



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθύντρια: Καθηγήτρια Χρυσή Χατζόγλου**

**Διδακτορική Διατριβή**

**«Μελέτη της επίδρασης του ωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα  
του υπεζωκότα»**

υπό

**ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΠΕΠΠΑ**

Φυσικού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2021

© 2021 ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΠΕΠΠΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (4<sup>η</sup>/16-12-2020 ΓΣΕΕΣ):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Χατζόγλου Χρυσή**  
(Επιβλέπουσα)      Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Ζαρογιάννης Σωτήριος**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος**  
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Πανταζόπουλος Ιωάννης**  
Επίκουρος Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Καλομενίδης Ιωάννης**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό &  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Μάλλη Φωτεινή**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας-Φροντίδας  
καρδιοαναπνευστικού ασθενή, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Κώτσιου Ουρανία**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Παθοφυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα  
Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν υποστηρικτικά στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας κυρία Χρυσή Χατζόγλου για τη καθοδήγηση, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας κύριο Σωτήρη Ζαρογιάννη για την καθημερινή υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κύριο Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για τις πολύτιμες συμβουλές και τη παρότρυνση σε όλα τα στάδια της συνεργασίας μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άψογη συνεργασία και όλους τους εργαζόμενους στα Σφαγεία Λάρισας ΑΕ και ιδιαίτερος στον κύριο Σάκη Πουρνάρα για την παροχή πειραματικού υλικού.

Οφείλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεισφορά και τη συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Βασιλική Γεωργία Πέππα



## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### Προσωπικές πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο	<b>Βασιλική - Γεωργία Πέππα</b>	
Διεύθυνση	31 <sup>ης</sup> Αυγούστου 30, 41221 – Λάρισα	
Διεύθυνση ηλεκ/νικού ταχυδρομείου	<a href="mailto:vikpeppa@gmail.com">vikpeppa@gmail.com</a>	
Τηλέφωνα	Οικίας:	2410235931
	Κινητό:	6939523448
Υπηκοότητα	Ελληνική	
Ημερομηνία γέννησης	11 Ιουλίου 1987	

### Εκπαίδευση και κατάρτιση

Χρονολογία αποφοίτησεως	Φεβρουάριος 2011 (Βαθμός Λίαν Καλώς 6,9)
Τίτλος πτυχιακής εργασίας	Δομικές και μικροδομικές μεταβολές υπό πίεση, στον κρύσταλλο $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{CuO}_4$
Τίτλος του πτυχίου	Πτυχίο Φυσικής
Τίτλος του Πανεπιστημίου	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Χρονολογία αποφοίτησεως	Φεβρουάριος 2013 (Βαθμός Άριστα 8,6)
Τίτλος πτυχιακής εργασίας	Κρυσταλλική δομή μεταλλαγμένων μορφών της λεκτίνης του μύκητα <i>Sclerotium Rolfsii</i>
Τίτλος του μεταπτυχιακού	Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Διαγνωστικοί δείκτες – Μοριακή γενετική
Τίτλος του Πανεπιστημίου	Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – Τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας
Εκπόνηση διδακτορικής Διατριβής	2013- σήμερα
Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής	Μελέτη της επίδρασης του ωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα
Τίτλος Πανεπιστημίου	Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Παρουσιάσεις

- *Peppa Vasiliki, Solenov I. Eugene, Molyvdas Pasxalis Adam, Gourgoulisanis Konstantinos, Hatzoglou Chryssi, Zarogiannis Sotiris* Effects of hyper and hypo osmotic stress on pleural mesothelial cell adhesion and migration. ERS international Congress 2015, Amsterdam, Netherlands
- **Peppa V., Solenov Evgeniy, Tsilioni I., Kalomenidis I., Molyvdas P.A., Gourgoulisanis K., Hatzoglou C, Zarogiannis S.**Osmotic Stress alters the permeability of the pleura and the migration properties of mesothelial cells.23rd Congress of Hellenic Thoracic Society, November 2014, Athens, Greece
- **Peppa V., Solenov E, Tsilioni I, Kalomenidis I, MolyvdasP.A., Gourgoulisanis K, Hatzoglou C, Zarogiannis S.G.**.Osmotic stress alters the permeability of the pleura and the migration properties of mesothelial cells. 9th International Conference of Anticancer Research, October 2014, Sithonia, Greece
- **Peppa V, Solenov S, Jagirdar R, Arsenopoulou Z, Hatzoglou C, Molyvdas PA, Gourgoulisanis K, Zarogiannis S.G.** Gene expression profile of the ABCC family of transporters and associations of the gene expression patterns of the differentially expressed members in MPM. 8th Conference of Hellenic Society of Computational Biology and Bioinformatics, November 2013, Lamia, Greece.
- *Kantsadi A, Peppa V, Skamnaki V, Zographos S, Inamdar S, Swamy B, Leonidas DD.* The crystal structure of Sclerotium Rolfsii lectin variants with fine carbohydrate specificity, 6th International Conference of Hellenic Crystallographic Society, September 2012, Athens, Greece.

## Δημοσιεύσεις

- V G Peppa· E I Solenov, I Kalomenidis, I Tsilioni, K I Gourgoulisanis, C Hatzoglou, S G Zarogiannis ·Pleural effusion osmolality correlation with pH and glucose level of pleural fluid and its effects on the pleural membrane permeability. *Respir Physiol Neurobiol* 2020 Nov 12; 285:103581
- O Nikitidou, V I Peppa, K Leivaditis, T Eleftheriadis, S G Zarogiannis , V Liakopoulos Animal models in peritoneal dialysis. . *Front Physiol* 2015 Sep 1; 6:244.
- V I Peppa<sup>1</sup>, H Venkat<sup>2</sup>, A L Kantsadi<sup>3</sup>, S R Inamdar<sup>4</sup>, G G Bhat , S Eligar<sup>6</sup>, A Shivanand, V B Chachadi, G J Satisha, B M Swamy , V T Skamnaki, S E Zographos, D D Leonidas. Molecular Cloning, Carbohydrate Specificity and the Crystal Structure of Two Sclerotium rolfsii Lectin Variants. *Molecules* 2015 Jun 12;20(6)
- V I Peppa , Z V Arsenopoulou , S G Zarogiannis , T Deligiorgi , R Jagirdar, I Makantasis , I Stefanidis, V Liakopoulos, P A Molyvdas, K I Gourgoulisanis, C Hatzoglou VEGF increases the permeability of sheep pleura ex vivo through VEGFR2 stimulation. *Cytokine* 2014 Oct;69(2):284-8.
- 

## Διακρίσεις

- Βραβείο Ν. Οικονομάκος της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρίας, για την παρουσίαση The crystal structure of Sclerotium Rolfsii lectin variants with fine carbohydrate specificity (Σεπτέμβριος 2012)



**«Μελέτη της επίδρασης του ωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα  
του υπεζωκότα»**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΠΕΠΠΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2021

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Χρυσή Χατζόγλου** Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Σωτήριος Ζαρογιάννης** Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης** Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## Περίληψη

Η υπεζωκοτική κοιλότητα εκτίθεται σε μεταβολές της ωσμωτικότητας κατά την ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής. Στη παρούσα μελέτη μετρήθηκε το εύρος των τιμών της ωσμωτικότητας υπεζωκοτικών συλλογών προερχόμενων από διάφορες παθολογικές καταστάσεις (κακοήθειες, παραπνευμονικές και διδρωματικές), με παράλληλη ανάλυση και συσχέτιση των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους (γλυκόζη, ολική πρωτεΐνη, LDH, pH). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής της ωσμωτικότητας στην διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου μέσω της μέτρησης της διαμεσοθηλιακής αντίστασης αλλά και η επίδρασή της στην κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και πολλαπλασιασμό καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A, και κυττάρων μεσοθηλιώματος M14K (επιθηλιοειδούς τύπου) και ZL34 (σαρκωματοειδούς τύπου). Το εύρος των υπεζωκοτικών συλλογών που μετρήθηκε (250mOsm – 350mOsm) χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή του υπερωσμωτικού και υποωσμωτικού στρες αντίστοιχα. Το υποωσμωτικό και όχι το υπερωσμωτικό στρες μείωσε τη διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Το υπερωσμωτικό και υποωσμωτικό στρες προκάλεσε μείωση στο ρυθμό μετανάστευσης των MeT-5A και ZL34 κυττάρων ενώ δεν επηρέασε τα M14K. Αντίστοιχα η κυτταρική προσκόλληση ενισχύθηκε παρουσία υπερωσμωτικού στρες στα MeT-5A και ZL34 κύτταρα ενώ δεν επηρεάστηκε στα M14K. Το υποωσμωτικό στρες προκάλεσε μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης μόνο στα ZL34 κύτταρα. Τέλος ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός δεν επηρεάστηκε παρουσία υπερωσμωτικού στρες και στις τρεις κυτταρικές σειρές ενώ μειώθηκε παρουσία υποωσμωτικού στρες στα MeT-5A και M14K κύτταρα ενώ δεν μεταβλήθηκε στα ZL34. Συνολικά παρατηρήθηκε ότι το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο εκτίθεται σε διάφορες τιμές της ωσμωτικότητας και η βαθμίδωση αυτή επηρεάζει τη διαπερατότητα αλλά και της κυτταρικές λειτουργίες τόσο των καλοήθων όσο και των καρκινικών κυττάρων.

## Abstract

The pleural cavity is exposed to osmolarity changes during the development of pleural effusion. In the present study the range of osmolarity of pleural effusions caused by different pathologies (malignant, parapneumonic and transudative) was measured, followed by analysis and correlation with the biochemical characteristics (glucose, total protein, LDH, pH). The effect of osmolality on the pleural membrane permeability was studied on sheep parietal pleura by means on transmesothelial resistance measurements while its effects on cell migration, adhesion and proliferation was studied on benign mesothelial cells (MeT-5A) and on the mesothelioma cell lines, M14K; (epithelioid mesothelioma) and ZL34 (sarcomatoid mesothelioma). The range of osmolarity (250mOsm – 350mOsm) that was measured was used to apply hyperosmotic and hypoosmotic stress respectively. Our results suggest that hypoosmotic but not hyperosmotic stress decreased sheep parietal pleura permeability. Hyperosmotic and hypoosmotic stress reduced the migration rate of MeT-5A and ZL34 cells, while it did not affect M14K cells. Cell adhesion was enhanced in the presence of hyperosmotic stress on MeT-5A and ZL34 cells but not affected on M14K cells. Hypoosmotic stress decreased cell adhesion only on ZL34 cells. Finally, cell proliferation rate was not altered under hyperosmotic conditions in all cell lines while under hypoosmotic stress, cell proliferation rate was decreased in MeT-5A and M14K but not in ZL34. In total, we found that the pleural mesothelium is exposed to osmotic gradients that affect its permeability and cell functions of both benign and malignant cells.

## Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή	18
Γενικό μέρος	22
1. Υπεζωκότας	23
1.1 Ανατομία	23
1.2 Αιμάτωση	25
1.3 Ιστολογία	25
1.4 Λεμφική κυκλοφορία	26
1.5 Μεσοθηλιακά κύτταρα	27
1.5.1 Μορφολογία	27
1.5.2 Κυτταρικές λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων	28
1.5.3 Μεσοθηλιακά κύτταρα και φλεγμονή	30
1.5.4 Ωσμωτικό στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα	31
1.6 Το υπεζωκοτικό υγρό	31
1.6.1 Όγκος και πάχος υπεζωκοτικού υγρού	31
1.6.2 Σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού	32
1.6.3 Λίπανση υπεζωκοτικής κοιλότητας	33
1.7 Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού	34
1.7.1 Μοντέλο ρύθμισης της ροής νερού από τα τριχοειδή στην υπεζωκοτική κοιλότητα	35
1.7.2 Ρύθμιση υπεζωκοτικού υγρού σε σταθερή κατάσταση	37
1.7.2.1 Δυνάμεις Starling	38
1.7.2.2 Λεμφική απορρόφηση	38
1.7.2.3 Διακυττάρωση	39

1.7.2.4 Απορρόφηση από το μεσοθήλιο	40
1.7.3 Διαπερατότητα υπεζωκοτικής μεμβράνης	41
1.7.3.1 Διακυτταρική μεταφορά	41
1.7.3.2 Παρακυτταρική μεταφορά	46
1.8 Παθοφυσιολογία υπεζωκοτικής συλλογής	47
1.8.1 Μεσοθηλίωμα	49
2. Διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών	50
2.1 Ώσμωση	51
2.1.1 Θερμοδυναμική προσέγγιση της ώσμωσης	52
2.1.2 Μεταβολή του κυτταρικού όγκου	55
2.1.2.1 Μεταβολή του κυτταρικού όγκου και παθοφυσιολογία	56
2.1.3 Ρύθμιση του κυτταρικού όγκου	57
2.1.3.1 Οι οργανικοί ωσμωλύτες στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου	59
2.1.3.2 Ρυθμιστική Μείωση του Κυτταρικού Όγκου	60
2.1.3.3 Ρυθμιστική Αύξηση του Κυτταρικού Όγκου	62
2.1.4 Μεταβολή του Κυτταρικού όγκου και Κυτταρικές λειτουργίες	64
2.1.4.1 Κυτταρική Μετανάστευση	65
2.1.4.2 Προσκόλληση	68
2.1.4.3 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	69
Ειδικό μέρος	71
1. Σκοπός της διατριβής	72
2. Υλικά και Μέθοδοι	73
2.1. Δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών	73

2.2. Μέτρηση ωσμωτικότητας δειγμάτων υπεζωκοτικών συλλογών	73
2.3. Διαλύματα	73
2.4. Απομόνωση τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου	74
2.5. Κυτταρικές καλλιέργειες	75
2.6. Ηλεκτροφυσιολογική Μελέτη	75
2.6.1. Μέθοδος Ussing	75
2.6.2. Η πειραματική διάταξη Ussing	76
2.6.3. Μέτρηση ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων με συνθήκες βραχυκυκλώματος	77
2.6.4. Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις με το σύστημα Ussing	78
2.7. Πειραματικές συνθήκες επώασης ιστού	78
2.7.1. Υπερωσμωτικό στρες	78
2.7.2. Υποωσμωτικό στρες	79
2.8. Πειραματικές συνθήκες επώασης των κυτταρικών σειρών	79
2.8.1. Κυτταρικές καλλιέργειες	79
2.8.2. Ωσμωτικό στρες	79
2.9. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης	80
2.10. Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης	80
2.11. Δοκιμασία Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού	81
2.12. Στατιστική ανάλυση	82
Αποτελέσματα	83
1. Μετρήσεις ωσμωτικότητας υπεζωκοτικών συλλογών	84

1.1. Χαρακτηριστικά υπεζωκοτικών συλλογών και ανάλυση της μεταξύ τους συσχέτισης.	85
2. Επίδραση του ωσμωτικού στρες στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου	87
2.1. Επίδραση υποωσμωτικού στρες	87
2.2. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες	88
3. Επίδραση ωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση	89
3.1. Υπερωσμωτικό στρες	89
<b>3.1.1.</b> Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.	89
<b>3.1.2.</b> Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	91
<b>3.1.3.</b> Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	92
3.2. Υποωσμωτικό στρες	93
<b>3.2.1.</b> Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A	93
<b>3.2.2.</b> Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	94
<b>3.2.3.</b> Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	95
4. Επίδραση του ωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση	96
4.1. Υπερωσμωτικό στρες	96
<b>4.1.1.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.	96
<b>4.1.2.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	97
<b>4.1.3.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	98
4.2. Υποωσμωτικό στρες	99



<b>4.2.1.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.	99
<b>4.2.2.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	100
<b>4.2.3.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	100
<b>5.</b> Επίδραση ωσμωτικού στρες στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό	101
5.1. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες	101
<b>5.1.1.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.	101
<b>5.1.2.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	102
<b>5.1.3.</b> Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	103
5.2. Επίδραση υποωσμωτικού στρες	104
<b>5.2.1.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.	104
<b>5.2.2.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.	105
<b>5.2.3.</b> Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.	106
Συζήτηση	108
Συμπεράσματα	121
Βιβλιογραφία	125



## Εισαγωγή

Ο υπεζωκότας είναι η ορώδης μεμβράνη που καλύπτει το πνευμονικό παρέγχυμα, το μεσοθωράκιο, το διάφραγμα και τη θωρακική κοιλότητα. Διακρίνεται σε δύο πέταλα, τον περισπλάχνιο και τον τοιχωματικό υπεζωκότα με το χώρο ανάμεσά τους να συνιστά την υπεζωκοτική κοιλότητα. Στον χώρο αυτό εντοπίζεται μικρή ποσότητα υγρού η οποία ονομάζεται υπεζωκοτικό υγρό. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η ισορροπία μεταξύ παροχής και απορρόφησης διαταράσσεται με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση μεγάλης ποσότητας υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα και τη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής. Οι υπεζωκοτικές συλλογές διακρίνονται σε διδρωματικές και εξιδρωματικές, οι μεν αντανακλούν εξω-υπεζωκοτικά νοσήματα οι δε δεύτερες αντανακλούν νόσημα που έχει συμμετοχή ο υπεζωκότας. Μια από τις παραμέτρους του υπεζωκοτικού υγρού στο πλαίσιο των υπεζωκοτικών συλλογών που δεν έχει μελετηθεί είναι η ωσμωτικότητα. Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ωσμωτικότητας σε υπεζωκοτικές συλλογές διάφορης αιτιολογίας και η συσχέτιση των τιμών της με άλλες παραμέτρους της τυπικής βιοχημικής ανάλυσης του υπεζωκοτικού υγρού (ολική πρωτεΐνη, pH, γλυκόζη και LDH).

Η μεταβολή της ωσμωτικότητας επηρεάζει τα κύτταρα και τους ιστούς που εκτίθενται σε αυτή. Η μεταβολή της ωσμωτικότητας προκαλεί αλλαγές στον όγκο του κυττάρου λόγω της ωσμωτικά προκαλούμενης ροής νερού από ή προς το κύτταρο. Το κύτταρο απαντά με διάφορους μηχανισμούς προκειμένου να ρυθμιστεί ο όγκος του κυρίως με την ενεργοποίηση διαύλων ιόντων, νερού αλλά και οργανικών ωσμωλυτών. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζεται η διακυτταρική μεταφορά ιόντων, νερού και οργανικών ωσμωλυτών και άρα η διακυτταρική διαπερατότητα. Παράλληλα η έκθεση των επιθηλιακών ιστών στο ωσμωτικό στρες έχει σαν

αποτέλεσμα την μεταβολή και της παρακυτταρικής διαπερατότητας, η οποία στη περίπτωση του υπεζωκοτικού μεσοθηλίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παροχή και απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού. Με βάση αυτό το δεδομένο ελέγχθηκε εάν σε κλινικά συναφή επίπεδα ωσμωτικότητας αλλάζει η διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.

Τέλος, η ρύθμιση του κυτταρικού όγκου σαν απάντηση στο ωσμωτικό στρες επηρεάζει τις κυτταρικές λειτουργίες της μετανάστευσης, προσκόλλησης και πολλαπλασιασμού. Οι ενέργειες που εμπλέκονται στη ρυθμιστική μεταβολή του κυτταρικού όγκου όπως η ενεργοποίηση δίαυλων ιόντων, υδατοπορινών, μονοπατιών πολυμερισμού της ακτίνης, ή πρωτεϊνών εστιακής προσκόλλησης ταυτίζονται με τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά τη κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και πολλαπλασιασμό και επηρεάζονται από το ωσμωτικό στρες. Οι προαναφερθείσες κυτταρικές λειτουργίες εμπλέκονται στα στάδια της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου. Συγκεκριμένα στην υπεζωκοτική κοιλότητα παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη αυτών των κυτταρικών λειτουργιών καθώς εκεί αναπτύσσεται το μεσοθηλιώμα το οποίο είναι μια σπάνια, επιθετική και ανθεκτική στη χημειοθεραπεία μορφή νεοπλασματος των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα, του περιτοναίου και του περικαρδίου. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κρίθηκε σημαντική η μελέτη της επίδρασης της μεταβολής της ωσμωτικότητας στις κυτταρικές λειτουργίες των καλοήθων αλλά και των καρκινικών κυττάρων του υπεζωκότα δύο διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων: του επιθηλιοειδούς και του σαρκωματοειδούς μεσοθηλιώματος.

Συνολικά η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στην μέτρηση της ωσμωτικότητας των υπεζωκοτικών συλλογών, στη συσχέτιση με άλλες βιοχημικές μεταβλητές, και στην μελέτη της επίδρασης της μεταβολής της ωσμωτικότητας στη διαπερατότητα του υπεζωκότα και στις κυτταρικές λειτουργίες των καλοήθων και καρκινικών υπεζωκοτικών κυττάρων. Εξ' όσων

γνωρίζουμε, η παρούσα εργασία αποτελεί τη πρώτη εκτεταμένη μελέτη πάνω στην επίδραση της ωσμωτικότητας στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιο. Περαιτέρω έρευνα στο αντικείμενο κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επίδραση του ωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα.



## **Γενικό μέρος**

## 1. Υπεζωκότης

### 1.1 Ανατομία

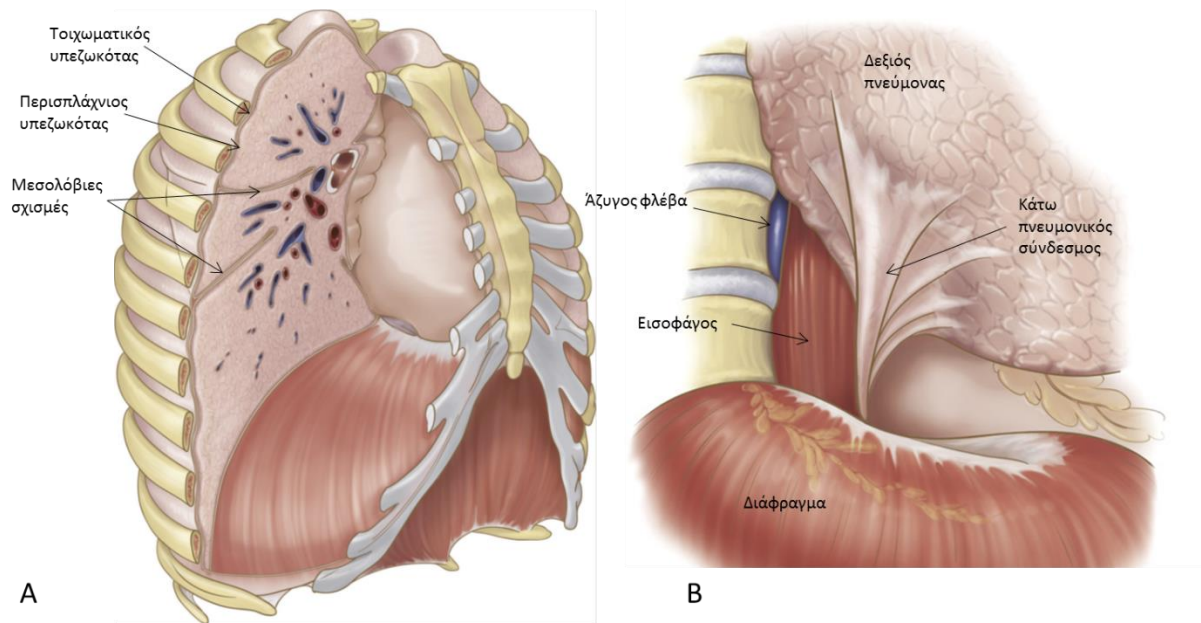
Ο υπεζωκότης είναι η ορογόνος μεμβράνη που καλύπτει το πνευμονικό παρέγχυμα, το μεσοθωράκιο, το διάφραγμα και τη θωρακική κοιλότητα. Ο ρόλος του είναι να επιτρέπει στο πνεύμονα να εκτείνεται και να συστέλλεται με ελάχιστη τριβή μέσα στη θωρακική κοιλότητα μεταφέροντας τις τάσεις που ασκούνται από το διάφραγμα κατά την αναπνοή. Παράλληλα ο υπεζωκότης αποτελεί ένα φραγμό που προστατεύει το πνεύμονα από μολύνσεις (1). Διακρίνεται σε δύο πέταλα, τον περισπλάχνιο και τον τοιχωματικό υπεζωκότα με το χώρο ανάμεσά τους να συνιστά την υπεζωκοτική κοιλότητα (**Εικόνα 1A**). Στην κοιλότητα αυτή εντοπίζεται μικρή ποσότητα υγρού που ονομάζεται υπεζωκοτικό υγρό και διευκολύνει την σχετική κίνηση των δύο πετάλων κατά τις αναπνευστικές κινήσεις (2) σε υπο-ατμοσφαιρική πίεση (706mm Hg) (3). Στον τοιχωματικό υπεζωκότα εντοπίζονται και λεμφαγγειακά στόματα (1).

Ο περισπλάχνιος υπεζωκότης επενδύει το πνευμονικό παρέγχυμα και καλύπτει όλες τις μεγάλες και μικρές μεσολόβιες σχισμές καθώς και τον κάτω πνευμονικό σύνδεσμο, ο οποίος σχηματίζεται από την ένωση του τοιχωματικού με το περισπλάχνιο υπεζωκότα (**Εικόνα 1B**). Η αφαίρεση του περισπλάχνιου υπεζωκότα είναι δυνατό να προκαλέσει και απώλεια τμήματος του πνευμονικού παρεγχύματος καθώς οι δύο ιστοί είναι στενά προσκολλημένοι μεταξύ τους (1). Η επέκταση του υπεζωκότα στο μεσολόβιο χώρο επιτρέπει στους λοβούς του πνεύμονα να εκπτύσσονται και να συμπύσσονται ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο. Εάν ένας λοβός εμφανίσει κάποια δυσλειτουργία, όπως για παράδειγμα στη περίπτωση της απόφραξης ενός βρόγχου από όγκο, οι ομόπλευροι λοβοί δεν επηρεάζονται από την κατάρρευσή του (1).



Η εσωτερική πλευρά του θώρακα, το μεσοθωράκιο και το διάφραγμα επενδύονται από τον τοιχωματικό υπεζωκότα (**Εικόνα 1Α**) ενώ η μετάβαση από το τοιχωματικό στο περισπλάγχιο υπεζωκότα λαμβάνει χώρα στη πνευμονική πύλη. Κατά μήκος του θωρακικού τοιχώματος υπάρχει λιπώδες στρώμα ανάμεσα στον τοιχωματικό υπεζωκότα και το ενδοθωράκιο, γεγονός που καθιστά εύκολη την αφαίρεση του τοιχωματικού υπεζωκότα από το μεγαλύτερο μέρος των υποκείμενων δομών. Εξαιρέση αποτελούν οι περιοχές του διαφράγματος και του περικαρδίου όπου χάνεται το λιπώδες στρώμα και η αφαίρεση του υπεζωκοτικού ιστού καθίσταται δύσκολη (1).

Στη θωρακική κοιλότητα ο υπεζωκότας εκτείνεται 2-3 cm πάνω από τη πρώτη πλευρά έως στο στερνοκλειδομαστοειδή μυ (**Εικόνα 2Β**). Η κατώτερη πτυχή του υπεζωκότα διαφέρει στο εμπρόσθιο πλάγιο και οπίσθιο μέρος ακολουθώντας τη γραμμή σύνδεσης του διαφράγματος με το θωρακικό τοίχωμα. Στο κατώτερο σημείο ο υπεζωκότας σταματά στην έκτη ή έβδομη πλευρά και κλίνει προς το πίσω μέρος έως τη δωδέκατη πλευρά. Επειδή ο υπεζωκότας εκτείνεται πέρα από τα όρια του θωρακικού κλωβού, ο τραυματισμός στις περιοχές αυτές είναι συχνότερος αυξάνοντας τον κίνδυνο πνευμοθώρακα (1).



**Εικόνα 1.** Ανατομία υπεζωκότα. **A.** Ο περισπλάχιος υπεζωκότας επενδύει το πνεύμονα και της μεσολόβιες σχισμές. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας εφάπτεται του θωρακικού τοιχώματος. **B.** Ο κατώτερος πνευμονικός σύνδεσμος. (Τροποποιημένες εικόνες για απόδοση στα ελληνικά από τη βιβλιογραφική αναφορά 1).

## 1.2 Αιμάτωση

Αναφορικά με την αιμάτωση του περισπλάχιου υπεζωκότα επικρατούν δύο απόψεις. Αρχικά υποστηρίχθηκε ότι παρέχεται αίμα μέσω είτε της πνευμονικής είτε της βρογχικής αρτηρίας. Από έρευνες σε περισπλάχιο υπεζωκότα προβάτου φάνηκε αποκλειστική παροχή μέσω της βρογχικής αρτηρίας. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι η παροχή αίματος στον περισπλάχιο υπεζωκότα αποδίδεται κυρίως στο βρογχικό και δευτερευόντως στο πνευμονικό σύστημα. Η φλεβική παροχέτευση πραγματοποιείται από το πνευμονικό σύστημα (1). Η αιμάτωση και η φλεβική παροχέτευση στον τοιχωματικού υπεζωκότα πραγματοποιούνται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας.

## 1.3 Ιστολογία

Ο υπεζωκότας αποτελείται από μια μονοστιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων που βρίσκεται σε επαφή με συνδετικό ιστό. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν ενδοπλασματικό δίκτυο

και σύστημα Golgi στα οποία αποδίδεται η ικανότητα τους να απορροφούν και να φαγοκυτταρώνουν, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην κάθαρση της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Πυκνές μικρολάχνες καλύπτουν την επιφάνεια των υπεζωκοτικών κυττάρων οι οποίες φέρουν φορτισμένα επιφανειοδραστικά μόρια. Επειδή οι μικρολάχνες εντοπίζονται στα κύτταρα τόσο του τοιχωματικού όσο και του περισπλάχνιου υπεζωκότα αλληλο-απωθούνται λόγω ίδιου φορτίου με αποτέλεσμα να ενισχύεται η λίπανση μεταξύ των δύο επιφανειών. Η βασεοπλευρική επιφάνεια είναι πλούσια σε ελαστικές ίνες, αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία καθώς και νευρικές απολήξεις που επιτρέπουν στη μεσοθηλιακή μονοστιβάδα να εκτείνεται μαζί με τις υποκείμενες δομές (1).

Ο περισπλάχνιος υπεζωκότας είναι άμεσα προσκολλημένος στο ελαστικό δίκτυο του πνεύμονα, επιτρέποντάς του να ακολουθεί τη μηχανική κίνηση λόγω αναπνοής. Το πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο που εντοπίζεται στη βασεοπλευρική επιφάνεια επιτρέπει την απορροή του υγρού που συγκεντρώνεται στη περιφέρεια του πνεύμονα. Σε πολλά είδη αλλά και στον άνθρωπο, στο τοιχωματικό υπεζωκότα εντοπίζονται λεμφαγγειακά στόματα που επιτρέπουν την άμεση σύνδεση της υπεζωκοτικής κοιλότητας με το λεμφικό δίκτυο (1).

#### **1.4 Λεμφική κυκλοφορία**

Το λεμφαγγειακό δίκτυο που εντοπίζεται υπό της βασεοπλευρικής επιφάνειας των μεσοθηλιακών κυττάρων του περισπλάχνιου υπεζωκότα, ιδιαίτερα στους κατώτερους λοβούς, απομακρύνει το υγρό που εντοπίζεται στο διάμεσο χώρο του πνευμονικού παρεγχύματος. Ο περισπλάχνιος υπεζωκότας δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού ούτε να συνδέεται με το λεμφαγγειακό δίκτυο μέσω λεμφικών στομάτων (1).

