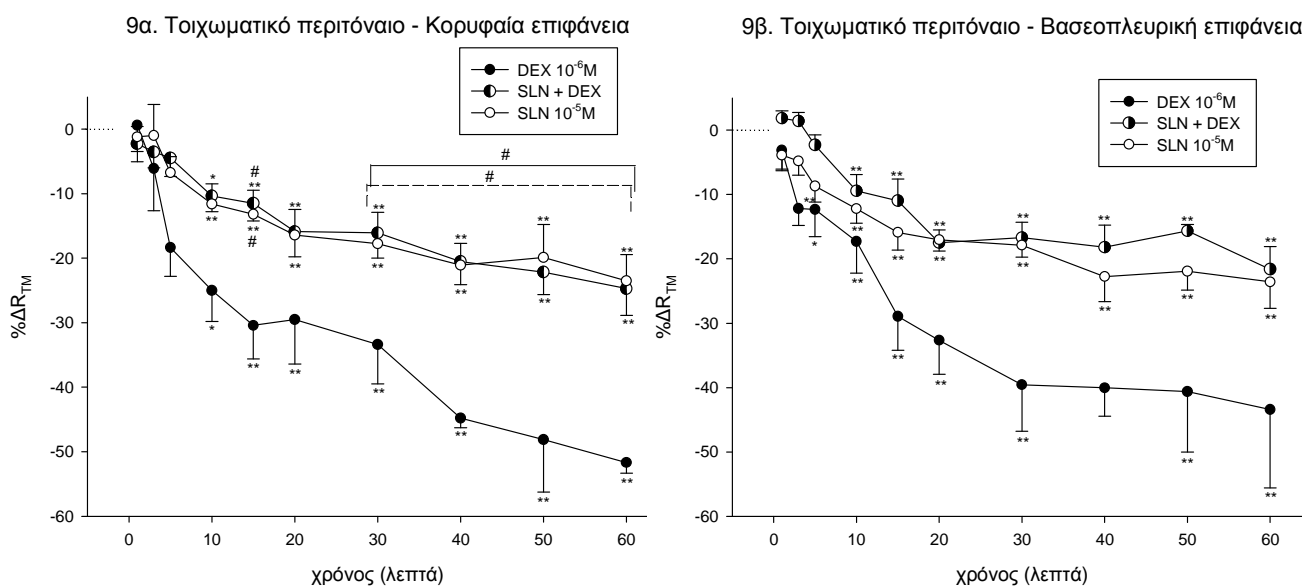


Διάγραμμα 8 Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), μιφεπριστόνης ($10^{-5}M$), και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (8α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (8β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (---), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Η σπιρονολακτόνη (SLN) είναι ανταγωνιστής των αλατοκορτικοειδών υποδοχέων της δεξαμεθαζόνης και χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $10^{-5}M$. Σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη ($10^{-6}M$) προκάλεσε μερική αναστολή της δράσης της, στατιστικώς σημαντική από το 10^0 λεπτό και μετά. Οι μέγιστες ποσοστιαίες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκαν μετά το 40^0 λεπτό.

Στο τοιχωματικό περιτόναιο η μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή, $\% \Delta R_{TM}$ έφτασε την τιμή του $24,71 \pm 4,16\%$ στην κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 9α) και $21,61 \pm 3,54\%$ βασεοπλευρικά (Διάγραμμα 9β) μία ώρα μετά από την προσθήκη του συνδυασμού. Η επίδραση της σπιρονολακτόνης επέφερε μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή της R_{TM}

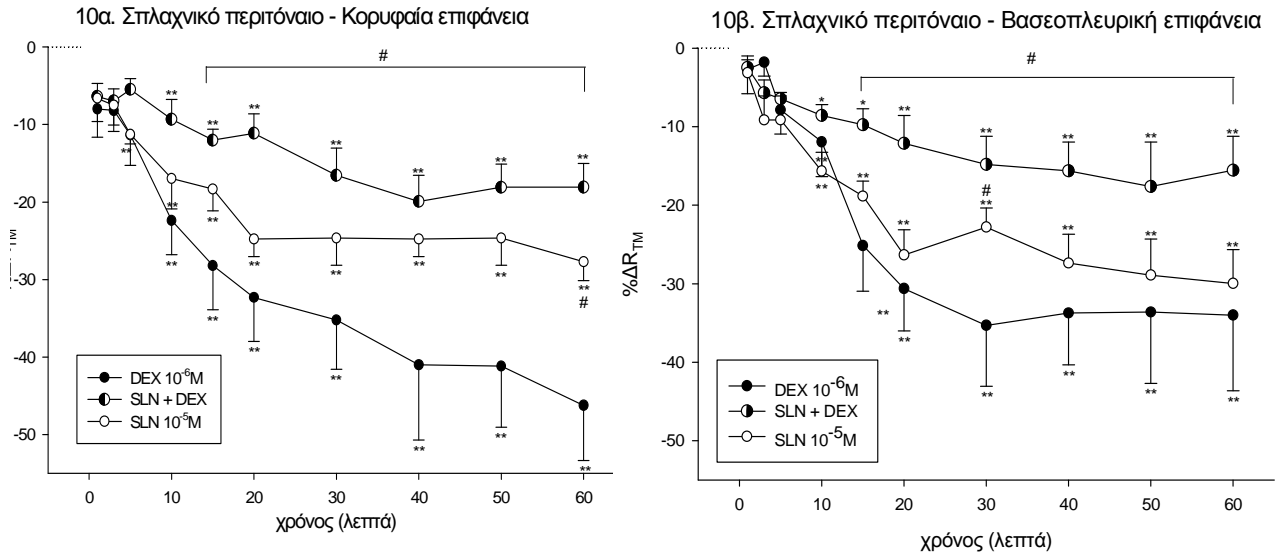
23,51±4,08% στην κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 9α) και 23,57±4,07% βασηοπλευρικά (Διάγραμμα 9β) στο 60^ο λεπτό.



Διάγραμμα 9 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), σπιρονολακτόνης ($10^{-5}M$), και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (11α) και βασηοπλευρική επιφάνεια (11β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (···), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου, η μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή % ΔR_{TM} ήταν 19,94±3,37% το 40^ο λεπτό για τον συνδυασμό σπιρονολακτόνης/δεξαμεθαζόνης, ενώ η σπιρονολακτόνη από μόνη της επέφερε μέγιστη μείωση το 60^ο λεπτό που ήταν 27,71±2,42% (Διάγραμμα 10α). Στη βασηοπλευρική επιφάνεια ο συνδυασμός είχε σαν αποτέλεσμα τη μερική αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης με μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή % ΔR_{TM} 17,6±5,64%

που καταγράφηκε το 50^ο λεπτό, ενώ ο ανταγωνιστής από μόνος του επέφερε μέγιστη $\% \Delta R_{TM}$ 29,97±4,29% στο τέλος του πειράματος της μίας ώρας (Διάγραμμα 10β).



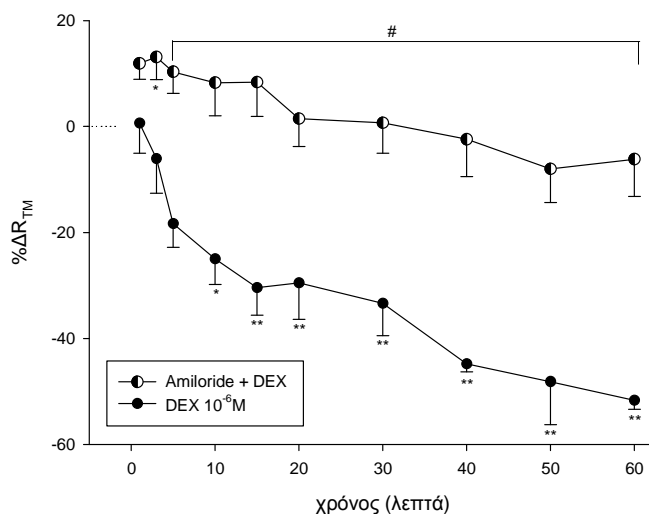
Διάγραμμα 10 Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), σπιρονολακτόνης ($10^{-5}M$), και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (10α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (12β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Επίδραση της αμιλορίδης και του EIPA στη δράση της δεξαμεθαζόνης

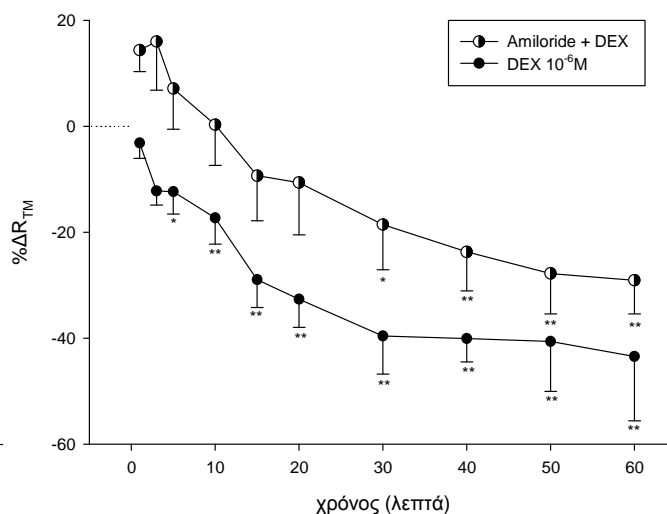
Η αμιλορίδη (10^{-5}M), ειδικός αναστολέας των διαύλων Na^+ , προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη και είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της. Στην κορυφαία πλευρά του περιτοναίου παρατηρήθηκε αναστροφή της επίδρασης της δεξαμεθαζόνης, δηλαδή αύξηση της R_{TM} στατιστικώς σημαντική στα πρώτα πέντε λεπτά και στη συνέχεια αναστολή, η οποία διήρκησε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Για το τοιχωματικό περιτόναιο η μέγιστη στατιστικώς σημαντική ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{\text{TM}}$ που προέκυψε από τον συνδυασμό της δεξαμεθαζόνης με την αμιλορίδη καταγράφηκε στο 3ο λεπτό και ήταν $13.09 \pm 4.27\%$ στην κορυφαία πλευρά (Διάγραμμα 11α). Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού αμιλορίδης/δεξαμεθαζόνης βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης στη μεγαλύτερη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 11α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου παρατηρήθηκε αύξηση της R_{TM} στα πρώτα 5 λεπτά που δεν ήταν στατιστικώς σημαντική και στη συνέχεια μερική αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης. Η μέγιστη αύξηση $\% \Delta R_{\text{TM}}$ καταγράφηκε στο 3^ο λεπτό και ήταν $16 \pm 9.13\%$ και η μέγιστη ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{\text{TM}}$ έφτασε το $29.05 \pm 6.37\%$ στο 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 11β).

11α. Τοιχωματικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



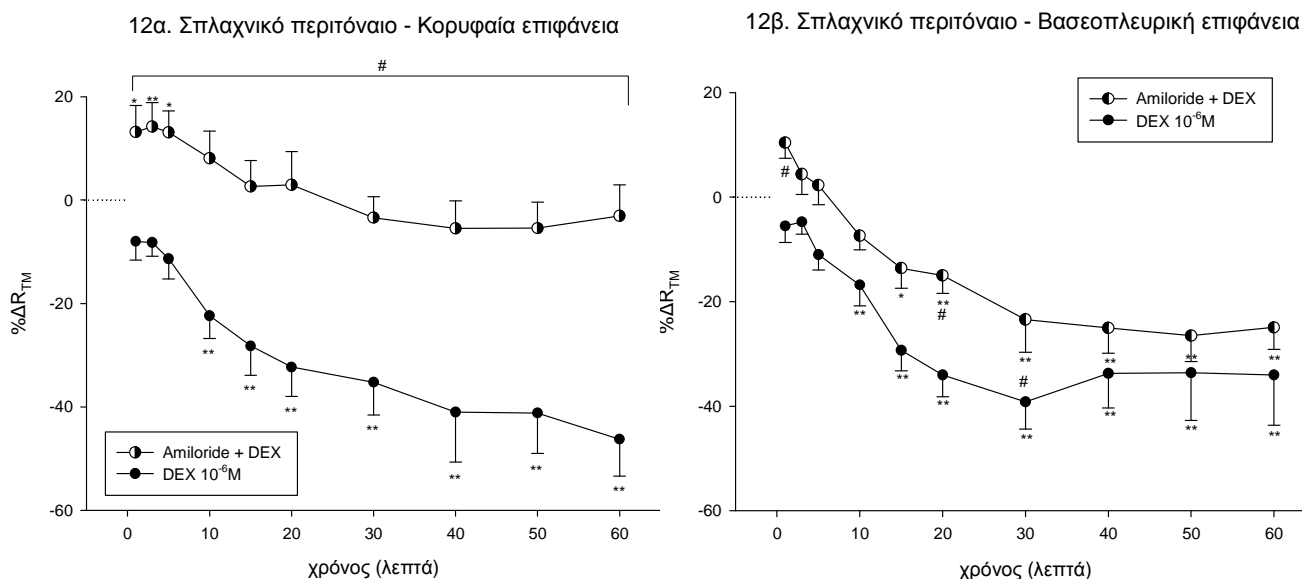
11β. Τοιχωματικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



Διάγραμμα 11 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), και του συνδυασμού αμιλοριδης ($10^{-5}M$)/δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία (11α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (11β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (··), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Στο σπλαχνικό περιτόναιο και στην κορυφαία επιφάνεια παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της R_{TM} τα πρώτα πέντε λεπτά από την προσθήκη του συνδυασμού αμιλοριδης/δεξαμεθαζόνης με μέγιστη στατιστικώς σημαντική ποσοστιαία αύξηση $\% \Delta R_{TM}$ $14,22 \pm 4,65\%$ το 3^ο λεπτό (Διάγραμμα 12α). Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας υπήρξε πλήρης αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού αμιλοριδης/δεξαμεθαζόνης βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης σε κάθε χρονική στιγμή (Διάγραμμα 12α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου καταγράφηκε αύξηση τα πρώτα πέντε λεπτά του πειράματος που δεν είναι όμως στατιστικώς σημαντική. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μερική αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης με μέγιστη στατιστικώς σημαντική

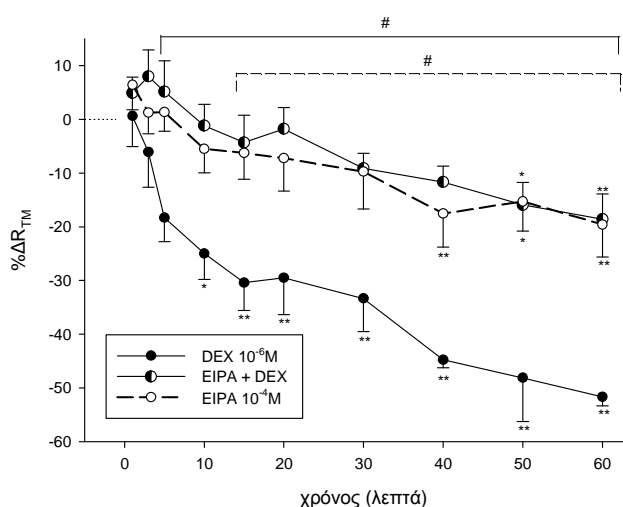
ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ $24,92 \pm 4,17\%$ στο τέλος του πειράματος από την προσθήκη του συνδυασμού (Διάγραμμα 12β).



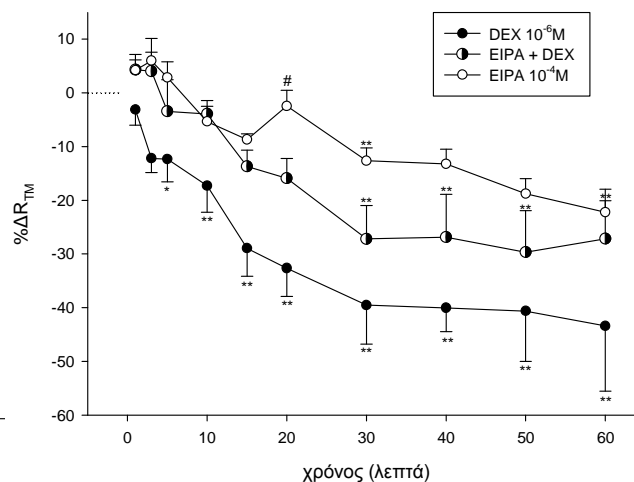
Διάγραμμα 12 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης (10^{-6}) και του συνδυασμού αμιλοριδης ($10^{-5}M$)/δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία (12α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (14) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Ο αντιμεταφορέας των διαύλων $Na^+ - H^+$, EIPA, σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ και σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη ανέστειλε τη δράση της στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου. Η αναστολή ήταν στατιστικώς σημαντική σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης από το 5^ο λεπτό μέχρι το πέρας του πειράματος (Διάγραμμα 13α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια παρατηρήθηκε μερική αναστολή της δράση της δεξαμεθαζόνης με μέγιστη στατιστικώς σημαντική ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ $29,66 \pm 7,74\%$ στο 50^ο λεπτό (Διάγραμμα 13β).

13α. Τοιχωματικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



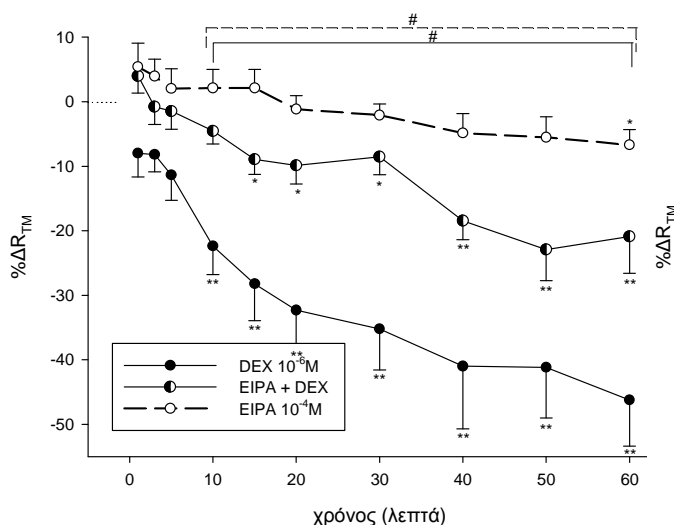
13β. Τοιχωματικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



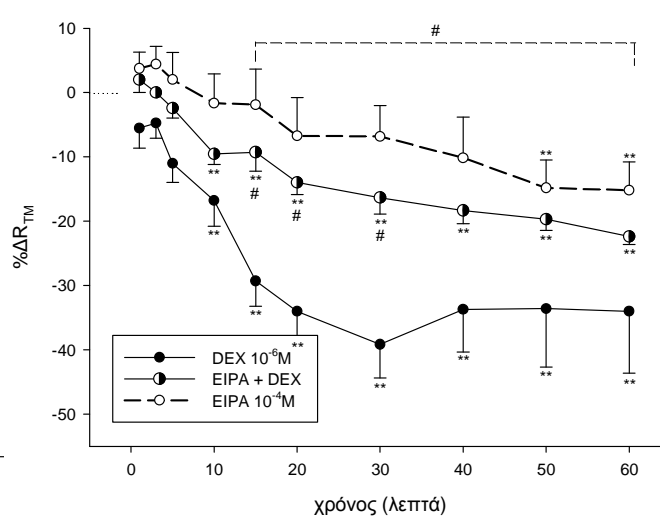
Διάγραμμα 13 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), EIPA($10^{-4}M$) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (13α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (13β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Στην κορυφαία πλευρά του σπλαχνικού περιτοναίου παρατηρήθηκε μερική αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης με μέγιστη στατιστικώς σημαντική ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ $22,9 \pm 4,83\%$ στο 50° λεπτό μετά την προσθήκη του συνδυασμού EIPA/δεξαμεθαζόνης. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού και της επίδρασης του EIPA βρέθηκε επίσης στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης από το 10° λεπτό και μέχρι το πέρας του πειράματος (Διάγραμμα 14α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου παρατηρήθηκε μερική αναστολή με μέγιστη στατιστικώς σημαντική ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ $22,39 \pm 1,23\%$ στο 60° λεπτό σημαντική αναστολή σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης (Διάγραμμα 14β).

14α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



14β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



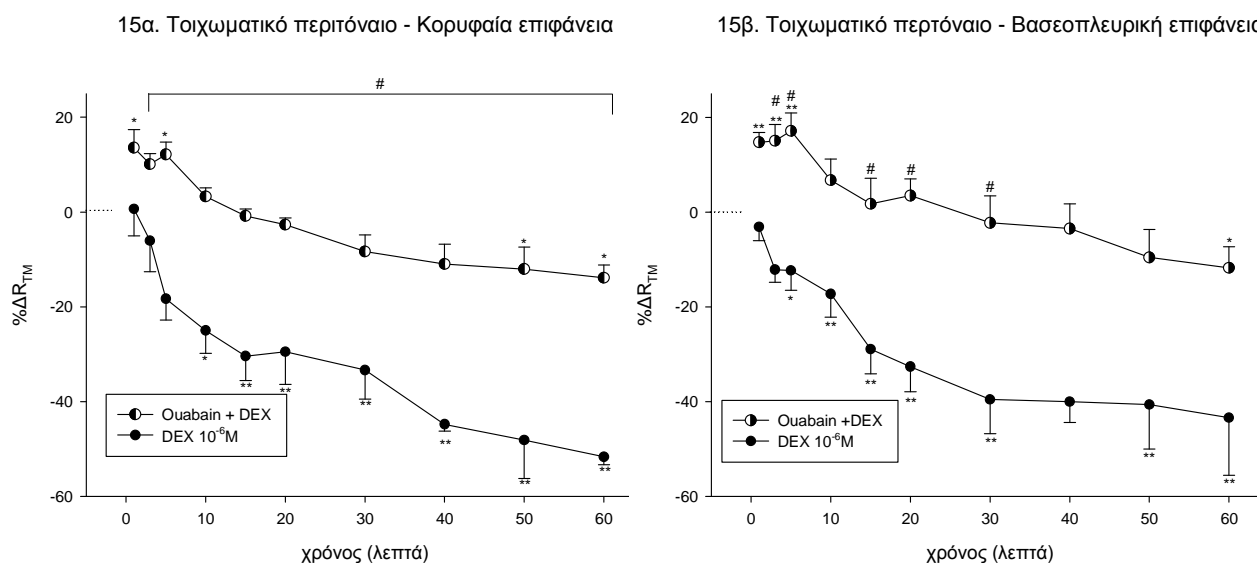
Διάγραμμα 14 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), EIPA($10^{-4}M$) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (14α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (14β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (···), # $p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Επίδραση της ουαμπαΐνης στη δράση της δεξαμεθαζόνης

Η ουαμπαΐνη, γνωστός αναστολέας της αντλίας Na^+/K^+ , χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ και σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη ανέστειλε πλήρως τη δράση της σε όλες τις επιφάνειες του περιτοναίου.

Συγκεκριμένα, στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε το 1^ο λεπτό από την προσθήκη του συνδυασμού ουαμπαΐνης/δεξαμεθαζόνης και ήταν $13,57 \pm 3,82\%$. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης ήταν στατιστικώς σημαντική διαφορά σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 15α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού

περιτοναίου η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της $\% \Delta R_{TM}$ παρατηρήθηκε το 3^ο λεπτό και είχε τιμή $17,13 \pm 3,77\%$ (Διάγραμμα 15β).

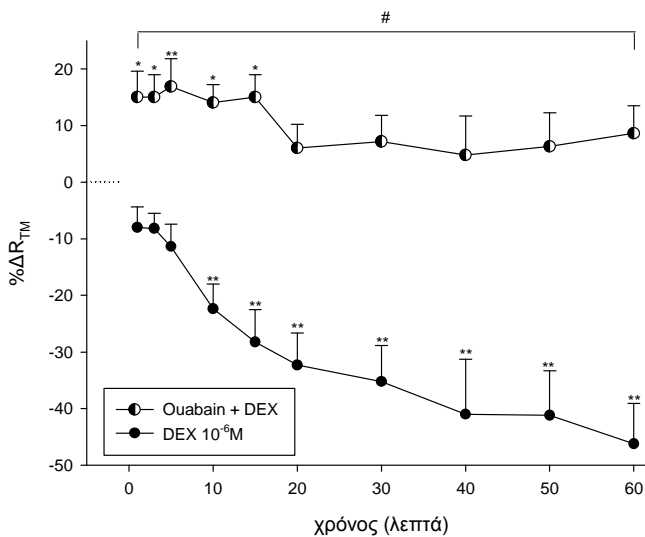


Διάγραμμα 15 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$) και του συνδυασμού ουαμπαΐνης ($10^{-4}M$)/δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία (15α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (15β) στη διάρκεια 1 ώρας. $*p < 0,05$ & $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (···), $\# p < 0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

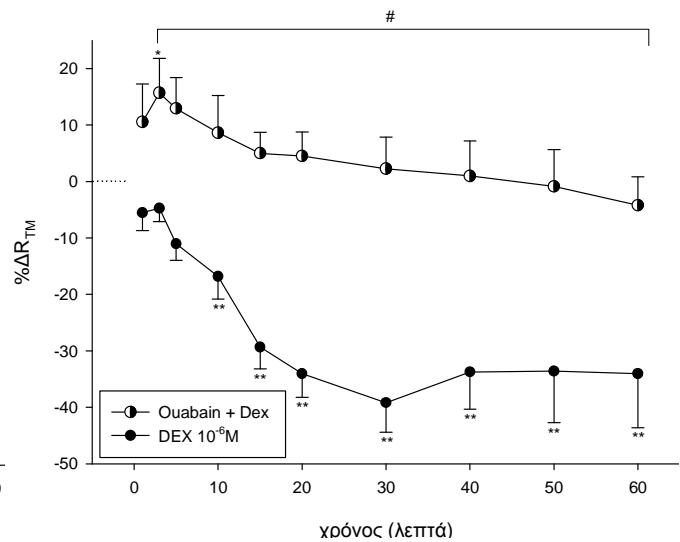
Στο σπλαχνικό περιτόναιο, η επίδραση του συνδυασμού της ουαμπαΐνης με τη δεξαμεθαζόνη είχε σαν αποτέλεσμα στην κορυφαία επιφάνεια την πλήρη αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης και μάλιστα την αύξηση της R_{TM} σε όλη τη διάρκεια της μιας ώρας. Η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε στο 5^ο λεπτό για την κορυφαία επιφάνεια και είχε τιμή $16,89 \pm 4,93\%$. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης βρέθηκε να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε κάθε χρονική στιγμή (Διάγραμμα 16α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της $\% \Delta R_{TM}$ ήταν $15,71 \pm 6,13\%$ και το 3^ο λεπτό από την

προσθήκη του συνδυασμού. Και σε αυτή την περίπτωση μεταξύ της δράσης του συνδυασμού σε σχέση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική διαφορά σχεδόν σε κάθε χρονική στιγμή (Διάγραμμα 16β).

16α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



16β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια

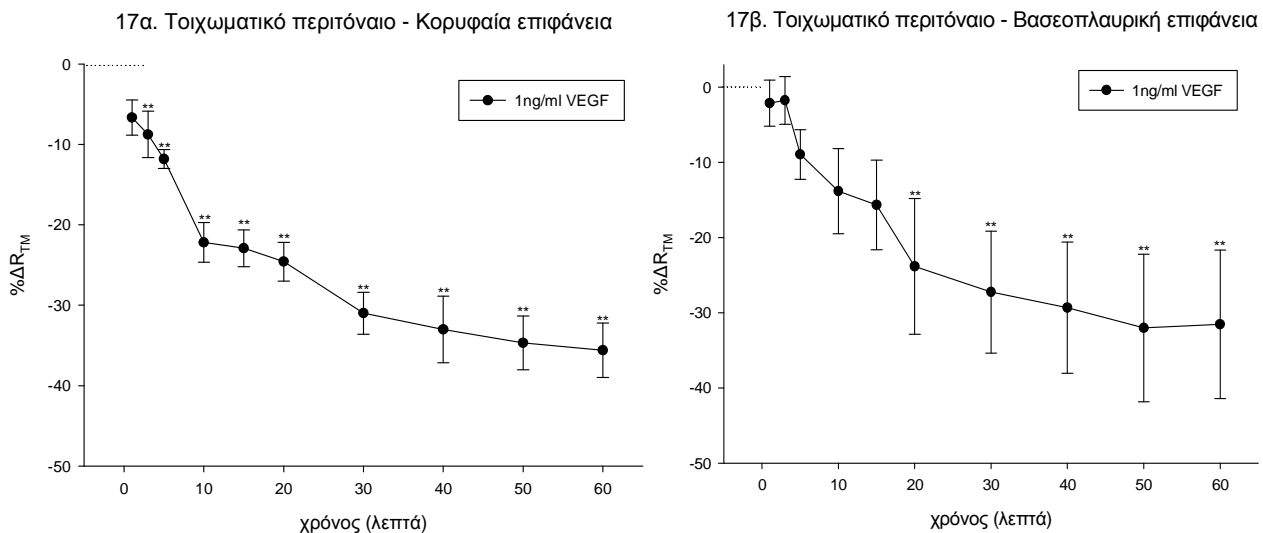


Διάγραμμα 16 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης (10⁻⁶M, και του συνδυασμού ουαπαΐνης (10⁻⁴M)/δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία (16α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (16β) στη διάρκεια 1 ώρας. *p<0,05 & **p<0,01 σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (···), # p<0,05 σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Επίδραση του VEGF στο Περιτόναιο Προβάτου

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) στις συγκεντρώσεις 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml και 20ng/ml προκαλεί μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης R_{TM} του περιτοναίου προβάτου. Η μείωση είναι σταδιακή και διαρκεί μέχρι το πέρας του πειράματος της μιας ώρας.

Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση του 1ng/ml ο VEGF προκαλεί στατιστικώς σημαντική μείωση της αντίστασης που για την κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου ξεκινάει από το 3^ο λεπτό. Η μέγιστη ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ παρατηρήθηκε στο 60^ο λεπτό και ήταν $35,6 \pm 3,39\%$ (Διάγραμμα 17α). Τα αντίστοιχα ποσοστά για τη βασεοπλευρική επιφάνεια βρέθηκαν $32,03 \pm 9,81\%$ (Διάγραμμα 17β).

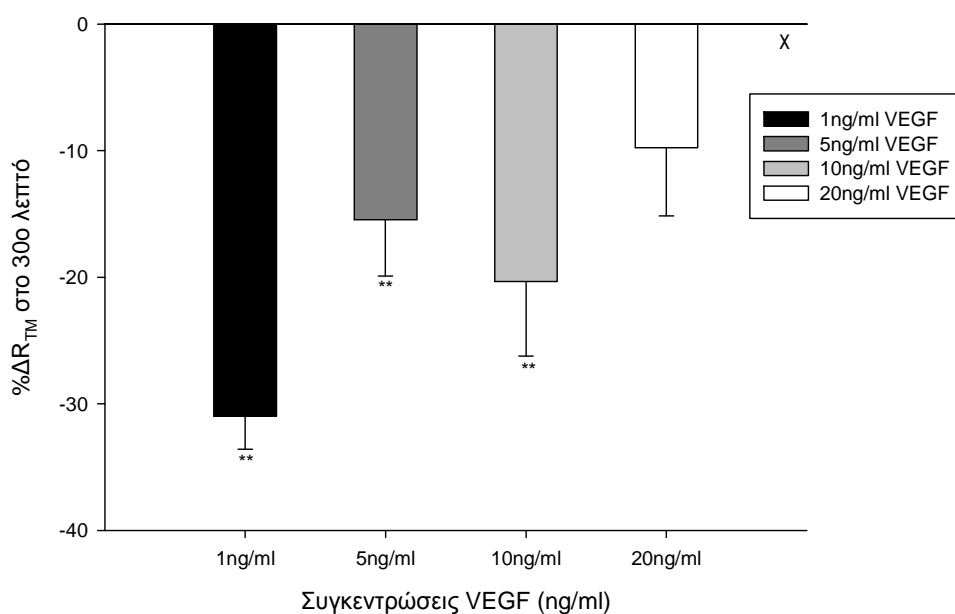


Διάγραμμα 17. Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία (17α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (17β) στη διάρκεια 1 ώρας.

** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (···).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 18) φαίνεται η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη του VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. Φαίνεται ότι η επίδραση του VEGF δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του. Για το 30^ο λεπτό, η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ που καταγράφηκε ήταν $30,97 \pm 2,61\%$ και αντιστοιχεί σε συγκέντρωση VEGF 1ng/ml, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 20ng/ml το ποσοστό ήταν μόλις $9,76 \pm 5,37\%$.