Στον τοιχωματικό υπεζωκότα εντοπίζονται λεμφικά στόματα διαμέτρου από 2 έως 12  $\mu\text{m}$ . Αυτές οι δομές επιτρέπουν την απορροή υγρού στο λεμφικό δίκτυο κυρίως στη

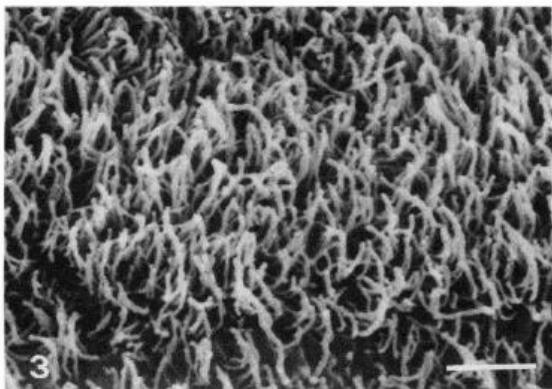
διαφραγματική και μεσοπνευμόνια επιφάνεια. Αυτές οι λεμφικές οδοί περιέχουν βαλβίδες που διευκολύνουν τη κίνηση του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα στο λεμφικό δίκτυο (1).

## **1.5 Μεσοθηλιακά κύτταρα**

### **1.5.1 Μορφολογία**

Τόσο ο σπλαχνικός όσο και ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποτελούνται από μια μεσοθηλιακή μονοστιβάδα. Το μεσοθήλιο εν γένει αποτελείται από μια μονοστιβάδα εξειδικευμένων, μεσοθηλιακών, κυττάρων και εκτείνεται σε όλη την επιφάνεια των ορογόνων κοιλοτήτων (υπεζωκότας, περικάρδιο και περιτόναιο) και στα όργανα που περιέχονται σε αυτές. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα επικάθονται σε ένα στρώμα συνδετικού ιστού το πάχος και η ποιότητα του οποίου ποικίλει ανάλογα με την ανατομική εντόπιση και μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η μορφή των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι πεπλατυσμένη πλακώδης, η διάμετρος τους είναι 25μm και περιέχουν ένα κεντρικό κυκλικό ή ωοειδή πυρήνα. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα περιέχουν μικροσωλινίσκους και μικρονημάτια, γλυκογόνο, κυστίδια και κενοτόπια, λίγα μιτοχόνδρια, σύστημα Golgi καθώς και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (4).

Στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων εντοπίζεται σύστημα μικρολάχνων (**Εικόνα 2**). Η σύνδεση μεταξύ των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω στενών συνδέσεων, συνδέσεων πρόσφυσης, χασματικών συνδέσεων και δεσμοσωμάτων. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της πολικότητας της μεσοθηλιακής στιβάδας και στη διατήρηση του ημιπερατού φραγμού διάχυσης (4). Οι συνδέσεις πρόσφυσης διαμορφώνουν το δομικό πλαίσιο της μονοστιβάδας, ενώ οι χασματικές συνδέσεις αποτελούν διαύλους επικοινωνίας των κυτταροπλασμάτων παρακείμενων κυττάρων (5).



**Εικόνα 2.** Μικρολάχνες μεσοθηλιακών κυττάρων σε περισπλάχνιο υπεζωκότα. Μεγέθυνση  $\times 10^4$  (Εικόνα από τη βιβλιογραφική αναφορά 6).

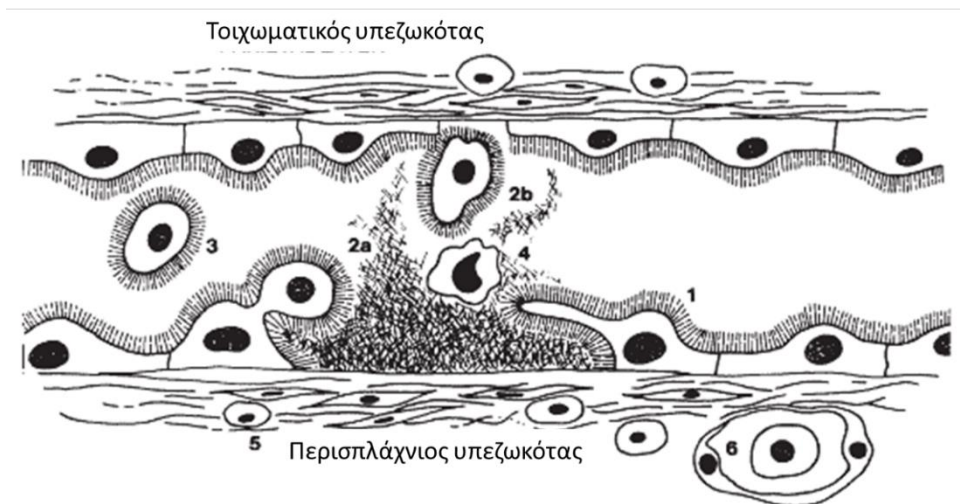
Το μεσοθήλιο εμπλέκεται στη μεταφορά νερού και διαλυμένων ουσιών δια μέσου των ορογόνων μεμβρανών. Αρχικά επικράτησε η άποψη ότι η ύπαρξη μικρολάχνων διευκόλυne τη μεταφορά καθώς αύξανε την επιφάνεια της κορυφαίας πλευράς των μεσοθηλιακών κυττάρων (6). Οι γλυκοκάλυκες που επενδύουν τις μικρολάχνες βοηθούν στην απορρόφηση καθώς περιέχουν γλυκοζαμινογλυκάνες που προσδένουν μόρια νερού. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρόφηση διαλυμένων ουσιών από το μεσοθήλιο πραγματοποιείται μέσω κυτταροπλασματικής πινοκυττάρωσης καθώς κατά τη μεταβολή για παράδειγμα της πίεσης του εξωκυττάριου υγρού αυξάνεται ο αριθμός των κυστιδίων στη πλασματική μεμβράνη. Άλλοι τρόποι με τους οποίους το μεσοθήλιο πραγματοποιεί τη διαμεσοθηλιακή μεταφορά είναι μέσω των διακυτταρικών διαύλων και παρακυτταρικά μέσω των στενών συνδέσεων (5).

### **1.5.2 Κυτταρικές λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων**

Το μεσοθήλιο είναι ένας ιστός που ανανεώνεται βραδέως καθώς κάθε στιγμή 0,16-0,5% των κυττάρων βρίσκεται στη φάση της μίτωσης. Ορισμένα ερεθίσματα αυξάνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των μεσοθηλιακών κυττάρων σε 30-80% μετά από τραυματισμό ή με την επίδραση σηματοδοτικών μορίων που προέρχονται από φλεγμονή ή από τραυματισμένα

κύτταρα (7,8). Τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες προκειμένου να πολλαπλασιαστούν και μόρια της εξωκυττάριας μήτρας που διευκολύνουν τη κυτταρική μετανάστευση, σαν απάντηση στη φλεγμονή ή τον τραυματισμό. Αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGFβ-1(transforming growth factor β-1), PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) και ο FGF (fibroblast growth factor) αλλά και μόρια της εξωκυττάριας μήτρας όπως το κολλαγόνο τύπου I, II και IV, η ελαστίνη και η λαμινίνη εκκρίνονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα και εμπλέκονται στις παραπάνω διαδικασίες (5).

Η αποκατάσταση του μεσοθηλίου διαφέρει από το επιθήλιο καθώς πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους και όχι μόνο από τα όρια του τραύματος (9). Η αποκατάσταση του τραυματισμένου μεσοθηλίου όπως έχει προταθεί πραγματοποιείται με τους εξής μηχανισμούς: 1) με μετανάστευση των γειτονικών κυττάρων, 2) με αποκόλληση ώριμων ή πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων a) από παρακείμενο σημείο ή b) από το αντίθετο πέταλο 3) μέσω των ελεύθερα κινούμενων μεσοθηλιακών κυττάρων στη κοιλότητα 4) μετατροπή των μακροφάγων 5) από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών (**Εικόνα 3**).



**Εικόνα 3.** Προτεινόμενοι μηχανισμοί αποκατάστασης τραυματισμένου μεσοθηλίου. (Τροποποιημένη εικόνα για απόδοση στα ελληνικά από βιβλιογραφική αναφορά 5).

Μια άλλη κυτταρική λειτουργία, η κυτταρική προσκόλληση στην εξωκυττάρια μήτρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη, τη διατήρηση της δομής του ιστού, την απάντηση στη φλεγμονή και τον τραυματισμό και τη μετάσταση. In vitro μελέτες σε μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα και του περιτοναίου καταδεικνύουν ότι οι ιντεγκρίνες, πρωτεΐνες που συνδέονται με τη κυτταρική προσκόλληση, επηρεάζουν τη κυτταρική μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και ενεργοποιούνται μετά από έκθεση σε ίνες αμιάντου (5).

### **1.5.3 Μεσοθηλιακά κύτταρα και φλεγμονή**

Φλεγμονώδεις καταστάσεις είναι γνωστό ότι οδηγούν σε αλλαγή του φαινοτύπου των μεσοθηλιακών κυττάρων σύμφωνα με μια διαδικασία παρόμοια με την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση που ορίζεται ως μεσοθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (MMT). Το μόριο μεσολαβητής αυτής της διαδικασίας, ο TGFβ-1 προκαλεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SNAI 1, ο οποίος οδηγεί σε υποέκφραση των επιθηλιακών δεικτών E-καντχερίνη και των κυτταροκερατινών με αποτέλεσμα τα μεσοθηλιακά κύτταρα να αποκτήσουν φαινότυπο ινοβλαστών. Παράλληλα έχει φανεί ότι σε φλεγμονή του υπεζωκότα υποεκφράζονται οι πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η πολικότητα των κυττάρων (10). Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου έχει παρατηρηθεί ότι υφίστανται MMT που οδηγεί σε ίνωση του περιτοναίου μετά από χρόνια περιτοναϊκή κάθαρση (9). Η περιτοναϊκή κάθαρση είναι μια θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας για την αντιμετώπιση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, κατά την οποία εγχέεται υπερωσμωτικό διάλυμα στη περιτοναϊκή κοιλότητα. Σε ότι αφορά το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο η ίνωση προκαλείται από διάφορες αιτίες φλεγμονής όπως το εμπύημα, οι κακοήθειες, η έκθεση σε ίνες αμιάντου αλλά και νανοσωλήνες άνθρακα (11). Συγκεκριμένα η επίδραση των νανοσωματιδίων προκαλεί αρχικά μεταβολές στις κυτταρικές λειτουργίες καθώς η κυτταρική

προσκόλληση και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των μεσοθηλιακών κυττάρων (12), αλλά και η διαπερατότητα (13) του υπεζωκότα μεταβάλλονται μετά από έκθεση σε σφαιρικά νανοσωματίδια αργύρου.

#### **1.5.4 Ωσμωτικό στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα**

Η επίδραση του ωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα έχει μελετηθεί περισσότερο στο περιτόναιο λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζει στο πλαίσιο της περιτοναϊκής κάθαρσης. Κατά την έκθεση των μεσοθηλιακών κυττάρων του περιτοναίου στο υπερωσμωτικό διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης εκτός από την MMT έχουν μελετηθεί και άλλες μεταβολές τόσο στη μορφολογία όσο και στις κυτταρικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα σε βιοψίες ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση έχουν παρατηρηθεί διογκωμένα, ασθενώς προσκολλημένα και εκφυλισμένα μεσοθηλιακά κύτταρα, με μειωμένο αριθμό μικρολάχνων και περιεκτικότητα ενδοπλασματικού δικτύου και μικροκυτταροποσικών κυστιδίων (14). Σαν αποτέλεσμα τα μεσοθηλιακά κύτταρα που εκτίθενται σε υπερωσμωτικό διάλυμα εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού (15,16) και μετανάστευσης (17).

### **1.6 Το υπεζωκοτικό υγρό**

#### **1.6.1 Όγκος και πάχος υπεζωκοτικού υγρού**

Η υπεζωκοτική κοιλότητα σε ένα υγιή άνθρωπο περιέχει μερικά ml υγρού, περίπου 0,26-0,1 ml/kg σωματικής μάζας (18) που διευκολύνει τη σχετική κίνηση του πνεύμονα και του θώρακα κατά την αναπνοή λιπαίνοντας τις δύο επιφάνειες. Η ποσότητα και η σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού σε φυσιολογικές συνθήκες παραμένει σταθερή μέσα από μια δυναμική διαδικασία παραγωγής και απορρόφησης. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η ισορροπία μεταξύ παραγωγής και απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού διαταράσσεται με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα και τη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής (3).



Το πάχος του υπεζωκοτικού υγρού έχει μετρηθεί σε διάφορα είδη με διαφορετικούς τρόπους και αποτελέσματα. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι το πάχος του υπεζωκοτικού υγρού μειώνεται με την αύξηση του όγκου του πνεύμονα, ενώ φαίνεται ότι είναι ελαφρώς μικρότερο στο πάνω μέρος του υπεζωκότα σε σύγκριση με το κάτω, πιθανώς λόγω του βαρυτικού πεδίου (19).

### 1.6.2 Σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού

Η κυτταρική σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού διαφέρει από είδος σε είδος. Στον άνθρωπο στο υπεζωκοτικό υγρό εντοπίζονται ερυθρά αιμοσφαίρια, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και μεσοθηλιακά κύτταρα και σπανιότερα ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα (3).

Η πρωτεϊνική σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού αλλά και η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες διαφέρει από είδος και είδος (πρόβατο, σκύλο, κουνέλι και αρουραίο). Μεγαλύτερο πρωτεϊνικό κλάσμα στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι η αλβουμίνη (~60% επί του συνόλου των πρωτεϊνών). Έχει φανεί ότι η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του υγρού μειώνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος του ζώου ενώ είναι μικρότερη από αυτή του διάμεσου υγρού. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η διάχυση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα πραγματοποιείται δια μέσου δύο μεμβρανών: του ενδοθηλίου και του μεσοθηλίου. Ο λόγος της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας του υπεζωκοτικού υγρού προς την αντίστοιχη του ορού επίσης μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους του ζώου. Τέλος παρόλο που η επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων καλύπτεται από γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υαλουρονικό οξύ, η παρουσία του στο υπεζωκοτικό υγρό είναι περιορισμένη (~1μg/ml στα κουνέλια) (19).

Αναφορικά με τη σύσταση των ανόργανων διαλυμένων ουσιών του υπεζωκοτικού υγρού, φαίνεται ότι η  $[Na^+]$  είναι 3-5% μικρότερη από αυτή του πλάσματος ενώ η  $[Cl^-]$  είναι 6-9% μικρότερη. Η  $[K^+]$  και γλυκόζης είναι παρόμοια με αυτή του πλάσματος ενώ η  $[HCO_3^-]$  είναι 20-25% μεγαλύτερη από αυτή του πλάσματος (20). Αν και η συγκέντρωση της γλυκόζης σε υπεζωκοτικό υγρό κουνελιών ήταν παρόμοια με αυτή του ορού, η αναισθησία που

απαιτείται για τη συλλογή του υγρού ενδέχεται να προκαλεί υπεργλυκαιμία και άρα αλλοίωση της πραγματικής κατάστασης (19).

### **1.6.3 Λίπανση υπεζωκοτικής κοιλότητας**

Κατά την αναπνοή, τα δύο πέταλα του υπεζωκότα μετατοπίζονται το ένα πάνω στο άλλο έως και 10cm με μέγιστη ταχύτητα τα 3cm/s. Το υπεζωκοτικό υγρό και τα λιπαντικά μόρια οφείλουν να μειώνουν τη τριβή ώστε να μη τραυματίζεται το μεσοθήλιο από τη συνεχή διαδικασία της εισπνοής και εκπνοής. Υπάρχουν δύο μοντέλα που περιγράφουν τον τρόπο λίπανσης της υπεζωκοτικής κοιλότητας (2).

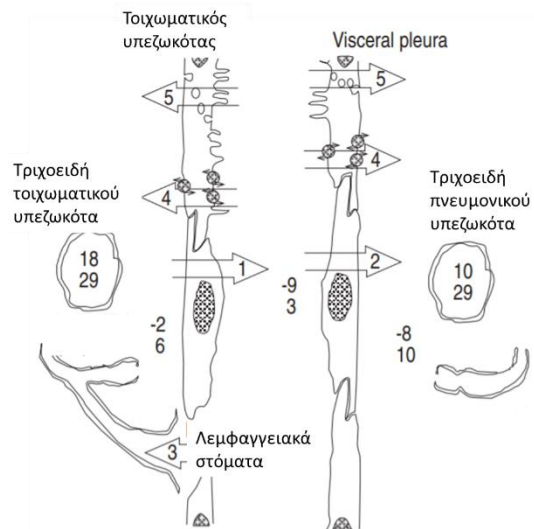
Το πρώτο μοντέλο προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ενιαίου και ομοιόμορφα κατανεμημένου στρώματος υπεζωκοτικού υγρού πάχους έως 20μm σε όλη την υπεζωκοτική κοιλότητα. Υπολογιστικές μελέτες ρευστοδυναμικής έχουν δείξει ότι οι σχετικές κινήσεις του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα κατά την αναπνοή προκαλούν χωρική ομοιομορφία του πάχους του υγρού που αποτρέπει τις δύο επιφάνειες να έρθουν σε επαφή (2).

Το δεύτερο μοντέλο υποθέτει ότι οι μηχανισμοί απορρόφησης του υγρού μειώνουν το πάχος του σε λιγότερο από 10μm, με αποτέλεσμα η πίεση του υγρού να είναι μικρότερη από αυτή της υπεζωκοτικής επιφάνειας και τα δύο πέταλα να βρίσκονται σε επαφή σε κάποια σημεία. Πειραματικά στοιχεία που στηρίζουν αυτό το μοντέλο έχουν δείξει ότι η πίεση του υπεζωκοτικού υγρού είναι μικρότερη από τη πίεση της υπεζωκοτικής επιφάνειας. Επίσης από μετρήσεις του πάχους της υπεζωκοτικής κοιλότητας φάνηκε ότι οι δύο επιφάνειες έρχονται σε επαφή, λαμβάνοντας υπόψιν και την ύπαρξη μικρολάχνων στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Το μοντέλο αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων που δρουν ως λιπαντικά για να διευκολύνεται η αναπνοή. Τα μόρια που έχουν προταθεί είναι το υαλουρονικό οξύ, τα επιφανειοδραστικά φωσφολιπίδια και η σιαλομουκίνη (2).

## 1.7 Διακίνηση υπεζωκοτικού υγρού

Βασικό στοιχείο για τη μελέτη της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού είναι οι πιέσεις που ασκούνται τόσο κατά τη διακίνηση του υγρού όσο και λόγω της μηχανικής του πνεύμονα. Όλες οι πιέσεις που λαμβάνουν χώρα και επηρεάζουν τη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού παρουσιάζουν εξαρτώμενη από τη βαρύτητα διακύμανση.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού πραγματοποιείται από ένα πλήθος μηχανισμών. Σε ότι αφορά στη διακίνηση μέσω της μεσοθηλιακής μεμβράνης η εισροή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα πραγματοποιείται μέσω διήθησης από τον τοιχωματικό υπεζωκότα ενώ η απορρόφηση πραγματοποιείται από τον περισπλάχνιο σύμφωνα με το νόμο Starling. Η απορρόφηση του υγρού πραγματοποιείται επίσης είτε άμεσα μέσω απορροής από τα λεμφικά στόματα του τοιχωματικού υπεζωκότα είτε είναι συζευγμένη με ιόντα μετακίνηση και από τα δύο πέταλα. Τέλος απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού πραγματοποιείται και μέσω ενδοκυττάρωσης από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα (21) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση των πιέσεων που ασκούνται στην υπεζωκοτική κοιλότητα. (Τροποποιημένη εικόνα για απόδοση στα ελληνικά από βιβλιογραφική αναφορά 21).

Επιπλέον τα δύο πέταλα του υπεζωκότα πιέζουν το ένα το άλλο με αποτέλεσμα να βρίσκονται πολύ κοντά αλλά όχι σε επαφή. Αυτό οφείλεται στις απωστικές δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων που βρίσκονται στις δύο επιφάνειες με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η τριβή κατά τη σχετική κίνηση του τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα (22).

#### **1.7.1 Μοντέλο ρύθμισης της ροής νερού από τα τριχοειδή στην υπεζωκοτική κοιλότητα**

Η διάχυση του νερού διαμέσου των βιολογικών φραγμών (π.χ. του ενδοθηλίου των τριχοειδών και του υπεζωκοτικού μεσοθηλίου) περιγράφεται από την αναθεωρημένη εξίσωση Starling:

$$I_f = K_f [(P_c - P_{ev}) - \sigma(\pi_c - \pi_{ev})] \quad (1)$$

Όπου:

$K_f$  η σταθερά διάχυσης

$P_c$  η υδροστατική πίεση των τριχοειδών

$P_{ev}$  η εξωαγγειακή υδροστατική πίεση

$\sigma$  ο συντελεστής ανάκλασης

$\pi_c$  η ωσμωτική πίεση των τριχοειδών

$\pi_{ev}$  η εξωαγγειακή ωσμωτική πίεση

Γενικά η εξίσωση Starling μπορεί να γραφτεί:

$$I_f = K_f \times P_f \quad (2)$$

Όπου η σταθερά διάχυσης  $K_f$  ισούται με το γινόμενο  $L_p \times S$  όπου  $L_p$  η υδραυλική διαπερατότητα του νερού και  $S$  η συνολική διαθέσιμη επιφάνεια διάχυσης. Ο όρος  $L_p$  κυρίως περιγράφει τη διαπερατότητα μέσω πόρων διαμέτρου της τάξης των 5nm της παρακυτταρικής οδού και πυκνότητας περίπου  $30\mu\text{m}^{-2}$ , από όπου τα μόρια του νερού κυρίως διέρχονται.

Μέσω των βιολογικών φραγμών διαχέονται και πρωτεΐνες οι οποίες παρασέρνονται από τα μόρια του νερού μέσω πόρων που επιτρέπουν τη διέλευσή τους. Ο συντελεστής ανάκλασης για κάθε πρωτεΐνη καθορίζει το πόσο εύκολο είναι για μια πρωτεΐνη ακτίνας  $a$  να περάσει μέσα από έναν πόρο ακτίνας  $R$  και ορίζεται ως:

$$\sigma = (1 - \frac{a}{R})^2 \quad (3)$$

$$\text{όπου } \frac{a}{R} = (1 - \frac{\sigma}{1})^2$$

Και ισούται με 1 στη περίπτωση που  $a=R$  ενώ τείνει στο 0 στη περίπτωση που  $a \ll R$ . Οι πόροι που επιτρέπουν τη διέλευση των πρωτεϊνών είναι μεγέθους 30-50nm και πυκνότητας  $0,006\mu\text{m}^{-2}$  και συνεισφέρουν ελάχιστα στη διακίνηση του νερού.

Σαν δείκτης του συντελεστή ανάκλασης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ο λόγος της εξωαγγειακής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης/ πρωτεϊνική συγκέντρωση του πλάσματος  $P_{ev}/P_{pl}$  σε καταστάσεις αυξημένης τριχοειδικής ροής όπως κατά τη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής. Σε αυτές τις περιπτώσεις ισχύει  $\sigma = 1 - \frac{P_{ev}}{P_{pl}}$ .

Όταν η πρωτεϊνική διαπερατότητα των τριχοειδών είναι μικρή ισχύει  $P_{ev}/P_{pl} \ll 1$  και  $\sigma \approx 1$ . Αντίθετα στη περίπτωση αυξημένης βλάβης των τριχοειδών σαν βιολογικών φραγμών οι πρωτεΐνες διαχέονται στον εξωαγγειακό χώρο με αποτέλεσμα ο λόγος  $P_{ev}/P_{pl}$  να αυξάνεται συνεπώς ο συντελεστής ανάκλασης  $\sigma$  να μειώνεται.

Η λεμφαγγειακή απορρόφηση του διάμεσου υγρού ορίζεται με την σχέση:

$$J_l = K_l(P_{labs} - P_{ev})$$

Όπου  $K_l$  η λεμφική αγωγιμότητα

$P_{labs}$  η πίεση απορρόφησης της λεμφικής αντλίας

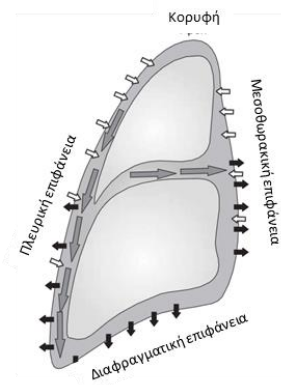
$P_{ev}$  η πίεση του εξωαγγειακού χώρου

Η  $P_{labs}$  έχει υπολογιστεί προσεγγιστικά 10-15cm H<sub>2</sub>O. Η διαφορά  $P_{labs} - P_{ev}$  έχει αρνητικό πρόσημο υποδεικνύοντας τη ροή του υγρού από τον εξωαγγειακό χώρο στο λεμφικό δίκτυο.

Αν και οι τιμές των πιέσεων ποικίλουν, πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο ανταλλαγής υγρών που βασίζεται στη ροή Starling και τη λεμφαγγειακή απορρόφηση. Έτσι σε σταθερή κατάσταση ισχύει ότι  $J_f + J_l \approx 0$  (22).

### 1.7.2 Ρύθμιση υπεζωκοτικού υγρού σε σταθερή κατάσταση

Η ροή του υπεζωκοτικού υγρού υπολογίζεται σε  $0,2\text{ml} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ώστε να ανανεώνεται πλήρως ανά μια ώρα. Το υγρό διηθείται κυρίως από τον τοιχωματικό υπεζωκότα (**Εικόνα 5**) ενώ η απορρόφηση του υγρού πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών οδών: τη τριχοειδική απορρόφηση μέσω δυνάμεων Starling, τη λεμφική απορρόφηση μέσω των στομάτων, την ενεργό μεταφορά μέσω των μεσοθηλιακών κυττάρων και τη διακυττάρωση (19,21,22).



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση της παροχής και παροχέτευσης του υπεζωκοτικού υγρού από τον τοιχωματικό υπεζωκότα. (Τροποποιημένη εικόνα για απόδοση στα ελληνικά από βιβλιογραφική αναφορά 22).

### **Δυνάμεις Starling**

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η παροχή υπεζωκοτικού υγρού πραγματοποιείται μέσω των δυνάμεων Starling από τα τριχοειδή στο διάμεσο υγρό και στη συνέχεια στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Άμεσα πειραματικά αποτελέσματα που στηρίζουν αυτή τη θεωρία δεν είναι ακόμα διαθέσιμα καθώς δεν είναι γνωστή η τιμή της πίεσης του σχετικού διάμεσου υγρού, παρά μόνο του έξω υπεζωκοτικού διάμεσου υγρού που απέχει ~200μm από το μεσοθήλιο. Επίσης δεν είναι γνωστή η υδραυλική αγωγιμότητα του φραγμού ενδοθηλίου- μεσοθηλίου και έτσι δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός του ρυθμού παροχής υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Ένας έμμεσος υπολογισμός του ρυθμού παροχής υγρού από τα τριχοειδή έχει πραγματοποιηθεί σε κουνέλια με τη μέτρηση της συγκέντρωσης σημασμένης αλβουμίνης στο πλάσμα και στο υπεζωκοτικό υγρό: 49μl/h ή 0,39μl/h·cm. Η τιμή αυτή θα πρέπει να αντιμετωπιστεί με επιφυλακτικότητα καθώς υπάρχουν περισσότερα μονοπάτια για τα υγρά να διαπεράσουν το φραγμό ενδοθηλίου – μεσοθηλίου από αυτά που ακολουθεί η αλβουμίνη (19). Δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποστηρίζουν την παροχή υγρού με άλλο μηχανισμό στην υπεζωκοτική κοιλότητα (19).

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν εκτός από τη παροχή και την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού μέσω δυνάμεων Starling από τα τριχοειδή του περισπλάχνιου υπεζωκότα. Αυτός ο μηχανισμός θα πρέπει να λαμβάνει χώρα σε σταθερή κατάσταση καθώς το διάμεσο υγρό ανάμεσα στα τριχοειδή του περισπλάχνιου υπεζωκότα και το μεσοθήλιο μπορεί να δεχτεί

υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα και σε φυσιολογικές καταστάσεις. Σε μοντέλο σκύλου υπολογίστηκε ο ρυθμός παροχέτευσης υγρού μέσω δυνάμεων Starling είναι  $0,9\text{ml/h}\cdot\text{cm}$  (19).

### 1.7.2.1 Λεμφαγγειακή απορρόφηση

Η λεμφαγγειακή απορρόφηση μέσω των στομάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα συμμετέχει σημαντικά στην απομάκρυνση κυττάρων, σωματιδίων και μακρομορίων μεγάλου μεγέθους που δεν μπορούν να αφαιρεθούν μέσω διακυττάρωσης (19). Υπάρχουν διαφορετικές απόψεις σχετικά με το ποσοστό συμμετοχής της λεμφαγγειακή απορρόφησης μέσω των στομάτων. Σε μοντέλο σκύλου με τη μέθοδο της σημασμένης αλβουμίνης αποδόθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό της απορρόφησης στα λεμφαγγειακά στόματα και υπολογίστηκε ο ρυθμός παροχέτευσης  $20\text{ml/h}\cdot\text{cm}$  (23). Αυτό που δεν ελήφθη υπόψιν είναι το γεγονός ότι η απορρόφηση της αλβουμίνης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί από το λεμφικό σύστημα του διάμεσου υγρού μέσω εναλλακτικών μονοπατιών (μεταγωγή, διάχυση, διακυττάρωση) (19). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πρόβατα, όπου υποβλήθηκαν σε μεγάλο όγκου υδροθώρακα ( $15\text{ml/kg}$ ) με σημασμένα ερυθροκύτταρα (που απορροφώνται μόνο από τα στόματα) και αλβουμίνη, αποδόθηκε επίσης το 89% της απορρόφησης στα λεμφικά στόματα ( $280\text{ml/h}\cdot\text{cm}$ ). Το γεγονός ότι η τιμή του ρυθμού απορρόφησης υγρού στο δεύτερο μοντέλο είναι 14 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο μοντέλο του σκύλου οφείλεται στην ραγδαία αύξηση της λεμφαγγειακής απορρόφησης μέσω των στομάτων σε μεγάλο όγκου υδροθώρακες σε σύγκριση με τις άλλες οδούς απορρόφησης υγρού και πρωτεϊνών. Η θεωρία αυτή έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά σε μοντέλο κουνελιού όπου μετά από εφαρμογή μικρού ( $0,12\text{ml/kg}$ ) και μεγάλου ( $2,4\text{ml/kg}$ ) υδροθώρακα η λεμφαγγειακή απορρόφηση μέσω των στομάτων συμμετείχε σε ποσοστό 39% και 64% επί του συνόλου της απορρόφησης αντίστοιχα (24). Φαίνεται ότι ο μηχανισμός της απορρόφησης από τα στόματα τοιχωματικού υπεζωκότα επιστρατεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τους άλλους μηχανισμούς στη περίπτωση του μεγάλου όγκου υδροθώρακα.