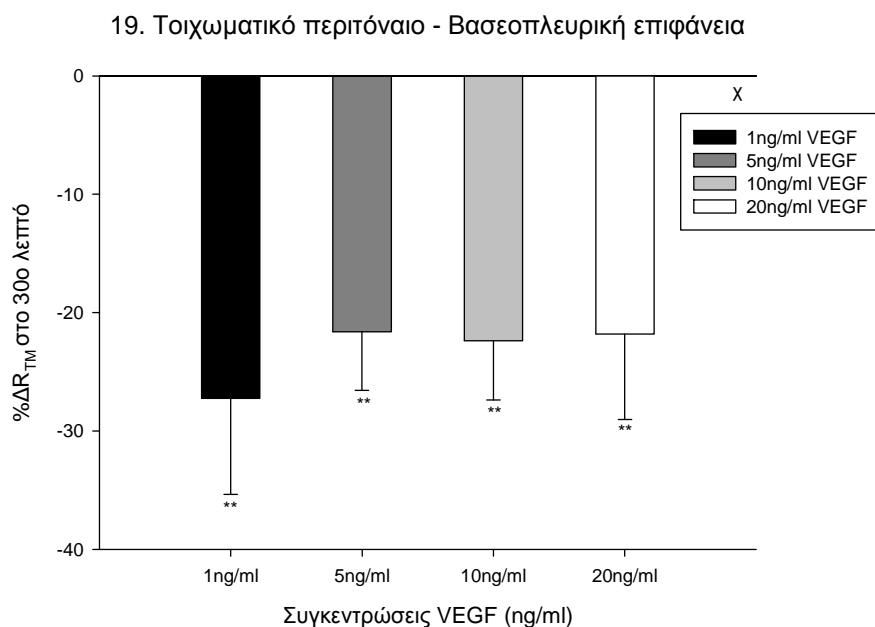
18. Τοιχωματικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



Διάγραμμα 18 Σύγκριση των ποσοστιαίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στη βασειπλευρική επιφάνεια (Διάγραμμα 19) του τοιχωματικού περιτοναίου η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ προέκυψε από

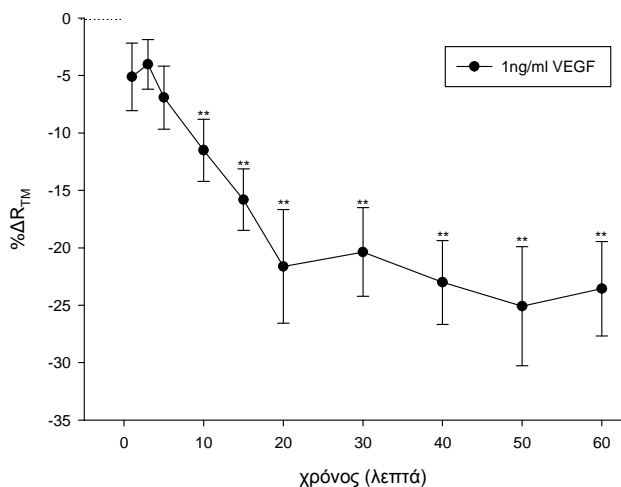
τη δράση του VEGF στη μικρότερη συγκέντρωση του 1ng/ml με τιμή $27,27 \pm 8,12\%$ για το 30^ο λεπτό. Στις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις τα ποσοστά ήταν παραπλήσια.



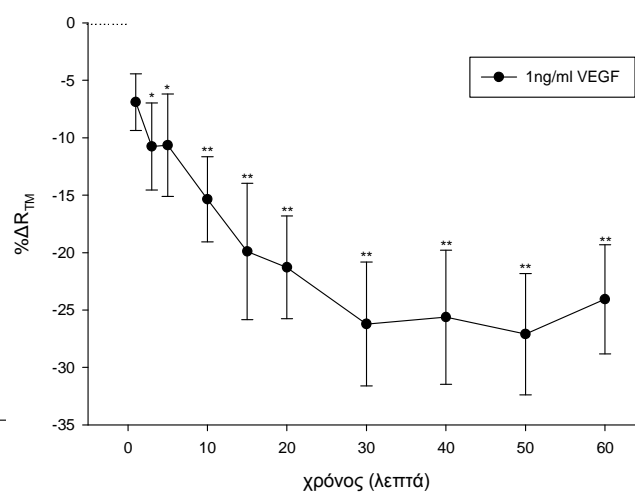
Διάγραμμα 19 Σύγκριση των ποσοστών μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στο σπλαχνικό περιτόναιο η δράση του VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml είχε σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή και παρατεταμένη μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης από τα πρώτα λεπτά της δράσης και μέχρι το τέλος του πειράματος της μίας ώρας. Για την κορυφαία επιφάνεια η μείωση παρουσίαζε στατιστικώς σημαντικά ποσοστά από το 10^ο λεπτό και μέγιστη ποσοστιαία μείωση $\% \Delta R_{TM}$ το 50^ο λεπτό με τιμή $25,08 \pm 5,19\%$ (Διάγραμμα 20α). Για τη βασεοπλευρική επιφάνεια στατιστικώς σημαντικές τιμές παρατηρήθηκαν από το 3^ο λεπτό και μέγιστη $27,09 \pm 5,29\%$ το 50^ο (Διάγραμμα 20β).

20α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



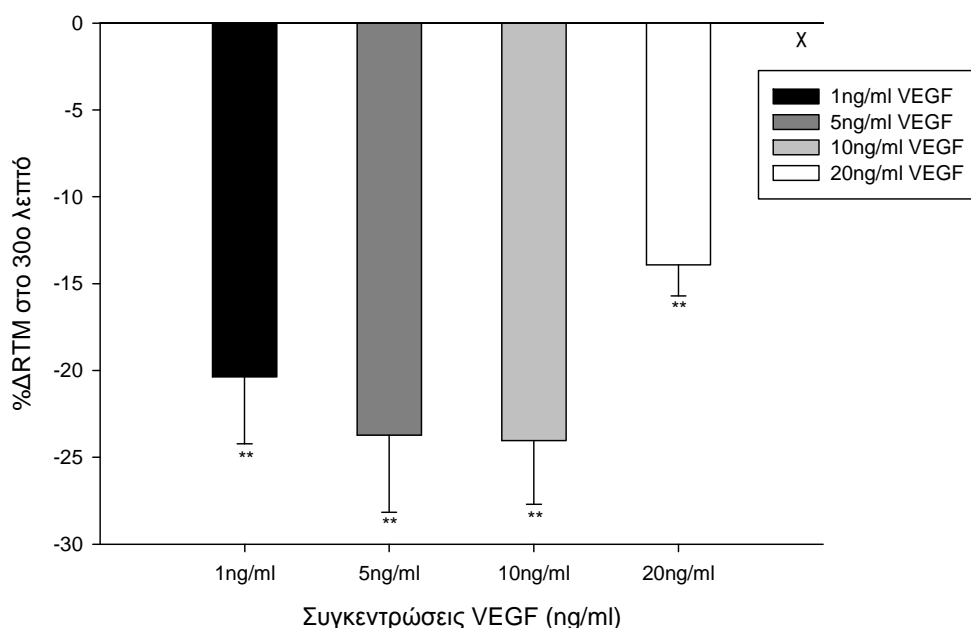
20β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



Διάγραμμα 20. Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία (20α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (20β) στη διάρκεια 1 ώρας. ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (···).

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 21) φαίνεται η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη του VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. Για το 30^ο λεπτό, η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} που καταγράφηκε ήταν $24,04 \pm 3,67\%$ και αντιστοιχεί σε συγκέντρωση VEGF 10ng/ml, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 20ng/ml το ποσοστό ήταν μόλις $13,92 \pm 1,8\%$.

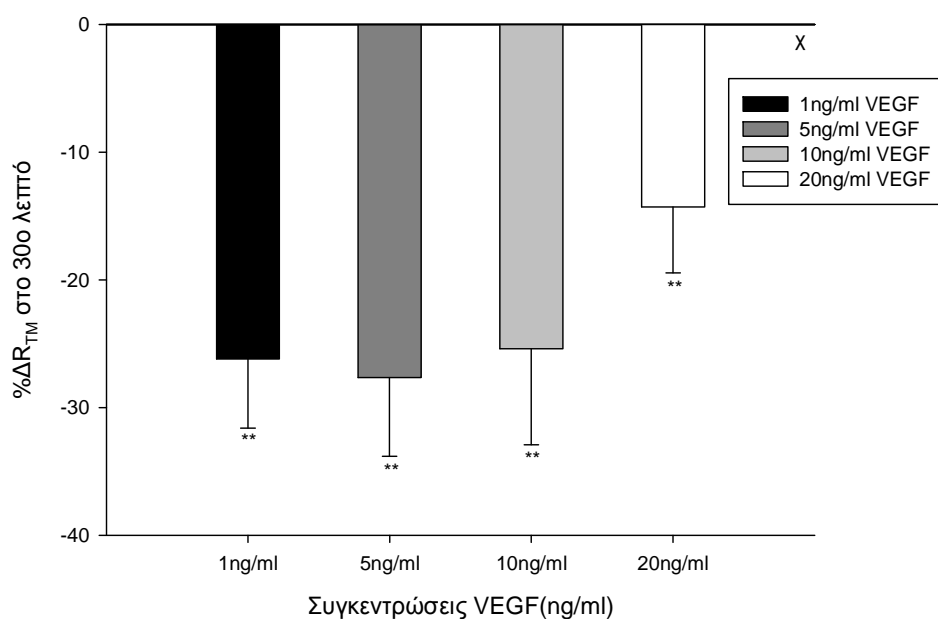
21. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



Διάγραμμα 21 Σύγκριση των ποσοστίων μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική $R_{TM}(x)$.

Στη βασειοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου στις συγκεντρώσεις του VEGF 1, 5 και 10ng/ml η μέγιστη ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ το 30^ο λεπτό είχαν παραπλήσιες τιμές με μεγαλύτερη αυτή που αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση των 10ng/ml και τιμή $27,64 \pm 6,18\%$. Η μικρότερη δράση παρατηρήθηκε και πάλι στη συγκέντρωση των 20ng/ml με ποσοστό $14,3 \pm 5,15\%$ (Διάγραμμα 22).

22. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



Διάγραμμα 22 Σύγκριση των ποσοσטיών μειώσεων της διαμεσοθηλιακής αντίστασης %ΔR_{TM} στη βασεοπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου προβάτου στο 30^ο λεπτό μετά την προσθήκη VEGF σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20ng/ml. **p<0,01 σε σύγκριση με την αρχική R_{TM}(x).

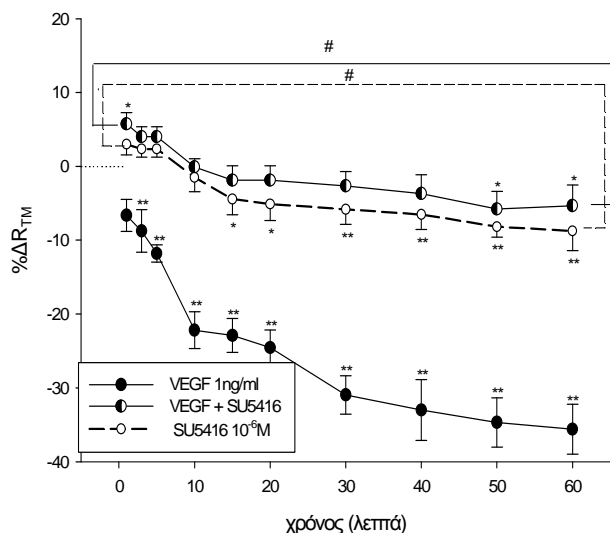
Επίδραση του SU1498 στη δράση του VEGF

Ο μη ειδικός αναστολέας των υποδοχέων του VEGF, ο SU5416 χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10⁻⁶M και ανέστειλε τη δράση του VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος της μια ώρας.

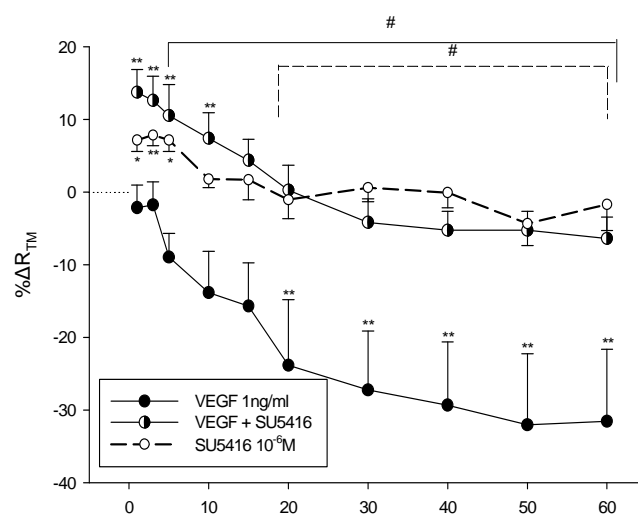
Στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου μεταξύ της δράσης του συνδυασμού SU5416/VEGF υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF, το ίδιο και μεταξύ της δράσης του αναστολέα. Η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης %ΔR_{TM} παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό μετά την προσθήκη του συνδυασμού και ήταν 5,74±1,55% (Διάγραμμα 23α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια η δράση του συνδυασμού SU5416/VEGF ήταν στατιστικώς σημαντική σε σχέση με τη δράση του VEGF από το 5^ο λεπτό και μετά,

ενώ αντιστοίχως η δράση του αναστολέα από το 20^ο. Η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό μετά την προσθήκη του συνδυασμού και ήταν 13,74±3,13% (Διάγραμμα 23β).

23α. Τοιχωματικό περιτόναιο- Κορυφαία επιφάνεια



23β. Τοιχωματικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια

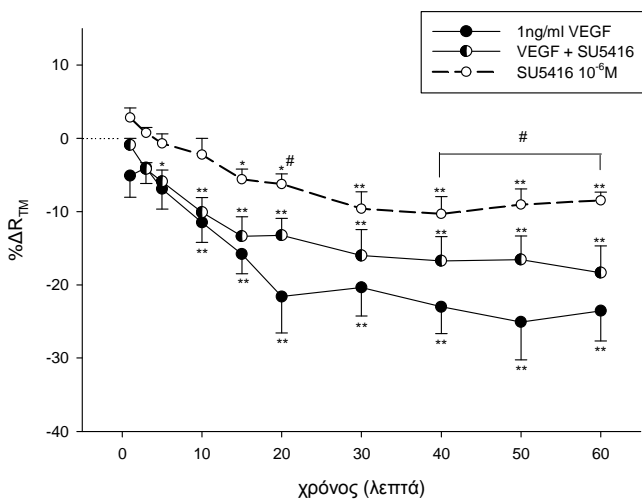


Διάγραμμα 23 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF (1ng/ml), SU5416 (10⁻⁶M) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (23α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (23β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τον VEGF

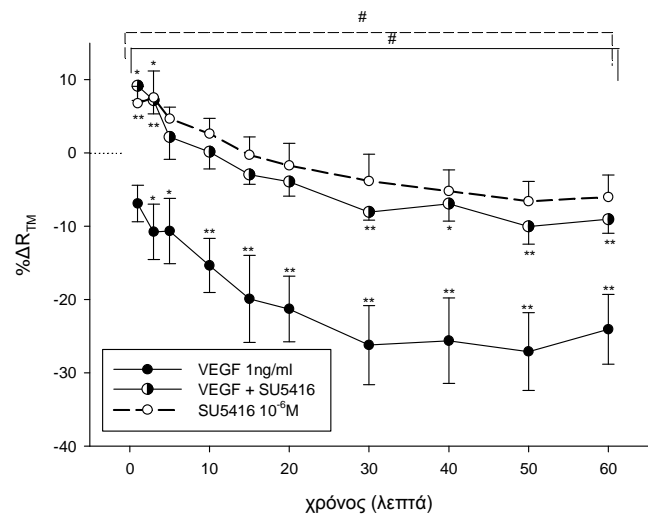
Στο σπλαχνικό περιτόναιο παρατηρήθηκε μερική αναστολή της δράσης του VEGF, ύστερα από την προσθήκη στην κορυφαία επιφάνεια του συνδυασμού SU5416/VEGF. Η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική από το 5^ο λεπτό και μετά και μέγιστη ποσοστιαία μείωση της αντίστασης % ΔR_{TM} καταγράφηκε στο 60^ο λεπτό με ποσοστό 18,36±3,66% (Διάγραμμα 24α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια υπήρξε

πλήρης αναστολή της δράσης του VEGF σε όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού SU5416/VEGF και του αναστολέα βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF από την έναρξη και μέχρι το πέρας του πειράματος. Η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ από τη στιγμή της προσθήκης του συνδυασμού καταγράφηκε στο 1^ο λεπτό και είχε τιμή $9,16 \pm 2\%$ (Διάγραμμα 24β).

24α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



24β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια



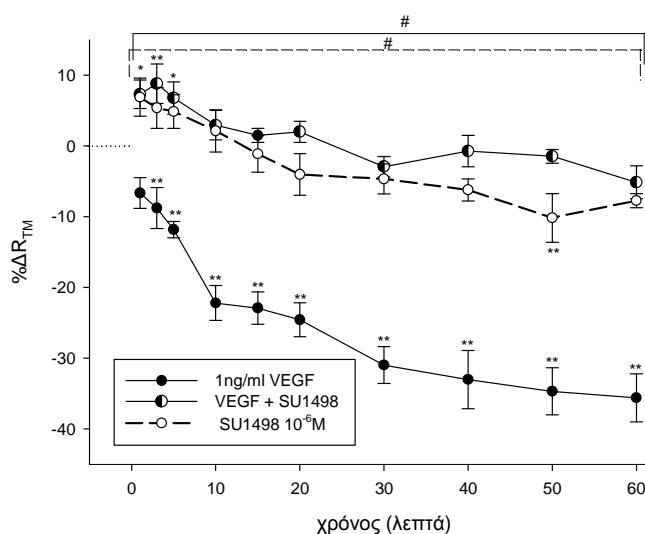
Διάγραμμα 24 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF (1ng/ml), SU5416 ($10^{-6}M$) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (24α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (24β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τον VEGF

Επίδραση του SU1498 στη δράση του VEGF

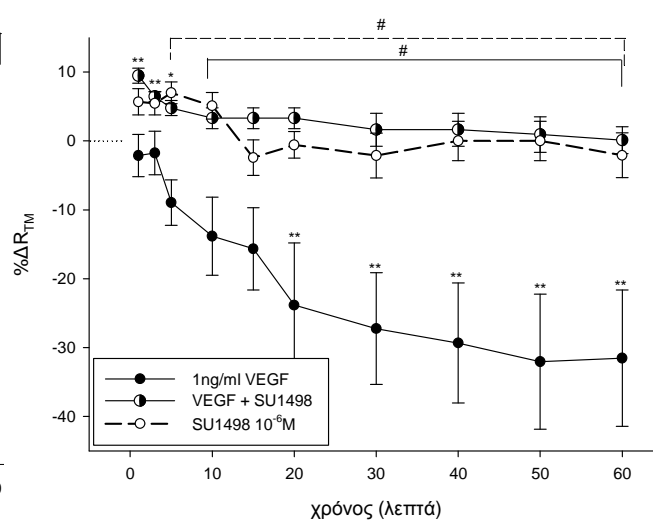
Χρησιμοποιήθηκε επίσης, ο ειδικός αναστολέας SU1498 των VEGFR2 υποδοχέων στη συγκέντρωση 10^{-6} M. Παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της δράσης που ασκούσε ο VEGF στο περιτόναιο προβάτου για όλη τη χρονική περίοδο της μιας ώρας.

Συγκεκριμένα, στο τοιχωματικό περιτόναιο παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ τα πρώτα πέντε λεπτά από την προσθήκη του συνδυασμού SU5416/VEGF, όπου και καταγράφηκε μικρή αύξηση της αντίστασης. Για την κορυφαία επιφάνεια η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε στο 3^ο λεπτό και ήταν $8,81 \pm 2,76\%$. Επίσης, οι ποσοστιαίες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ του συνδυασμού βρέθηκαν να έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF. Το ίδιο διαπιστώθηκε και για τη δράση που είχε ο αναστολέας από μόνος του (Διάγραμμα 25α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια η ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό με ποσοστό $9,46 \pm 1,11\%$. Μεταξύ της δράσης του συνδυασμού SU5416/VEGF και του αναστολέα βρεθήκαν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF στη μεγαλύτερη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 25β).

25α. Τοιχωματικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



25β. Τοιχωματικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια

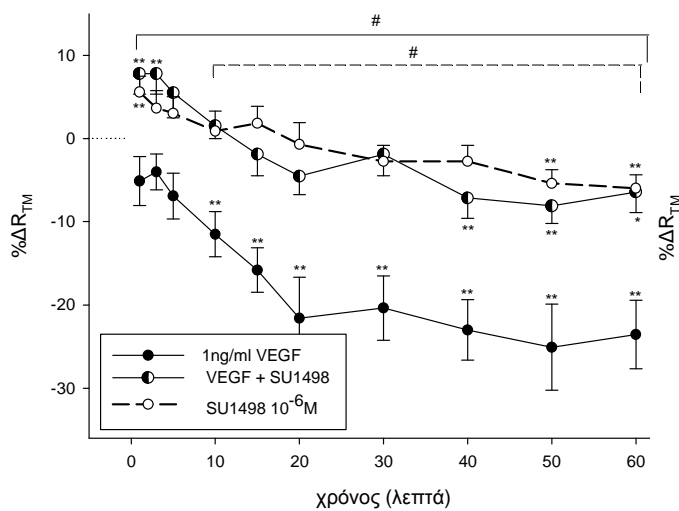


Διάγραμμα 25 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο τοιχωματικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF (1ng/ml), SU1498 ($10^{-6}M$) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (25α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (2β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (\dots), # $p < 0,05$ σε σχέση με τον VEGF

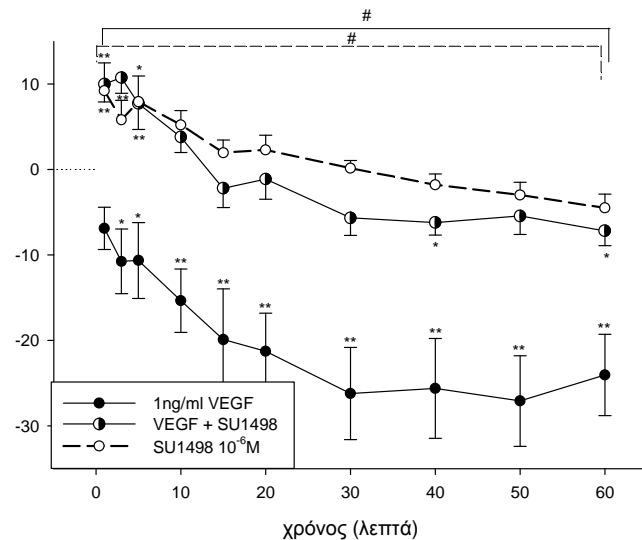
Στο σπλαχνικό περιτόναιο ύστερα από την προσθήκη του συνδυασμού SU5416/VEGF παρατηρήθηκε αρχικά αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης και στη συνέχεια αναστολή της δράσης του VEGF. Στην κορυφαία επιφάνεια (Διάγραμμα 26α) η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε στο 1^ο λεπτό από την προσθήκη του συνδυασμού και είχε τιμή $7,79 \pm 2,48\%$. Οι ποσοστιαίες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ του συνδυασμού είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και για το μεγαλύτερο μέρος του στην περίπτωση του αναστολέα (Διάγραμμα 26α). Στη βασεοπλευρική επιφάνεια (Διάγραμμα 26β) η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση της αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ καταγράφηκε στο 3^ο λεπτό από

την προσθήκη του συνδυασμού και είχε τιμή $10,75 \pm 1,83\%$. Επίσης, οι ποσοστιαίες μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ του συνδυασμού είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του VEGF. Το ίδιο διαπιστώθηκε και για τη δράση που είχε ο αναστολέας από μόνος του.

26α. Σπλαχνικό περιτόναιο - Κορυφαία επιφάνεια



26β. Σπλαχνικό περιτόναιο - Βασεοπλευρική επιφάνεια

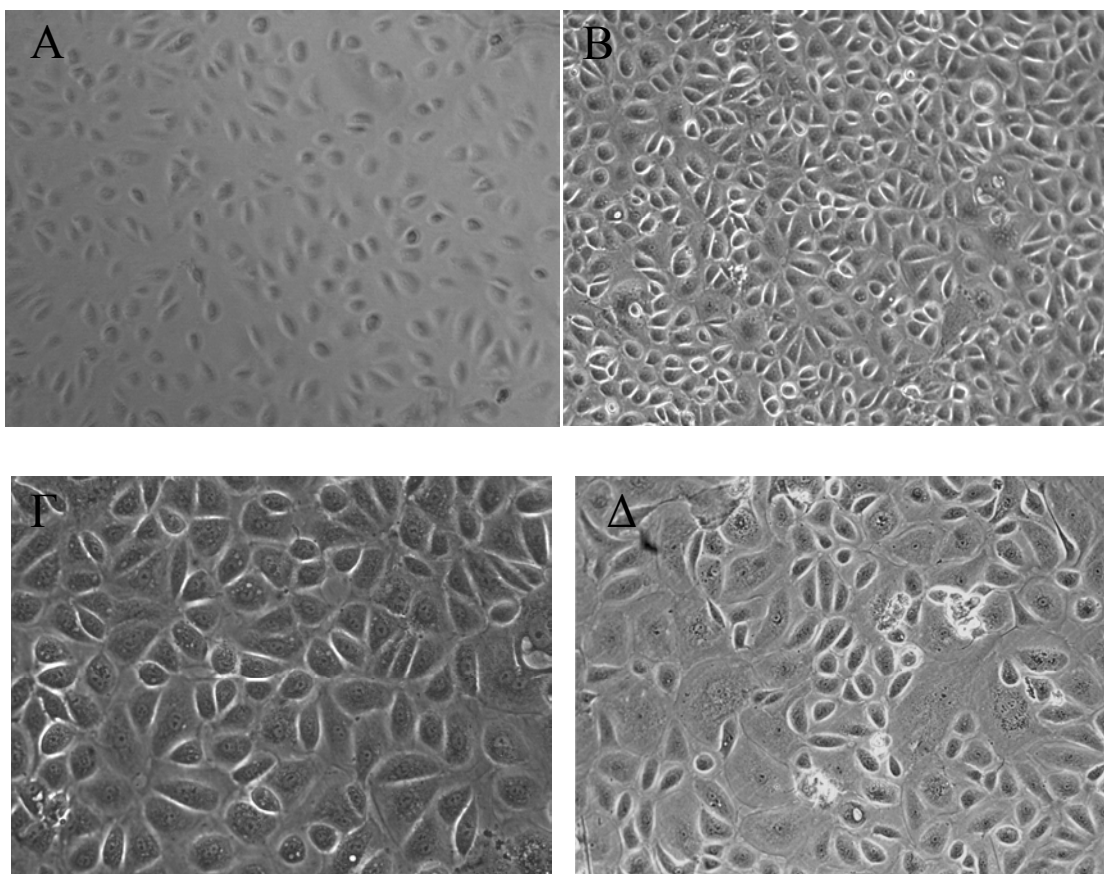


Διάγραμμα 26 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στο σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου μετά την προσθήκη VEGF (1ng/ml), SU1498 ($10^{-6}M$) και του συνδυασμού τους στην κορυφαία (26α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (26β) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} (...), # $p < 0,05$ σε σχέση με τον VEGF

ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

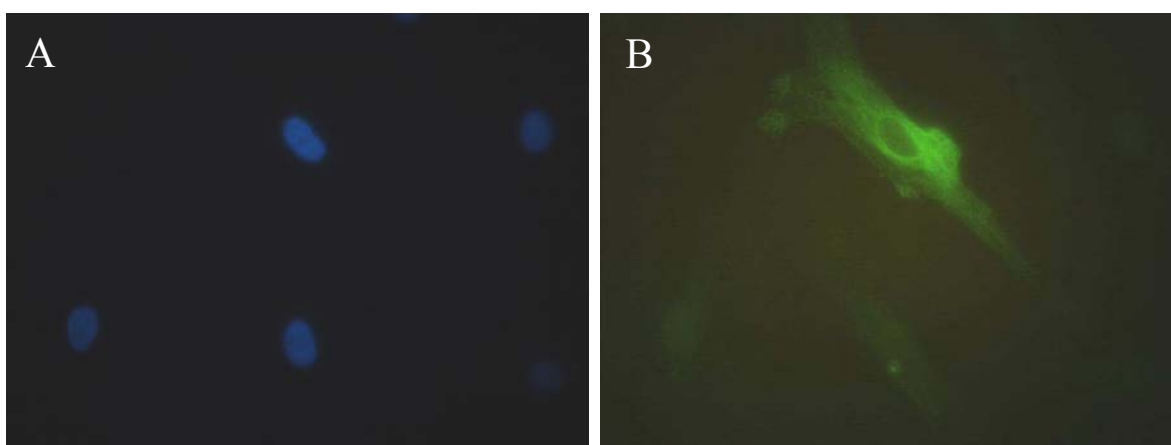
Καλλιέργεια και Ταυτοποίηση

Στην Εικόνα 6 διακρίνονται οι διάφοροι φαινότυποι που παρουσιάζει η καλλιέργεια πρωτογενούς σειράς ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (HPMC) σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Διακρίνεται η πολυγωνική μορφή που αποκτούν τα μεσοθηλιακά κύτταρα σε κορεσμό (B, Γ) και η εμφάνιση νεκρών κυττάρων σε ανακαλλιέργεια πάνω από τρεις φορές (Δ).



Εικόνα 6 Διάφοροι φαινότυποι καλλιέργειας ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων: σε αρχικό στάδιο μετά την απομόνωση (A), σε κορεσμό (B, Γ) και έπειτα από ανακαλλιέργεια πάνω από τρεις φορές (Δ).

Η χαρακτηριστική μορφολογία που εμφανίζουν στο μικροσκόπιο τα μεσοθηλιακά κύτταρα όταν βρίσκονται σε κορεσμό και η ομοιογένεια της καλλιέργειας είναι οι πρώτες ενδείξεις για την ταυτότητα των κυττάρων. Η ταυτοποίηση έγινε με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κυτοκερατίνης, όπου διακρίνονται χαρακτηριστικά τα ενδιάμεσα ινίδια (Εικόνα 7B). Με μπλε χρώμα (χρώση dapi) φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων του συγκεκριμένου στιγμιότυπου (Εικόνα 7A).

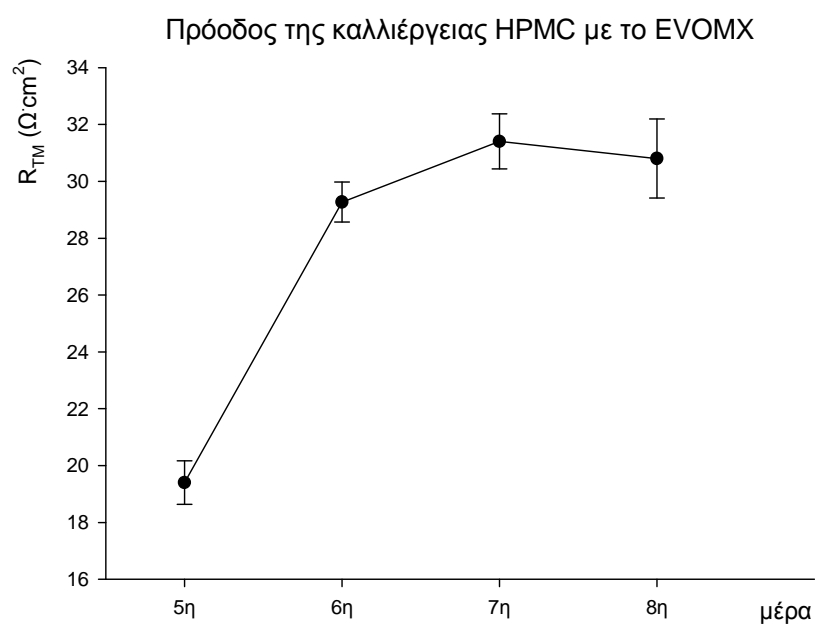


Εικόνα 7 Ταυτοποίηση με ανοσοφθορισμό ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων. A) με χρώση DAPI και B) με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της κυτοκερατίνης 19

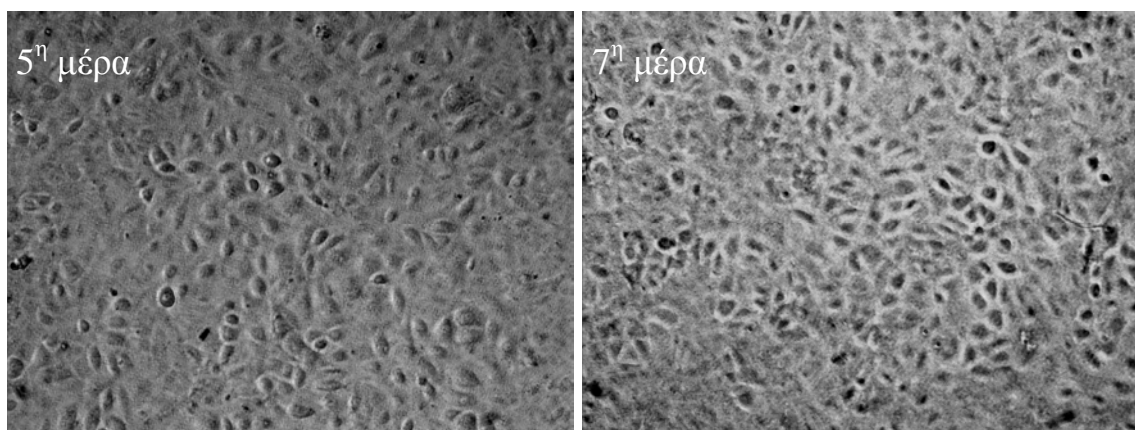
Καλλιέργεια των κυττάρων στα Snapwells

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πυκνότητα 5×10^4 κύτταρα/cm² σε πολυεστερικά φίλτρα (snapwells). Η πορεία της καλλιέργειας στα φίλτρα παρακολουθήθηκε καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο και όταν άρχισε να καλύπτει την επιφάνειά της ξεκίνησαν οι καθημερινές μετρήσεις με τη συσκευή EVOMX/ST2 (Διάγραμμα 27). Η διαμεσοθηλιακή αντίσταση αυξανόταν καθημερινά με μέγιστη τιμή $31,4 \pm 0,97 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=18) την 7^η μέρα. Η εικόνα της καλλιέργειας την ίδια χρονική στιγμή συνάδει επίσης με τον κορεσμό των μεσοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 6). Τα φίλτρα με τη μονοστοιβάδα των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων ήταν

εφικτό να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω πειράματα διαβατότητας στο Ussing system.