### 1.7.2.2 Διακυττάρωση

In vitro μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την απορρόφηση από το μεσοθήλιο μέσω διακυττάρωσης σε ιστούς περικαρδίου αρουραίου και περιτοναίου ποντικού. Συγκεκριμένα σε πειράματα με σημασμένη αλβουμίνη ο ρυθμός μεταφοράς της πρωτεΐνης από την κορυφαία πλευρά προς τη πλευρά του διάμεσου υγρού στους 37° C μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τους 12° C (όπου υπάρχει απουσία κυστιδίων) υποδεικνύοντας μεταφορά μέσω διακυττάρωσης (19). Στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιο η μεταφορά μέσω διακυττάρωσης έχει μελετηθεί έμμεσα σε in vivo μελέτη όπου εγχύθηκε στην υπεζωκοτική κοιλότητα κουνελιού μικρή ποσότητα διαλύματος σημασμένης αλβουμίνης και δεξτράνης-70KDa αλλά και του αναστολέα των μικροσωληνίσκων νοκοδαζόλη (25). Από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι η ποσότητα της σημασμένης αλβουμίνης και δεξτράνης-70KDa στην υπεζωκοτική κοιλότητα ήταν κατά 50% και 35% αντίστοιχα αυξημένη με αναστολή των μεταφοράς κυστιδίων σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς. Ο ρυθμός απορρόφησης υγρού μέσω κυστιδίων υπολογίστηκε 0,2μl/h·cm<sup>2</sup>.

### 1.7.2.3 Απορρόφηση από το μεσοθήλιο

Το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο έχει αποδειχθεί ότι μεταφέρει ενεργά διαλυμένες ουσίες αλλά και ότι μέσω αυτής της διαδικασίας απορροφάται υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα (26). Συγκεκριμένα σε μελέτες εφαρμογής υδροθώρακα με ταυτόχρονη αναστολή των Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> αντιμεταφορέων και της αντλίας Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> φάνηκε ότι ο ρυθμός απορρόφησης του υγρού μειώθηκε. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν στην απορρόφηση υγρού μέσω των Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> αντιμεταφορέων στη κορυφαία επιφάνεια και της αντλίας Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> στη βασική επιφάνεια. Ο μηχανισμός αυτός έχει επιβεβαιωθεί ότι λαμβάνει χώρα όχι μόνο έπειτα από την εφαρμογή υδροθώρακα αλλά και σε φυσιολογικές συνθήκες (27). Εκτός από τους προαναφερόμενους διαύλους και ο

συμμεταφορέας  $\text{Na}^+$ / γλυκόζης έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην απορρόφηση υγρού τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και μετά από εφαρμογή υδροθώρακα (28).

Λαμβάνοντας υπόψιν τις μορφολογικές ομοιότητες του τοιχωματικού και περισπλάχνιου υπεζωκότα ο μηχανισμός απορρόφησης υγρού μέσω της απορρόφησης διαλυτών από το μεσοθήλιο θα πρέπει να πραγματοποιείται και από τις δύο μεμβράνες (19). Κατά την μεταφορά διαλυμένων ουσιών από τα μεσοθηλιακά κύτταρα με τους διαύλους που μελετήθηκαν, μειώνεται η κολλοειδοσμοτική πίεση του διάμεσου υγρού με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η απορρόφηση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα (19).

### **1.7.3 Διαπερατότητα υπεζωκοτικής μεμβράνης**

Εκτός από τις μελέτες σε μοντέλα ζώων που αναφέρθηκαν, η διαπερατότητα του υπεζωκότα σε νερό και διαλυμένες ουσίες έχει μελετηθεί και *in vitro* και έχει αποδοθεί σε ένα σύνολο διακυτταρικών και παρακυτταρικών οδών.

Ένας έμμεσος τρόπος εκτίμησης της διαπερατότητας του υπεζωκότα είναι με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας. Σε μελέτες με τη διάταξη Ussing έχουν μετρηθεί ηλεκτροφυσιολογικές παράμετροι της υπεζωκοτικής μεμβράνης (διαμεσοθηλιακή αντίσταση  $R_m$  και διαμεσοθηλιακό δυναμικό  $V_m$ ) που καταδεικνύουν την ύπαρξη διακυτταρικής μεταφοράς. Έχει παρατηρηθεί διαφορά στις ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους αλλά και μορφολογικά ανάμεσα στο διαφραγματικό και θωρακικό τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου (29). Σε υπεζωκότα ανθρώπου φάνηκε ότι η διαμεσοθηλιακή αντίσταση είναι αυξημένη στα κατώτερα τμήματα του θωρακικού τοιχωματικού υπεζωκότα ( $7^{\text{η}}$ - $10^{\text{η}}$  πλευρά) σε σύγκριση με τα ανώτερα τμήματα ( $2^{\text{η}}$ - $5^{\text{η}}$  πλευρά) και του μεσοθωρακικού υπεζωκότα (30). Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν τη μη ομοιογενή διαπερατότητα της υπεζωκοτικής μεμβράνης.

#### **1.7.3.1 Διακυτταρική μεταφορά**

Η διακυτταρική μεταφορά διαλυμένων ουσιών αλλά και μορίων νερού έχει μελετηθεί με διαφορετικές μεθόδους και τα μόρια της μεσοθηλιακής μεμβράνης που έχουν ταυτοποιηθεί και συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι:

Αντλία νατρίου – καλίου: η παρουσία της αντλίας νατρίου καλίου στην υπεζωκοτική μεμβράνη έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε μοριακό επίπεδο με ανάλυση Western blot όσο και με το μοντέλο του υδροθώρακα και τη διάταξη Ussing (20,26)-Σε ιστό κουνελιού εντοπίστηκε η αντλία νατρίου – καλίου στη κορυφαία πλευρά της υπεζωκοτικής μεμβράνης ενώ σε ιστό προβάτου επιτεύχθηκε η διάκριση μεταξύ σπλαχνικού (στη κορυφαία πλευρά) και τοιχωματικού υπεζωκότα (στη βασική και στη κορυφαία πλευρά). Στον υπεζωκοτικό ιστό ανθρώπου εντοπίστηκε η αντλία νατρίου – καλίου στη κορυφαία πλευρά του τοιχωματικού υπεζωκότα (30).

Επιθηλιακός διάυλος νατρίου (ENaC): ο επιθηλιακός διάυλος νατρίου έχει εντοπιστεί στον υπεζωκότα ποντικού, κουνελιού, προβάτου και ανθρώπου. Συγκεκριμένα έχει φανεί με το μοντέλο του υδροθώρακα σε κουνέλια ότι αναστολή του ENaC μείωσε την απορρόφηση νερού και τη μεταφορά  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  (26). Με το ίδιο μοντέλο σε ποντικούς η ενεργοποίηση του ENaC με τερβουταλίνη και η αναστολή με αμιλορίδη οδήγησε σε αύξηση και μείωση αντίστοιχα της απορρόφησης νερού από την υπεζωκοτική μεμβράνη (31). Πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας έχουν δείξει ότι αναστολή του ENaC τόσο από την κορυφαία όσο και από τη βασοπλευρική πλευρά του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου και ανθρώπου οδήγησε σε αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης και άρα μείωση της διαπερατότητας (SNP) (32). Παράλληλα ο ENaC έχει εντοπιστεί και σε μοριακό επίπεδο στην κορυφαία πλευρά πρωτογενών μεσοθηλιακών κυτταροκαλλιεργειών τοιχωματικού υπεζωκότα ανθρώπου και ποντικού (33). Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες (SNP) με χρήση του αναστολέα αμιλορίδη σε περισπλάχνιο υπεζωκότα προβάτου έδειξαν ότι δεν μεταβάλλεται η διαμεσοθηλιακή αντίσταση και άρα έμμεσα δεν επιβεβαιώνεται η παρουσία του ENaC σε αυτό το πέταλο.

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάση: Η παρουσία της Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα έχει επιβεβαιωθεί με το μοντέλο του υδροθώρακα σε κουνέλια με χρήση του αναστολέα ουαμπαΐνη (26) αλλά και σε μοριακό επίπεδο με Western blot τόσο στο τοιχωματικό όσο και στο περισπλάχνιο υπεζωκότα κουνελιού (34). Προκειμένου να εντοπιστεί η Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάση στη κορυφαία ή βασική πλευρά του μεσοθηλίου πραγματοποιήθηκαν μελέτες στη διάταξη Ussing σε υπεζωκότα προβάτου με χρήση του αναστολέα της Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης ουαμπαΐνη. Φάνηκε ότι η αναστολή της Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης επηρέασε τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση και από τις δύο πλευρές του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ στο περισπλάχνιο υπεζωκότα μόνο από τη κορυφαία επιφάνεια (35). Επιπλέον ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη της Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάση στη κορυφαία πλευρά του τοιχωματικού υπεζωκότα ανθρώπου (30). Η παρουσία της Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιο δεν έχει επιβεβαιωθεί με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας.

Συμμεταφορέας νατρίου-γλυκόζης-1 (Sodium glucose linked transporter -1, SGLT-1): δεδομένου ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπεζωκοτικό υγρό είναι παραπλήσια με αυτή του αίματος αναμένεται η ύπαρξη συστήματος μεταφοράς γλυκόζης στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Πράγματι η έκφραση του συμμεταφορέα γλυκόζης - νατρίου στο τοιχωματικό και περισπλάχνιο υπεζωκότα κουνελιού και προβάτου καθώς και σε πρωτογενή ανθρώπινα υπεζωκοτικά κύτταρα έχει επιβεβαιωθεί σε μοριακό επίπεδο(34). Ταυτόχρονα αναστολή του SGLT-1 με φλοριζίνη μείωσε την απορρόφηση νερού από την υπεζωκοτική μεμβράνη κουνελιών στο μοντέλο του υδροθώρακα (28).

Διάλυλοι ασβεστίου: Διάλυλοι ασβεστίου έχουν εντοπιστεί σε υπεζωκοτικά κύτταρα αρουραίου και έχει φανεί ότι η ρύθμιση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ασβεστίου διαμεσολαβείται από τασοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (36). Η αυξημένη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup> ενεργοποιεί μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών ενώ φαίνεται από μελέτες χρώσης της F ακτίνης ότι το κυτταροπλασματικό Ca<sup>2+</sup> έχει ρυθμιστικό

ρόλο στη διάταξη του κυτταροσκελετού. Παράλληλα έχει φανεί ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) μειώνει το κυτταροπλασματικό  $Ca^{2+}$  μέσω του μονοπατιού NO-cGMP και του τασοεξατρώμενου υποδοχέα  $Ca^{2+}$  τύπου L. Μέσω του ίδιου μονοπατιού το NO αυξάνει την ανοιχτή επιφάνεια των λεμφικών στομάτων αυξάνοντας και την απορρόφηση υγρού.

Διάλυλοι χλωρίου: διάλυλοι χλωρίου όπως ο ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας κυστικής ίνωσης (CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator) έχουν εντοπιστεί στη κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων και αποτελούν διαμεσολαβητές έκκρισης υγρού. Διάλυλοι που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου (regulatory volume decrease channels RVDC) αλλά παραμένουν ενεργοί και σε ισοοσμωτικές συνθήκες έχουν εντοπιστεί σε κύτταρα μεσοθηλιώματος. Σε υποοσμωτικές συνθήκες ενεργοποιούνται διάλυλοι ανιόντων οι οποίοι συνδέονται με το παρατηρούμενο ρεύμα χλωρίου επαγόμενο από την αύξηση του κυτταρικού όγκου (ICln). Η διαφοροέκφραση των διαύλων χλωρίου σε μεσοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα μεσοθηλιώματος παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς οι διάλυλοι αυτοί συμμετέχουν σε διαδικασίες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, μετανάστευσης, απόπτωσης και συνδέονται με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία. (37,38)

Τασοεξαρτώμενοι διάλυλοι νατρίου: αυξημένη έκφραση των τασοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου παρουσιάζουν νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Συναφώς η παρουσία των τασοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου έχει επιβεβαιωθεί σε κύτταρα μεσοθηλιώματος αλλά όχι σε μεσοθηλιακά κύτταρα. Αναστολή των τασοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου σε κύτταρα μεσοθηλιώματος in vitro έχει φανεί ότι μειώνει το ρυθμό της κυτταρικής μετανάστευσης αλλά δεν επηρεάζει το ρυθμό πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και τη βιωσιμότητα τους. Ενδέχεται οι διάλυλοι αυτοί να συνδέονται με την αυξημένη κινητικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, ενός χαρακτηριστικού που συνδέεται με τον κακοήθη φαινότυπο (39).

Ανταλλάκτης  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : ο ανταλλάκτης  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  εντοπίζεται στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων καθώς σε πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων υπεζωκοτικών κυττάρων παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  μέσω του μονοπατιού όπου συμμετέχει η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και ενεργοποιείται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF). Ταυτόχρονα υπερέκφραση του ανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  οδηγεί σε αλκάλωση που σταματά με την αναστολή της PKC (36).

Ανταλλάκτης  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  εξαρτώμενος από  $\text{Na}^+$ : η συμμετοχή του ανταλλάκτη  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  και του συζευγμένου ανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ο οποίος βρίσκεται επίσης στη κορυφαία πλευρά των υπεζωκοτικών μεσοθηλιακών κυττάρων, στην απορρόφηση υγρού από το μεσοθήλιο έχει επιβεβαιωθεί έμμεσα με το μοντέλο του υδροθώρακα: αναστολή των δύο ανταλλακτών προκάλεσε μείωση του ρυθμού απορρόφησης υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα κουνελιών (26).

Συμμεταφορέας  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ : στο μοντέλο του υδροθώρακα η ταυτόχρονη εφαρμογή τερβουταλίνης, ενός  $\beta_2$  αδρενεργικού αγωνιστή και αμιλορίδης (αναστολέα διαύλων  $\text{Na}^+$  ENaC) οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού απορρόφησης υγρού σε σχέση με την εφαρμογή αμιλορίδης. Αυτό καταδεικνύει ότι η τερβουταλίνη ενεργοποιεί ένα μηχανισμό μεταφοράς νατρίου, ανεξάρτητο της αμιλορίδης, από τη κορυφαία πλευρά του μεσοθηλίου. Η επακόλουθη αναστολή του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  με βουμετανίδη οδήγησε σε μείωση του ρυθμού απορρόφησης νερού από την υπεζωκοτική μεμβράνη. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν ότι η τερβουταλίνη προκαλεί την απορρόφηση υγρού είτε μέσω του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  είτε μέσω του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ . (36)

Υδατοπορίνες: οι υδατοπορίνες είναι μικρές (μέγεθος μονομερούς 30 kDa) διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πλήθος κυττάρων που εμπλέκονται στη μεταφορά νερού. Δέκα υδατοπορίνες έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά οι περισσότερες από τις οποίες εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα στα μόρια νερού ενώ ορισμένες μεταφέρουν μόρια

γλυκερόλης (AQP-3, AQP-8) ή άλλα μόρια (AQP-9). Καθώς οι υδατοπορίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διακίνησης νερού, η παρουσία τους στον υπεζωκότα παρουσιάζει ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα η υδατοπορίνη-1 (AQP-1) έχει εντοπιστεί στον περισπλάχνιο, τοιχωματικό και διαφραγματικό υπεζωκότα, ενώ σε AQP1 knock out ποντίκια φάνηκε ότι μειώθηκε σημαντικά η διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων μετά από εφαρμογή ωσμωτικού στρες στην υπεζωκοτική κοιλότητα ενώ δεν επηρεάστηκε η διαπερατότητα σε ισοοσμωτικές συνθήκες (40).

### 1.7.3.2 Παρακυτταρική μεταφορά

Η παρακυτταρική μεταφορά αποδίδεται στις πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων, οι οποίες στους επιθηλιακούς ιστούς συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση της πολικότητας όσο και στη δημιουργία φραγμού.

Στον υπεζωκότα η έκφραση των πρωτεϊνών των στενών συνδέσεων διαφέρει ανάμεσα στα δύο πέταλα. Συγκεκριμένα στον σπλαχνικό υπεζωκότα εντοπίστηκαν η οκλουδίνη και οι κλαουδίνες -1, -3, -5 και -7, ενώ στον τοιχωματικό υπεζωκότα εντοπίστηκαν οι κλαουδίνη -1, -3 και -5 (10). Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στη λειτουργία του επιθηλίου έχει μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι οι κλαουδίνες -1, -3, και -5 συμμετέχουν στη δημιουργία φραγμού στον επιθηλιακό ιστό ενώ στη κλαουδίνη -2 έχει αποδοθεί η ρύθμιση της παρακυτταρικής διαπερατότητας μέσω της δημιουργίας πόρων και διαύλων εξειδικευμένων για τη διέλευση ύδατος και  $\text{Na}^+$  (20,41). Ο ρόλος της οκλουδίνης και της κλαουδίνης -7 ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί. Το γεγονός ότι σε φλεγμαίνοντα υπεζωκότα εκφράζεται η κλαουδίνη -2 και υποεκφράζονται οι υπόλοιπες πρωτεΐνες στενών συνδέσεων είναι σε συμφωνία με τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που παρατηρούνται σε φλεγμαίνοντα επιθήλια (10).

Η φλεγμονή στον υπεζωκότα προκαλεί γενικά τη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών των στενών συνδέσεων (10) που οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης.

Παράλληλα παρατηρείται έκφραση της κλαουδίνης -2, που επάγεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων- $\alpha$  (tumor necrosis factor TNF- $\alpha$ ) αυξημένα επίπεδα του οποίου έχουν παρατηρηθεί σε εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή σε μοντέλο φλεγμονής ποντικού (15) αλλά και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η φυματίωση και ο καρκίνος (20). Και οι δυο αυτοί μηχανισμοί αυξάνουν τη διαπερατότητα της υπεζωκοτικής μεμβράνης.

Η μελέτη της εναλλαγής της έκφρασης των πρωτεϊνών των στενών συνδέσεων στον υπεζωκότα σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις έδειξε επίσης την διαφοροέκφραση της κλαουδίνης -4 ανάμεσα σε καλοήθη και κακοήθη μεσοθηλιώματα (42) .

### 1.8 Παθοφυσιολογία υπεζωκοτικής συλλογής

Όταν ο ρυθμός εισροής υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα ξεπερνά το ρυθμό απορρόφησής του, προκαλείται υπεζωκοτική συλλογή. Σε φυσιολογικές συνθήκες ένας μικρός όγκος υγρού εισέρχεται στη κοιλότητα ( $0,01\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ σχεδόν όλη αυτή η ποσότητα απορροφάται μέσω του λεμφικού δικτύου (δυνατότητα απορρόφησης  $20\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Πειραματικά δεδομένα αλλά και η ιατρική πρακτική υποδεικνύουν ότι προκειμένου να δημιουργηθεί υπεζωκοτική συλλογή θα πρέπει να αυξηθεί δραματικά η εισροή υγρού στην κοιλότητα καθώς το λεμφικό δίκτυο παίζει καθοριστικά ρυθμιστικό ρόλο όπως φαίνεται και από τους ρυθμούς εισροής και απορρόφησης. Για παράδειγμα, σε περίπτωση δεκαπλασιασμού του ρυθμού εισροής ο όγκος του υγρού αυξάνεται μόνο κατά 15-20%, και η διαφορά δεν εντοπίζεται με κοινή ακτινογραφία (21)

Η αυξημένη συγκέντρωση υπεζωκοτικού υγρού οφείλεται είτε στην αύξηση του διάμεσου πνευμονικού υγρού είτε στη περίπτωση που μια από τις παραμέτρους της εξίσωσης Starling μεταβάλλεται ώστε να ευνοείται ο σχηματισμός υπεζωκοτικής συλλογής. Οι υπεζωκοτικές συλλογές διακρίνονται σε διδρωματικές και εξιδρωματικές προκειμένου να διαγνωστεί η αιτία δημιουργίας τους βάση των κριτηρίων του Light σύμφωνα με τα οποία



εξιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή διαγιγνώσκεται όταν πληρούνται ένα ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια:

- Υπεζωκοτική πρωτεϊνική συγκέντρωση/ πρωτεϊνική συγκέντρωση του πλάσματος >0,5
- Υπεζωκοτική συγκέντρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)/ συγκέντρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) του πλάσματος >0,6
- Το επίπεδο της LDH του υπεζωκοτικού υγρού  $>\frac{2}{3}$  του ανώτατου ορίου της LDH του ορού (7).

Παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν στη δημιουργία διδρωματικών και εξιδρωματικών συλλογών φαίνονται στον **Πίνακα 1** (7).

**Πίνακας 1. Αίτια δημιουργίας διδρωματικών και εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών.**

Διδρώματα	Εξιδρώματα
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	Νεοπλασματικές ασθένειες (μεσοθηλίωμα, μεταστατικές ασθένειες)
Κίρρωση	Μολυσματικές ασθένειες (φυματίωση, βακτηριακή λοίμωξη)
Υποαλβουμιναιμία	Πνευμονική εμβολή
Περιτοναϊκή κάθαρση	Γαστρεντερικές νόσοι
Νεφρωσικό σύνδρομο	Καρδιακές παθήσεις
Απόφραξη της άνω κοίλης φλέβας	Μαιευτικές και γυναικολογικές παθήσεις
	Νοσήματα κολλαγόνου
	Προκαλούμενες από φάρμακα νόσοι του υπεζωκότα
	Αιμοθώρακας

	Χυλοθώρακας
	Άλλες ασθένειες και καταστάσεις (έκθεση σε αμιάντο, σύνδρομο κίτρινων ούχων κ.α.)

Ταυτόχρονη αύξηση της διαπερατότητας του μεσοθηλίου και των τριχοειδών οδηγεί σε υποογκωτικό υγρό (μικρότερης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης) αν η εισροή υγρού υπερβεί την μέγιστη λεμφική απορρόφηση δημιουργείται διδρωματική υπεζωκοτική συλλογή.

Εξιδρωματική συλλογή δημιουργείται στη περίπτωση που αυξηθεί η πρωτεϊνική διαπερατότητα των τριχοειδών. Αντίστοιχη αύξηση της διαπερατότητας του μεσοθηλίου συμμετέχει σε πολύ μικρότερο βαθμό στη δημιουργία εξιδρώματος λόγω του χαμηλού επιπέδου πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του διάμεσου υγρού (21).

### **1.8.1 Μεσοθηλίωμα**

Μια από τις παθοφυσιολογικές καταστάσεις που οδηγεί σε σχηματισμό υπεζωκοτικής συλλογής είναι το μεσοθηλίωμα. Το μεσοθηλίωμα είναι μια σπάνια, επιθετική και ανθεκτική στη χημειοθεραπεία μορφή νεοπλάσματος των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα, του περιτοναίου και του περικαρδίου με διάρκεια επιβίωσης από 4 έως 12 μήνες (6). Το μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα συνδέεται με την έκθεση σε ίνες αμιάντου, οι οποίες προκαλούν χρόνια φλεγμονή και συνεχή διαδικασία βλάβης και αποκατάστασης. Οι ελεύθερες ρίζες που συνδέονται στην επιφάνεια των ινών αμιάντου οδηγούν σε λανθασμένη αποκατάσταση του DNA ενώ η διαδικασία της μίτωσης, η αποκατάσταση του DNA και η δομή των χρωμοσωμάτων επηρεάζονται καθώς ίνες αμιάντου εισχωρούν στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Σε συνδυασμό με την έκκριση κυτταροκινών (TGFβ-1, VEGF) από τα προσβεβλημένα κύτταρα οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν στη καρκινογένεση (7).

Ιστολογικά το μεσοθηλίωμα χωρίζεται σε τρεις τύπους, το επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, το σαρκωματοειδές και το διφασικό. Το επιθηλιακού τύπου μεσοθηλίωμα είναι το πιο κοινό (70%), με τη καλύτερη πρόγνωση (16,2 μήνες επιβίωσης) και χωρίζεται σε πολλούς υποτύπους, ο διαχωρισμός των οποίων είναι σημαντικός για τη πρόγνωση της ασθένειας [8]. Το σαρκωματοειδές μεσοθηλίωμα διακρίνεται από το επιθηλιοειδές καθώς διαφέρει η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων και συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση (3,8 μήνες επιβίωσης). Τέλος στο διφασικό μεσοθηλίωμα εντοπίζονται περιοχές τόσο με επιθηλιοειδές όσο και με σαρκωματοειδές μεσοθηλίωμα και έχει διάρκεια επιβίωσης 7 μήνες [8][9].

Μεγάλο ποσοστό ασθενών με μεσοθηλίωμα (95%) εμφανίζουν κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή η οποία σε πολλές περιπτώσεις επαναδημιουργείται μετά τη παρακέντηση και προκαλεί δύσπνοια (43). Εκτός από το μεσοθηλίωμα κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές προκαλούνται και από άλλους πρωτογενείς καρκίνους (πνεύμονα 37,5%, μαστού 17%, λέμφωμα 11,5%, γαστρεντερικού σωλήνα 6,9%, ουρογεννητικού συστήματος 9,4%) (44). Η κακοήθης υπεζωκοτική συλλογή προκαλείται από αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών του τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα και περιέχει πλήθος αυξητικών παραγόντων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας  $\beta$ -1 (TGF $\beta$ 1) αλλά και κυτταροκινών που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως η ντερλευκίνη 6 και 8 (IL-6, IL-8) και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων MCP-1. Τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος σε αυτή τη περίπτωση έρχονται σε συνεχή επαφή με τα προαναφερθέντα μόρια και έχει φανεί ότι σε αυτές τις συνθήκες αυξάνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης τους (43).

## **2. Διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών**

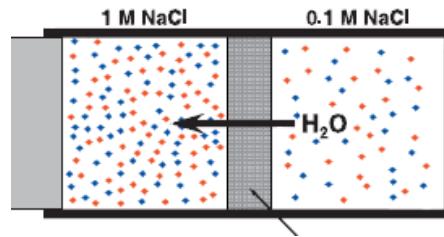
Η διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων μέσω των μηχανισμών που πραγματοποιείται, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού.

Γενικά η μεταφορά ουσιών δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι μια βασικής σημασίας βιολογική δραστηριότητα. Οι μηχανισμοί μεταφοράς χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: μηχανισμοί ενεργού και παθητικής μεταφοράς. Ενώ στη πρώτη περίπτωση απαιτείται κατανάλωση ενέργειας προκειμένου να διακινηθούν μόρια αντίθετα με τη βαθμίδα της συγκέντρωσής τους, στη δεύτερη η μεταφορά γίνεται μέσω μη ειδικής διάχυσης.

Η διάχυση των περισσότερων μικρών και ουδέτερα φορτισμένων μορίων, όπως το νερό, ερμηνεύεται με το μοντέλο διαλυτότητας- διάχυσης (45) όπου λαμβάνεται υπόψιν η υδροφοβικότητα της μεμβράνης αλλά και η εξάρτηση της διαπερατότητας από το μέγεθος του μορίου. Συγκεκριμένα η διαπερατότητα της μεμβράνης σε μόρια νερού έχει συσχετιστεί με τη πυκνότητα των λιπιδίων ενώ ο ρόλος του πάχους της μεμβράνης και της ακτίνας καμπυλότητας είναι ασαφής (46). Τα ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια, λόγω της υδροφιλικότητάς τους, συμπαρασύρουν και μόρια νερού προκειμένου να διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Μόρια με αμφίφιλη φύση θα πρέπει να προσεγγίσουν τη κυτταρική μεμβράνη με κατάλληλο προσανατολισμό προκειμένου να πραγματοποιηθεί παθητική μεταφορά (46).

## 2.1 Ωσμωση

Η διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών μεταβάλλεται λόγω ωσμωτικής πίεσης. Γενικά σε δύο υδατικά διαλύματα με διαφορετική συγκέντρωση, που διαχωρίζονται από ημιπερατή μεμβράνη, μόρια νερού μεταφέρονται από το αραιό διάλυμα στο πυκνό, με τρόπο που εξαρτάται από τη διαφορά στη συγκέντρωση των δύο διαλυμάτων και από τη διαπερατότητα της ίδιας της μεμβράνης (**Εικόνα 6**). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ώσμωση και η πίεση που πρέπει να ασκηθεί ώστε να παύσει αυτή η μεταφορά νερού ονομάζεται ωσμωτική πίεση. Η ωσμωτική πίεση καθορίζεται από το συνολικό αριθμό των διαλυμένων σωματιδίων στο διάλυμα και είναι ανεξάρτητη από τη φύση τους (π.χ. μόρια, ιόντα, μοριακό βάρος) (47).



**Εικόνα 6.** Ωσμωτική μεταφορά νερού μέσω ημιπερατής μεμβράνης από το αραιότερο στο πυκνότερο διάλυμα. (Εικόνα από βιβλιογραφική αναφορά 48).

### 2.1.1 Θερμοδυναμική προσέγγιση της ώσμωσης

Η ωσμωτική πίεση δίνεται από την εξίσωση Van't Hoff (49):

$$\Pi = \Delta c \cdot R \cdot T \quad (4)$$

Όπου

$\Pi$  η ωσμωτική πίεση

$\Delta c$  η μεταβολή της συγκέντρωσης των διαλυμάτων που χωρίζει η ημιπερατή μεμβράνη

$T$  η απόλυτη θερμοκρασία

Η διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών έχει περιγραφεί θερμοδυναμικά με τις εξισώσεις Kedem-Katchalski (50) με την επίδραση βαθμίδας της ωσμωτικότητας σε μη ηλεκτρολυτικά διαλύματα.

Ο όρος ωσμωτικότητα χρησιμοποιείται για να περιγράψει το συνολικό αριθμό των διαλυμένων σωματιδίων (μόρια και ιόντα) σε ένα διάλυμα ανά κιλό διαλύτη (osmolality) ή ανά λίτρο διαλύματος (osmolarity). Το 1osmol σαν μονάδα μέτρησης ορίζεται το 1mol ( $6,023 \cdot 10^{23}$ ) διαλυμένων σωματιδίων. (48)

Η παραπάνω περιγραφή του φαινομένου τη ώσμωσης αφορά στην απλοποιημένη περίπτωση που η ημιπερατή μεμβράνη είναι περατή μόνο σε μόρια νερού. Αυτό όμως στη περίπτωση των βιολογικών μεμβρανών δεν ισχύει. Ενώ η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών σε ορισμένους διαλύτες είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του νερού και άρα συμπεριφέρονται σαν αδιαπέραστες, άλλοι διαλύτες έχουν διαπερατότητα συγκρίσιμη με αυτή του νερού. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την ωσμωτική πίεση καθώς οι διαλύτες αυτοί διαχέονται γρήγορα μέσω της μεμβράνης σύμφωνα με τη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταφορά του νερού που οφείλεται στην ωσμωτική πίεση.

Προκειμένου να περιγραφεί η ωσμωτική πίεση στη περίπτωση των μη ιδανικών μεμβρανών, χρησιμοποιείται ο συντελεστής ανάκλασης Staverman (51)  $\sigma_i$  για τον διαλύτη  $i$ :

$$\sigma_i = \frac{\Delta\pi_{obs}}{\Delta\pi_{th}} \quad (5)$$

Όπου:

$\Delta\pi_{obs}$  η παρατηρούμενη ωσμωτική πίεση

$\Delta\pi_{th}$  η θεωρητική ωσμωτική πίεση που υπολογίζεται από την εξίσωση (4)

Ο συντελεστής ανάκλασης Staverman είναι ένας όρος του οποίου οι τιμή κυμαίνεται από 1 για διαλυμένες ουσίες που δε διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη («ανακλώνται» στη μεμβράνη) σε 0 για διαλυμένες ουσίες για τις οποίες η διαπερατότητα της μεμβράνης είναι παρόμοια με αυτή για το νερό. Η ενεργός ωσμωτική πίεση που οφείλεται στον διαλύτη  $i$  είναι:

$$\Delta\pi_{eff} = \sigma_i RT \Delta C_i \quad (6)$$

Η ροή του νερού  $J_v$  δια μέσου της μεμβράνης ορίζεται ως:

$$J_v = L_p (\sigma_i \Delta\pi_{th} - \Delta P) \quad (7)$$

Όπου:

$L_p$  ο συντελεστής υδραυλικής αγωγιμότητας της μεμβράνης

$\Delta P$  η μεταβολή της υδροστατικής πίεσης εκατέρωθεν της μεμβράνης.

Ο συντελεστής υδραυλικής αγωγιμότητας είναι μέτρο της διαπερατότητας της μεμβράνης στο νερό. Οι κυτταρικές μεμβράνες δεν δημιουργούν ούτε διατηρούν σημαντική βαθμίδωση υδροστατικής πίεσης και για αυτό το λόγο ο παράγοντας  $\Delta P$  της εξίσωσης (7) μπορεί να αγνοηθεί. Μόνο στη περίπτωση κυττάρων με άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα, όπως τα βακτήρια ή τα φυτικά κύτταρα μπορεί να δημιουργηθεί βαθμίδωση της υδροστατικής πίεσης η οποία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ροή του νερού μέσω της μεμβράνης.

Η ωσμωτικά οδηγούμενη ροή του νερού δια μέσου των περισσότερων κυτταρικών μεμβρανών συμβαίνει με απλή διάχυση των μορίων του νερού μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Ωστόσο κάποια κύτταρα παράγουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες που δημιουργούν επιλεκτικούς στο νερό πόρους στη κυτταρική μεμβράνη, τις υδατοπορίνες ή ακουαπορίνες (aquaporins). Η διέλευση του νερού μέσα από τις υδατοπορίνες οφείλεται στην διαφορά στο χημικό δυναμικό του νερού δηλαδή στη βαθμίδα της ωσμωτικότητας. Οι υδατοπορίνες περιέχουν κατάλληλα φίλτρα, δημιουργούμενα από κατάλοιπα αμινοξέων, που δεν επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων (52).

Στους επιθηλιακούς ιστούς οι υδατοπορίνες διευκολύνουν τη διακυτταρική μεταφορά νερού υπό την επίδραση ωσμωτικής βαθμίδωσης. Η υδατοπορίνη -1 (AQP-1) εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, και του κατιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle όπου φαίνεται από μελέτες ότι AQP-1 knock out ποντίκια εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα συγκέντρωσης ούρων (53). Οι υδατοπορίνες -2, -3, -4 (AQP-2, AQP-3, AQP-4) εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού αθροιστικού πόρου. Η συγκράτηση νερού από τον νεφρό απαιτεί υψηλή διαπερατότητα στο αθροιστικό σύστημα που επιτυγχάνεται με την, επαγόμενη από τη βασοπρεσίνη, συγκέντρωση της κυτταροπλασματικής

AQP-2 στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα οι AQP-3, -4 είναι συνεχώς ενεργοί διάυλοι νερού στη βασική επιφάνεια. Μελέτες σε AQP-2, -3, -4 knock out ποντικούς έδειξαν μειωμένη συγκράτηση ούρων (53). Οι υδατοπορίνες διευκολύνουν τη συγκέντρωση νερού στις κυψελίδες των αδένων υπό την επίδραση ωσμωτικής βαθμίδωσης που δημιουργείται από την ενεργό μεταφορά διαλυτών. Ποντίκια που δεν εκφράζουν την υδατοπορίνη -5 (AQP-5) εμφανίζουν μειωμένη έκκριση σιέλου και βλέννης στους αεραγωγούς. Οι περιορισμένες αυτές εκκρίσεις είναι υπερωσμωτικές και οφείλονται στη μειωμένη διαπερατότητα του αδένα και την έλλειψη εξισορρόπησης της ωσμωτικότητας εκατέρωθεν του επιθηλίου η οποία ρυθμίζεται από την AQP-5 (54).

### **2.1.2 Μεταβολή του κυτταρικού όγκου**

Στη σταθερή κατάσταση η ωσμωτικότητα έξω από το κύτταρο ( $\pi_o$ ) είναι ίση με αυτή στο εσωτερικό του ( $\pi_i$ ). Αλλαγές στη συγκέντρωση των διαλυτών εσωτερικά ή εξωτερικά του κυττάρου δημιουργούν βαθμίδωση ωσμωτικότητας ( $\Delta\pi$ ). Καθώς η κυτταρική μεμβράνη είναι περατή στο νερό, υπό την επίδραση της βαθμίδωσης της ωσμωτικότητας δημιουργείται ροή νερού προς το εσωτερικό του κυττάρου ή αντίστροφα έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Επειδή η κυτταρική μεμβράνη δεν μπορεί να δημιουργήσει ή να διατηρήσει υδροστατική πίεση η άμεση επίδραση της μεταβολής της ωσμωτικότητας στα κύτταρα είναι η μεταβολή του όγκου τους.

Η αλλαγή στον κυτταρικό όγκο κατηγοριοποιείται σε ισοωσμωτική ή ανισοωσμωτική. Η ανισοωσμωτική αλλαγή του κυτταρικού όγκου οφείλεται σε αλλαγές της ωσμωτικότητας του εξωκυττάρου περιβάλλοντος. Κατά κανόνα τα κύτταρα προστατεύονται από ανισοωσμωτική αλλαγή του όγκου τους μέσω της ρύθμισης της ωσμωτικότητας του πλάσματος από τους νεφρούς. Ισοωσμωτική αλλαγή του κυτταρικού όγκου λαμβάνει χώρα στη περίπτωση που υπάρχει αλλαγή στην συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών στο



εσωτερικό του κυττάρου. Σε σταθερή κατάσταση το κύτταρο διατηρεί σταθερή την ωσμωτικότητα του κυτταροπλάσματος μέσω της ρύθμισης της εισροής και εκροής διαλυμένων ουσιών καθώς και μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας όπου παράγονται και αποβάλλονται οργανικές ουσίες (55).

### **2.1.2.1 Μεταβολή του κυτταρικού όγκου και παθοφυσιολογία**

Λόγω σταθερής εξωκυττάριας ωσμωτικότητας, ένας περιορισμένος αριθμός κυττάρων εκτίθεται σε φυσιολογικές συνθήκες σε ωσμωτικό στρες, όπως τα νεφρικά κύτταρα, κύτταρα του αίματος, του εντέρου και τα ηπατοκύτταρα (21). Αντίθετα παρατηρείται διατάραξη της ομοιόστασης των βιολογικών υγρών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η υπονατρίαμια και η υπερνατρίαμια, η ελονοσία και άλλες τροπικές ασθένειες, η λευχαιμία και σε διάφορες παιδιατρικές ασθένειες (21). Η ομοιόσταση του κυτταρικού όγκου δεν απειλείται μόνο από τη μεταβολή της εξωκυττάριας ωσμωτικότητας αλλά και από τη μεταβολή της σύστασης του εξωκυττάριου υγρού όπως στη περίπτωση της νεφρικής ή ηπατικής ανεπάρκειας όπου διαταράσσεται η συγκέντρωση ουρίας και  $\text{NH}_3$  και στη περίπτωση του σακχαρώδους διαβήτη όπου παρατηρείται μεταβολή της συγκέντρωσης σορβιτόλης (21). Γενικά οι διακυμάνσεις της ωσμωτικότητας είναι επιβλαβείς για τον εγκέφαλο δεδομένου του περιορισμένου χώρου και του μικρού όγκου εξωκυττάριου υγρού. Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με αυτό είναι η ισχαιμία και η ηπατική εγκεφαλοπάθεια (56).

Η μεταβολή της ωσμωτικότητας χρησιμοποιείται θεραπευτικά κυρίως με την εφαρμογή υπερωσμωτικού στρες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η σήψη, η υποαραχνοειδής αιμορραγία, τα εγκεφαλικά τραύματα και η μετατραυματική υπόταση (21). Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι η περιτοναϊκή κάθαρση μια μορφή θεραπείας υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, όπου η περιτοναϊκή κοιλότητα έρχεται σε επαφή με υπερωσμωτικό διάλυμα προκειμένου να φιλτραριστεί το αίμα του του ασθενούς (57). Η χρόνια

περιτοναϊκή κάθαρση οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως υποαλβουμιναιμία, περιτονίτιδα (58), υπεζωκοτική συλλογή, δύσπνοια προκαλούμενη από αυξημένη ενδοκοιλιακή πίεση (57) και διαταραχή της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών (59). Πιο συγκεκριμένα η μακροχρόνια έκθεση στο υπερωσμωτικό διάλυμα περιτοναϊκής κάθαρσης εγείρει την έκκριση προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων όπως TGFβ-1, VEGF. Τα προϊόντα αποικοδόμησης της γλυκόζης, που περιέχεται στο διάλυμα της περιτοναϊκής κάθαρσης και δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της αποστείρωσής του, έχουν κυτταροτοξικές δράσεις προκαλώντας οξειδωτικό στρες και εμποδίζοντας τα μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου να επιδιορθώσουν τις βλάβες. Οι παραπάνω μηχανισμοί πρόκλησης της φλεγμονής, οδηγούν στην ανάπτυξη υπομεσοθηλιακής αγγειογένεσης, αγγειοπάθεια και περιτοναϊκή ίνωση (60,61).

### **2.1.3 Ρύθμιση του κυτταρικού όγκου**

Τα κύτταρα απαντούν στην αλλαγή του όγκου τους με διάφορους μηχανισμούς. Το σύνολο των μηχανισμών αυτών ονομάζεται Ρυθμιστική Μείωση του Κυτταρικού Όγκου (Regulatory Volume decrease ή RVD) στη περίπτωση που ο κυτταρικός όγκος αυξάνεται παρουσία υποωσμωτικού διαλύματος και Ρυθμιστική Αύξηση του Κυτταρικού Όγκου (Regulatory Volume increase ή RVI) στη περίπτωση που ο κυτταρικός όγκος μειώνεται παρουσία υπερωσμωτικού διαλύματος (**Εικόνα 7**). Η ρύθμιση του κυτταρικού όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μέσω της εισροής ή εκροής ωσμωτικά δραστικών σωματιδίων, κυρίως ανόργανων ιόντων (όπως  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) ή μικρών οργανικών μορίων που ονομάζονται οργανικοί ωσμωλύτες (**Εικόνα 8** και **Πίνακας 2**).



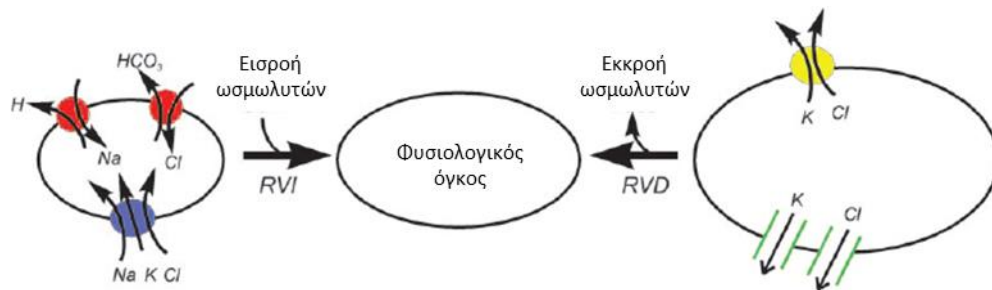
**Εικόνα 7.** Σχηματική αναπαράσταση της ρυθμιστικής αύξησης και μείωσης του κυτταρικού όγκου σαν απάντηση σε αλλαγές της εξωκυττάριας ωσμωτικότητας.

**Πίνακας 2.** Συγκεντρωτικός πίνακας μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού όγκου (62)

Ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου	Ρυθμιστική αύξηση του κυτταρικού όγκου
Δίαυλοι $K^+$	Αντιμεταφορέας $Na^+/H^+$ (NHE)
Δίαυλοι $Cl^-$	Συμμεταφορέας $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC)
Συμμεταφορείς $K^+ - Cl^-$	Μη ειδικόί διάυλοι κατιόντων
Μη ειδικόί διάυλοι κατιόντων	Δίαυλοι $K^+$
Μονοπάτια εκροής ταυρίνης	Συμμεταφορέας $Na^+-Cl^-$ -ταυρίνης (Tau-T)
Μονοπάτια εκροής μυοϊνοσιτόλης	Συμμεταφορέας $Na^+-Cl^-$ - βεταΐνης
Μονοπάτια εκροής σορβιτόλης	Συμμεταφορέας $Na^+$ - μυοϊνοσιτόλης
	Σύστημα μεταφοράς αμινοξέων A

Η ενεργοποίηση της μεταφοράς ηλεκτρολυτών είναι γρήγορη απόκριση και οφείλεται στο γεγονός ότι αυτοί οι διάυλοι και οι μεταφορείς ιόντων βρίσκονται μονίμως στη κυτταρική μεμβράνη ή είναι αποθηκευμένοι σε κυτταροπλασματικά υπομεμβρανικά κυστίδια. Εκτός από

τη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου, ορισμένοι από τους διαλύσιμους ιόντων συμμετέχουν και σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου όπως η διεπιθηλιακή μεταφορά ιόντων και η ρύθμιση του ενδοκυττάρου pH.



**Εικόνα 8.** Συνήθεις μηχανισμοί που μεσολαβούν τη ρυθμιστική αύξηση και τη ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου.

### 2.1.3.1 Οι οργανικοί ωσμωλύτες στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου

Σε ότι αφορά τους οργανικούς ωσμωλύτες, βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (10-10<sup>2</sup>mM) στο κυτταρόπλασμα όλων των οργανισμών από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο. Στα ζωικά κύτταρα οι οργανικοί ωσμωλύτες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

1. Πολυόλες (π.χ. σορβιτόλη, μυοϊνοσιτόλη)
2. Αμινοξέα και τα παράγωγά τους (π.χ. ταυρίνη, αλανίνη και προλίνη)
3. Μεθυλαμίνες (π.χ. μετατίνη, γλύκεροφωσφορυλοχολίνη )

Οι οργανικοί ωσμωλύτες έχουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες που επιτρέπουν στα κύτταρα να υποστηρίξουν μεγάλες συγκεντρώσεις ή μεταβολές στη συγκέντρωσή τους χωρίς να επηρεάζεται η κυτταρική δομή ή λειτουργία. Σε αντίθεση με τους οργανικούς ωσμωλύτες η διαταραχή της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών ή της ουρίας είναι επιβλαβής για τα κύτταρα και μπορεί να επηρεάσει τη μεταβολική τους λειτουργία. Για παράδειγμα, αυξημένη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ιοντικής ισχύος του κυτταροπλάσματος και αποτέλεσμα την μετουσίωση των κυτταρικών μακρομορίων (48,62).

Η συσσώρευση των οργανικών ωσμωλυτών στο κύτταρο μεσολαβεί είτε από ενεργο-εξαρτώμενη μεταφορά από το εξωκυττάριο περιβάλλον ή από μεταβολές στο ρυθμό σύνθεσης και αποδόμησης τους. Παράδειγμα της μεταφοράς οργανικών ωσμωλυτών είναι το σύστημα συμμεταφοράς νατρίου για τη μυοϊνοσιτόλη, ταυρίνη και μεταΐνη, που χρησιμοποιεί τη βαθμίδα συγκέντρωσης νατρίου σαν κινητήρια δύναμη. Η διαμεμβρανική μεταφορά των οργανικών ωσμωλυτών που λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου είναι μια αργή διαδικασία σχετικά με αυτή της μεταφοράς ιόντων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταφοράς οργανικών διαλυτών απαιτεί τη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων (48,62).

Η αποβολή οργανικών ωσμωλυτών που οφείλεται στην αύξηση του κυτταρικού όγκου πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς. Αρχικά η αύξηση του κυτταρικού όγκου έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη (μέσα σε δευτερόλεπτα) και παθητική εκροή οργανικών ωσμωλυτών. Παράλληλα αναστέλλεται η σύνθεση τους και οι μηχανισμοί εισροής τους με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση των οργανικών ωσμωλυτών στο κύτταρο. Η διαδικασία αυτή είναι αργή καθώς η αύξηση του κυτταρικού όγκου οδηγεί στην υποέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς των οργανικών διαλυτών και για τα ένζυμα σύνθεσής τους (48,62,63) :

### **Ρυθμιστική Μείωση του Κυτταρικού Όγκου**

Η ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου στα περισσότερα ζωικά κύτταρα, γίνεται μέσω της αποβολής από το κύτταρο ιόντων  $K^+$  και  $Cl^-$ , μέσω της ενεργοποίησης ξεχωριστών διαύλων  $K^+$  και  $Cl^-$  ή μέσω του συμμεταφορέα  $K^+$ ,  $Cl^-$ .

Δίαυλοι ανιόντων: Οι διάυλοι ανιόντων που ενεργοποιούνται μετά την έκθεση του κυττάρου σε υποωσμωτικό στρες VRAC (Volume Regulated Anion Channels) έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρικού ρεύματος ανιόντων χλωρίου  $I_{Cl,swell}$ . Οι διάυλοι VRAC

συμμετέχουν εκτός από τη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Σε ότι αφορά την αγωγιμότητά τους κυμαίνεται ανάλογα με το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης: 50-80 pS για θετικό και 10-20 pS για αρνητικό μεμβρανικό δυναμικό (64). Παρόλο που η ενεργοποίηση διαύλων ανιόντων μετά από υποωσμωτικό στρες είναι γνωστή (65) η ταυτοποίηση της μοριακής τους δομής πραγματοποιήθηκε εν μέρη. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη SWELL1 (66) βρέθηκε ότι αποτελεί τμήμα των VRAC, ενεργοποιείται από τη μεταβολή της κυτταροπλασματικής ιοντικής ισχύος (67) αν και δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των VRAC (68)

Διάυλοι  $K^+$ : Η επαγωγή ρεύματος  $K^+$  μετά από έκθεση του κυττάρου σε υποωσμωτικό περιβάλλον έχει επιβεβαιωθεί σε πληθώρα κυττάρων. Οι διάυλοι που διαμεσολαβούν αυτό το ρεύμα ενεργοποιούνται από τη μεταβολή του κυτταρικού όγκου. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των διαύλων  $K^+$  και της δημιουργίας ρεύματος καλίου επαγόμενου από τη μεταβολή του όγκου  $I_{K,vol}$  είναι οι εξής (69):

- Διάταση της μεμβράνης: ορισμένοι διάυλοι καλίου ενεργοποιούνται μέσω της διάτασης της μεμβράνης αλλά και την αύξηση του κυτταρικού όγκου.
- Κυτταροσκελετός: η αλληλεπίδραση των διαύλων καλίου με τον κυτταροσκελετό έχει δείξει ότι επάγει ρεύμα καλίου μετά από υποωσμωτικό στρες.
- $[Ca^{2+}]_i$ : Η μεταβολή στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου λόγω της αύξησης του κυτταρικού όγκου δεν φαίνεται να επηρεάζει τους διαύλους καλίου που ενεργοποιούνται μέσω  $Ca^{2+}$ .
- Πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες: οι κινάσες τυροσύνης αλλά και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) έχει δείξει ότι αλληλεπιδρούν με τους διαύλους καλίου κατά την ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου.

Συμμεταφορέας  $K^+-Cl^-$  : Οι συμμεταφορείς  $K^+-Cl^-$  (KCC) συμμετέχουν τόσο στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου, όσο και στη διεπιθηλιακή μεταφορά και τη ρύθμιση του ενδοκυττάρου pH (69).

Εκροή οργανικών ωσμωλυτών, ή Ταυρίνης: Η ρύθμιση του κυτταρικού όγκου μέσω της εκροής ταυρίνης μετά από ωσμωτικό στρες έχει περιγραφεί σε πληθώρα οργανισμών. Κατά τη ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου το 30-50% της ενδοκυτταρικής ταυρίνης αποβάλλεται από το κύτταρο (62). Αν και το μονοπάτι που οδηγεί στην εκροή ταυρίνης δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί μοριακά έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται από κινάσες τυροσίνης (69).

### 2.1.3.2 Ρυθμιστική Αύξηση του Κυτταρικού Όγκου

Η ρυθμιστική αύξηση του κυτταρικού όγκου απαιτεί την γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης ωσμωλυτών στο εσωτερικό του κυττάρου. Έτσι η πρώτη αντίδραση είναι η ενεργοποίηση συστημάτων μεταφοράς ανόργανων ωσμωλυτών και συγκεκριμένα  $Na^+$ ,  $K^+$  και  $Cl^-$ . Το ιόν  $Na^+$  είναι ο κύριος ωσμωλύτης που συγκεντρώνεται στο κύτταρο ο οποίος στη συνέχεια ανταλλάσσεται με  $K^+$  μέσω της  $Na^+-K^+$  ΑΤΡάσης προκειμένου να επανέλθει η αρχική βαθμίδωση  $Na^+$  και το ηλεκτροχημικό του δυναμικό. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ρυθμιστική αύξηση του κυτταρικού όγκου είναι:

Αντιμεταφορέας  $Na^+/H^+$  (NHE): Ο αντιμεταφορέας  $Na^+/H^+$  καταλύει την ανταλλαγή  $H^+$  με  $Na^+$ . Ο βασικός του ρόλος είναι η ρύθμιση του ενδοκυττάρου pH αλλά συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μετανάστευσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διεπιθηλιακής μεταφοράς ιόντων αλλά και της ρύθμισης του κυτταρικού όγκου. Δέκα ισομορφές έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα (NHE1-10). Στα επιθηλιακά κύτταρα ο NHE1 έχει βρεθεί στη βασοπλευρική αλλά και στη κορυφαία επιφάνεια (62,69).

Συμμεταφορέας  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (NKCC): Ο συμμεταφορέας  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  πραγματοποιεί τη συμμεταφορά  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  και  $\text{Cl}^-$  με στοιχειομετρική αναλογία 1:1:2. Ενεργοποιείται κατά την ωσμωτικά οδηγούμενη μείωση του κυτταρικού όγκου μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης (62,69).

Διάλυλοι κατιόντων: Ένας μεγάλος αριθμός διαύλων κατιόντων, που δεν εμφανίζουν εξειδίκευση σε ιόντα  $\text{Na}^+$  ή  $\text{K}^+$ , έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιείται κατά τη ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου (Hypertonicity Induced Cation Channels, HICC). Οι διάλυλοι κατιόντων συγκριτικά με το σύστημα συμμεταφοράς που προαναφέρθηκε μεταφέρουν ιόντα με ρυθμό 4-5 φορές μεγαλύτερο με αποτέλεσμα να είναι ένας γρήγορος και αποτελεσματικός μηχανισμός ρύθμισης του κυτταρικού όγκου. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο αναστολής τους (62,69):

1. HICC ευαίσθητοι στην αμιλορίδη. Σε αυτή τη κατηγορία ορισμένοι διάλυλοι έχουν σχετιστεί με τον επιθηλιακό διάλυλο νατρίου (ENaC).
2. HICC μη ευαίσθητοι στην αμιλορίδη. Οι διάλυλοι αυτοί αναστέλλονται από τη φλουφενάμια και το γαδολίνιο  $\text{Gd}^{3+}$ .
3. HICC ευαίσθητοι στην αμιλορίδη και στο γαδολίνιο  $\text{Gd}^{3+}$ : οι διάλυλοι αυτοί ενδέχεται να προέρχονται από μοριακή σύνδεση των δύο παραπάνω ομάδων.

Συστήματα εισροής οργανικών ωσμωλυτών Tau-T: η συγκέντρωση του οργανικού ωσμωλύτη ταυρίνη στο κύτταρο ρυθμίζεται από την εισροή της μέσω του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -ταυρίνης (Tau-T) αλλά και από την παθητική εκροή της από μη ταυτοποιημένο σύστημα μεταφοράς. Κατά τη ρυθμιστική αύξηση του κυτταρικού όγκου ενεργοποιείται ο Tau-T τόσο άμεσα σε περίπτωση οξείας αύξησης της εξωκυττάριας ωσμωτικότητας αλλά και σε μεταγραφικό επίπεδο μετά από χρόνιο ωσμωτικό στρες (69).



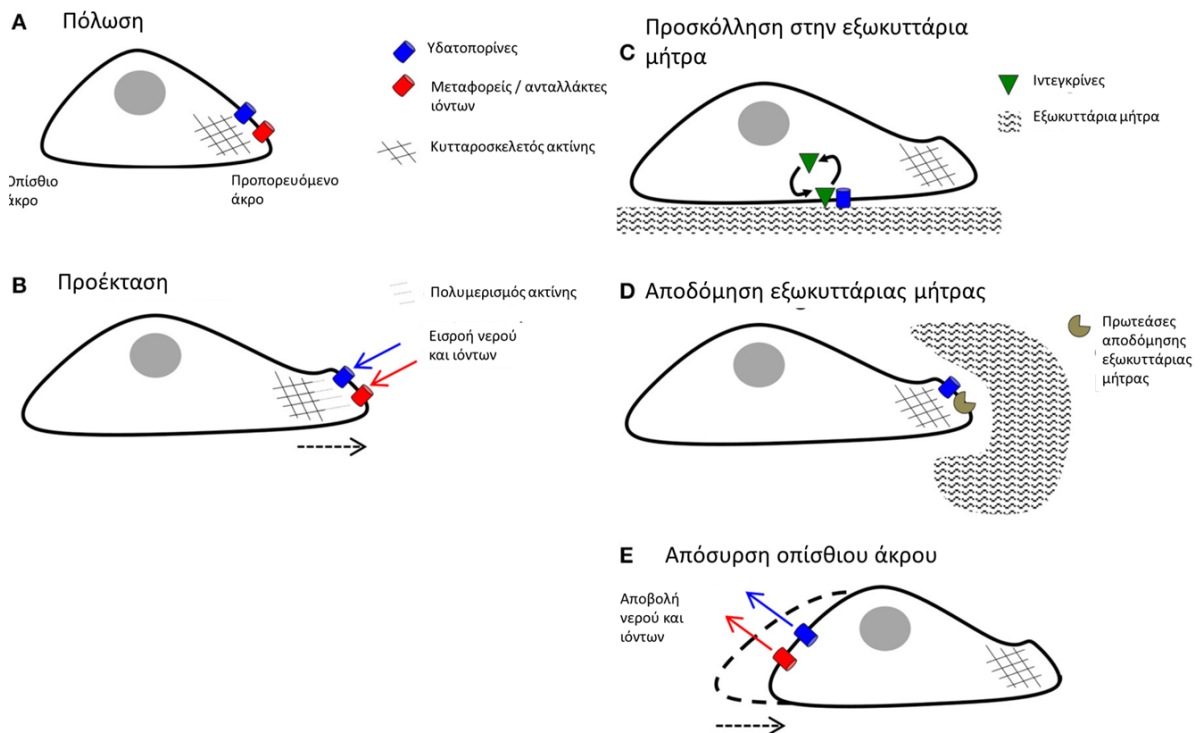
## 2.1.4 Μεταβολή του Κυτταρικού όγκου και Κυτταρικές λειτουργίες

### 2.1.4.1 Κυτταρική Μετανάστευση

Η κυτταρική μετανάστευση ονομάζεται η μετακίνηση των κυττάρων σε πολυκύτταρους οργανισμούς προκειμένου να προαχθούν διαδικασίες όπως η μορφογένεση, η ανοσολογική απάντηση και η επιδιόρθωση των ιστών. Στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης είναι μεγαλύτερος κατά την μορφογένεση και την ανάπτυξη αλλά και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος (70).

Οι μεταβολές στον κυτταρικό όγκο επηρεάζουν τη κυτταρική μετανάστευση σε διάφορους τύπους κυττάρων. Συγκεκριμένα η ικανότητα μετανάστευσης επηρεάζεται στα επιθηλιακά κύτταρα από τη διακύμανση του κυτταρικού όγκου, τα ουδετερόφιλα σε υπερωσμωτικό περιβάλλον μεταναστεύουν λιγότερο ενώ σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα αναστέλλεται η κυτταρική μετανάστευση μετά από έκθεση τόσο σε υπερωσμωτικό αλλά και σε υποωσμωτικό εξωκυττάριο υγρό (71).

Οι διαδικασίες που διαμεσολαβούν τη κυτταρική μετανάστευση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πέντε αλληλεξαρτώμενα στάδια: την πόλωση, την προέκταση του προπορευόμενου άκρου, τη προσκόλληση στην εξωκυττάρια μήτρα, την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και την απόσυρση του οπίσθιου άκρου (**Εικόνα 9**).



**Εικόνα 9.** Στάδια της κυτταρικής μετανάστευσης. (Τροποποιημένη εικόνα για απόδοση στα ελληνικά από βιβλιογραφική αναφορά 71).