Διάγραμμα 27 Η πορεία της διαμεσοθηλιακής αντίστασης της μονοστοιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων στα πολυεστερικά φίλτρα ($n=18$).

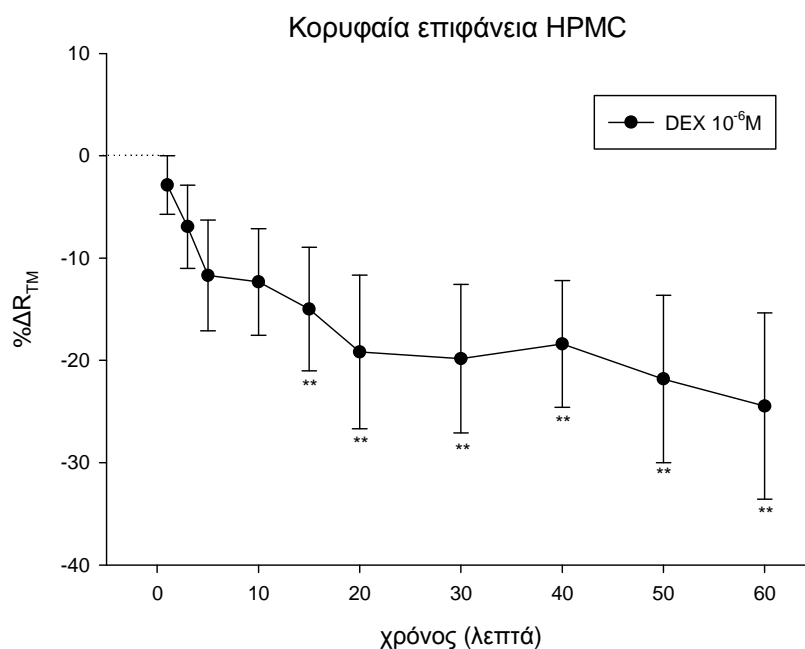


Εικόνα 8 Καλλιέργεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων στα πολυεστερικά φίλτρα την 5^η και την 7^η μέρα μετά την τοποθέτησή τους.

Πειράματα διαβατότητας σε ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα (HPMC)

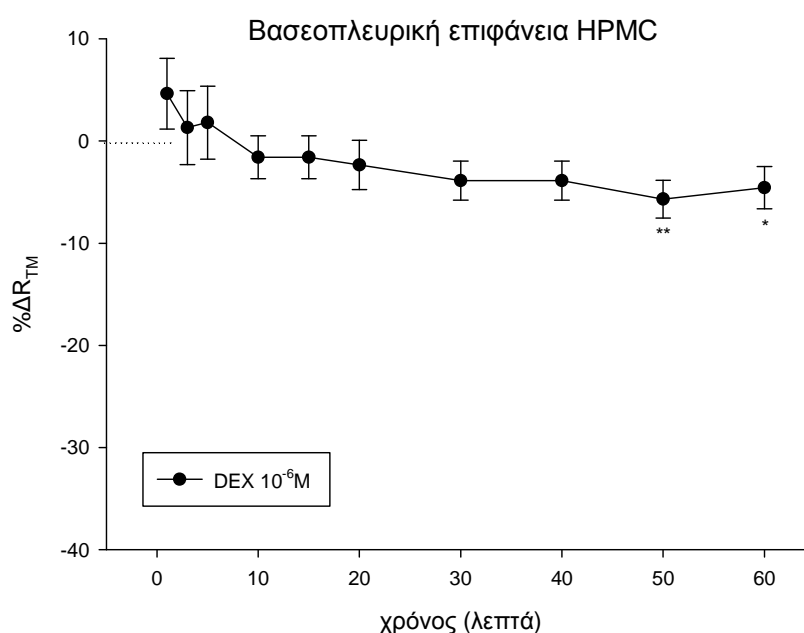
Επίδραση της Δεξαμεθαζόνης σε HPMC

Όταν η δεξαμεθαζόνη προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια της μονοστιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ παρατηρήθηκε άμεση μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης, η οποία παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας. Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ βρέθηκε στατιστικώς σημαντική από το 15^ο λεπτό και μέχρι το πέρας του πειράματος, ενώ η μέγιστη καταγράφηκε στο 60^ο λεπτό και ήταν $24,46 \pm 9,1\%$ (Διάγραμμα 28).



Διάγραμμα 28 Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (HPMC) μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στη διάρκεια 1 ώρας. $n=5$, $**p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (**).

Στην σειρά πειραμάτων στα οποία η δεξαμεθαζόνη προστέθηκε στη βασεοπλευρική επιφάνεια της μονοστοιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ δεν παρατηρήθηκε μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 29.

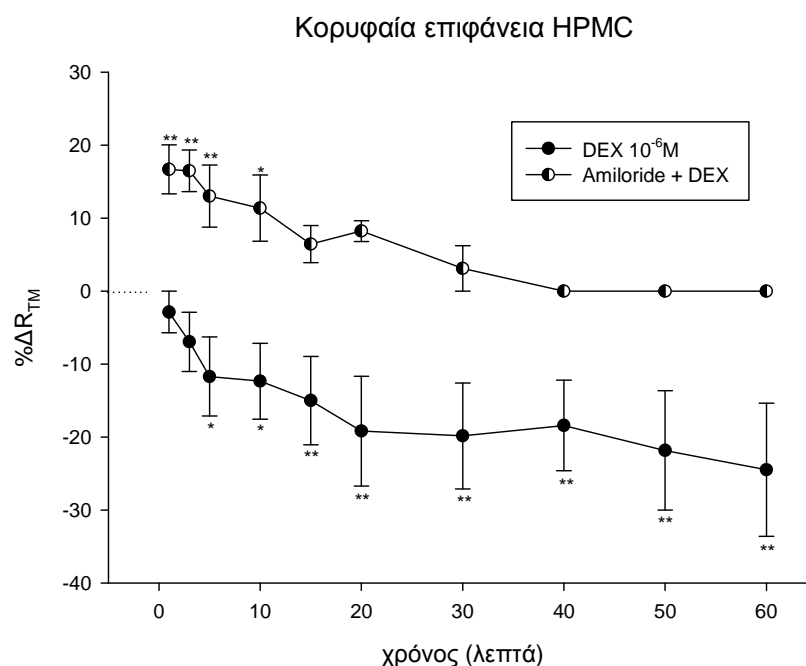


Διάγραμμα 29 Η ποσοστιαία μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στη βασεοπλευρική επιφάνεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (ΗΡΜC) μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στη διάρκεια 1 ώρας. $n=6$, $*p<0,05$ & $**p<0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (···).

Επίδραση της Αμιλορίδης στη δράση της Δεξαμεθαζόνης

Η αμιλορίδη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ μόνο στην κορυφαία επιφάνεια της μονοστοιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων όπου και παρατηρήθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη είχε δράση. Στο διάγραμμα 30 φαίνεται ότι η αμιλορίδη ανέστειλε τη δράση της δεξαμεθαζόνης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας. Στο πρώτο

μισάωρο παρατηρήθηκε στην ουσία αναστροφή της δράσης της δεξαμεθαζόνης με αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης. Η ποσοστιαία αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ ήταν στατιστικώς σημαντική κατά τη διάρκεια του πρώτου δεκάλεπτου και η μέγιστη καταγράφηκε στο 1^ο λεπτό και έλαβε τιμή $16,7 \pm 3,34\%$.

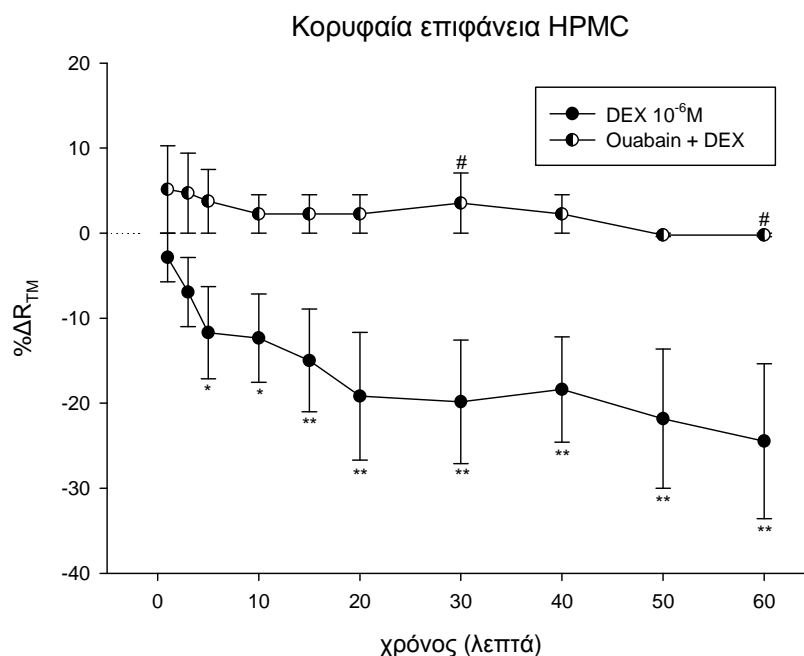


Διάγραμμα 30 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης $\% \Delta R_{TM}$ στην κορυφαία επιφάνεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (HPMC) μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), και του συνδυασμού αμιλοριδης ($10^{-5}M$)/δεξαμεθαζόνης ($n=4$) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p < 0,05$ & ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (···).

Επίδραση της Ουαμπαΐνης στη δράση της Δεξαμεθαζόνης

Η ουαμπαΐνη προστέθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ μόνο στην κορυφαία επιφάνεια της μονοστοιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων όπου και παρατηρήθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη

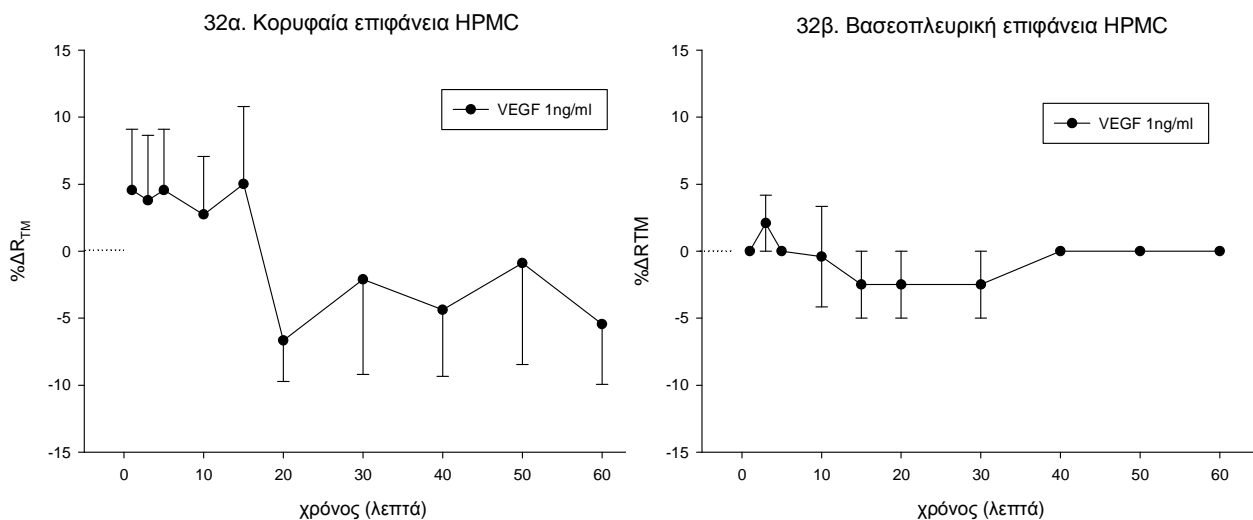
είχε δράση. Ο συνδυασμός είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας (Διάγραμμα 31).



Διάγραμμα 31 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} στην κορυφαία επιφάνεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (HPMC) μετά την προσθήκη δεξαμεθαζόνης ($10^{-6}M$), και του συνδυασμού ουαπαΐνης ($10^{-4}M$)/δεξαμεθαζόνης ($n=3$) στη διάρκεια 1 ώρας. * $p<0,05$ & ** $p<0,01$ σε σύγκριση με την αρχική R_{TM} . (·), # $p<0,05$ σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη

Επίδραση του VEGF σε ΗPMC

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) προστέθηκε στην κορυφαία (διάγραμμα 32α) και βασηοπλευρική επιφάνεια (διάγραμμα 32β) της μονοστοιβάδας των ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων στη συγκέντρωση του 1ng/ml. Φάνηκε ότι δεν είχε επίδραση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση σε καμία από τις δύο επιφάνειες.



Διάγραμμα 32 Η ποσοστιαία μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης % ΔR_{TM} σε ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα (HPMC) μετά την προσθήκη VEGF σε συγκέντρωση 1ng/ml στην κορυφαία (32α) και βασεοπλευρική επιφάνεια (32β) στη διάρκεια 1 ώρας. n=4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας που διεξήχθησαν σε περιτοναϊκό ιστό προβάτου η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης R_{TM} της μεμβράνης του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου. Η μείωση αυτή ήταν άμεση, στατιστικώς σημαντική και προοδευτική καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων της μια ώρας και στα δύο πέταλα του περιτοναίου. Η απόκριση της δεξαμεθαζόνης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ήταν όμοια.

Η μιφεπριστόνη και η σπιρονολακτόνη που είναι ανταγωνιστές των κλασσικών υποδοχέων της δεξαμεθαζόνης, γλυκοκορτικοειδικών και αλατοκορτικοειδικών αντίστοιχα, ανέστειλαν μερικώς τη δράση της δεξαμεθαζόνης στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο. Παρατηρήθηκε επίσης αγωνιστική δράση των αναστολέων αυτών. Τόσο η μιφεπριστόνη, όσο και η σπιρονολακτόνη μείωσαν την R_{TM} της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Η αμιλοριδίδη γνωστός αναστολέας των επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC), ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου αναστρέφοντας μάλιστα τη δράση της δεξαμεθαζόνης και προκαλώντας αύξηση της R_{TM} στην αρχή του πειράματος. Στη βασεοπλευρική επιφάνεια του περιτοναίου η αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης ήταν μερική.

Ο ειδικός αναστολέας των διαύλων Na^+/H^+ , EIPA, ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου, ενώ μερική αναστολή παρατηρήθηκε στη βασεοπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου και στον σπλαχνικό ιστό.

Η ουαμπαΐνη ειδικός αναστολέας της αντλίας Na^+/K^+ , ανέστειλε πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο. Στην αρχή δε

του πειράματος παρατηρήθηκε αναστροφή του αποτελέσματος της δράσης της δεξαμεθαζόνης, ενώ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού περιτοναίου η αύξηση της R_{TM} διήρκησε έως το πέρας του πειράματος.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η δεξαμεθαζόνη έχει άμεση δράση στο περιτόναιο προβάτου αυξάνοντας τη διαπερατότητά του. Η άμεση αυτή απόκριση της δεξαμεθαζόνης μέσα σε λίγα λεπτά από τη στιγμή που επιδρά στον ιστό συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης ενός ή περισσότερων μη γενομικών μονοπατιών – μηχανισμών δράσης. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτες που έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή, όπως η πρεδνιζολόνη μπορούν να μεταβάλλουν άμεσα τις φυσιολογικές διεργασίες ιστών και οργάνων όπου επιδρούν (46). Έτσι, εκτός από το κλασσικό γενομικό μονοπάτι που ακολουθούν οι στεροειδείς ορμόνες, έχει προταθεί η μη γενομική δράση τους στην οποία εμπλέκονται μεμβρανικοί μηχανισμοί, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των νευροδιαβιβαστών και των πεπτιδικών ορμονών. Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια επικεντρώνουν τις έρευνές τους στην άμεση δράση των γλυκοκορτικοειδών και στους μηχανισμούς που διέπουν τη δράση αυτή (48-52, 60, 98, 99).