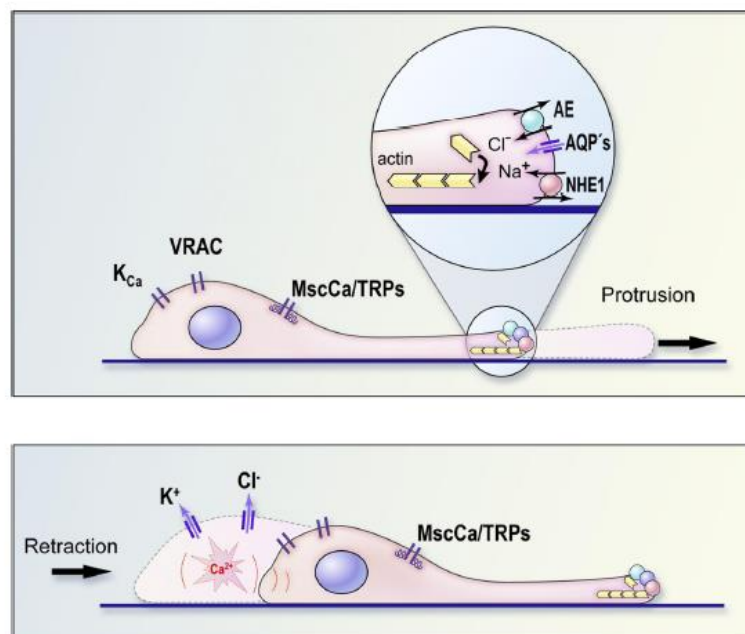
Κατά τη πόλωση του κυττάρου διακρίνονται τομείς της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος με διαφορετικές λειτουργίες, καθώς οργανίδια, σηματοδοτικοί μηχανισμοί και μεμβρανικοί μεταφορείς και υποδοχείς κατανέμονται ασύμμετρα (72). Την πόλωση ακολουθεί η προέκταση του προπορευόμενου άκρου απαιτείται αναδιάταξη των νηματίων της ακτίνης και σύμπτυξη κυστιδίων προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια της μεμβράνης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τρία είδη προεκτάσεων: τα ελασματοπόδια, τα νηματοπόδια και τα πόδια διήθησης, που το καθένα εξυπηρετεί διαφορετικές απαιτήσεις του μεταναστεύοντος κυττάρου (73). Προκειμένου το κύτταρο να κινηθεί απαιτείται πρόσφυση με το υπόστρωμα μέσω της προσκόλλησης, η οποία πραγματοποιείται με τη σύνδεση των νηματίων ακτίνης με την εξωκυττάρια μήτρα (74). Η αποδόμηση των πρωτεϊνών της

εξωκυττάριας μήτρας διανοίγει μονοπάτια διήθησης των κυττάρων σε ξένους ιστούς. Τα πόδια διήθησης εμφανίζονται στο προπορευόμενο άκρο των νηματοπόδιων και προσκολλώνται στις ίνες κολλαγόνου της εξωκυττάριας μήτρας. Για να διευκολυνθεί η προώθηση του κυττάρου αποδομούνται οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας με πρωτεάσες όπως οι πρωτεάσες σερίνης και οι πρωτεάσες εξωκυττάριου δικτύου (matrix metalloproteinases MMP) (75). Το τελευταίο βήμα του κύκλου είναι η απόσυρση του οπίσθιου άκρου. Σύμφωνα με το μοντέλο που περιγράφει αυτή τη διαδικασία, ανοίγουν ενεργοποιούμενοι από την έκταση της μεμβράνης διάλυτοι  $Ca^{2+}$ , με αποτέλεσμα να αποδομούνται οι πρωτεΐνες προσκόλλησης ενώ ταυτόχρονα έκκριση  $K^+$  προκαλεί τη μείωση του κυτταρικού όγκου τοπικά στο οπίσθιο άκρο (70).

Οι πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται κατά τη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου διαμεσολαβούν και τη κυτταρική μετανάστευση και ενεργοποιούνται σε όλα τα προαναφερόμενα στάδια. Πρωτεΐνες μεταφοράς ιόντων που λαμβάνουν μέρος στη ρυθμιστική αύξηση του κυτταρικού όγκου εντοπίζονται στο προπορευόμενο άκρο του μεταναστεύοντος κυττάρου ενώ οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται κατά τη ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου εντοπίζονται στο συρόμενο άκρο (**Εικόνα 10**). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αύξηση του όγκου του κυττάρου στο εμπρόσθιο άκρο και τη μείωση στο οπίσθιο προκειμένου να διευκολυνθεί η κίνηση του κυττάρου (71). Συγκεκριμένα ο αντιμεταφορέας NHE παίζει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική μετανάστευση (76), ενώ υπερέκφραση του NHE σε καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση της μεταναστευτικότητας και μεταστατικότητάς τους (77). Παράλληλα υδατοπορίνες έχουν σχετιστεί με τη κυτταρική μετανάστευση καθώς εντοπίζονται στο προεξέχον άκρο της μεμβράνης διαμεσολαβώντας την ωσμωτική εισροή νερού και διευκολύνοντας τη κίνηση του κυττάρου (78) τόσο σε καλοήγη (79) όσο και σε καρκινικά κύτταρα (80). Επίσης ο ρόλος των υδατοπορίνων AQP -1, -3, -4, -5, -8, -9 στη μετανάστευση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με τη διαμεσολάβηση της

εκροής  $H_2O_2$  ενός δευτερογενούς σηματοδοτικού μορίου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης και μετανάστευσης (70). Στο συρόμενο άκρο εντοπίζονται διάλυτοι χλωρίου (VRAC) και καλίου που συμμετέχουν στη ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου αλλά και άλλοι τύποι ασβεστιο-εξαρτώμενων διαύλων καλίου.

Η ρύθμιση του κυτταρικού όγκου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική μετανάστευση και για το λόγο ότι μεταβολές του όγκου επηρεάζουν το κυτταροσκελετό και συγκεκριμένα τα νημάτια της ακτίνης. Δεδομένου ότι ο πολυμερισμός της ακτίνης εξαρτάται από το  $Ca^{2+}$ , πολλά είδη κυττάρων εμφανίζουν κατά τη μετανάστευση βαθμίδωση συγκέντρωσης ασβεστίου από το προπορευόμενο στο οπίσθιο άκρο έτσι ώστε η συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  να είναι πάντα μεγαλύτερη στο οπίσθιο άκρο. Έτσι ευνοείται ο πολυμερισμός της ακτίνης στο οπίσθιο άκρο και ο αποπολυμερισμός στο εμπρόσθιο (81). Τέλος οι διάλυτοι TRP (Transient Receptor Potential Cation Channels) που συμμετέχουν στην ανίχνευση των μεταβολών της ωσμωτικότητας ρυθμίζουν και τη κυτταρική μετανάστευση (81).



**Εικόνα 10.** Σχηματική αναπαράσταση συστημάτων μεταφοράς στο εμπρόσθιο και το οπίσθιο άκρο μεταναστεύοντος κυττάρου (Εικόνα από βιβλιογραφική αναφορά 69).

#### 2.1.4.2 Κυτταρική Προσκόλληση

Η προσκόλληση στο υπόστρωμα είναι ένα βασικό βήμα του κύκλου της κυτταρικής μετανάστευσης. Στις κυτταρικές προεκτάσεις οι υποδοχείς ιντεγκρίνης συνδέουν την εξωκυττάρια μήτρα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η εξωκυττάρια σύνδεση των υποδοχέων ιντεγκρίνης με τους προσδέτες της εξωκυττάριας μήτρας επάγουν την ομαδοποίηση των ιντεγκρινών και ενεργοποιεί κινάσες τυροσίνης και μικρές GTPασες (82).

Οι ιντεγκρίνες είναι παράλληλα αισθητήρες της μεταβολής του κυτταρικού όγκου αλλά και ρυθμίζουν και ρυθμίζονται από διαύλους που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου. Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης οδηγεί σε αυξημένη λειτουργία των VRAC και ρυθμίζει την έκφραση διαύλων  $K^+$  (71) ενώ επηρεάζεται και από τη λειτουργία των υδατοπορινών. Συγκεκριμένα αυξημένη δράση της AQP-1 σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προωθεί τη κυτταρική μετανάστευση μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει τη β-κατενίνη και τη κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK), δύο μόρια τα οποία ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των ιντεγκρινών (83). Η AQP-2, μειώνει τη δράση της ιντεγκρίνης β-1 στα σημεία εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion sites) (84), η αναστολή της AQP-3 με siRNA οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης των κινασών εστιακής προσκόλλησης FAK με αποτέλεσμα τη μειωμένη κυτταρική προσκόλληση σε ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος οισοφάγου (85) ενώ και η AQP-4 φαίνεται ότι προωθεί τη κυτταρική προσκόλληση (86). Τέλος ένα άλλο μόριο της ρύθμισης του κυτταρικού όγκου, ο NHE1 σε υποωσμωτικό περιβάλλον προκαλεί ισχυρότερη κυτταρική προσκόλληση και μείωση της μετανάστευσης ενώ η ελλιπής λειτουργία του NHE1 αναστέλλει τη κυτταρική προσκόλληση (69).

### 2.1.4.3 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού όγκου προκειμένου το μητρικό κύτταρο να διαιρεθεί σε δύο κύτταρα ίσου μεγέθους με το μητρικό. Έτσι η αύξηση του κυτταρικού όγκου παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην πορεία του κυτταρικού κύκλου (87,88). Παράλληλα φαίνεται ότι η επαγόμενη από υποοσμωτικό στρες, αύξηση του κυτταρικού όγκου προάγει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ αντίθετα αποτελέσματα επιφέρει η μείωση του κυτταρικού όγκου παρουσία υπεροσμωτικού στρες (89,90). Παρόλο που ο μηχανισμός μέσω του οποίου η μεταβολή του κυτταρικού όγκου επηρεάζει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου δεν είναι γνωστός, φαίνεται ότι παίζουν ρόλο μηχανισμοί που εμπλέκουν υποδοχείς κινασών τυροσίνης και τις MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (91). Η επίδραση του οσμωτικού στρες ενεργοποιεί τις ERK1/2 MAPK (Extracellular signal Regulated Kinase 1/2) που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (88).

Αναφορικά με τη μεταφορά ιόντων που σχετίζεται με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, φαίνεται ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου  $[Ca^{2+}]_i$  ενεργοποιεί τους διαύλους NHE1 και NKCC1 με αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού όγκου που επάγει τη κυτταρική διαίρεση (88). Παράλληλα διάυλοι  $K^+$  φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ εμφανίζουν αυξημένη λειτουργία σε καρκινικά κύτταρα (92). Τέλος, σχετικά με τις πρωτεΐνες μεταφοράς  $Cl^-$  έχει αναφερθεί ότι η αναστολή τους οδηγεί σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (93) ενώ συγκεκριμένα για τις πρωτεΐνες VRAC φαίνεται ότι διαφοροεκφράζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (94).

Η μεταφορά μορίων νερού μέσω των υδατοπορινών σχετίζεται επίσης με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα η αναστολή της AQP-5 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενδεχομένως μέσω της αλληλεπίδρασης της AQP-5 με το ενεργοποιούμενο από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα σηματοδοτικό μονοπάτι ERK1/2 (70). Επίσης η AQP-3 που μέσω της έκκρισης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει τη κυτταρική μετανάστευση, αυξάνει μέσω του ίδιου μηχανισμού και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (70). Τέλος αναστολή της AQP-1 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κυτταροκαλλιέργειες μεσοθηλιώματος αλλά όχι σε in vivo μοντέλα (95).

## **Ειδικό μέρος**



## 1. Σκοπός της διατριβής

Το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο εκτίθεται στο υπεζωκοτικό υγρό και επηρεάζεται από την ανάπτυξη των υπεζωκοτικών συλλογών και από τις διακυμάνσεις της σύστασής τους. Λαμβάνοντας υπόψιν την επίδραση της μεταβολής της ωσμωτικότητας στις κυτταρικές λειτουργίες αλλά και την διαπερατότητα των επιθηλιακών ιστών κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη του αποτελέσματος της εφαρμογής του ωσμωτικού στρες και στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Σκοπός της διατριβής είναι η μέτρηση της τιμής της ωσμωτικότητας των υπεζωκοτικών συλλογών, προερχόμενων από διάφορα παθολογικά αίτια, και η συσχέτισή της με τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε συλλογής. Ακολούθως, με βάση τις ακραίες τιμές της ωσμωτικότητας που μετρήθηκαν, μελετήθηκε η επίδραση του ωσμωτικού στρες στη διαπερατότητα του υπεζωκοτικού ιστού και στις κυτταρικές λειτουργίες: προσκόλληση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα και των κυττάρων μεσοθηλιώματος επιθηλιοειδούς και σαρκωματοειδούς τύπου.

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1. Δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών και μέτρηση ωσμωτικότητας**

Δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών από διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις παρασχέθηκαν από 64 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το 2013 και 2014. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης και η μελέτη είχε εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου. Οι 64 διαγνωσμένες υπεζωκοτικές συλλογές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με τη διάγνωση: α) 6 διυδροματικές υπεζωκοτικές συλλογές, β) 47 κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές και γ) 11 παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές. Η διαχείριση των δειγμάτων έγινε ως εξής: Τα δείγματα υπεζωκοτικού υγρού φυγοκεντρήθηκαν αμέσως μετά την παρακέντηση στα 1500g για 15 λεπτά για το διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο το οποίο αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να αναλυθεί περαιτέρω. Το υπεζωκοτικό υγρό υποβλήθηκε άμεσα σε ανάλυση για τον ολικό αριθμό και τον τύπο των κυττάρων, καθώς και τα επίπεδα της γλυκόζης, των ολικών πρωτεϊνών και της γαλακτικής δευδρογενάσης (LDH). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3** των αποτελεσμάτων.

### **2.2. Μέτρηση ωσμωτικότητας δειγμάτων υπεζωκοτικών συλλογών.**

Η μέτρηση της ωσμωτικότητας πραγματοποιήθηκε με το κρυσκοπικό ωσμόμετρο Osmomat 030 (Gonotec, D10823, Berlin) το οποίο απαιτεί 50  $\mu\text{L}$  όγκου για τη διαδικασία της μέτρησης.

### **2.3. Διαλύματα**

Για την ηλεκτροφυσιολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate buffered Saline) με σύνθεση (σε mM): 137 NaCl, 2,7 KCl, 10  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O και 11,1 και διάλυμα Krebs – Ringer KRB με pH

7.4 που περιείχε (σε mM): 117.5 NaCl, 1.15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.99 NaHCO<sub>3</sub>, 5.65 KCl, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 2.52 CaCl<sub>2</sub>, and 5.55 γλυκόζη. Για τη μελέτη του υπερωσμωτικού στρες ο ιστός εκτέθηκε σε διάλυμα KRB που περιείχε επιπλέον 50mM μαννιτόλη.

Για τη μελέτη της επίδρασης του ωσμωτικού στρηστις κυτταρικές λειτουργίες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 που περιείχε 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS), 1% πενικιλίνη στρεπτομυκίνη, και 1% L γλουταμίνη. Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τη Sigma –Aldrich.

#### **2.4. Απομόνωση τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου**

Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από το θώρακα ενήλικων αρσενικών και θηλυκών προβάτων αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων (**Εικόνα 11**). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 4°C. Μετά την επιστροφή στον εργαστηριακό χώρο και σε διάστημα μισής ώρας τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε KRB. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο χειρισμό των δειγμάτων προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα των ιστών ενώ το διάλυμα KRB παρέμεινε διαρκώς οξυγονωμένο με αέριο μείγμα 95%O<sub>2</sub> /5%CO<sub>2</sub>. Τα δείγματα παρέμειναν στο διάλυμα KRB για 30 λεπτά προκειμένου να ισορροπήσουν στις νέες συνθήκες.



**Εικόνα 11.** Χαρακτηριστική απομόνωση τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.

## **2.5. Κυτταρικές καλλιέργειες**

Καλοήθη μεσοθηλιακά κύτταρα (MeT5-A), επιθηλιοειδή κύτταρα μεσοθηλιώματος (M14K) και σαρκνματοειδή κύτταρα μεσοθηλιώματος (ZL34) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI που περιείχε 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS), 1% πενικιλίνη στρεπτομυκίνη, και 1% L γλουταμίνης επωαστήρα στους 37° C παρουσία 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.6. Ηλεκτροφυσιολογική Μελέτη**

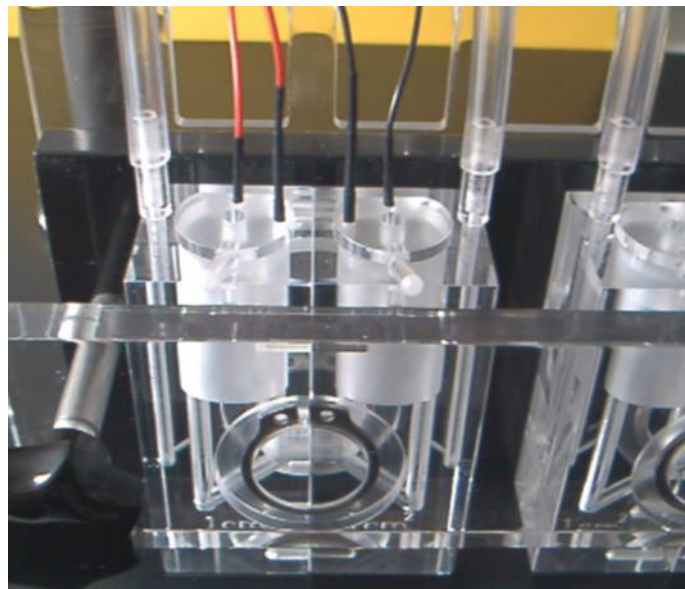
### **2.6.1. Μέθοδος Ussing**

Η μέθοδος και η συσκευή Ussing που χρησιμοποιούνται προκειμένου να μελετηθεί η μεταφορά ηλεκτρολυτών, θρεπτικών συστατικών και φαρμάκων διαμέσου των επιθηλιακών ιστών και αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1950 από το Δανό βιολόγο Hans Ussing σκοπό τη μελέτη της ενεργού μεταφοράς ιόντων Na<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup> σε δέρμα βατράχου (96). Προκειμένου να διαχωρίσει την ενεργό μεταφορά ιόντων από την παθητική μεταφορά μέσω της παρακυτταρικής οδού, ο Ussing και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια πειραματική διάταξη στην οποία ο επιθηλιακός ιστός χώριζε στη μέση ένα θάλαμο όπου κάθε ένα από τα δύο μέρη

περιείχε ίσο όγκο από το ίδιο ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Έτσι η παρακυτταρική μεταφορά λόγω βαθμίδας συγκέντρωσης και ωσμωτικής πίεσης εξαλείφθηκε. Ταυτόχρονα, προκειμένου να περιορίσει τη παθητική διεπιθηλιακή μεταφορά που οφείλεται στο αυθόρμητο ηλεκτρικό δυναμικό, επέβαλε μηδενική διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της επιθηλιακής μεμβράνης εφαρμόζοντας εξωτερικά κατάλληλο ηλεκτρικό ρεύμα. Αυτό το ρεύμα, ονομάζεται ρεύμα βραχυκυκλώματος  $I_{sc}$  (short-circuit current) και είναι ισοδύναμο με το αλγεβρικό άθροισμα όλων των ρευμάτων που οφείλονται στη ενεργή μεταφορά ιόντων (97).

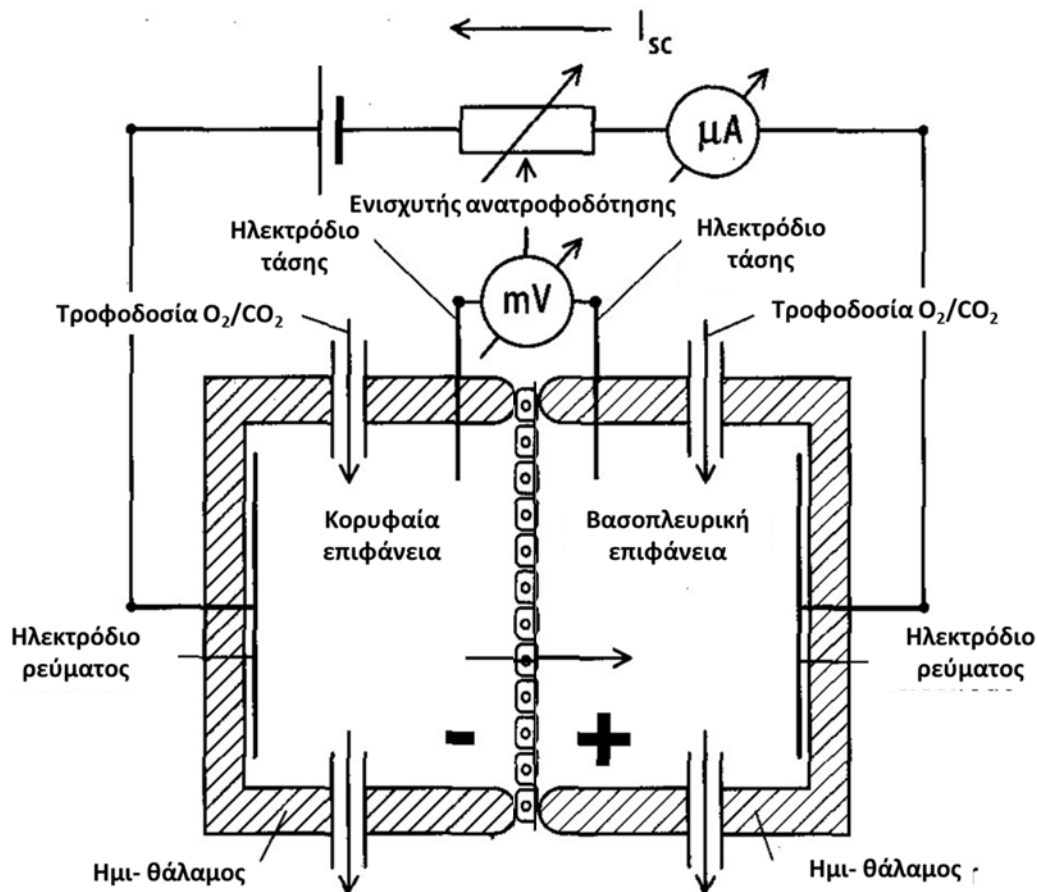
### 2.6.2. Η πειραματική διάταξη Ussing

Η πειραματική διάταξη Ussing (K Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) αποτελείται από δύο ημιθαλάμους που χωρίζονται από τον επιθηλιακό ιστό και περιέχουν διάλυμα Krebs- Ringer που διαβρέχει τον ιστό (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Η πειραματική διάταξη Ussing που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Στους θαλάμους τοποθετείται ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl συνδεδεμένο με ένα βολτόμετρο που μετρά τη διαφορά δυναμικού (mV) και ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl συνδεδεμένο με αμπερόμετρο που μετρά την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος ( $\mu\text{A}$ ). Παράλληλα οι θάλαμοι τροφοδοτούνται συνεχώς από μείγμα αερίου 95%  $\text{O}_2$  /5%  $\text{CO}_2$  (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης Ussing

### 2.6.3. Μέτρηση ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων με συνθήκες βραχυκυκλώματος.

Οι μετρήσεις στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες βραχυκυκλώματος. Μέσω ενός ενισχυτή ανατροφοδότησης εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα ώστε η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν του επιθηλιακού ιστού να είναι μηδενική (98).

Ενδιάμεσα το δυναμικό αφήνεται να πάρει τιμές διαφορετικές του μηδενός επιτρέποντας τον υπολογισμό της διεπιθηλιακής αντίστασης μέσω του νόμου του Ωμ:

$$I_{sc} = \frac{V_{tm}}{R_{tm}}$$

Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή παλμών ρεύματος 50μΑ και διάρκειας 200ms κάθε ένα λεπτό.

#### **2.6.4. Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις με το σύστημα Ussing**

Τα τμήματα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου τοποθετήθηκαν στο επίπεδο της επιφάνειας σύνδεσης των δύο ημιθαλάμων και μετά τη συναρμολόγηση σε κάθε ημιθάλαμο τοποθετήθηκαν 4ml διαλύματος Krebs – Ringer ,ενώ το εμβαδόν της επιφάνειας έκλουσης του ιστού στο διάλυμα ήταν 1cm<sup>2</sup>. Η μέτρηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης R<sub>TM</sub> (Ω•cm<sup>2</sup>) πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C. Μέτρηση της διαφοράς δυναμικού των ηλεκτροδίων και της αντίστασης του διαλύματος Krebs – Ringer προηγείτο της έναρξης του πειράματος και η τιμή της αντίστασης του υγρού σε κάθε πείραμα αφαιρούνταν αυτόματα από την τελική R<sub>TM</sub>. Όλες οι μετρήσεις καταγράφηκαν μέσω λογισμικού σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Clamp Version 2.1 software, Micro-Clamp, Aachen Germany). Ο ιστός αφέθηκε να ισορροπήσει στις καινούριες συνθήκες για χρόνο 10 – 20 λεπτών. Μετά τη σταθεροποίηση των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων ξεκίνησε το πείραμα.

### **2.7. Πειραματικές συνθήκες επώασης ιστού**

#### **2.7.1. Υπερωσμωτικό στρες**

Για τη μελέτη του ωσμωτικού στρες προστέθηκαν ταυτόχρονα και με τον ίδιο ρυθμό και στους δύο ημιθαλάμους 0,6 ml διαλύματος Krebs – Ringer στη βασοπλευρική επιφάνεια και 0,6 ml διαλύματος Krebs – Ringer που περιείχε επιπλέον 50mM μαννιτόλης στη κορυφαία

επιφάνεια του ιστού. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ωτηστικότητας του διαλύματος Krebs – Ringer από ~300mOsm σε ~350mOsm. Οι τιμές της  $R_{TM}$  καταγράφηκαν για διάστημα 10 λεπτών από την έναρξη του πειράματος. Προκειμένου να μελετηθούν οι συνθήκες ελέγχου σε άλλη ομάδα πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν πειράματα χωρίς πρόκληση ωσμωτικού στρες αλλά με τον ίδιο ρυθμό εφαρμογής 0,6ml διαλύματος Krebs – Ringer και στις δύο επιφάνειες του ιστού. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 5 φορές.

### **2.7.2. Υποωσμωτικό στρες**

Για τη μελέτη του υποωσμωτικού στρες προστέθηκαν ταυτόχρονα και με τον ίδιο ρυθμό και στους δύο ημιθαλάμους 0,6 ml διαλύματος Krebs – Ringer στη βασοπλευρική επιφάνεια και 0,6 ml dH<sub>2</sub>O στη κορυφαία επιφάνεια του ιστού. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ωσμωτικότητας του διαλύματος Krebs – Ringer από ~300mOsm σε ~250mOsm. Οι τιμές της  $R_{TM}$  καταγράφηκαν για διάστημα 10 λεπτών από την έναρξη του πειράματος. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 5 φορές.

## **2.8. Πειραματικές συνθήκες επώασης των κυτταρικών σειρών**

### **2.8.1. Κυτταρικές καλλιέργειες**

Καλοήθη μεσοθηλιακά κύτταρα (MeT-5A), επιθηλιοειδή κύτταρα μεσοθηλιώματος (M14K) και σαρκωματοειδή κύτταρα μεσοθηλιώματος (ZL34) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI που περιείχε 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS), 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, και 1% L γλουταμίνη σε επωαστήρα στους 37° C παρουσία 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.8.2. Ωσμωτικό στρες**

Στις κυτταροκαλλιέργειες το υποωσμωτικό στρες επετεύχθη με την αραίωση του θρεπτικού μέσου με dH<sub>2</sub>O (~250mOsm) με διατήρηση της περιεκτικότητας 10% FBS ενώ το υπερωσμωτικό στρες εφαρμόστηκε με τη προσθήκη θρεπτικού μέσου αυξημένης



ωσμωτικότητα (~350mOsm). Η εφαρμογή υπερωσμωτικού στρες μελετήθηκε με την προσθήκη τριών διαφορετικών ωσμωλυτών: 50mM μαννιτόλη, 50mM γλυκόζη και 25mM NaCl. Στην ομάδα πειραμάτων ελέγχου τα κύτταρα εκτέθηκαν στο θρεπτικό μέσο όπου και καλλιεργήθηκαν.

## 2.9. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης

Η κυτταρική μετανάστευση υπό την επίδραση ωσμωτικού στρες μελετήθηκε με τη δοκιμασία της επούλωσης πληγής. Συγκεκριμένα τα κύτταρα τοποθετήθηκαν με πυκνότητα  $1.5 \cdot 10^5$  κύτταρα/βοθρίο σε πλάκες 48 βοθρίων προεπικαλυμένων με φμπρονεκτίνη. Τα κύτταρα αφέθηκαν να σχηματίσουν συνεχή μονοστιβάδα καλύπτοντας το βοθρίο με 100% πληρότητα και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 24 ώρες. Μετά το συγχρονισμό των κυττάρων δημιουργήθηκε μια ασυνέχεια στη μονοστιβάδα με ρίγχος πιπέτας των 20μl και αντικαταστάθηκε το θρεπτικό μέσο με το υποωσμωτικό, τα υπερωσμωτικά και το θρεπτικό μέσο ελέγχου. Η ασυνέχεια φωτογραφήθηκε με μεγέθυνση 100x τη χρονική στιγμή  $t=0$  και έπειτα από επώαση 8 ωρών στους  $37^\circ \text{C}$  σε 5%CO<sub>2</sub> για τις κυτταρικές σειρές MeT-5A και M14K και έπειτα από επώαση 4 ωρών για τη κυτταρική σειρά ZL34. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές φορές και είχε 8 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη. Με τη μέτρηση του εύρους της ασυνέχειας με το λογισμικό Image J τις δύο χρονικές στιγμές υπολογίστηκε ο δείκτης κυτταρικής μετανάστευσης  $i$ :

$$i = \frac{a(t_0) + a(t_{end})}{a(t_0)}$$

Όπου  $a(t_0)$  το αρχικό εύρος και  $a(t_{end})$  το τελικό εύρος της ασυνέχειας.

## 2.10. Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης

Η κυτταρική προσκόλληση μελετήθηκε υπό συνθήκες ωσμωτικού στρες. Για 24 ώρες πριν την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού με την έκθεσή τους σε θρεπτικό μέσο παρουσία 0,5% FBS προκειμένου να συγχρονιστούν στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν στο υποωσμωτικό και στα υπερωσμωτικά θρεπτικά μέσα και τοποθετήθηκαν με πυκνότητα  $2.5 \cdot 10^4$  κύτταρα/βοθρίο σε πλάκες 48 βοθρίων που ήταν προεπικαλυμμένα με φιμπρονεκτίνη. Μετά από επώαση 90 λεπτών στους 37°C παρουσία 5%CO<sub>2</sub> τα βοθρία ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS προς απομάκρυνση των κυττάρων που αιωρούνταν, εφαρμόστηκε 4% παραφολμαλδεΐδη για τη μονιμοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων και πραγματοποιήθηκε χρώση με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους, τα βοθρία ξεπλύθηκαν ενδελεχώς και αφέθηκαν να στεγνώσουν για τουλάχιστον 12 ώρες. Έπειτα ανακτήθηκε η χρωστική με την προσθήκη στα βοθρία διαλύματος οξικού οξέως 10% για 20 λεπτά και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 570 nm. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και είχε 5-8 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη.

## **2.11. Δοκιμασία Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού**

Μελέτη του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση ωσμωτικού στρες πραγματοποιήθηκε σε διάρκεια 3 ημερών. Σε όλες τις κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε στέρηση ορού προς συγχρονισμό των κυττάρων για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαν-εναιωρήθηκαν στο υποωσμωτικό θρεπτικό μέσο, στα υπερωσμωτικά θρεπτικά μέσα και στο θρεπτικό μέσο ελέγχου και τοποθετήθηκαν με πυκνότητα  $10^4$  κύτταρα/βοθρίο σε πλάκες 96 βοθρίων προεπικαλυμένων με φιμπρονεκτίνη. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξετάστηκε μετά από 3, 24, 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος.

Για κάθε χρονική στιγμή τα βοθρία ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS προς απομάκρυνση των κυττάρων που αιωρούνταν, εφαρμόστηκε 4% παραφολμαλδεΐδη για τη μονιμοποίηση των

προσκολλημένων κυττάρων και πραγματοποιήθηκε χρώση με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους, τα βοθρία ξεπλύθηκαν ενδελεχώς και αφέθηκαν να στεγνώσουν για τουλάχιστον 12 ώρες. Έπειτα ανακτήθηκε η χρωστική με την προσθήκη στα βοθρία διαλύματος οξικού οξέως 10% για 20 λεπτά και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 570 nm. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε με βάση τη μέτρηση, μέσω της οπτικής πυκνότητας, του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονταν σε κάθε χρονική στιγμή στα βοθρία. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και είχε 8 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη.

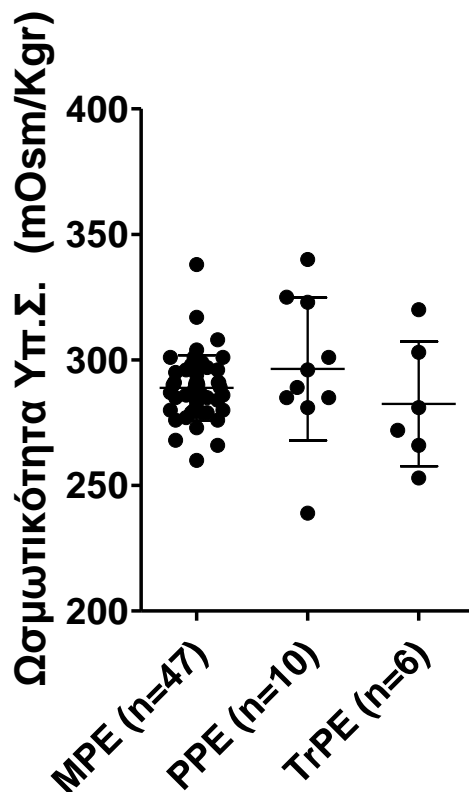
## 2.12. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism 5 έκδοση για Windows. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής με εξέρεση τα χαρακτηριστικά των υπεζωκοτικών συλλογών που παρουσιάζονται με τη μορφή μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η σύγκριση των τιμών της οσμοτικότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά των υπεζωκοτικών συλλογών έγινε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό των τιμών τους με ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Ο έλεγχος κανονικότητας έγινε με το D'Agostino & Pearson test. Η σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με το Student's t test (πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης και μετανάστευσης υποοσμωτικού στρες) ενώ η σύγκριση μεταξύ τριών ομάδων πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο One – way ANOVA ή Brown-Forsythe and Welch ANOVA test (ανάλογα με την κανονικότητα των δεδομένων) που ακολουθήθηκε από Dunnett's post test πολλαπλών συγκρίσεων. Για τη σύγκριση δύο μεταβλητών σε περισσότερες από τρεις ομάδες χρησιμοποιήθηκε Two – way ANOVA με Bonferroni post test. Η τιμή  $p < 0.05$  θεωρήθηκε ότι καταδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά.

## **Αποτελέσματα**

## 1. Μετρήσεις ωσμωτικότητας υπεζωκοτικών συλλογών

Από τα συνολικά 64 δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών που συνελέχθησαν κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής σύμφωνα με τη διάγνωση: 6 διδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές (9%) (TPE) 47 κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές (74%) (MPE) και 11 παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές (17%) (PPE). Η ωσμωτικότητα των διδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών ήταν  $282.5 \pm 24.83$ , των κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών  $288.8 \pm 13.07$  και των παραπνευμονικών υπεζωκοτικών συλλογών  $308.7 \pm 49$  (Σχήμα 1). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ωσμωτικότητας  $\pm$  τυπική απόκλιση. Συνολικά η τιμή της ωσμωτικότητας των υπεζωκοτικών συλλογών κυμαίνεται από 239mOsm (παραπνευμονική υπεζωκοτική συλλογή) έως 340mOsm (παραπνευμονική υπεζωκοτική συλλογή).



**Σχήμα 1.** Μέσες τιμές ωσμωτικότητας και τυπικές αποκλίσεις δειγμάτων υπεζωκοτικού υγρού ασθενών με κακοήθεις, παραπνευμονικές και διδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές.

### 1.1. Χαρακτηριστικά υπεζωκοτικών συλλογών και ανάλυση της μεταξύ τους συσχέτισης.

Τα δημογραφικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των υπεζωκοτικών συλλογών που μελετήθηκαν παρατίθενται στον **Πίνακα 3**. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση ή ως σχετικές συχνότητες. Η ανάλυση One-Way ANOVA ανάμεσα στις τιμές της ωσμωτικότητας των διαφορετικών ομάδων των υπεζωκοτικών συλλογών πραγματοποιήθηκε μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό των τιμών τους.

**Πίνακας 3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά υπεζωκοτικών συλλογών των συμμετεχόντων στη μελέτη, συνολικά και αντίστοιχα με το είδος της υπεζωκοτικής συλλογής.**

		Σύνολο ασθενών n=64	TrPE n=6	PPE n=11	MPE n=47	p
<b>Φύλο</b>	Άνδρες, # (%)	43 (67.2)	3 (50%)	8 (72.7)	32 (68.1)	0.614
	Γυναίκες, # (%)	21 (32.8)	3 (50%)	3 (27.3)	15 (31.9)	
<b>Ηλικία</b>		63.36±13.87	57.67±24 .25	53.55± 17.14	66.38 ± 9.95	0.057
<b>Υπεζωκοτικό υγρό</b>						
<b>Γλυκόζη (g/dL)</b>		102.6±54.65	107.4±18 .5	93.09± 80.18	104.3±50. 70	0.816
<b>Ολική πρωτεΐνη (g/dL)</b>		4.23±1.33	3.27±1.4 7	3.91±1. 76	4.41±1.17	0.129
<b>LDH (IU/L)</b>		995±3094	394.2±48 4.9	3231±7 195	535.6± 417.5	<b>0.028</b>

<b>pH</b>	7.30±0.32	7.43±0.0	6.91±0.	7.38±0.12	<b>&lt;0.001</b>
		7	57		
<b>Ωσμωτικότητα (mOsm/kg<sub>r</sub> H<sub>2</sub>O)</b>	291.7±24.89	282.5±24	308.7±	288.8±13.	<b>0.050<sup>#</sup></b>
		.83	49.0	07	
<b>Είδος κακοήθων Υ.Σ.</b>		<b>Είδος παραπνευμονικών Υ.Σ.</b>			
<i>Καρκίνος Πνεύμονα</i>	37 (40%)	<i>Μη επιπλεγμένες: 3 (28%)</i>			
<i>Μεσοθηλίωμα</i>	5 (40%)	<i>Επιπλεγμένες: 4 (36%)</i>			
<i>Καρκίνος Μαστού</i>	3 (30%)	<i>Εμπόημα: 4 (36%)</i>			
<i>Παρανεοπλασματικές</i>	2 (20%)				

Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των λογαριθμικά μετασχηματισμένων τιμών της ωσμωτικότητας σε σχέση με τις υπόλοιπες βιοχημικές παραμέτρους των υπεζωκοτικών συλλογών που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Φαίνεται ότι οι λογαριθμημένες τιμές της ωσμωτικότητας παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση σε σύγκριση με το pH ( $p<0.05$ ) και θετική συσχέτιση με τη λογαριθμημένη συγκέντρωση της γλυκόζης ( $p<0.05$ ). Οι λογαριθμημένες τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών πρωτεϊνών και της LDH δεν παρουσίασε συσχέτιση με τις τιμές της ωσμωτικότητας.

Πίνακας 4. Ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης αξιολόγησης της συσχέτισης της λογαριθμικά μετασχηματισμένης ωσμωτικότητας με το pH, συνολική πρωτεΐνη, LDH και γλυκόζης του υπεζωκοτικού υγρού.

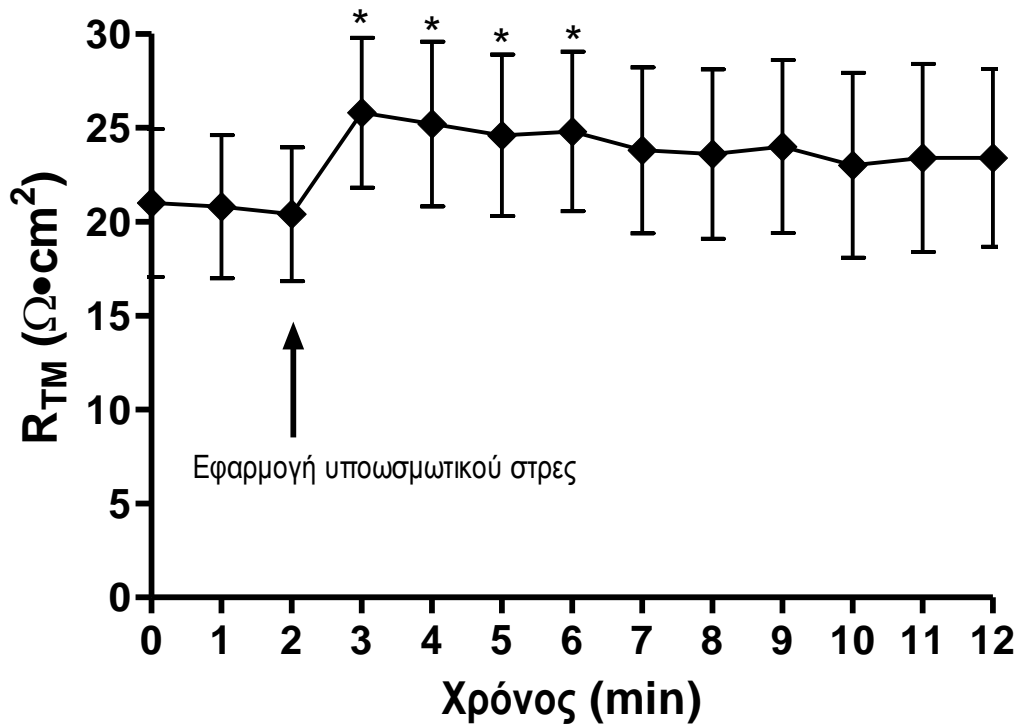
Παράμετροι	$\beta$	$p$
<i>Εξαρτημένη μεταβλητή LogOsm</i>		
Intercept	2.639	<b>0.001</b>
pH	-0.034	<b>0.043</b>
Log10 πρωτεΐνες	-0.040	0.147
Log10 LDH	0.021	0.107
Log10 Γλυκόζη	0.021	<b>0.048</b>

## 2. Επίδραση του ωσμωτικού στρες στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου

### 2.1. Επίδραση υποωσμωτικού στρες

Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες παρατηρήθηκε αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου ( $p > 0.05$ ) διάρκειας 4 λεπτών μετά την εφαρμογή του υποωσμωτικού στρες (**Σχήμα 2**).

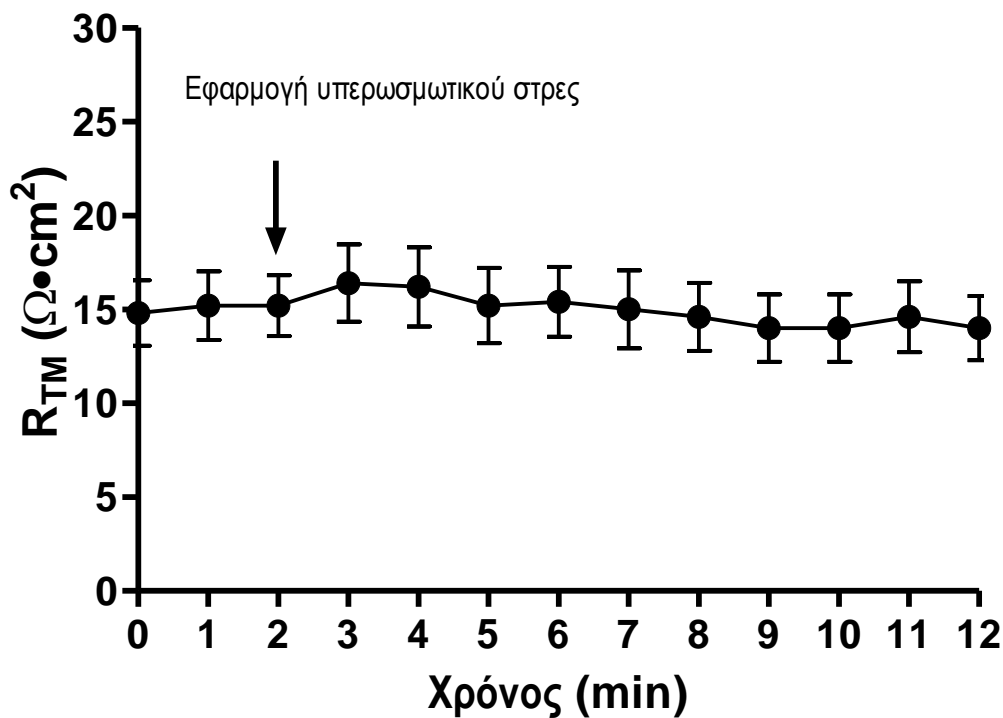




**Σχήμα 2.** Μέση τιμή διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $R_{TM}$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε συνάρτηση με το χρόνο. Το υποωσμωτικό στρες εφαρμόστηκε τη χρονική στιγμή 2min. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με τη χρονική στιγμή 2min.

## 2.2. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της διαμεσοθηλιακής αντίστασης τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου (**Σχήμα 3**).



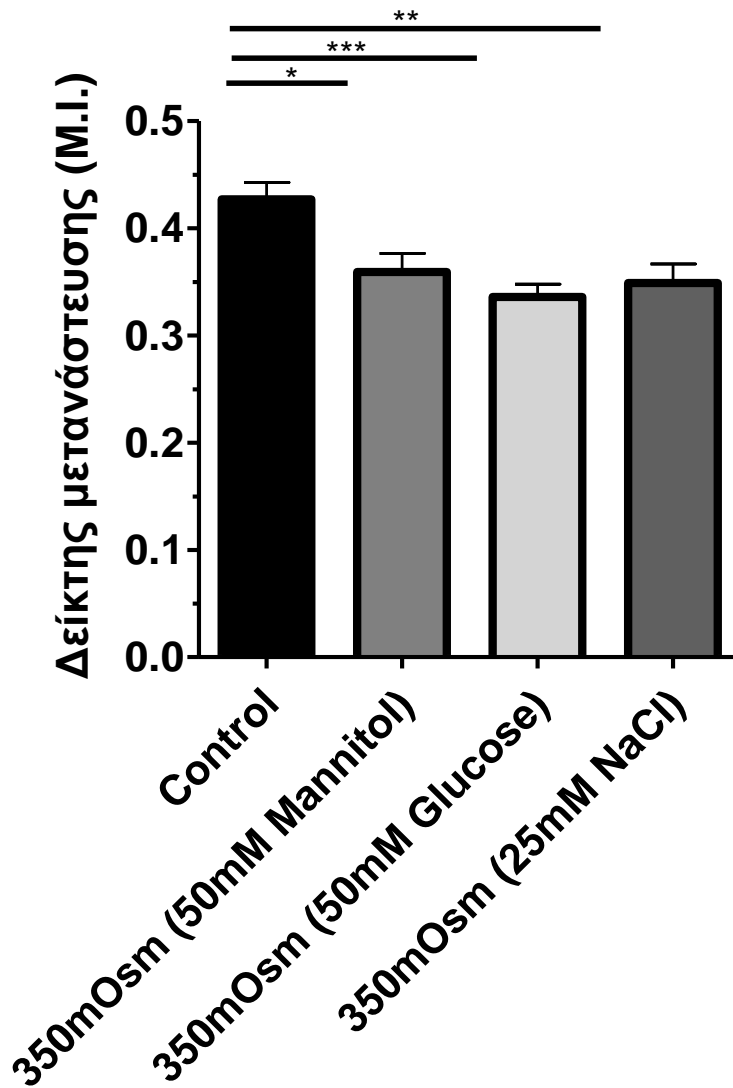
**Σχήμα 3.** Μέση τιμή διαμεσοθηλιακής αντίστασης  $R_{TM}$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου σε συνάρτηση με το χρόνο. Το υπερωσμωτικό στρες εφαρμόστηκε τη χρονική στιγμή 2min.

### 3. Επίδραση ωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση

#### 3.1. Υπερωσμωτικό στρες

##### 3.1.1. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.

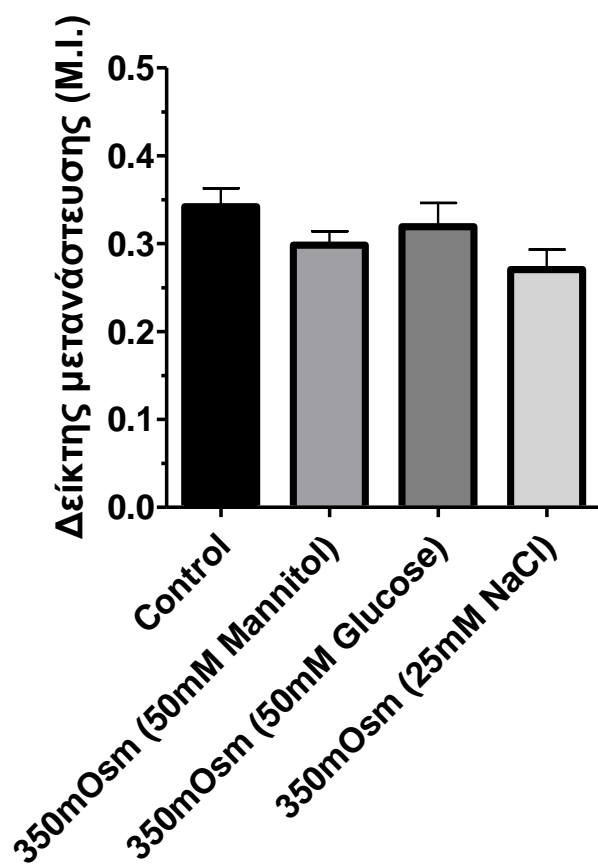
Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A μειώθηκε και στις τρεις συνθήκες: παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.36 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ), γλυκόζης ( $0.34 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) και χλωριούχου νατρίου ( $0.35 \pm 0.02$ ,  $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.42 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4.** Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της ανθρώπινη μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control ~300 mOsm/Kg, n=16), υπεροσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=16), 50mM γλυκόζη (n=16) και 25mM NaCl (n=16). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

### 3.1.2. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.

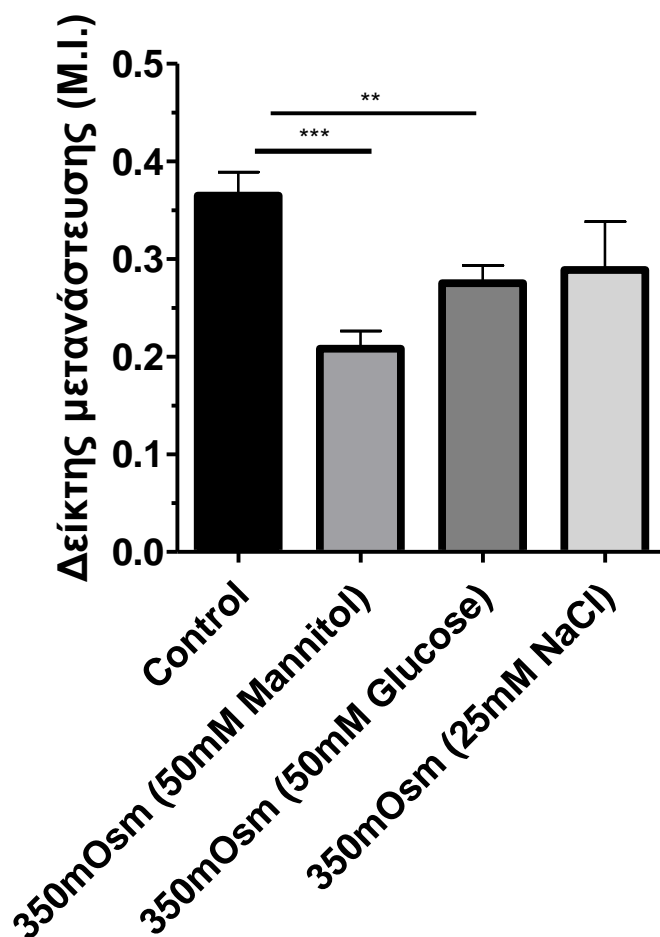
Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε καμία από τις τρεις συνθήκες: παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.30 \pm 0.02$ ), γλυκόζης ( $0.32 \pm 0.03$ ) και χλωριούχου νατρίου ( $0.27 \pm 0.02$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες ( $0.34 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 5).



**Σχήμα 5.** Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim 300$ mOsm/Kg,  $n=16$ ), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη ( $n=16$ ), 50mM γλυκόζη ( $n=16$ ) και 25mM NaCl ( $n=16$ ).

### 3.1.3. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 μειώθηκε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.20 \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ ), γλυκόζης ( $0.28 \pm 0.02$ ,  $p < 0.01$ ) ενώ δεν μεταβλήθηκε σημαντικά παρουσία χλωριούχου νατρίου ( $0.29 \pm 0.05$ ) σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.37 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 6).



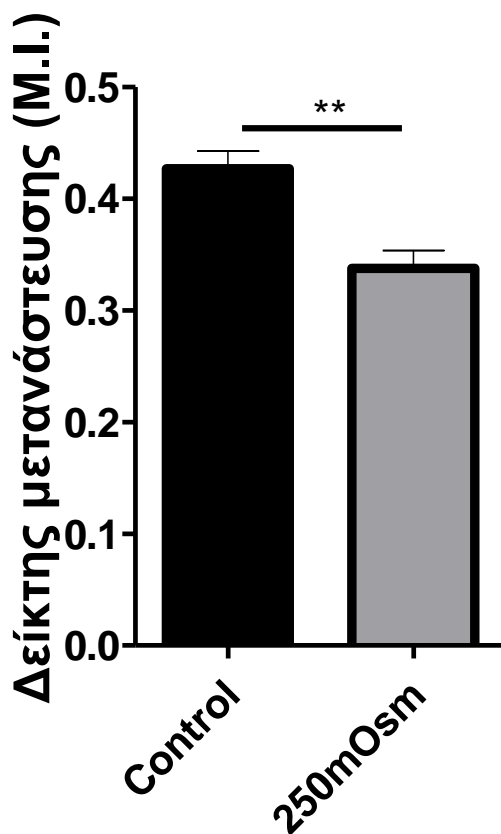
Σχήμα 6. Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control

~300mOsm/Kg, n=16), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=16), 50mM γλυκόζη (n=16) και 25mM NaCl (n=16). \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

### 3.2. Υποωσμωτικό στρες

#### 3.2.1. Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A

Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A μειώθηκε ( $0.34 \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.44 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 7).

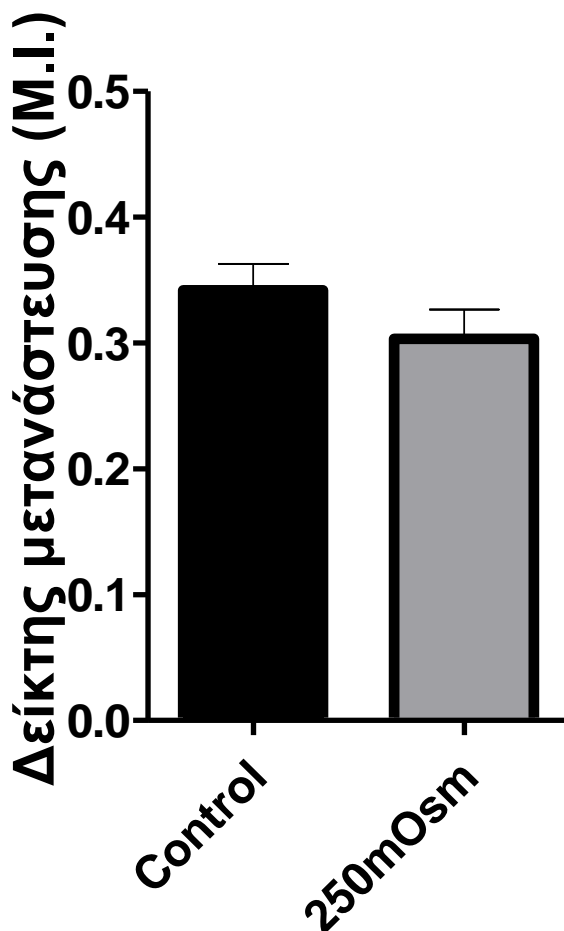


Σχήμα 7. Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης ± τυπικό σφάλμα της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες

(Control ~300mOsm/Kg, n=16) και υποωσμωτικές (~250mOsm/Kg, n=16), \*\*\*p<0.001 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

### 3.2.2. Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθελιώματος M14K.

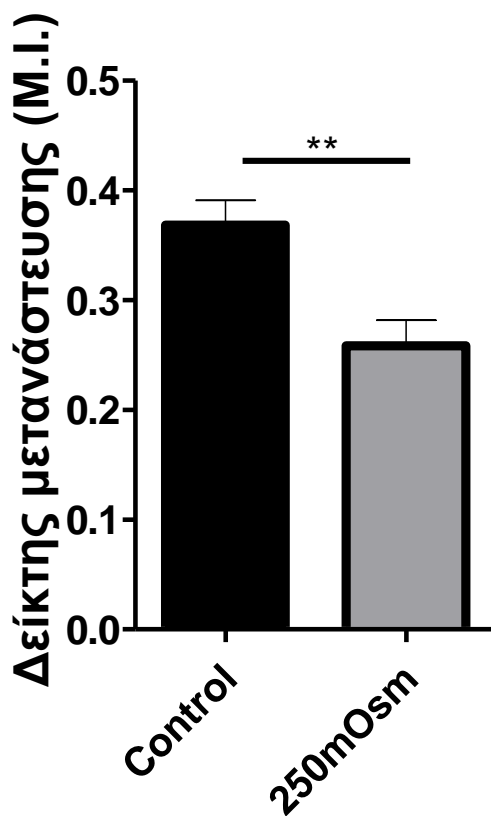
Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθελιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ( $0.30 \pm 0.02$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.34 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης ± τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθελιώματος M14K. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες (Control ~300mOsm/Kg, n=16) και υποωσμωτικές (~250mOsm/Kg, n=16).

### 3.2.3. Επίδραση υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική μετανάστευση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 μειώθηκε ( $0.26 \pm 0.02$ ,  $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.37 \pm 0.02$ ) (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Μέση τιμή του δείκτη μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim 300$ mOsm/Kg,  $n=16$ ) και υποωσμωτικές ( $\sim 250$ mOsm/Kg,  $n=16$ ),  $**p < 0.01$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

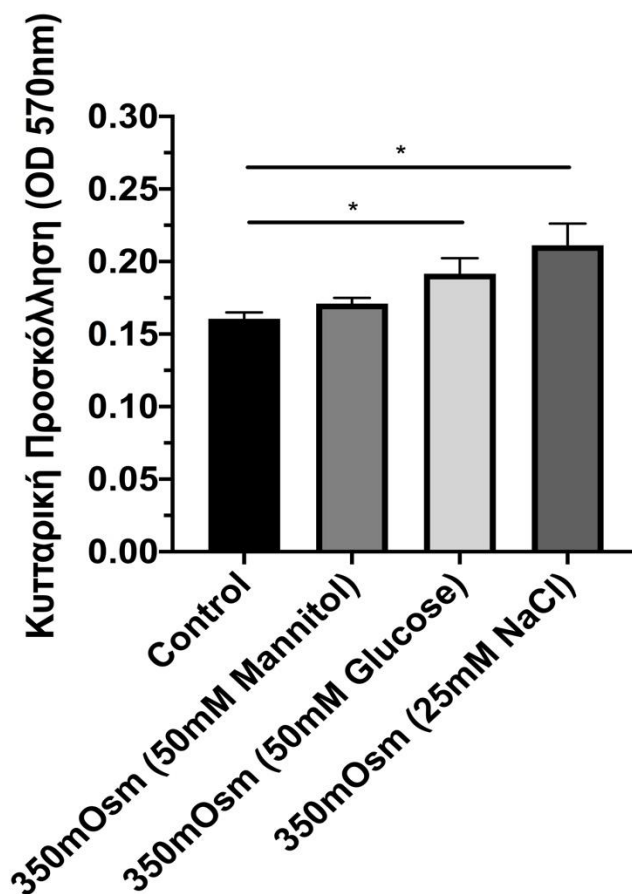


#### 4. Επίδραση του ωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση

##### 4.1. Υπερωσμωτικό στρες

##### 4.1.1. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A δεν μεταβλήθηκε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.17 \pm 0.01$ ), ενώ αυξήθηκε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης ( $0.19 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) και χλωριούχου νατρίου ( $0.21 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.16 \pm 0.01$ ) (Σχήμα 10).

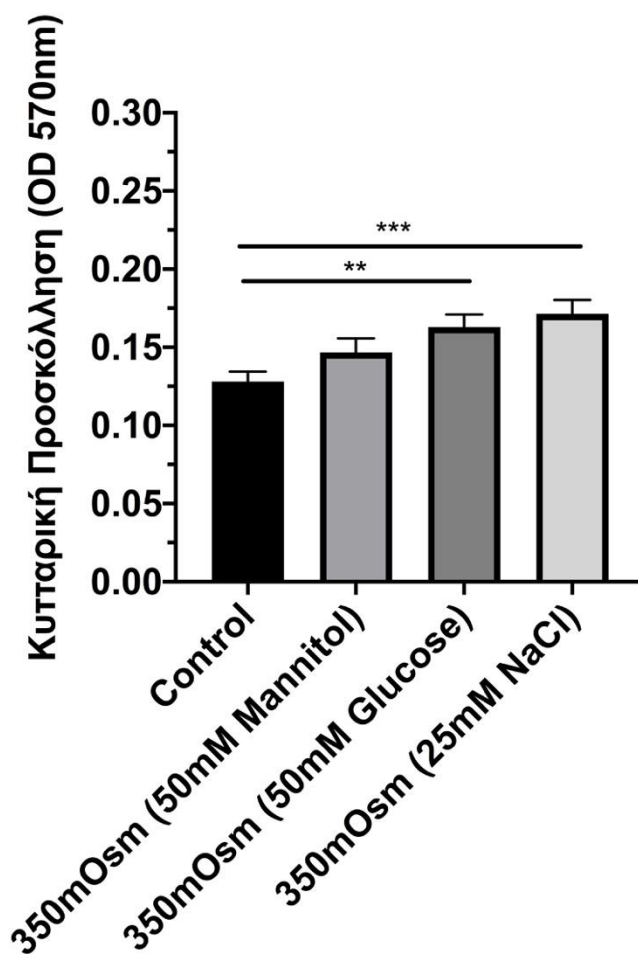


Σχήμα 10. Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρική σειρά MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες

(Control ~300mOsm/Kg, n=21), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=21), 50mM γλυκόζη (n=21) και 25mM NaCl (n=21). \*p<0.05 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

#### 4.1.2. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.

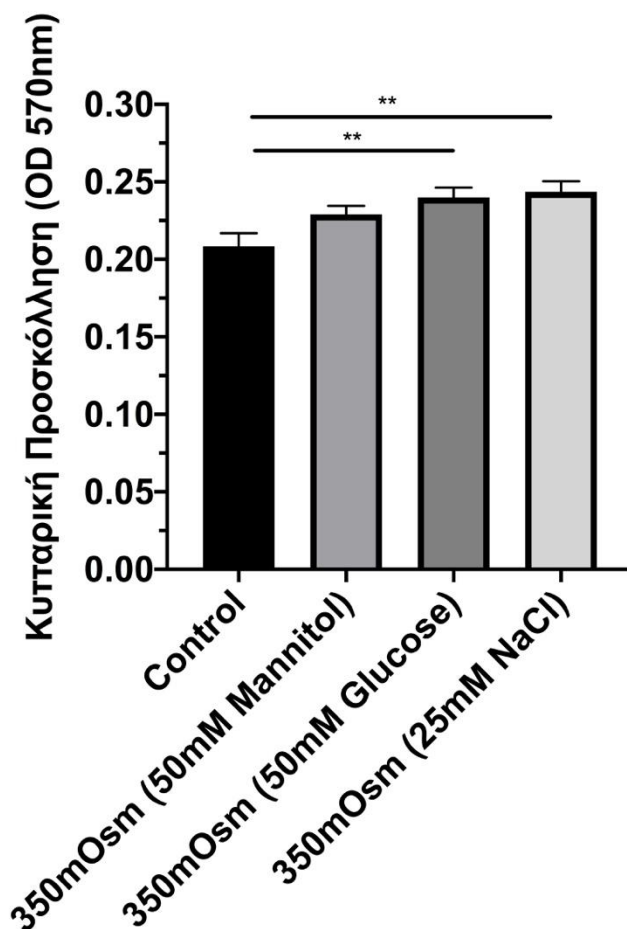
Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.15 \pm 0.01$ ), ενώ αυξήθηκε σημαντικά παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης και γλυκόζης ( $0.16 \pm 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) και χλωριούχου νατρίου ( $0.17 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.13 \pm 0.01$ ) (Σχήμα 11).