Για τη δεξαμεθαζόνη ειδικότερα έχει δειχτεί *in vivo* ότι σε περιτόναιο αρουραίου επάγει την έκφραση των υδατοπορινών-1 (AQP-1) και προάγει τη διαπερατότητα σε νερό της περιτοναϊκής μεμβράνης κατά την περιτοναϊκή κάθαρση (55). Σε μια προγενέστερη μελέτη είχε δειχτεί ότι η επαγόμενη έκφραση των υδατοπορινών από τη δεξαμεθαζόνη είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης αρουραίου σε νάτριο, την καλύτερη υπερδιήθηση, χωρίς όμως να μεταβάλλεται η οσμωτική βαθμίδωση και η διαπερατότητα σε μικρές διαλυτές ουσίες (56). Αυτή η δράση είναι επομένως σημαντική και θα μπορούσε να αποδειχτεί ωφέλιμη σε ασθενείς που υπόκεινται σε περιτοναϊκή κάθαρση (PD).

Επίσης, η δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή όπως η πρεδνιζολόνη χορηγούνται σε καταστάσεις ίνωσης του περιτοναίου, ένα φαινόμενο που απαντάται συχνά σε ασθενείς που ακολουθούν περιτοναϊκή κάθαρση και σε βαριά μορφή είναι μοιραίο. Σε μοντέλα περιτοναϊκής ίνωσης σε ζώα και σε κλινικές μελέτες η χρήση της πρεδνιζολόνης έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την περαιτέρω διερεύνηση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών στην αντιμετώπιση και εξέλιξη της περιτοναϊκής ίνωσης (57-59, 100).

Από τα πειράματα της παρούσας μελέτης πιθανολογείται ακόμη βάσιμα ότι η δράση της δεξαμεθαζόνης ήταν παρατεταμένη. Η δεξαμεθαζόνη έχει δείχτει ότι ενεργοποιεί τη μεταφορά των ιόντων Na^+ και την απορρόφηση νερού σε εντερικό επιθήλιο αρουραίου, κουνελιού και σε βρογχικό επιθήλιο βοοειδούς (50, 53, 54). Επίσης αυξάνει την ενεργότητα της $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPάσης}$ σε πνευμονικά κύτταρα τύπου II με το να επάγει την εμφάνιση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη των κυττάρων (48). Αυτά τα στοιχεία θα μπορούσαν να εξηγήσουν την σταδιακή και παρατεταμένη δράση της δεξαμεθαζόνης.

Επίσης, η βιβλιογραφία ποικίλλει για το αν η δεξαμεθαζόνη δρα μέσω των κλασσικών υποδοχέων της στις άμεσες αποκρίσεις. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η μιφεπριστόνη, ο αναστολέας δηλαδή των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων αναστέλλει πλήρως την άμεση δράση της δεξαμεθαζόνης (49, 101) . Στην παρούσα εργασία όμως διαπιστώθηκε μερική αναστολή της δράσης της. Δεν είναι η πρώτη φορά που απαντάται αυτό το ενδεχόμενο. Έχει ήδη περιγραφεί σε νεφρό και ήπαρ αρουραίου και φαίνεται ότι οφείλεται στην ιστοειδικότητα των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων (62). Σε μια πρόσφατη μελέτη μάλιστα με τεχνική Ussing σε ανθρώπινη εμβρυική μεμβράνη βρέθηκε ότι η μιφεπριστόνη δρα συνεργικά με την προγεστερόνη. Σε αυτήν τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας όταν

χρησιμοποιείται μόνος του έχει αγωνιστική δράση, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (102). Και άλλες μελέτες έχουν αναδείξει τη δράση αυτή της μιφεπριστόνης σε διάφορους τύπους κυττάρων. Μια πρόσφατη δημοσίευση υποστηρίζει ότι αυτή η δράση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων στο κύτταρο (60). Η μη γενομική δράση της μιφεπριστόνης έχει ήδη επιβεβαιωθεί για το ανθρώπινο μυομήτριο μέσω της ρύθμισης του συστήματος της πρωτεϊνικής κινάσης A και του κυκλικού cAMP (61, 103). Η μη γενομική δράση της μιφεπριστόνης, και η μερική αναστολή της άμεσης δράσης της δεξαμεθαζόνης πιθανόν εμπλέκουν τις δυο ουσίες σε ένα κοινό μη γενομικό μονοπάτι.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα προέκυψε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Είναι η δράση της σπιρονολακτόνης, η οποία μειώνει τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του περιτοναίου προβάτου, με μεγαλύτερη επίδραση να παρατηρείται στο σπλαχνικό περιτόναιο. Η σπιρονολακτόνη είναι αναστολέας της αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη παίζει σημαντικό ρόλο στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS), το οποίο είναι υπεύθυνο να διατηρεί την αρτηριακή πίεση και τον εξωκυττάριο όγκο. Το σύστημα αυτό εμπλέκεται σημαντικά στην παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας, αλλά και στην εξέλιξη της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου (ESRD), καθώς στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται συχνά καρδιακή ανεπάρκεια. Το ποσοστό δε θνησιμότητας εξαιτίας καρδιαγγειακών νοσημάτων στους ασθενείς με ESRD είναι ιδιαίτερος υψηλό σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (104-106). Επίσης, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης συμβάλλει σημαντικά στην περιτοναϊκή ίνωση και περιτοναϊκή κάθαρση, σύμφωνα με τελευταία κλινικά και πειραματικά δεδομένα (107, 108). Σε πειραματικά μοντέλα σε ζώα μάλιστα, η σπιρονολακτόνη μείωσε αποτελεσματικά την περιτοναϊκή ίνωση (109, 110). Η

αύξηση της διαπερατότητας, όπως προέκυψε από τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας μελέτης, που οφείλεται στη δράση της σπιρονολακτόνης θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως αύξηση της διαπερατότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης στο νάτριο, γεγονός ευεργετικό τόσο για τους ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία περιτοναϊκής κάθαρσης, όσο και σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.

Η αμιλορίδη χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη, προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η δράση που ασκεί η δεξαμεθαζόνη στο περιτόναιο προβάτου θα μπορούσε να διεξάγεται μέσω των επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC). Πράγματι, η αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης αυτής. Η ύπαρξη των διαύλων αυτών στο περιτόναιο (63, 64) και στον υπεζωκότα προβάτου (65, 66) έχει ήδη διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες με τη μέθοδο Ussing. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν την έκφραση των επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC) σε επιθήλιο μόσχου (50) και σε κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων της αναπνευστικής οδού (51).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης και το ανάλογο της αμιλορίδης EIPA που είναι ειδικός αναστολέας Na^+/H^+ . Η πλήρης αναστολή της δράσης της δεξαμεθαζόνης εντοπίστηκε στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου. Έχει βρεθεί ότι ο αντιμεταφορέας Na^+/H^+ υπάρχει στη μεμβράνη μεσοθηλιακών κυττάρων (111). Έχει επιβεβαιωθεί ότι η αναστολή ενός εκ των τριών ισοτύπων του αντιμεταφορέα (Nhe1, Nhe2, Nhe3) μεταβάλλει την ηλεκτρική αντίσταση σε διάφορα επιθήλια (70, 112). Το εύρημα αυτό της μελέτης δίνει στοιχεία για την ύπαρξη των διαύλων αυτών στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού περιτοναίου.

Η ουαμπαΐνη αναστέλλει πλήρως τη δράση της δεξαμεθαζόνης στο τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο, στην κορυφαία και βασεοπλευρική επιφάνεια. Στα αρχικά

στάδια του πειράματος η αναστολή της Na^+/K^+ ATPάσης προεξάρχει και η διαμεσοθηλιακή αντίσταση R_{TM} αυξάνεται παροδικά. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που υποστηρίζουν ότι η δεξαμεθαζόνη ρυθμίζει την ενεργότητα της Na^+/K^+ ATPάσης όπως στα επιθηλιακά κύτταρα αουραίου (113). Σε ενδοθηλιακά κύτταρα μόσχου έχειδειχτεί ότι η δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση 10^{-6}M επιφέρει τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση της μεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης (114). Σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων από νεφρικό σωληνάριο επίμυ περιγράφεται μια χρονο- και δοσο- εξαρτώμενη επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με τη συγγένεια πρόσδεσης στους γλυκοκορτικοειδικούς υποδοχείς και μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και της ενεργότητας της Na^+/K^+ ATPάσης (115).

Λόγω της γνωστής αντιφλεγμονώδης και ανοσοκατασταλτικής τους ιδιότητας, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία και φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Παράγονται κάτω από καταβολικές συνθήκες και απελευθερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά σε απάντηση οσμωτικών διαταραχών και σε καταστάσεις στρες. Ενεργοποιούν τα ενεργειακά αποθέματα του οργανισμού και προάγουν υπεργλυκαιμία με το να διεγείρουν την ηπατική γλυκονεογένεση και μειώνοντας την απορρόφηση γλυκόζης από τα κύτταρα (45).

Συνοπτικά, η άμεση δράση της δεξαμεθαζόνης μειώνοντας τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση επιφέρει στην ουσία αύξηση στη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης. Επίσης, οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης που αναφέρθηκαν και αφορούν στη μετακίνηση ιόντων νατρίου, καλίου, υδρογόνου, την ενεργοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών και επιθηλιακών διαύλων νατρίου είναι σημαντικοί, γιατί αφορούν στη διαπερατότητα της μεμβράνης στο νερό. Τα δεδομένα αυτά μας προσφέρουν μια πρώτη ένδειξη για το πώς θα μπορούσε η δεξαμεθαζόνη να συμβάλλει στην καλύτερη

υπερδιήθηση, αυξάνοντας τη διακίνηση ιόντων νατρίου και νερού κατά την περιτοναϊκή κάθαρση.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) επέφερε μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης R_{TM} του περιτοναίου προβάτου που ήταν άμεση, προοδευτική, και παρατεταμένη.

Οι αναστολείς των υποδοχέων του VEGF (VEGFR1/R2) ανέστειλαν τη δράση του σε όλη τη διάρκεια του πειράματος της μιας ώρας. Ο SU5416, αναστολέας και των δύο υποδοχέων, και ο SU1498 εκλεκτικός αναστολέας των VEGFR2 ανέστειλαν πλήρως τη δράση του VEGF και στις δύο επιφάνειες του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου.

Η δράση του VEGF που παρατηρήθηκε στα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν άμεση. Ο VEGF επάγει την αύξηση της διαπερατότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να λαμβάνει χώρα με το να επηρεάζει τις σφιχτές συνδέσεις που υπάρχουν μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες ZO (zonula occluden) είναι σημαντικές στο σχηματισμό των σφιχτών συνδέσεων. Η υπόθεση αυτή έχει περιγραφεί σε μελέτες, όπου ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα της μικροαγγειακής μονοστοιβάδας ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου με το να διαρρηγνύει τις πρωτεΐνες ZO1 και την οργάνωσή τους, γεγονός που οδηγεί στην αποσυναρμολόγηση των σφιχτών συνδέσεων και τη μετακίνηση των πρωτεϊνών αυτών από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα (89). Μελέτες σε ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα έδειξαν ότι η εξωγενής προσθήκη VEGF είχε σαν αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης των ZO1 λόγω άμεσης έκθεσης σε προϊόν αποδόμησης της γλυκόζης (116).

Η μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης του περιτοναίου προβάτου που παρατηρήθηκε μετά την εφαρμογή του VEGF στις διάφορες συγκεντρώσεις εμφάνισε

ανεξάρτητη πορεία δράσης. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι ο VEGF χρησιμοποιήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τάξεως των ng/ml σε σχέση με τα φυσιολογικά του επίπεδα. Σε μια πρόσφατη μελέτη οι τιμές αυτές στο πλάσμα βρέθηκαν <80 pg/ml, ενώ στον ορό <500 pg/ml (117). Στο υπερδιήθημα περιτοναϊκής κάθαρσης το εύρος τιμών κυμαίνεται επίσης σε pg/ml υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις από ασθενή σε ασθενή ακόμη και στην ίδια μελέτη από 60-700 pg/ml (118-120). Έτσι, ενώ η συγκέντρωση του 1ng/ml είναι πλησίον των φυσιολογικών επιπέδων, στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις έχει φτάσει σε κορεσμό. Σε ανθρώπινο πνευμονικό ενδοθήλιο η δράση του VEGF στη συγκέντρωση των 100ng/ml οδήγησε σε αλλοίωση των σφιχτών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων με αποτέλεσμα τη διάρρηξη του βιολογικού φραγμού, ενώ σε συγκέντρωση της τάξεως των 10ng/ml έδρασε προστατευτικά (121).

Σύμφωνα με τα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των υποδοχέων του VEGF μπορούμε να αποφανθούμε ότι ο VEGF δρα στο περιτόναιο προβάτου μέσω των υποδοχέων αυτών. Επειδή όμως η δράση του VEGF αναστάλθηκε τόσο με την προσθήκη του ειδικού αναστολέα του VEGFR2 (SU1498), όσο και με την προσθήκη του μη εκλεκτικού αναστολέα (SU5416) δεν είναι δυνατό να αποφανθούμε με απόλυτη βεβαιότητα για το αν ο VEGF ασκεί τη δράση του μέσω των VEGFR1 υποδοχέων. Αν και από τη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η επαγόμενη αγγειακή διαπερατότητα που ρυθμίζεται από τον VEGF επιτυγχάνεται μέσω των VEGFR2 υποδοχέων (79).

Όπως έχει ήδη διατυπωθεί η χρόνια εφαρμογή περιτοναϊκής κάθαρσης σχετίζεται με μορφολειτουργικές αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης. Οι παρατηρούμενες αλλαγές στη μορφή της μεμβράνης συμπεριλαμβάνουν απώλεια ή εκφυλισμό του μεσοθηλίου, πάχυνση του υπομεσοθηλιακού υποστρώματος (από 40μm σε 270 μm),

αλλαγές στη δομή και στον αριθμό των αγγείων, καθώς επίσης διπλασιασμό της βασικής μεμβράνης αυτών (85). Η μείωση της υπερδιήθησης που ακολουθεί αναφέρεται στην αυξημένη μεταφορά διαλυτών ουσιών μικρού μοριακού βάρους, λόγω αύξησης της επιφάνειας των αγγείων της περιτοναϊκής μεμβράνης καθώς επίσης και αύξηση της πυκνότητας του αγγειακού τοιχώματος. Σε αυτά τα πλαίσια ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των χαρακτηριστικών της περιτοναϊκής μεμβράνης. Ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων, επάγει την αγγειοδιαστολή μέσω ενεργοποίησης της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου και είναι ισχυρός αγγειογόνος παράγοντας (30, 81). Αποτελέσματα πολλών μελετών έχουν καταστήσει σαφές ότι ο VEGF παράγεται τοπικά στα περιτοναϊκά ενδοθηλιακά και μεσοθηλιακά κύτταρα (116). Η συγκέντρωσή του στο διηθούμενο υγρό βρέθηκε υψηλότερη από αυτή που θα αναμενόταν αν διαχέονταν μόνο από την κυκλοφορία (81, 82).

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους ο VEGF παράγεται τοπικά στην περιτοναϊκή μεμβράνη και κοιλότητα στους χρόνια περιτοναϊκά διηθούμενους ασθενείς. Βασικός παράγοντας είναι η συνεχής χρήση των διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης. Τα πιο κοινά διαλύματα δεν είναι βιοσυμβατά, γιατί έχουν χαμηλό pH (5,5), ρυθμιστικό διάλυμα τύπου lactate (εστέρας γαλακτικού οξέως), συγκέντρωση γλυκόζης (75-200mmol/L) και είναι υπέρτονα (ωσμωτικότητα, 334-486 mOsm/L). Περιέχουν επίσης αλδεύδες λόγω της θερμικής αποστείρωσης (122). Μελέτες σε καλλιέργειες μεσοθηλιακών κυττάρων έδειξαν ότι η γλυκόζη σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται και το χαμηλό pH αποτελούν τοξικούς παράγοντες (123). Σε περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα αρουραίου έχει δείχτει ότι η σύνθεση του VEGF αυξάνεται σε απάντηση ενός προϊόντος αποδόμησης της γλυκόζης, της μεθυλγλυοξάλης, το οποίο είναι παρών στα συμβατικά διαλύματα

περιτοναϊκής κάθαρσης (116, 124). Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης δεν είναι σαφές αν ρυθμίζει τη σύνθεση και έκκριση του VEGF από τα ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGE, advanced glycation end products) ευθύνονται επίσης, λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύονται σε ιστούς, να αλληλεπιδρούν και να παράγουν ελεύθεριζες ρίζες οξυγόνου. Επίσης έχει βρεθεί ότι επάγουν την έκφραση του VEGF και πιθανά διαθέτουν τη δυναμική να προάγουν την περιτοναϊκή νεοαγγειογένεση. Τα διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης με χαμηλή συγκέντρωση των προϊόντων αυτών είναι περισσότερο βιοσυμβατά με τη φυσιολογία μεσοθηλιακών κυττάρων (125). Ένας άλλος παράγοντας είναι η περιτοναϊκή ίνωση, συχνή επιπλοκή κατά την περιτοναϊκή κάθαρση. Η απάντηση του περιτοναίου σε μικροοργανισμούς εμπλέκει φλεγμονώδεις κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτταρικών πληθυσμών που γειτνιάζουν όπως είναι τα μακροφάγα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες. Ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης (TGF-β) είναι ένας βασικός παράγοντας σε καταστάσεις φλεγμονής και μπορεί να επάγει την έκφραση του VEGF. Επίσης, σε μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζεται ότι και τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή TGF-β και φιμπρονεκτίνης σε ανθρώπινα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (126).