**Σχήμα 11.** Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim$ 300mOsm/Kg, n=21), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=21), 50mM γλυκόζη (n=21) και 25mM NaCl (n=21). \*\*p<0.01 και \*\*\*p<0.001 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

#### 4.1.3. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 δεν μεταβλήθηκε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης ( $0.23 \pm 0.01$ ), ενώ αυξήθηκε σημαντικά παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης ( $0.24 \pm 0.01$ ) και χλωριούχου νατρίου ( $0.24 \pm 0.01$ , p<0.05) σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.21 \pm 0.01$ ) (Σχήμα 12).

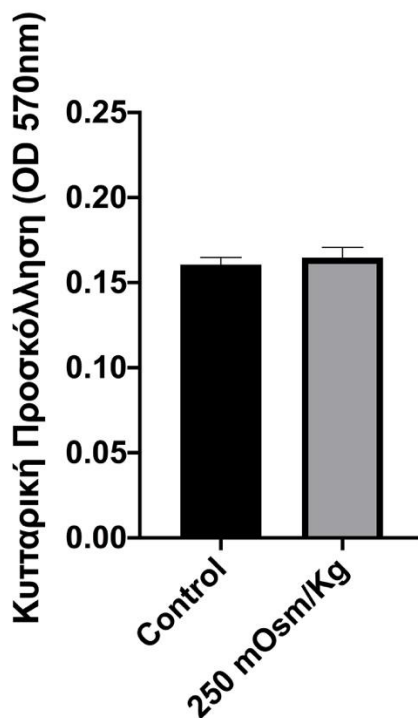


**Σχήμα 12.** Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim$ 300mOsm/Kg, n=26), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=26), 50mM γλυκόζη (n=26) και 25mM NaCl (n=26). \*\*p<0.01 σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς.

## 4.2. Υποοσμωτικό στρες

### 4.2.1. Επίδραση του υποοσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.

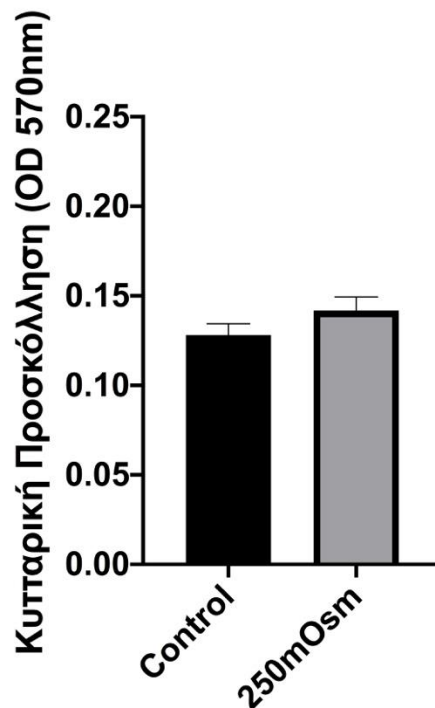
Υπό την επίδραση υποοσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A δεν μεταβλήθηκε ( $0.16\pm 0.01$ ) σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.16\pm 0.01$ ) (**Σχήμα 13**).



**Σχήμα 13.** Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim$ 300mOsm/Kg, n=21) και υποοσμωτικές ( $\sim$ 250mOsm/Kg, n=21).

#### 4.2.2. Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.

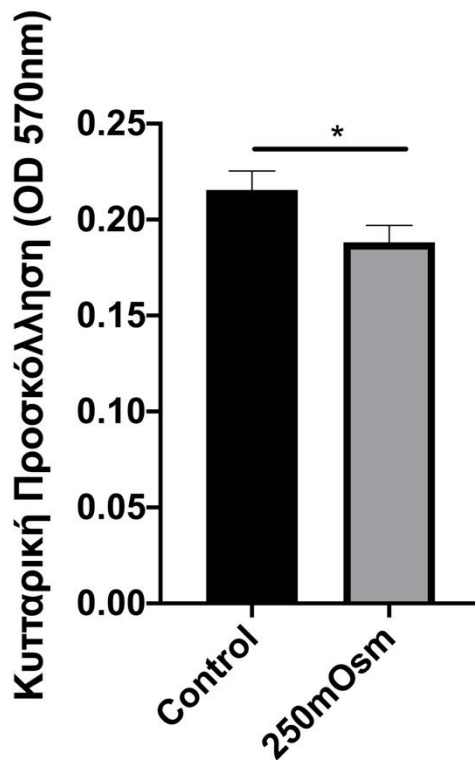
Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε ( $0.14 \pm 0.01$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.13 \pm 0.01$ ) (Σχήμα 14).



**Σχήμα 14.** Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοωσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim 300\text{mOsm/Kg}$ ,  $n=21$ ) και υποωσμωτικές ( $\sim 250\text{mOsm/Kg}$ ,  $n=21$ ).

#### 4.2.3. Επίδραση του υποωσμωτικού στρες στη κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες η κυτταρική προσκόλληση της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 μειώθηκε ( $0.19 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) σε σύγκριση με τις ισοωσμωτικές συνθήκες αναφοράς ( $0.22 \pm 0.01$ ) (Σχήμα 15).



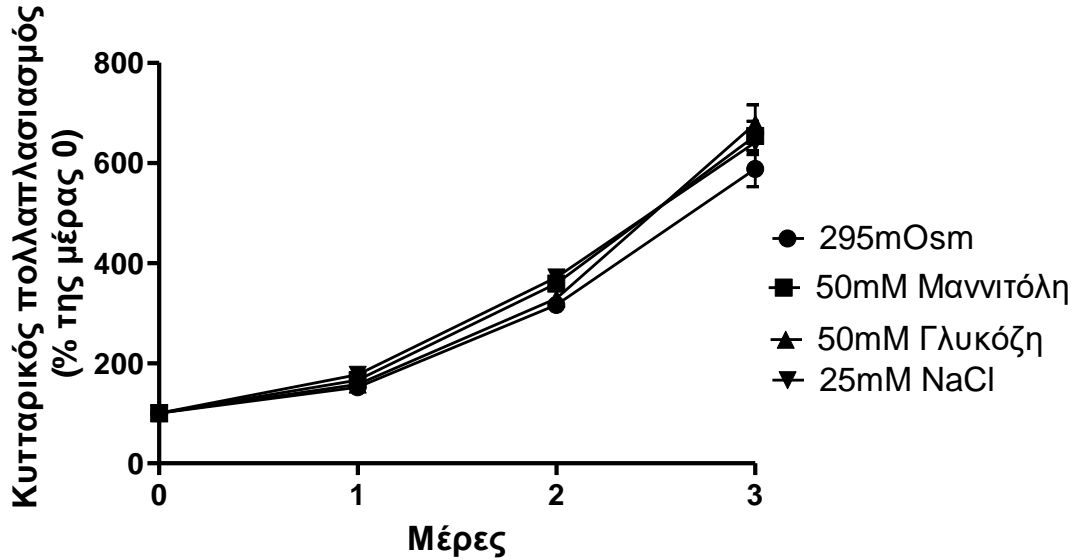
**Σχήμα 15.** Μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\pm$  τυπικό σφάλμα της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control  $\sim$ 300mOsm/Kg, n=21) και υποοσμωτικές ( $\sim$ 250mOsm/Kg, n=21), \*p<0.05.

## 5. Επίδραση οσμωτικού στρες στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό

### 5.1. Επίδραση υπερωσμωτικού στρες

#### 5.1.1. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.

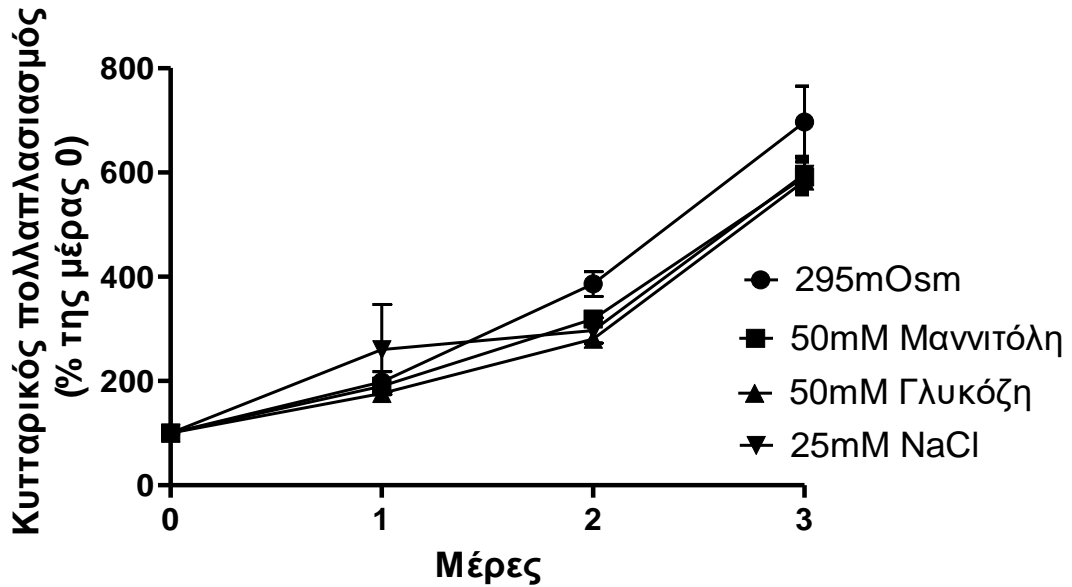
Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A δεν μεταβλήθηκε σε καμία από τις συνθήκες: παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης, γλυκόζης και χλωριούχου νατρίου σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 μέρες) (Σχήμα 16).



**Σχήμα 16.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0 ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στην ανθρώπινη μεσοθηλιακή κυτταρική σειρά MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (Control ~300mOsm/Kg, n=16), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=16), 50mM γλυκόζη (n=16) και 25mM NaCl (n=16).

### 5.1.2. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε σε καμία από τις συνθήκες: παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης, γλυκόζης και χλωριούχου νατρίου σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 μέρες) (Σχήμα 17).

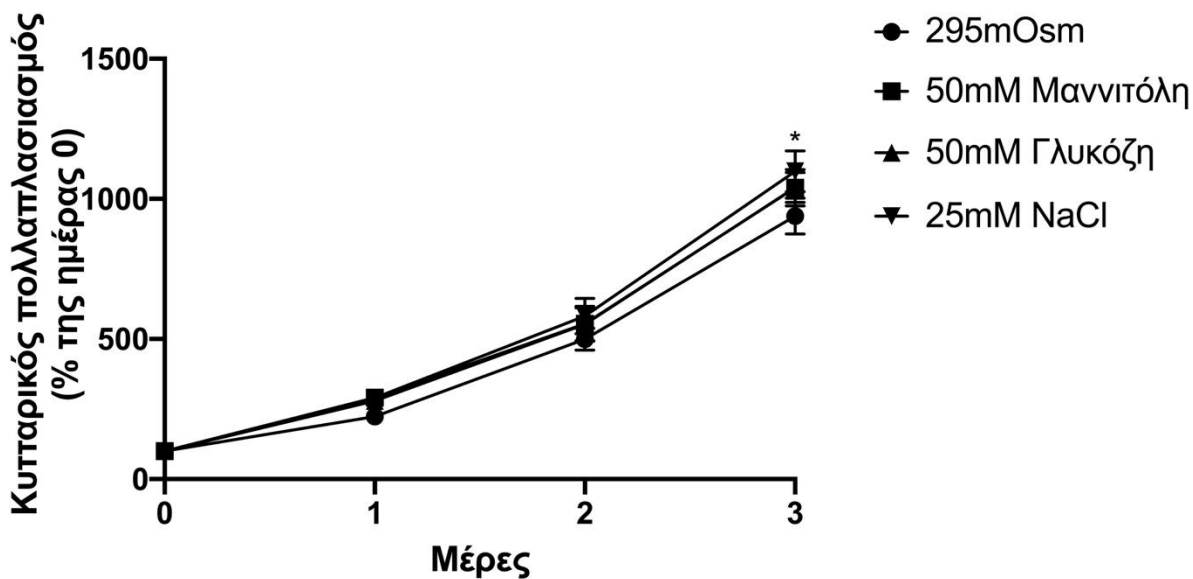


**Σχήμα 17.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0 ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στη κυτταρική σειρά μεσοθηλιώματος M14K. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (control ~300mOsm/Kg, n=8), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=8), 50mM γλυκόζη (n=8) και 25mM NaCl (n=8).

### 5.1.3. Επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 δεν μεταβλήθηκε σε παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης μαννιτόλης και γλυκόζης, ενώ παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου αυξήθηκε σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς την τρίτη ημέρα από την εκκίνηση του πειράματος ( $p < 0.5$ ) (**Σχήμα 18**).



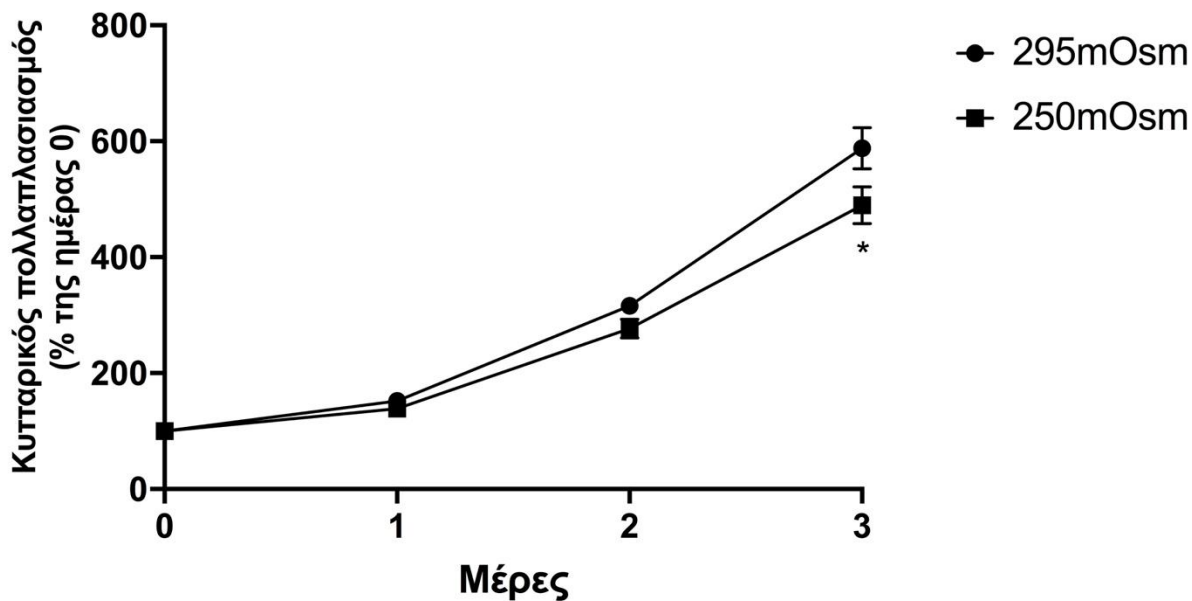


**Σχήμα 18.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0 ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στη κυτταρική σειρά μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (control ~300mOsm. n=16), υπερωσμωτικές με 50mM μαννιτόλη (n=16), 50mM γλυκόζη (n=16) και 25mM NaCl (n=16), \*p<0.05.

## 5.2. Επίδραση υποοσμωτικού στρες

### 5.2.1. Επίδραση του υποοσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.

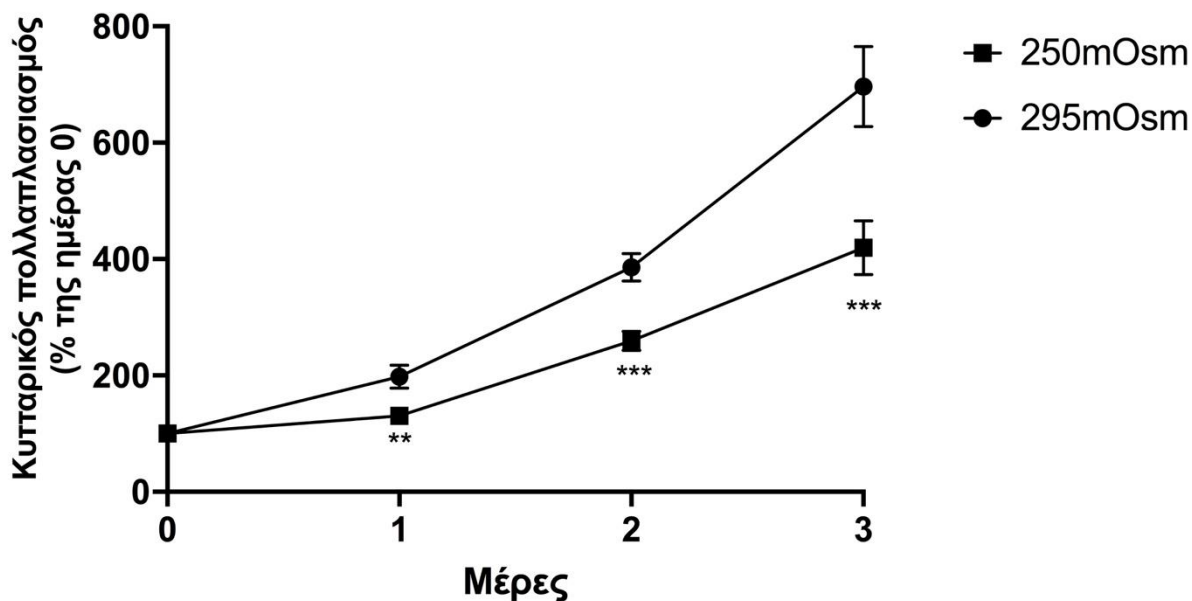
Υπό την επίδραση υποοσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A μειώθηκε σημαντικά κατά τη τρίτη μέρα διεξαγωγής του πειράματος σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς (Σχήμα 19).



**Σχήμα 19.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά Met-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (control  $\sim$ 300mOsm, n=16) και υποοσμωτικές συνθήκες ( $\sim$ 250mOsm, n=16), \*p<0.05.

### 5.2.2. Επίδραση του υποοσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.

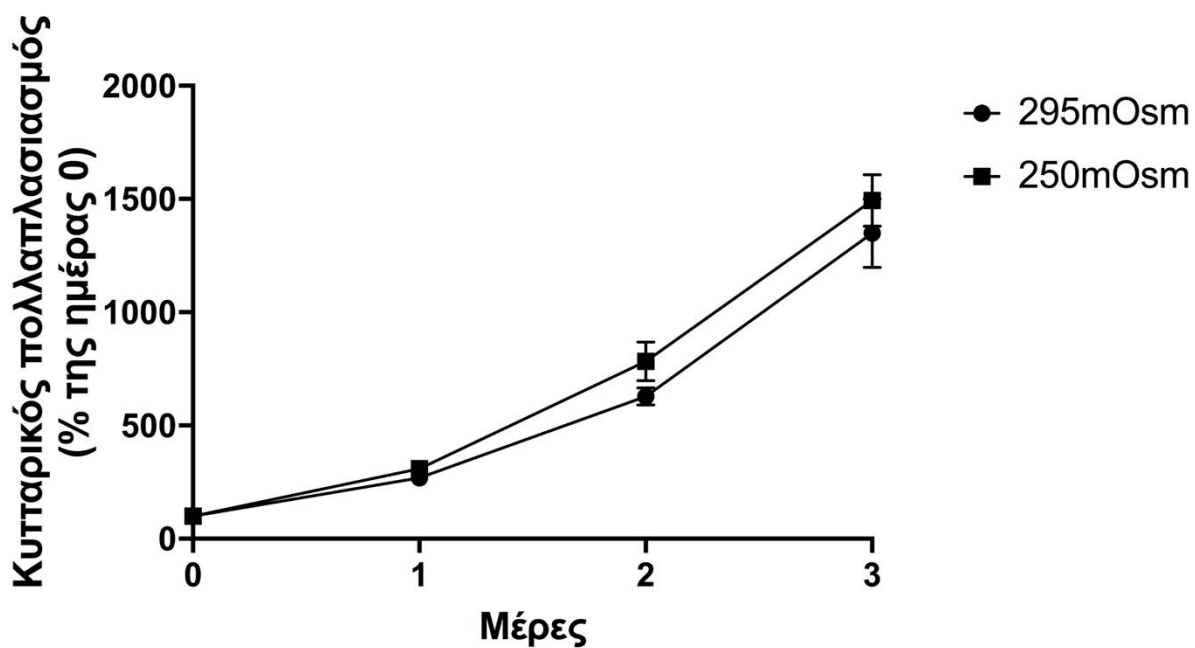
Υπό την επίδραση υποοσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K μειώθηκε σημαντικά και κατά τις τρεις μέρες διεξαγωγής του πειράματος σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς (**Σχήμα 20**).



**Σχήμα 20.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0 ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στη κυτταρική σειρά μεσοθηλιώματος M14K.. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (control ~300mOsm, n=8) και υποοσμωτικές συνθήκες (~250mOsm, n=8), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### 5.2.3. Επίδραση του υποοσμωτικού στρες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34.

Υπό την επίδραση υποοσμωτικού στρες ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34 δεν μεταβλήθηκε σε σύγκριση με τις ισοοσμωτικές συνθήκες αναφοράς καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 μέρες) (**Σχήμα 21**).



**Σχήμα 21.** Μέση τιμή της % μεταβολής της οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με τη μέρα 0 ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής στη κυτταρική σειρά μεσοθηλιώματος ZL34. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες (control ~300mOsm, n=16) και υποοσμωτικές συνθήκες (~250mOsm, n=16).

## Συζήτηση

Η κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι διαδικασίες σημαντικές για την εξέλιξη και εξάπλωση ενός καρκινικού όγκου. Δεδομένου ότι η υπεζωκοτική κοιλότητα εκτίθεται σε μεταβολές της ωσμωτικότητας όπως φαίνεται και στη παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της βαθμίδωσης της ωσμωτικότητας στις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων μεσοθηλιώματος. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση της μεταβολής της ωσμωτικότητας στην διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα, δεδομένου ότι η παρακυτταρική και η διακυτταρική μεταφορά συμβάλλουν στην διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού. Το εύρος του ωσμωτικού στρες που εφαρμόστηκε στη παρούσα μελέτη βασίστηκε στις μετρήσεις ωσμωτικότητας υπεζωκοτικών συλλογών, οφειλόμενων σε διάφορα παθολογικά αίτια.

Οι μέσες τιμές της ωσμωτικότητας που μετρήθηκαν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις κακοήθεις, παραπνευμονικές και διδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές. Οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στις παραπνευμονικές συλλογές και οι χαμηλότερες στις διδρωματικές. Η μέση τιμή της ωσμωτικότητας αναλύοντας όλες τις υπεζωκοτικές συλλογές σε μια ομάδα ήταν ισοωσμωτική ( $291.7 \pm 24.89$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Το εύρος των τιμών τους όμως κυμαίνεται από υποωσμωτικές τιμές (240 mOsm/kg) έως και υπερωσμωτικές τιμές (340 mOsm/kg). Η έκταση του εύρους της ωσμωτικότητας που μετρήθηκε θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι δεν γνωρίζουμε σε ποιο σημείο της εξέλιξης της υπεζωκοτικής συλλογής συλλέχθηκαν τα δείγματα υπεζωκοτικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη λαμβάνοντας υπόψιν ότι είναι πιθανό να υπάρχουν αυξομειώσεις στην ωσμωτικότητα του υπεζωκοτικού υγρού ανάλογα με την πορεία της νόσου που την προκαλεί. Αν και δεν είναι γνωστό σε ποιο βαθμό συνεισφέρουν οι πρωτεΐνες στην ωσμωτικότητα του υπεζωκοτικού υγρού, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών μειώνεται η πρωτεϊνική

συγκέντρωση σε ασθενείς που παρακολουθήθηκαν για χρονική διάρκεια 300 ημερών (99). Παράλληλα είναι γνωστό ότι δεν είναι μόνο η πρωτεϊνική συγκέντρωση των υπεζωκοτικών συλλογών που διαφέρει ανάμεσα στις διδρωματικές και εξιδρωματικές συλλογές αλλά και το ιξώδες όπου φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερες τιμές στα εξιδρώματα σε σχέση με τα διδρώματα και το εύρημα αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη πρωτεϊνική συγκέντρωση (100). Αυτές οι διαφορές ενδεχομένως να έχουν αντίκτυπο στην ωσμωτικότητα όπως φάνηκε από τις μετρήσεις της παρούσας μελέτης. Σε ότι αφορά τη περιεκτικότητα των υπεζωκοτικών συλλογών σε γλυκόζη και στη συνεισφορά της σαν ωσμωτικά ενεργός παράγοντας στη τιμή της ωσμωτικότητας έχει φανεί ότι η τιμή της συγκέντρωσής της εμφανίζει μεγάλη απόκλιση τόσο ανάμεσα στις υπεζωκοτικές συλλογές διαφορετικής παθολογικής αιτίας όσο και στις συλλογές που αποδίδονται στο ίδιο παθολογικό αίτιο (101). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σε ότι αφορά το μεγάλο εύρος τιμών της ωσμωτικότητας που μετρήθηκαν.

Η ανάλυση των βιοχημικών χαρακτηριστικών των υπεζωκοτικών συλλογών έδειξε ότι η συγκέντρωση της LDH διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές και στις διδρωματικές και κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές. Αυτό το εύρημα είναι αναμενόμενο καθώς η συγκέντρωση της LDH είναι ένα από τα κριτήρια του Light για τη διάκριση εξιδρωματικών και διδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών (7). Σημαντικά αυξημένη τιμή της LDH είναι επίσης συνδεδεμένη με τις παραπνευμονικές συλλογές ή το εμπύημα, τη φυματιώδη πλευρίτιδα ή τη κακοήθεια (102). Παρατηρείται επίσης σημαντικά μειωμένη τιμή του pH στις παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές σε σύγκριση με τις διδρωματικές και κακοήθεις συλλογές. Η τιμή του pH είναι σε ορισμένες περιπτώσεις ενδεικτική του παθολογικού αιτίου που προκάλεσε την υπεζωκοτική συλλογή: τιμή μεγαλύτερη του 7,4 παρατηρείται μετά από συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και κίρρωση (102). Η χαμηλή τιμή του pH (<7.2) παρατηρείται στις επιπλεγμένες παραπνευμονικές

συλλογές, έχει προγνωστικό ρόλο για την ανάπτυξη εμπύματος και είναι ενδεικτική για να εφαρμοστεί η διαδικασία της παρακέντησης (103). Στο χαρακτηριστικό αυτό των επιλεγμένων υπεζωκοτικών συλλογών αποδίδεται εν μέρη η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της τιμής του pH και της λογαριθμικά μετασχηματισμένης τιμής της ωσμωτικότητας που προέκυψε μετά από την ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Συγκεκριμένα στις παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές η τιμή της ωσμωτικότητας είναι ελαφρά αν και όχι σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τις διδρωματικές και κακοήθεις συλλογές, γεγονός που ερμηνεύεται λόγω της μεγαλύτερης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης που τις χαρακτηρίζει (7). Σε ότι αφορά τη λογαριθμικά μετασχηματισμένη τιμή της ωσμωτικότητας σε σχέση με την αντίστοιχη της γλυκόζης παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στην δράση της γλυκόζης σαν ενεργός ωσμωλύτης στην υπεζωκοτική συλλογή. Ωστόσο παρατηρώντας τις μέσες τιμές της γλυκόζης και ωσμωτικότητας φαίνεται ότι στις συλλογές που η μέση τιμή της ωσμωτικότητας παίρνει τη μεγαλύτερη τιμή (στις παραπνευμονικές συλλογές) αντιστοιχεί η μικρότερη μέση τιμή της γλυκόζης και αντίστροφα. Αυτή η παρατήρηση εξηγείται από τα ισχύοντα δεδομένα για τη συγκέντρωση της γλυκόζης στις υπεζωκοτικές συλλογές διαφόρων παθολογικών αιτιών, η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (<60mg/dl) αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο για να αναγνωριστούν επιλεγμένες παραπνευμονικές συλλογές (103). Ταυτόχρονα η συγκέντρωση της γλυκόζης στις υπεζωκοτικές συλλογές συνδέεται με τη τιμή του pH. Συλλογές με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης χαρακτηρίζονται από χαμηλό pH που αποδίδεται στο γεγονός ότι κατιόντα υδρογόνου  $H^+$  παράγονται κατά το μεταβολισμό της γλυκόζης ο οποίος συνεχίζεται όσο υπάρχει διαθέσιμη γλυκόζη στην υπεζωκοτική κοιλότητα (101). Η αναντιστοιχία που παρατηρείται ανάμεσα στα αποτελέσματα της ανάλυσης πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και στις μέσες τιμές της ωσμωτικότητας και της γλυκόζης αποδίδεται εν μέρη στο μικρό δείγμα αλλά και στο ασύμμετρο πλήθος δειγμάτων συλλογών που αντιστοιχούν σε



κάθε παθολογικό αίτιο. Συγκεκριμένα το δείγμα αποτελείται από 47 κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές και μόνο 11 και 6 παραπνευμονικές και διδρωματικές αντίστοιχα.

Στα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας που διεξήχθησαν φάνηκε ότι το υποωσμωτικό στρες προκάλεσε αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Παρόμοια επίδραση έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς. Συγκεκριμένα σε σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα έχει φανεί ότι η επίδραση του υποωσμωτικού στρες οδήγησε σε αύξηση της διεπιθηλιακής αντίστασης η οποία συσχετίστηκε με την υποέκφραση της κλαουδίνης -1 μέσω των p38 MAPK κινασών (104). Η ηλεκτρική αντίσταση που παρουσιάζει μια επιθηλιακή κυτταρική μονοστοιβάδα αποτελεί μέτρο της ακεραιότητας του παρακυτταρικού φραγμού (105) και συσχετίζεται με τις πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων. Σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης των στενών συνδέσεων κλαουδίνης -2 επέφερε την αύξηση της διεπιθηλιακής αντίστασης (106). Στον υπεζωκότα, αν και δεν έχει μελετηθεί η συσχέτιση μεταξύ της διαμεσοθηλιακής αντίστασης και των πρωτεϊνών των στενών συνδέσεων είναι γνωστό ότι οι κλαουδίνες -1, -3, και -5 δημιουργούν φραγμό στον επιθηλιακό ιστό ενώ η κλαουδίνη -2 είναι ρυθμιστής της παρακυτταρικής διαπερατότητας δημιουργώντας πόρους διέλευσης κατιόντων (κυρίως νατρίου) και νερού (20,41).