Από τα παραπάνω, γίνεται κατανοητή η σημασία που έχει ο VEGF στη συνοχή της περιτοναϊκής μεμβράνης και στην πορεία της περιτοναϊκής κάθαρσης. Η άμεση δράση που παρατηρήθηκε στη μεμβράνη του προβάτου αυξάνει τη διαπερατότητά της πιθανόν μέσω της μεταφοράς ιόντων.

Μια άλλη παράμετρος της μελέτης που ίσως θα πρέπει να ληφθεί υπόψη μελλοντικά είναι η δράση της δεξαμεθαζόνης στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF). Κάποιες μελέτες εξετάζουν το θέμα αυτό σε γενετικό επίπεδο. Η

δεξαμεθαζόνη αποτελεί το κατεξοχήν φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της αγγειακής φύσεως οιδήματος στον εγκέφαλο. Και σε αυτή την περίπτωση ο VEGF διακόπτει τη συνοχή των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων και οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και στην τελική κατάρρευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Στη μελέτη αυτή η δεξαμεθαζόνη μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του VEGF μέσω γλυκοκορτικοειδικού υποδοχέα (εξετάστηκαν με τον ανταγωνιστή μifeπριστόνη) (127). Τα γλυκοκορτικοειδή έχει δείξει ότι αναστέλλουν την έκφραση του VEGF γονιδίου σε διάφορους τύπους κυττάρων. Σε μια άλλη μελέτη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού προτείνεται η ρύθμιση του VEGF από τη δεξαμεθαζόνη με έναν πιο άμεσο μηχανισμό, ίσως μέσω της ταχείας φωσφορυλίωσης των ZO1 πρωτεϊνών των σφιχτών συνδέσεων (128, 129).

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων επιτεύχθηκε η απομόνωση ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων από μείζον επίπλουν και η καλλιέργειά τους για τη χρήση σε πειράματα διαβατότητας. Τα πειράματα αυτά μπορούν να μας δώσουν μια πιο ακριβή εικόνα για τη συμπεριφορά του περιτοναϊκού μεσοθήλιου στην επίδραση του VEGF και της δεξαμεθαζόνης. Η μονοστοιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι απαλλαγμένη από οποιαδήποτε ίχνος συνδετικού ιστού, αγγείων και λιπώδους ιστού που σε κάθε περίπτωση εμπεριέχεται στο τμήμα που μελετάται κατά τα ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα σε περιτόναιο προβάτου.

Υπάρχουν αρκετές πηγές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση. Μια από αυτές είναι από το διηθούμενο υγρό ασθενών σε περιτοναϊκή κάθαρση, φυσικά εξαιρούνται οι ασθενείς με μικροβιακή λοίμωξη. Η καθαρότητα της καλλιέργειας εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που ο ασθενής ακολουθεί αυτό τον τρόπο θεραπείας. Τα κύτταρα απαιτούν διπλάσιο χρόνο για να φτάσει η καλλιέργεια σε κορεσμό και πολύ συχνά συμπεριλαμβάνονται ετερογενείς πληθυσμοί κυττάρων

όπως πολυγωνικά μεσοθηλιακά κύτταρα, διαφοροποιημένα και σε κάποιες των περιπτώσεων ινοβλάστες. Το πρωτόκολλο απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε για το ανθρώπινο περιτόναιο θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε μείζον επίπλυν κουνελιού, αρουραίου ή ακόμη και προβάτου και μάλιστα παρουσιάζει πλεονεκτήματα. Υπάρχει πιο συχνή πρόσβαση στον ιστό και μπορεί να επιλεχτεί νεαρής ηλικίας ζώο, από το περιτόναιο του οποίου μπορεί να προκύψουν κύτταρα με μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Η καλλιέργεια αυτή συχνά καταλήγει σε αθάνατα κύτταρα, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί με τα ανθρώπινα καθώς προέρχονται συνήθως από άτομα μεγάλης ηλικίας και διαθέτουν περιορισμένο χρόνο πριν αρχίσουν να διαφοροποιούνται ή να πεθαίνουν. Υπάρχει επίσης και εμπορική κυτταρική σειρά φυσιολογικών ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων, η Met-5A. Προέρχεται από υπεζωκοτικό υγρό ατόμων χωρίς καρκίνο και η σειρά αυτή χρησιμοποιείται αναγνωρισμένα σε μελέτες περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων (130).

Η πορεία της καλλιέργειας μετρώντας τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση στα Snapwells (97) και η τιμή της σε κατάσταση κορεσμού $31,4 \pm 0,97 \Omega \cdot \text{cm}^2$ συνάδει με πρόσφατες μελέτες (86). Η εφαρμογή της μεθόδου Ussing σε πειράματα διαβατότητας σε πρωτογενή σειρά ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των υπό μελέτη ουσιών (δεξαμεθαζόνης και VEGF) ήταν πιλοτική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνηγορούν υπέρ των ακόλουθων συμπερασμάτων:

1. Η δεξαμεθαζόνη προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου προβάτου όταν δράσει στην κορυφαία και βασεοπλευρική επιφάνεια.
2. Η μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ήταν άμεση εμπλέκοντας τη δεξαμεθαζόνη σε ένα μη γενομικό τρόπο δράσης.
3. Η δράση της δεξαμεθαζόνης επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω των γλυκοκορτικοειδικών και αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων.
4. Η μιφεπριστόνη, αναστολέας των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων, παρουσίασε αγωνιστική δράση μειώνοντας άμεσα τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του περιτοναίου. Η δράση αυτή εμπλέκει τη μιφεπριστόνη σε ένα μη γενομικό μονοπάτι, πιθανότατα κοινό με αυτό της δεξαμεθαζόνης.
5. Η σπιρονολακτόνη, αναστολέας των αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων παρουσίασε επίσης αγωνιστική δράση μειώνοντας άμεσα τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του περιτοναίου σε όλες τις επιφάνειες όπου εφαρμόστηκε.
6. Η δράση της δεξαμεθαζόνης επιτυγχάνεται μέσω των ευαίσθητων σε αμιλορίδη επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC).
7. Η δράση της δεξαμεθαζόνης περιλαμβάνει επίσης την ενεργοποίηση της αντιμεταφοράς ιόντων Na^+/H^+ .
8. Η δεξαμεθαζόνη τέλος φάνηκε ότι δρα μέσω της ενεργοποίησης της αντλίας Na^+/K^+ .

9. Οι παραπάνω πιθανοί μηχανισμοί άμεσης δράσης της δεξαμεθαζόνης στο περιτόναιο προβάτου είναι μια πρώτη ένδειξη για το πώς θα μπορούσε η δεξαμεθαζόνη να συμβάλλει στην καλύτερη υπερδιήθηση, αυξάνοντας τη διακίνηση ιόντων νατρίου και νερού κατά την περιτοναϊκή κάθαρση.
10. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) οδηγεί με ταχύ ρυθμό στην αύξηση της διαπερατότητας του τοιχωματικού και σπλαχνικού περιτοναίου όταν δράσει στην κορυφαία και βασηοπλευρική επιφάνεια.
11. Η δράση του VEGF μεσολαβείται δια των VEGFR2 υποδοχέων.
12. Η άμεση δράση του VEGF στο περιτόναιο προβάτου υποδηλώνει ότι ο VEGF ενδεχομένως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη συνοχή της περιτοναϊκής μεμβράνης και επομένως στην πορεία της περιτοναϊκής κάθαρσης.
13. Η πρωτογενής σειρά ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων που δημιουργήθηκε μπορεί σταδιακά να καθιερωθεί σαν μέθοδος για περαιτέρω πειράματα διαβατότητας και ηλεκτροφυσιολογίας (με τη μέθοδο Ussing).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Χ.Ν.Α.) τελικού σταδίου αυξάνεται συνεχώς σε συχνότητα τα τελευταία χρόνια τόσο παγκοσμίως, όσο και στην Ελλάδα σε μικρότερο όμως βαθμό. Στο τελικό στάδιο της ουραιμίας η περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ) ενδείκνυται ως μία θεραπεία υποκατάστασης. Η ΠΚ εφαρμόζεται στο 15% περίπου των ασθενών με Χ.Ν.Α. τελικού σταδίου. Κατά τη διάρκεια της ΠΚ η ημιδιαπερατή περιτοναϊκή μεμβράνη χρησιμεύει ως ηθμός. Τα υπέρτονα όμως διαλύματα της ΠΚ δεν είναι βιοσυμβατά με τη φυσιολογία του περιτοναίου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μία μορφή χρόνιας περιτονίτιδας, ίνωση και διαταραχές της αγγειογένεσης. Έτσι η περιτοναϊκή μεμβράνη χάνει σταδιακά την ιδιότητά της αυτή. Τελικά, επέρχεται απώλεια της υπερδιήθησης σε ποσοστό 50% των ασθενών που χρησιμοποιούν την ΠΚ για περισσότερο από 6 χρόνια και ανεπάρκεια της μεθόδου. Το μεσοθήλιο και τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μεμβράνης ως βιολογικού ηθμού και φραγμού.

Σε αυτά τα πλαίσια, μελέτες πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της επίδρασης φαρμακολογικών και άλλων παραγόντων στη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη ηλεκτροφυσιολογίας σε περιτόναιο προβάτου της δράσης αφενός της δεξαμεθαζόνης, γνωστού αντιφλεγμονώδους γλυκοκορτικοειδούς (κορτικοστεροειδούς) και αφετέρου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος πιθανολογείται ότι εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της περιτοναϊκής ίνωσης.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαβατότητας σε τοιχωματικό και σπλαχνικό περιτόναιο προβάτου με τη μέθοδο Ussing. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη μέτρηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης (transmesothelial resistance, R_{TM}) και την εξαγωγή συμπερασμάτων για την ιοντική διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Η δεξαμεθαζόνη προκαλεί ταχεία αύξηση στη διαπερατότητα του περιτοναίου προβάτου. Η δράση της αυτή επιτυγχάνεται μερικώς μέσω των γλυκοκορτικοειδικών και αλατοκορτικοειδικών υποδοχέων. Περιλαμβάνει επίσης την ενεργοποίηση των ευαίσθητων σε αμιλορίδη επιθηλιακών διαύλων Na^+ (ENaC), την αντιμεταφορά ιόντων Na^+/H^+ και την ενεργοποίηση της Na^+/K^+ ATPάσης. Ο VEGF αυξάνει με ταχύ ρυθμό τη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης προβάτου και η δράση του αυτή πραγματοποιείται μέσω των VEGFR2 υποδοχέων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε περιτόναιο προβάτου δίνουν μια πρώτη ένδειξη για το πώς θα μπορούσε η δεξαμεθαζόνη να συμβάλλει στην καλύτερη υπερδιήθηση, αυξάνοντας τη διακίνηση ιόντων νατρίου και νερού κατά την περιτοναϊκή κάθαρση. Η άμεση δράση του VEGF από την άλλη υποδηλώνει ότι ο VEGF ενδεχομένως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη συνοχή της περιτοναϊκής μεμβράνης και επομένως στην πορεία της περιτοναϊκής κάθαρσης.

Τέλος, επιτεύχθηκε η απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων και πραγματοποιήθηκαν πρωταρχικά πειράματα διαβατότητας με τη μέθοδο Ussing.

SUMMARY

The number of patients with end-stage renal disease (ERSD) is continuously increased in the past few years worldwide, in greek population as well, but in a smaller degree. In the end stage of uremia a replacement treatment of peritoneal dialysis (PD) is recommended. PD is applied in the 15% of dialysis patients. During PD the semi-permeable peritoneal membrane is used as a filter. The hypertonic PD solutions are bioincompatible with the peritoneum physiology. As a result repeated episodes of peritonitis, fibrosis and disorders of angiogenesis eventuate. Thus, the peritoneal membrane loses its property as a semi-permeable membrane. Finally, it occurs high incidence of ultrafiltration failure (UF) in 50% of PD patients treated for more than 6 years and inadequacy of method. Peritoneal mesothelium and mesothelial cells play an important role in the maintenance of the membrane as a biological barrier.

In this context, studies are performed in order to investigate the effect of pharmacological agents and other substances in the permeability of peritoneal membrane. The aim of the present thesis was the electrophysiological study in sheep peritoneum of dexamethasone, a glucocorticoid (corticosteroid) known for its anti-inflammatory effect and vascular endothelial growth factor (VEGF), which possibly appears to be involved in the pathophysiology of peritoneal fibrosis.

Permeability experiments in peritoneal and visceral sheep peritoneum were performed by Ussing technique. This method allows the measurement of transmesothelial resistance, R_{TM} , and permeability conclusions are thus drawn for the ionic permeability of peritoneal membrane.

Dexamethasone rapidly increased the permeability of sheep peritoneum. This action was partially achieved via glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. It was also mediated via the activation of amiloride-sensitive sodium channels (ENaC),

Na^+/H^+ exchanger and the activation of Na^+/K^+ ATPase. VEGF rapidly increased the permeability of sheep peritoneal membrane and this action was mediated through VEGFR2 receptors.

The result of the present study in sheep peritoneum give first evidence of how dexamethasone might contribute toward better ultrafiltration, by increasing the transport of sodium and water during a PD dwell. The direct action of VEGF indicates a potential role of VEGF in the cohesion of the peritoneal membrane and consequently in the course of PD.

Finally, the isolation and culture of human peritoneal mesothelial cells was achieved and initial permeability experiments were performed at Ussing apparatus.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χατζημπούγιας Ι. Ανατομία - Ιστολογία του Περιτοναίου. In: Ζηρογιάννης Π, Κατιρτζόγλου Α, editors. Πρακτικά 1ου Πανελληνίου Συμποσίου Περιτοναϊκής Κάθαρσης. Αλεξανδρούπολη: Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία; 1991. p. 35-48.
2. Άγιος ΑΕ. Το περιτόναιο. In: Α.Ε.Άγιος, editor. Περιγραφική και εφαρμοσμένη ανατομική Β Τα σπλάχνα Θεσσαλονίκη: University Studio Press; 1997. p. 267-93.
3. Gotloib L. SA, Wajsbrot V. Functional structure of the peritoneum as a dialysing membrane. In: Gokal R., Khanna R., Krediet R.Th., Nolph K.D., editors. Textbook of Peritoneal Dialysis. 2nd ed. Great Britain: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 37-96.
4. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*. 2002 Sep;7(3):171-91.
5. Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, Didio LJ. Comparative electron microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium, as materials for cardiac valve bioprostheses. *J Submicrosc Cytol*. 1986 Jan;18(1):53-65.
6. Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G. Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study. *Chest*. 1988 Jan;93(1):149-53.
7. Wang NS. The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1974 Nov;110(5):623-33.
8. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan;36(1):9-16.

9. Michailova KN, Usunoff KG. Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2006;183:i-vii, 1-144, back cover.
10. Hesseldahl H, Larsen JF. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat.* 1969 Nov;126(3):315-35.
11. Tiedemann K. On the yolk sac of the cat. Endoderm and mesothelium. *Cell Tissue Res.* 1976 Oct 1;173(1):109-27.
12. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1213-28.
13. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium: a histochemical study of resting mesothelial cells. *J Pathol.* 1980 Nov;132(3):273-84.
14. Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 2007 Jun;27 Suppl 2:S110-5.
15. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int.* 2000 Feb;57(2):476-86.
16. Cunliffe WJ, Sugarbaker PH. Gastrointestinal malignancy: rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg.* 1989 Oct;76(10):1082-90.
17. Jones LM, Gardner MJ, Catterall JB, Turner GA. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis.* 1995 Sep;13(5):373-80.
18. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Albumin transcytosis in mesothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jan;282(1):L3-11.

19. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol.* 2002 Nov;93(5):1806-12.
20. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J.* 2002 Dec;20(6):1545-58.
21. Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):385-410.
22. Holmdahl L, Ivarsson ML. The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg.* 1999 Nov;165(11):1012-9.
23. Miserocchi G, Agostoni E. Contents of the pleural space. *J Appl Physiol.* 1971 Feb;30(2):208-13.
24. Simon M, Piestrzynska T. Features of the parietal peritoneum as a "leaky" membrane. *Post Biol Kom.* 1984;11:391-4.
25. Δημητριάδης ΑΧ. Οι Λειτουργίες του Περιτοναίου. In: Π.Ζηρογιάννης, Κατιρτζόγλου Α, editors. Πρακτικά 1ου Πανελληνίου Συμποσίου Περιτοναϊκής Κάθαρσης. Αλεξανδρούπολη: Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία; 1991. p. 49-57.
26. Nolph K.D. Peritoneal anatomy and transport biology. In: Drukker W., Parsons F.M., Mahler J.E., editors. *Replacement of Renal Function by Dialysis.* Boston: Martinus Nijhoff Publ.; 1986. p. 440-56.
27. Ι. Στεφανίδης. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια. In: Ι. Στεφανίδης, Σταθάκης Ν, editors. *Σημειώσεις Παθολογίας.* Λάρισα: Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, p. 43-63.
28. Peter B.G., Daugirdas J.T. Physiology of Peritoneal Dialysis. In: Peter B.G., Daugirdas J.T., Ing T.S., editors. *Handbook of Dialysis.* 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 323-38.

29. Schoenicke G, Diamant R, Donner A, Roehrborn A, Grabensee B, Plum J. Histochemical distribution and expression of aquaporin 1 in the peritoneum of patients undergoing peritoneal dialysis: relation to peritoneal transport. *Am J Kidney Dis.* 2004 Jul;44(1):146-54.
30. Devuyst O. New insights in the molecular mechanisms regulating peritoneal permeability. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Apr;17(4):548-51.
31. Kim YL. Update on mechanisms of ultrafiltration failure. *Perit Dial Int.* 2009 Feb;29 Suppl 2:S123-7.
32. Selgas R, Bajo A, Jimenez-Heffernan JA, Sanchez-Tomero JA, Del Peso G, Aguilera A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell--its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Jul;21 Suppl 2:ii2-7.
33. Spring KR. Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation. *News Physiol Sci.* 1999 Jun;14:92-8.
34. Schultz SG. A century of (epithelial) transport physiology: from vitalism to molecular cloning. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 1):C13-23.
35. Benos DJ. Introduction to medical physiology: cellular membranes and transmembrane transport of solutes and water. *Am J Physiol.* 1996 Dec;271(6 Pt 3):S2-9.
36. Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol.* 1987 Dec;253(6 Pt 1):C749-58.
37. Harris PJ, Chatton JY, Tran PH, Bungay PM, Spring KR. pH, morphology, and diffusion in lateral intercellular spaces of epithelial cell monolayers. *Am J Physiol.* 1994 Jan;266(1 Pt 1):C73-80.

38. Wright EM, Pietras RJ. Routes of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J Membr Biol.* 1974 Jul 12;17(3):293-312.
39. Gorodeski GI, Goldfarb J. Extracellular ATP regulates transcervical permeability by modulating two distinct paracellular pathways. *Am J Physiol.* 1997 May;272(5 Pt 1):C1602-10.
40. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1951 Aug 25;23(2-3):110-27.
41. Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros.* 2004 Aug;3 Suppl 2:123-6.
42. Gotoh Y, Kamada N, Momose D. The advantages of the Ussing chamber in drug absorption studies. *J Biomol Screen.* 2005 Aug;10(5):517-23.
43. Simon M. Peritoneal mesothelium in vitro: an electrophysiologic study. *Perit Dial Int.* 1996 Jul-Aug;16(4):393-7.
44. Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol.* 2000 Jan;21(1):57-94.
45. Borski RJ. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Dec;11(10):427-36.
46. Haller J, Halasz J, Makara GB, Kruk MR. Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;23(2):337-44.
47. Cole TJ. Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands. *Biotechnol Annu Rev.* 2006;12:269-300.

48. Barquin N, Ciccolella DE, Ridge KM, Sznajder JJ. Dexamethasone upregulates the Na-K-ATPase in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):L825-30.
49. Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Margioris AN, Gravanis A, Stournaras C. Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J Cell Biochem*. 1996 Aug;62(2):251-61.
50. Quesnell RR, Han X, Schultz BD. Glucocorticoids stimulate ENaC upregulation in bovine mammary epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 May;292(5):C1739-45.
51. Ramminger SJ, Richard K, Inglis SK, Land SC, Olver RE, Wilson SM. A regulated apical Na(+) conductance in dexamethasone-treated H441 airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Aug;287(2):L411-9.
52. Urbach V, Walsh DE, Mainprice B, Bousquet J, Harvey BJ. Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl⁻ secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. *J Physiol*. 2002 Dec 15;545(Pt 3):869-78.
53. Binder HJ, McGlone F, Sandle GI. Effects of corticosteroid hormones on the electrophysiology of rat distal colon: implications for Na⁺ and K⁺ transport. *J Physiol*. 1989 Mar;410:425-41.
54. Clauss W, Durr J, Skadhauge E, Hornicke H. Effects of aldosterone and dexamethasone on apical membrane properties and Na-transport of rabbit distal colon in vitro. *Pflugers Arch*. 1985 Feb;403(2):186-92.
55. Devuyt O, Ni J, Verbavatz JM. Aquaporin-1 in the peritoneal membrane: implications for peritoneal dialysis and endothelial cell function. *Biol Cell*. 2005 Sep;97(9):667-73.

56. Stoenoiu MS, Ni J, Verkaeren C, Debaix H, Jonas JC, Lameire N, et al. Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Mar;14(3):555-65.
57. Imai H, Nakamoto H, Fukushima R, Yamanouchi Y, Ishida Y, Suzuki H. Glucocorticoid protects against the development of encapsulating peritoneal sclerosis on peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial*. 2002;18:124-30.
58. Imai H, Nakamoto H, Ishida Y, Inoue T, Kanno Y, Okada H, et al. Glucocorticoid restores the deterioration of water transport in the peritoneum through increment in aquaporin. *Adv Perit Dial*. 2000;16:297-302.
59. McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol*. 1991 Oct;21(10):2523-7.
60. Zhang S, Jonklaas J, Danielsen M. The glucocorticoid agonist activities of mifepristone (RU486) and progesterone are dependent on glucocorticoid receptor levels but not on EC50 values. *Steroids*. 2007 Jun;72(6-7):600-8.
61. Nordeen SK, Bona BJ, Beck CA, Edwards DP, Borrer KC, DeFranco DB. The two faces of a steroid antagonist: when an antagonist isn't. *Steroids*. 1995 Jan;60(1):97-104.
62. Agarwai MK. The antiglucocorticoid action of mifepristone. *Pharmacol Ther*. 1996;70(3):183-213.
63. Stefanidis I, Liakopoulos V, Kourti P, Zarogiannis S, Poultsidi A, Mertems PR, et al. Amiloride-sensitive sodium channels on the parietal human peritoneum: evidence by ussing-type chamber experiments. *ASAIO J*. 2007 May-Jun;53(3):335-8.

64. Zarogiannis S, Kourti P, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultsidi A, Gourgoulianis K, 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.
65. Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol.* 2001 Apr;90(4):1565-9.
66. Sarkos S, Hatzoglou C, Dahabre J, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002 Aug 30;132(2):233-7.
67. Garty H, Benos DJ. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev.* 1988 Apr;68(2):309-73.
68. Ji HL, Nie HG. Electrolyte and Fluid Transport in Mesothelial Cells. *J Epithel Biol Pharmacol.* 2008;1:1-7.
69. Teiwes J, Toto RD. Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. A potential role for amiloride. *Am J Hypertens.* 2007 Jan;20(1):109-17.
70. Cox T. Amiloride analog stimulation of short-circuit current in larval frog skin epithelium. *J Exp Biol.* 1997 Dec;200(Pt 23):3055-65.
71. Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H, Silbernagl S. Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10500-4.
72. Jorgensen PL. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump. Protein structure and conformations of the pure (Na⁺ +K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Aug 11;694(1):27-68.

73. Masuzawa T, Ohta T, Kawakami K, Sato F. Immunocytochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase in the canine choroid plexus. *Brain*. 1985 Sep;108 (Pt 3):625-46.
74. Rajasekaran SA, Hu J, Gopal J, Gallemore R, Ryazantsev S, Bok D, et al. Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Jun;284(6):C1497-507.
75. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. Electrolyte transport across the pleura of rabbits. *Respir Physiol*. 1991 Oct;86(1):125-38.
76. Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol*. 1990 Jul;81(1):19-27.
77. 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;23:43-7.
78. Bhutada A, Wassinger WW, Ismail-Beigi F. Dexamethasone markedly induces Na,K-ATPase mRNA beta 1 in a rat liver cell line. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):10859-66.
79. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007 Dec 15;102(6):1358-67.
80. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
81. Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in

- human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Apr;11(4):717-28.
82. Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med.* 1999 Aug;134(2):124-32.
83. De Vriese AS, Mortier S, Lameire NH. Glucotoxicity of the peritoneal membrane: the case for VEGF. *Nephrol Dial Transplant.* 2001 Dec;16(12):2299-302.
84. Mortier S, De Vriese AS, Lameire N. Recent concepts in the molecular biology of the peritoneal membrane - implications for more biocompatible dialysis solutions. *Blood Purif.* 2003;21(1):14-23.
85. Krediet RT, Zweers MM, van der Wal AC, Struijk DG. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int.* 2000;20 Suppl 2:S19-25.
86. Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, Horiuchi T. Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. *J Artif Organs.* 2006;9(4):241-50.
87. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):23463-7.
88. Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Duran WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res.* 2001 Nov;62(3):252-62.

89. Wang W, Dentler WL, Borchardt RT. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jan;280(1):H434-40.
90. Manley PW, Bold G, Bruggen J, Fendrich G, Furet P, Mestan J, et al. Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 11;1697(1-2):17-27.
91. Breborowicz A, Rodela H, Knapowski J, Oreopoulos DG. Permeability of different parts of the peritoneal mesothelium to solutes: an in vitro study. *Perit Dial Int*. 1989;9(2):135-41.
92. Barajas-Lopez C, Huizinga JD. Ouabain-induced excitation of colonic smooth muscle due to block of K⁺ conductance by intracellular Na⁺ ions. *Eur J Pharmacol*. 1992 Oct 6;221(1):51-8.
93. Urbach V, Van Kerkhove E, Maguire D, Harvey BJ. Cross-talk between ATP-regulated K⁺ channels and Na⁺ transport via cellular metabolism in frog skin principal cells. *J Physiol*. 1996 Feb 15;491 (Pt 1):99-109.
94. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*. 1990 Jun;37(6):1563-70.
95. Riera M, McCulloch P, Pazmany L, Jagoe T. Optimal method for isolation of human peritoneal mesothelial cells from clinical samples of omentum. *J Tissue Viability*. 2006 Nov;16(4):22-4.
96. Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, et al. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased

- permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett*. 2003 Jun 26;344(2):112-6.
97. Li FK, To CH, Leung JK, Chan TM, Lai KN. Electrophysiology and glucose transport of human peritoneal mesothelial cells: implications for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2001 Mar-Apr;21(2):115-21.
98. Oberleithner H, Riethmuller C, Ludwig T, Shahin V, Stock C, Schwab A, et al. Differential action of steroid hormones on human endothelium. *J Cell Sci*. 2006 May 1;119(Pt 9):1926-32.
99. Verriere VA, Hynes D, Faherty S, Devaney J, Bousquet J, Harvey BJ, et al. Rapid effects of dexamethasone on intracellular pH and Na⁺/H⁺ exchanger activity in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):35807-14.
100. Wong CF, Beshir S, Khalil A, Pai P, Ahmad R. Successful treatment of encapsulating peritoneal sclerosis with azathioprine and prednisolone. *Perit Dial Int*. 2005 May-Jun;25(3):285-7.
101. Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 2003 Apr;144(4):1164-74.
102. Verikouki CH, Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Kallitsaris A, Messinis IE. Rapid effect of progesterone on transepithelial resistance of human fetal membranes: evidence for non-genomic action. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Feb;35(2):174-9.

103. Nordeen SK, Bona BJ, Moyer ML. Latent agonist activity of the steroid antagonist, RU486, is unmasked in cells treated with activators of protein kinase A. *Mol Endocrinol.* 1993 Jun;7(6):731-42.
104. Hostetter TH, Ibrahim HN. Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Sep;14(9):2395-401.
105. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2;341(10):709-17.
106. Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Aug;19(8):1459-62.
107. Duman S. The renin-angiotensin system and peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2004 Jan-Feb;24(1):5-9.
108. Nakamoto H, Imai H, Fukushima R, Ishida Y, Yamanouchi Y, Suzuki H. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int.* 2008 Jun;28 Suppl 3:S83-7.
109. Ersoy R, Celik A, Yilmaz O, Sarioglu S, Sis B, Akan P, et al. The effects of irbesartan and spironolactone in prevention of peritoneal fibrosis in rats. *Perit Dial Int.* 2007 Jul-Aug;27(4):424-31.
110. Nishimura H, Ito Y, Mizuno M, Tanaka A, Morita Y, Maruyama S, et al. Mineralocorticoid receptor blockade ameliorates peritoneal fibrosis in new rat peritonitis model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 May;294(5):F1084-93.
111. Ganapathy V, Balkovetz DF, Miyamoto Y, Ganapathy ME, Mahesh VB, Devoe LD, et al. Inhibition of human placental Na⁺-H⁺ exchanger by cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Oct;239(1):192-7.

112. Turner JR, Black ED, Ward J, Tse CM, Uchwat FA, Alli HA, et al. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal brush-border Na(+)/H(+) exchanger NHE3. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C1918-24.
113. Guney S, Schuler A, Ott A, Hoschele S, Zugel S, Baloglu E, et al. Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na⁺-K⁺-ATPase and epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Nov;293(5):L1332-8.
114. Chen WL, Lin CT, Yao CC, Huang YH, Chou YB, Yin HS, et al. In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells. *Ocul Immunol Inflamm*. 2006 Aug;14(4):215-23.
115. Ellis D, Sothi TD, Avner ED. Glucocorticoids modulate renal glucocorticoid receptors and Na-K ATPase activity. *Kidney Int*. 1987 Oct;32(4):464-71.
116. Leung JC, Chan LY, Li FF, Tang SC, Chan KW, Chan TM, et al. Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jul;20(7):1336-49.
117. Larsson A, Skoldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis*. 2002;5(1-2):107-10.
118. del Peso G, Selgas R, Bajo MA, Fernandez de Castro M, Aguilera A, Cirugeda A, et al. Serum level of vascular endothelial growth factor is influenced by erythropoietin treatment in peritoneal dialysis patients. (Grupo de Estudios Peritoneales de Madrid). *Adv Perit Dial*. 2000;16:85-9.

119. Selgas R, del Peso G, Bajo MA, Molina S, Cirugeda A, Sanchez-Tomero JA, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in peritoneal dialysis effluent. *J Nephrol*. 2001 Jul-Aug;14(4):270-4.
120. Zweers MM, Struijk DG, Smit W, Krediet RT. Vascular endothelial growth factor in peritoneal dialysis: a longitudinal follow-up. *J Lab Clin Med*. 2001 Feb;137(2):125-32.
121. Mirzapoiazova T, Kolosova I, Usatyuk PV, Natarajan V, Verin AD. Diverse effects of vascular endothelial growth factor on human pulmonary endothelial barrier and migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Oct;291(4):L718-24.
122. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int*. 1999 Jan;55(1):341-56.
123. Breborowicz A, Rodela H, Oreopoulos DG. Toxicity of osmotic solutes on human mesothelial cells in vitro. *Kidney Int*. 1992 May;41(5):1280-5.
124. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, et al. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett*. 1999 Dec 17;463(3):260-4.
125. Witowski J, Korybalska K, Ksiazek K, Wisniewska-Elnur J, Jorres A, Lage C, et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Apr;19(4):917-24.

126. Ha H, Yu MR, Lee HB. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2001 Feb;59(2):463-70.
127. Kim H, Lee JM, Park JS, Jo SA, Kim YO, Kim CW, et al. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jul 18;372(1):243-8.
128. Edelman JL, Lutz D, Castro MR. Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Res.* 2005 Feb;80(2):249-58.
129. Hartnett ME, Lappas A, Darland D, McColm JR, Lovejoy S, D'Amore PA. Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF-dependent mechanism. *Exp Eye Res.* 2003 Nov;77(5):593-9.
130. Yung S, Li FK, Chan TM. Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int.* 2006 Mar-Apr;26(2):162-73.