Παράλληλα με το υποωσμωτικό στρες ο τοιχωματικός υπεζωκότας προβάτου εκτέθηκε και σε υπερωσμωτικό στρες με αυξημένη συγκέντρωση μαννιτόλης (50mM) χωρίς να μεταβληθεί σημαντικά η διαμεσοθηλιακή αντίσταση. Αντιθέτως έχει αναφερθεί ότι η εφαρμογή υπερωσμωτικού στρες μεταβάλλει τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση σε κύτταρα των νεφρών (107,108) συσχετίζοντας το φαινόμενο αυτό με τις πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων (109). Η διαφορά στην επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στον υπεζωκότα που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη ενδεχομένως να οφείλεται στην υψηλότερη βαθμίδα ωσμωτικότητας που χρησιμοποιήθηκε στις προαναφερθείσες μελέτες.

Σε ότι αφορά την κυτταρική μετανάστευση, από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη φάνηκε ότι το ωσμωτικό στρες επηρεάζει τον ρυθμό μετανάστευσης ποικιλοτρόπως. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων επηρεάστηκαν από το συγκεκριμένο ερέθισμα με διαφορετικό τρόπο. Πιο αναλυτικά, το υπερωσμωτικό στρες μείωσε το ρυθμό μετανάστευσης της καλοήθους μεσοθηλιακής σειράς MeT-5A και της σαρκωματοειδούς κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος ZL34, ενώ δεν επηρέασε τη κυτταρική σειρά επιθηλιοειδούς μεσοθηλιώματος M14K. Η μείωση του ρυθμού μετανάστευσης παρουσία υπερωσμωτικού στρες έχει αναφερθεί και σε καλοήγη μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου που εκτέθηκαν σε υψηλότερες τιμές ωσμωτικότητας (17) αλλά όχι σε σαρκωματοειδή κύτταρα μεσοθηλιώματος. Παρόμοια επίδραση της υπερωσμωτικότητας στη κυτταρική μετανάστευση έχει αναφερθεί σε καρκινικά κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού και πνεύμονα (110). Η αυξημένη μεταναστευτικότητα της σαρκωματοειδούς κυτταρικής σειράς έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (111)(112) και αποδίδεται στην επιθετικότερη συμπεριφορά του σαρκωματοειδούς μεσοθηλιώματος το οποίο συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με το επιθηλιοειδές (113)(114). Στο σαρκωματοειδές μεσοθηλίωμα τα κύτταρα έχουν υποστεί μεσοθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση και έχουν χάσει τον επιθηλιακό τους χαρακτήρα. Η έκφραση των πρωτεϊνών που συνδέονται με την μεσοθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση έχει μελετηθεί στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων (114). Αυτό το πρωτεϊνικό προφίλ επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ των κυττάρων και του υποστρώματος, τη κυτταρική δομή και τη μεταναστευτικότητα. Φαίνεται ότι η E-cadherin, b-catenin και CK5/6 οι οποίες είναι απαραίτητες για να διατηρηθεί η κυτταρική επαφή και η επιθηλιακή μορφολογία εκφράζονται στο επιθηλιοειδές ενώ δεν εκφράζονται στο σαρκωματοειδές μεσοθηλίωμα. Κατά συνέπεια τα σαρκωματοειδή κύτταρα αποκτούν μεσεγγυματικό φαινότυπο: αυξημένη έκφραση της N-cadherin με αποτέλεσμα τη μειωμένη κυτταρική προσκόλληση (114).

Η συμμετοχή της ωσμωτικής ροής νερού στη κυτταρική μετανάστευση έχει μελετηθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων. Μελέτες έχουν επικεντρωθεί συγκεκριμένα στα καρκινικά κύτταρα και στη μετάσταση. Κύτταρα καρκίνου του μαστού φάνηκε ότι διατήρησαν την ικανότητά τους να μεταναστεύουν μετά από αναστολή του πολυμερισμού της ακτίνης, αλλά η κινητικότητά τους μειώθηκε μετά από αναστολή του αντιμεταφορέα NHE1 και του διαύλου ύδατος AQP-5. Στον ίδιο τύπο κυττάρων μεταβολή της εξωκυττάριας ωσμωτικότητας επηρέασε τον εντοπισμό του NHE1 στη κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας την αλλαγή της κατεύθυνσης μετανάστευσης (76). Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την άποψη ότι η ωσμωτική ροή νερού αποτελεί σημαντικό παράγοντα που καθορίζει την κυτταρική μετανάστευση. Αναλύοντας πιο προσεκτικά την υπάρχουσα βιβλιογραφία όμως, φαίνεται πως ο μηχανισμός της μετανάστευσης είναι πιο σύνθετος. Συγκεκριμένα για τα υπεζωκοτικά κύτταρα έχει φανεί ότι τα καλοήγη μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A εμφανίζουν μεγαλύτερη ωσμωτική διαπερατότητα σε σύγκριση με τα επιθηλιοειδή M14K και τα σαρκωματοειδή ZL34 κύτταρα μεσοθηλιώματος (115). Στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι η επίδραση του υπερωσμωτικού στρες με προσθήκη 4% γλυκόζης είχε διαφορετικά αποτελέσματα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων: η διαπερατότητα αυξήθηκε μετά την εφαρμογή ωσμωτικού στρες στα MeT-5A, μειώθηκε στα ZL-34 και δεν μεταβλήθηκε στα M14K. Λαμβάνοντας υπόψιν το ρόλο της ωσμωτικής ροής νερού στη κυτταρική μετανάστευση και ότι η διαπερατότητα των M14K δεν μεταβλήθηκε κάτω από υπερωσμωτικές συνθήκες θα μπορούσε να εξηγηθεί η διατήρηση του ίδιου ρυθμού μετανάστευσης σε αυτό τον τύπο κυττάρων. Σε ότι αφορά τα καλοήγη MeT-5A η μειωμένη μεταναστευτικότητα κάτω από υπερωσμωτικές συνθήκες που φάνηκε στη παρούσα μελέτη δεν μπορεί να αποδοθεί στην ωσμωτική ροή νερού δεδομένου ότι στην ίδια κυτταρική σειρά η διαπερατότητα αυξήθηκε στις ίδιες συνθήκες (115). Παράλληλα η αναστολή της AQP-1 στην ίδια κυτταρική σειρά δεν επηρέασε το ρυθμό κυτταρικής μετανάστευσης (111). Συμπεραίνουμε ότι είναι άλλος μηχανισμός που ενεργοποιείται υπό την

επίδραση ωσμωτικού στρες και αναστέλλει τη κυτταρική μετανάστευση. Οι διάλυτοι ιόντων ενεργοποιούνται από το υποωσμωτικό στρες και συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης. Στα μεσοθηλιακά κύτταρα έχει φανεί ότι η αναστολή ασβεστιο-εξαρτώμενων διαύλων καλίου, που εντοπίζονται στο προπορευόμενο άκρο του μεταναστεύοντος κυττάρου (70) προκαλεί μείωση του ρυθμού μετανάστευσης (116). Σε ότι αφορά τη κυτταρική σειρά σαρκωματοειδούς μεσοθηλιώματος ZL-34 η μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης υπό την επίδραση ωσμωτικού στρες μπορεί να εξηγηθεί από το μοντέλο της ωσμωτικής ροής νερού δεδομένου ότι κάτω από τις ίδιες συνθήκες η διαπερατότητα των ZL-34 μειώθηκε (115).

Μετά την έκθεση σε υποωσμωτικό στρες ο ρυθμός κυτταρικής μετανάστευσης της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A και της κυτταρικής σειράς σαρκωματοειδούς μεσοθηλιώματος ZL-34 μειώθηκε, ενώ της κυτταρικής σειράς επιθηλιοειδούς μεσοθηλιώματος παρέμεινε αμετάβλητη. Η επίδραση του υποωσμωτικού στρες έχει ελάχιστα μελετηθεί στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Η ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση διαύλων καλίου και ανιόντων (117) τα οποία εντοπίζονται στο άκρο του μεταναστεύοντος κυττάρου και διευκολύνουν τη κυτταρική μετανάστευση (70). Ένα άλλο μόριο που συμμετέχει στη κυτταρική μετανάστευση είναι η AQP 1 η αναστολή της οποίας είναι γνωστό ότι μειώνει την ωσμωτική ροή νερού κάτω από υποωσμωτικές συνθήκες στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα (40). Παράλληλα, αναστολή της AQP-5 μείωσε το ρυθμό μετανάστευσης κυττάρων αδενοκαρκινώματος (118). Με βάση τα προηγούμενα, ο μηχανισμός που εμπλέκεται στη μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης υπό υποωσμωτικές συνθήκες θα πρέπει να είναι ανεξάρτητος των διαύλων ιόντων και νερού. Μια πιθανή αιτία της μείωσης της μεταναστευτικότητας είναι η αναδιοργάνωση των ενδιάμεσων νηματίων μετά την επίδραση υποωσμωτικού στρες, τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη κυτταρική μορφολογία και μετανάστευση (119).

Αναφορικά με την επίδραση του υπερωσμωτικού στρες στην κυτταρική προσκόλληση φαίνεται ότι εξαρτάται από τον ωσμωλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα η αυξημένη συγκέντρωση μαννιτόλης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη κυτταρική προσκόλληση των τριών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ενώ η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης και NaCl αύξησε την προσκόλληση των μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A, M14K και των ZL-34. Η αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης υπό την επίδραση αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης έχει παρατηρηθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα (120), σε επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς (121) και σε μονοκύτταρα αυξάνοντας την έκφραση του μορίου προσκόλλησης VCAM-1 και της κυτταροκίνης MCP-1 (122). Ο συμμεταφορέας νατρίου γλυκόζης SGLT-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική προσκόλληση δεδομένου ότι η αναστολή του μείωσε τη προσκόλληση λευκοκυττάρων *in vivo* (123). Στο περιτοναϊκό μεσοθήλιο, έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του SGLT-1 υπό την επίδραση υγρού περιτοναϊκής κάθαρσης αυξημένης ωσμωτικότητας σε διαβητικό ζωικό μοντέλο (124). Ο ίδιος συμμεταφορέας εκφράζεται και στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιου κουνελιού (34).

Παράλληλα υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης επάγει την έκφραση της AQP-1 σε μεσοθηλιακά κύτταρα (125). Φαίνεται ότι η AQP-1 συμμετέχει στη διαδικασία της κυτταρικής προσκόλλησης δεδομένου ότι αναστολή της οδηγεί σε σημαντική μείωση της προσκολλητικής ικανότητας των MeT-5A και M14K. Η σημασία των παραπάνω δεδομένων ενισχύεται από το γεγονός ότι ασθενείς με κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (MPM) εμφανίζουν ταυτόχρονα διαβήτη (126) αλλά και η ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής είναι συχνή σε ασθενείς με μακροχρόνιο διαβήτη (127).

Από τα πειράματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι η προσκολλητική ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων MET-5A και των επιθηλιοειδών M14K δεν μεταβλήθηκε υπό την επίδραση υποωσμωτικού στρες ενώ η κυτταρική προσκόλληση των σαρκωματοειδών κυττάρων ZL-34 μειώθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ένα μόριο που συμμετέχει στη

ρυθμιστική μείωση του κυτταρικού όγκου, ο συμμεταφορέας καλίου χλωρίου SLC12A7 (KCl cotransporter 4; KCC4) προάγει τη κακοήθη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων του επινεφριδίου προάγοντας τη κυτταρική προσκόλληση αλλά και τη κυτταρική μετανάστευση και διήθηση (128).

Η βαθμίδωση της ωσμωτικότητας προκαλεί μεταβολή του κυτταρικού όγκου η οποία επηρεάζει την αλληλεπίδραση κυττάρου – υποστρώματος και ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την κινάση εστιακής προσκόλλησης FAK. Το συγκεκριμένο μόριο ενεργοποιείται υπό την επίδραση ωσμωτικού στρες (129) και ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση (85). Σε ότι αφορά το μεσοθηλιώμα έχει φανεί ότι η αναστολή της FAK κινάσης μειώνει τη κινητικότητα των κυττάρων μεσοθηλιώματος διφασικού τύπου (130). Μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη χρήση της FAK κινάσης ως θεραπευτικού στόχου του κακοήθους μεσοθηλιώματος δεδομένου ότι η αναστολή της FAK επηρεάζει τη κυτταρική ανάπτυξη, βιωσιμότητα και τον κυτταρικό κύκλο (131). Η FAK κινάση αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη NFAT5 (132) η έκφραση της οποίας αυξάνεται υπό την επίδραση υπερωσμωτικού στρες σε περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα (133). Η NFAT5 η οποία δρα σαν μεσολαβητής της απάντησης στο ωσμωτικό στρες (133), προωθεί τη κυτταρική μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα Caki μέσω της πρωτεΐνης S100A4 (134) με αποτέλεσμα να επιταχύνει την εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση (132). Μια άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας των S100, η S100A11 έχει προταθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος του κακοήθους μεσοθηλιώματος δεδομένου ότι η αναστολή της επιβραδύνει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και διήθηση των κυττάρων μεσοθηλιώματος (135). Στα καλοήθη μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A, η NFAT5 μεσολαβεί την ωσμωτικά ενεργοποιούμενη έκφραση της MCP-1 (133), ένα μόριο το οποίο είναι γνωστό ότι επάγει την δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής σε ζωικά μοντέλα (136)(137).

Από τις δοκιμασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού που πραγματοποιήθηκαν στη

παρούσα μελέτη φάνηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των μεσοθηλιακών κυττάρων MET-5A και των κυττάρων επιθηλιοειδούς μεσοθηλιώματος M14K δεν μεταβλήθηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υπερωσμωτικό στρες σε καμία από τις τρεις συνθήκες (50mM μαννιτόλη, 50mM γλυκόζη και 25mM NaCl). Στην κυτταρική σειρά ZL34 ο πολλαπλασιασμός αυξήθηκε μόνο από την αυξημένη συγκέντρωση NaCl. Σε πρωτογενή καλλιέργεια μεσοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου περιτοναίου όπου μεταξύ άλλων μελετήθηκε η επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και αντίστοιχα μαννιτόλης παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης και μαννιτόλης αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη (>75mM) (16). Με βάση το παραπάνω εύρημα φαίνεται πως υπάρχει ένα όριο συγκέντρωσης γλυκόζης και ένα εύρος υπερωσμωτικού στρες το οποίο είναι ανεκτό από τα κύτταρα και δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους, πέρα από το οποίο ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός επιβραδύνεται.

Σε ότι αφορά το υποωσμωτικό στρες φάνηκε ότι προκαλεί μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού στις κυτταρικές σειρές MeT-5A και M14K ενώ δεν επηρέασε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων ZL-34. Η επίδραση του υποωσμωτικού στρες στα μεσοθηλιακά κύτταρα έχει μελετηθεί ελάχιστα. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με αργό ρυθμό, 0,16-3.0% των κυττάρων να βρίσκονται στη φάση της μίτωσης σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή (4). Στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εμπλέκονται οι ρυθμιζόμενοι από τη μεταβολή του όγκου διάλυοι χλωρίου VRCC (138) οι οποίοι σε μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούνται υπο την επίδραση υποωσμωτικού στρες (37). Στη συγκεκριμένη μελέτη η βαθμίδωση ωσμωτικότητας ήταν παρόμοια με την παρούσα μελέτη (250 mOsm/kg). Επομένως είναι πιθανό η συμβολή των διαύλων χλωρίου να συμμετέχει στις αλλαγές κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα έσω μυελώδους

αθροιστικού πόρου νεφρώνων αρουραίου η εφαρμογή υποωσμωτικού στρες υψηλότερης βαθμίδωσης (200 mOsm/kg αντί για 250 mOsm/kg) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη επίσης μείωσε το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού (139).





## **Συμπεράσματα**

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η τιμή της ωσμωτικότητας διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διδρωματικές, παραπνευμονικές και κακοήθεις συλλογές. Η χαμηλότερη τιμή της ωσμωτικότητας που μετρήθηκε είναι 239mOsm και η υψηλότερη 340mOsm.
2. Η λογαριθμικά μετασχηματισμένη τιμή της ωσμωτικότητας των υπεζωκοτικών συλλογών παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τη λογαριθμικά μετασχηματισμένη τιμή του pH και θετική συσχέτιση με τη λογαριθμικά μετασχηματισμένη τιμή της γλυκόζης.
3. Το υποωσμωτικό στρες προκάλεσε αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.
4. Το υποωσμωτικό στρες δεν προκάλεσε μεταβολή στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.
5. Το υπερωσμωτικό στρες που προκλήθηκε από υψηλή συγκέντρωση τριών ωσμωλυτών (μαννιτόλη, γλυκόζη και NaCl) προκάλεσε μείωση του ρυθμού μετανάστευσης της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.
6. Το υπερωσμωτικό στρες που προκλήθηκε από υψηλή συγκέντρωση τριών ωσμωλυτών (μαννιτόλη, γλυκόζη και NaCl) δεν προκάλεσε μεταβολή του ρυθμού μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.
7. Το υπερωσμωτικό στρες που προκλήθηκε από υψηλή συγκέντρωση μαννιτόλης και γλυκόζης προκάλεσε μείωση του ρυθμού μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34 ενώ η αυξημένη συγκέντρωση NaCl δεν επέφερε μεταβολή στο ρυθμό μετανάστευσης της ίδια κυτταρικής σειράς.

8. Το υποωσμωτικό στρες μείωσε το ρυθμό μετανάστευσης της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A και της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34 ενώ δεν προκάλεσε μεταβολή στο ρυθμό μετανάστευσης της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος M14K.
9. Το υπερωσμωτικό στρες που προκλήθηκε από αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης και NaCl προκάλεσε αύξηση της προσκόλλησης της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A, M14 και ZL34.
10. Το υποωσμωτικό στρες δεν μετάβαλλε τη προσκολλητική ικανότητα της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A και της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος επιθηλιοειδούς τύπου M14K αλλά προκάλεσε μείωση της προσκολλητικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34.
11. Η εφαρμογή υπερωσμωτικού στρες δεν προκάλεσε μεταβολή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A και της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος επιθηλιοειδούς τύπου M14K.
12. Η εφαρμογή υπερωσμωτικού στρες με αυξημένη συγκέντρωση NaCl προκάλεσε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34.
13. Η εφαρμογή υποωσμωτικού στρες προκάλεσε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A και της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος επιθηλιοειδούς τύπου M14K, αλλά δεν μετέβαλλε το ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34.

Συμπερασματικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που εξετάζει τις τιμές και το εύρος της ωσμωτικότητας των υπεζωκοτικών συλλογών διαφόρων παθολογικών αιτιών. Με βάση τις ακραίες τιμές της ωσμωτικότητας που μετρήθηκε εξετάστηκε στη παρούσα

μελέτη για πρώτη φορά η επίδραση του ωσμωτικού στρες στη διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μεταβολή της διαπερατότητας του υπεζωκότα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του υπερωσμωτικού στρες από τρεις διαφορετικούς ωσμωλύτες στις κυτταρικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη του καρκίνου : τη κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και πολλαπλασιασμό. Η απάντηση των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν της μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A , της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος επιθηλιοειδούς τύπου M14K και της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος σαρκωματοειδούς τύπου ZL34 διαφέρει τόσο από κυτταρική σειρά σε κυτταρική σειρά όσο και από ωσμωλύτη σε ωσμωλύτη. Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στη διαφοροαπόκριση των κυτταρικών σειρών στο ωσμωτικό στρες μένει να διερευνηθεί.

## Βιβλιογραφία

1. Sevin CM, Light RW. Microscopic Anatomy of the Pleura. *Thorac Surg Clin.* 2011;21(2):173–5.
2. Porta C, Sironi C, Bodega F, Agostoni E. Pleural Lubrication. *Lubricants* 2016;4(2):15.
3. David Feller-Kopman, M.D., and Richard Light, M.D. pleural disease the Nee England Journal of Medicine 2018 378;8
4. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(1):9–16.
5. Mutsaers SE. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 2002;7(3):171–91.
6. Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G. Surface Morphology of the Human Pleura. *Chest.* 1988;93(1):149–53.
7. Kawanishi K. Diverse properties of the Mesothelial cells in health and disease. *Pleura and Peritoneum.* 2016;1(2):91–7.
8. Light RW. Pleural effusions. *Med Clin North Am.* 2011;95(6):1055–70.
9. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudate macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *Am J Pathol.* 2002;160(2):681–92.
10. Mutsaers SE, Prêle CMA, Pengelly S, Herrick SE. Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1018–24.
11. Markov AG, Voronkova M a, Volgin GN, Yablonsky PK, Fromm M, Amasheh S. Tight junction proteins contribute to barrier properties in human pleura. *Respir Physiol Neurobiol .* 2011;175(3):331–5.
12. Batra H, Antony VB. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J Thorac Dis.* 2015;7(6):964–80.
13. Arsenopoulou Z V., Taitzoglou IA, Molyvdas PA, Gourgoulisanis KI, Hatzoglou C,

- Zarogiannis SG. Silver nanoparticles alter cell adhesion and proliferation of sheep primary mesothelial cells. *In Vivo (Brooklyn)*. 2018;32(1):109–12.
14. Arsenopoulou Z V., Taitzoglou IA, Molyvdas PA, Gourgoulialis KI, Hatzoglou C, Zarogiannis SG. Silver nanoparticles alter the permeability of sheep pleura and of sheep and human pleural mesothelial cell monolayers. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;50:212–5.
15. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol*. 2015;6(MAY):1–12.
16. Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF- $\alpha$  in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res*. 2007;8:1–19.
17. Ito T, Yorioka N, Kyuden Y, Asakimori Y, Kiribayashi K, Ogawa T, et al. Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *Nephron Clin Pract*. 2003;93(23):c97–105.
18. Tamura M, Osajima A, Nakayamada S, Anai H, Kabashima N, Kanegae K, et al. High glucose levels inhibit focal adhesion kinase-mediated wound healing of rat peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*. 2003;63:722–31.
19. Noppen M, Waele MDE, Li R, Gucht K Vander, Haese JAND, Gerlo E. Volume and Cellular Content of Normal Pleural Fluid in Humans Examined by Pleural Lavage. 2000;162:1023–6.
20. . Agostoni ,E Zocchi R Pleural liquid and its exchanges. *Resp Phys And Neurobiology* 2007,(3):311-23
21. Markov AG, Amasheh S. Tight junction physiology of pleural mesothelium. *Front Physiol* 2014;5(June):1–7.
22. Miserocchi G. Mechanisms controlling the volume of pleural fluid and extravascular lung

- water. *Eur Respir Rev.* 2009;18(114):244–52.126
23. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J.* 2002;20(6):1545–58.
  24. Dötsch A, Severin J, Alt W, Galinski EA, Kreft JU. A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria. *Microbiology.* 2008;154(10):2956–69.
  25. Bodega F, Agostoni E. Contribution of lymphatic drainage through stomata to albumin removal from pleural space. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;142(2–3):251–63.
  26. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol.* 2002;93(5):1806–12.
  27. Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol.* 1990;81(1):19–27.
  28. Agostoni E, Zocchi L. Active Na<sup>+</sup>transport coupled liquid outflow from hydrothoraces of various size. *Respir Physiol.* 1993;92(1):101–13.
  29. Zocchi L, Agostoni E, Raffaini A. Effect of phloridzin on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits. *Exp Physiol.* 1996;81(6):957–67.
  30. Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, Ioannou M, Paraskeva E, Gourgoulianis K, et al. Comparison of the electrophysiological properties of the sheep isolated costal and diaphragmatic parietal pleura. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(1–2):129–31.
  31. Kouritas VK, Hatzoglou C, Foroulis CN, Gourgoulianis KI. Human parietal pleura present electrophysiology variations according to location in pleural cavity. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008;7(4):544–7.
  32. Jiang J, Hu J, Bai C. Role of aquaporin and sodium channel in pleural water movement. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;139(1):83–8.
  33. Sarkos S, Hatzoglou C, Dahabre J, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;132(2):233–7.



34. Nie H-G, Tucker T, Su X-F, Na T, Peng J-B, Smith PR, et al. Expression and regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by nucleotides in pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(5):543–54.
35. Sironi C, Bodega F, Porta C, Zocchi L, Agostoni E. Expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT1) in visceral and parietal mesothelium of rabbit pleura. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(1):68–75.
36. Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Molyvdas P a. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol.* 2001;90(4):1565–9.
37. Ji H-L, Nie H-G. Electrolyte and Fluid Transport in Mesothelial Cells. *J Epithel Biol Pharmacol* 2008;1:1–7.
38. Yoshise Y, Ito K, Tsubone H, Kuwahara M. Functional and molecular characterizations of chloride channels in rat pleural mesothelial cells. *Eur J Pharmacol .* 2009;614(1–3):22–9.
39. Meyer G, Rodighiero S, Guizzardi F, Bazzini C, Bottà G, Bertocchi C, et al. Volume-regulated Cl<sup>-</sup> channels in human pleural mesothelioma cells. *FEBS Lett.* 2004;559:45–50.
40. Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M, Soldovieri MV, Miceli F, Amoroso S, et al. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1146–59.
41. Song Y, Yang B, Matthay M a, Ma T, Verkman a S. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C1744–50.
42. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke J-D, Amasheh S, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*

- 2010;123(11):1913–21.
43. Jo VY, Cibas ES, Pinkus GS. Claudin-4 immunohistochemistry is highly effective in  
128  
distinguishing adenocarcinoma from malignant mesothelioma in effusion cytology. *Cancer  
Cytopathol.* 2014;122(4):299–306.
44. Neumann V, Loseke S, Nowak D, Herth FJ, Tannapfel A. Malignant pleural mesothelioma:  
incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch Arztebl Int*  
2013;110(18):319–26.
45. Bibby AC, Tsim S, Kanellakis N, Ball H, Talbot DC, Blyth KG, et al. Malignant pleural  
mesothelioma: An update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev.*  
2016;25(142):472–86.
46. Karpathiou G, Stefanou D, Froudarakis ME. Pleural neoplastic pathology. *Respir Med .*  
2015;109(8):931–43.
47. Cheah HM, Lansley SM, Varano della Vergiliana JF, Tan AL, Thomas R, Leong SL, et al.  
Malignant pleural fluid from mesothelioma has potent biological activities. *Respirology.*  
2017;22(1):192–9.
48. Thomas JM, Musani AI. Malignant Pleural Effusions. A Review. *Clin Chest Med.*  
2013;34(3):459–71.
49. Walter A, Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer  
membranes. *J Membr Biol.* 1986;90(3):207–17.
50. Shinoda W. Permeability across lipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.*  
2016;1858(10):2254–65.
51. Lord RCC. Osmoregulation. 1999;(September 1998):67–73.
52. Strange K. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ.* 2004;28:155–9.
53. Lachish U. Osmosis and thermodynamics. *Am J Phys .* 2007;75(11):997–8.

54. Kedem O, Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta*. 1958;27:229–46.
55. Staverman AJ. The theory of measurement of osmotic pressure. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas* . 1951;70(4):344–52.
56. Zeuthen T. Water-transporting proteins. *J Membr Biol*. 2010;234(2):57–73.
57. Verkman AS. Dissecting the Roles of Aquaporins in Renal Pathophysiology Using Transgenic Mice. *Semin Nephrol*. 2008;28(3):217–26.
58. Kwon TH, Hager H, Nejsum LN, Andersen MLE, Frøkiær J, Nielsen S. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol*. 2001;21(3):231–8.
59. Song Y, Verkman AS. Aquaporin-5 Dependent Fluid Secretion in Airway Submucosal Glands. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41288–92.
60. Epstein FH, McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Regulation of Cell Volume in Health and Disease. *N Engl J Med*. 1995;333(19):1260–7.
61. Syková E. Glia and volume transmission during physiological and pathological states. *J Neural Transm*. 2005;112(1):137–47.
62. Ross LA, Labato MA. Current techniques in peritoneal dialysis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2013;23(2):230–40.
63. Disease R. Peritoneal dialysis-related peritonitis : challenges and solutions. 2018;173–86.
64. Góes CR, Berbel MN, Balbi AL, Ponce D. Approach to the metabolic implications of peritoneal dialysis in acute kidney injury. *Perit Dial Int*. 2015;35(4):397–405.
65. Li PKT, Ng JKC, McIntyre CW. Inflammation and Peritoneal Dialysis. *Semin Nephrol*. 2017;37(1):54–65.
66. Witowski J, Kawka E, Rudolf A, Jörres A. New Developments in Peritoneal Fibroblast Biology: Implications for Inflammation and Fibrosis in Peritoneal Dialysis. *Biomed Res*

- Int. 2015;2015.
67. Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RKH. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* . 2003;1–80.
  68. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(5):852–62.
  69. Pedersen SF, Klausen TK, Nilius B. The identification of a volume-regulated anion channel: An amazing Odyssey. *Acta Physiol*. 2015;213(4):868–81.
  70. Hoffmann, Simonsent Membrane potential Chloride exchange and chloride conductance in Ehrlich mouse ascites tumor cells. *Physiol*. (1979), 296,. 1979;61–84.
  71. Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ. SWELL1 , a Plasma Membrane Protein , Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel. 2014;447–58.
  72. Syeda R, Qiu Z, Dubin AE, Murthy SE, Maria N, Mason DE, et al. sense ionic strength. 2017;164(3):499–511.
  73. Sirianant L, Wanitchakool P, Ousingsawat J, Benedetto R, Zormpa A, Cabrita I, et al. Non-essential contribution of LRRC8A to volume regulation. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2016;468(5):805–16.
  74. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. 2009;89:193–277.
  75. De Ieso ML, Yool AJ. Mechanisms of Aquaporin-Facilitated Cancer Invasion and Metastasis. *Front Chem*. 2018;6(April):1–20.
  76. Lambert IH, Hoffmann EK, Pedersen SF. Cell volume regulation: Physiology and pathophysiology. *Acta Physiol*. 2008;194:255–82.
  77. Swaney KF, Huang C-H, Devreotes PN. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling

- pathways controls motility, directional sensing, and polarity *Annu Rev Biophys.* 2010;39:265–89.
78. Fletcher SJ, Rappoport JZ. Moving forward: polarised trafficking in cell migration. 131  
*Trends Cell Biol.* 2010;20(2):71–8.
79. CURTIS AS. the Mechanism of Adhesion of Cells To Glass. a Study By Interference Reflection Microscopy. *J Cell Biol.* 1964;20(1):199–215.
80. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2007;9(8):893–904.
81. Stroka KM, Jiang H, Chen SH, Tong Z, Wirtz D, Sun SX, et al. Water permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments. *Cell.* 2014;157(3):611–23.
82. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;5(10):786–95.
83. Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J.* 2006;20(11):1892–4.
84. Yun X, Jiang H, Lai N, Wang J, Shimoda LA. Aquaporin 1-mediated changes in pulmonary arterial smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;
85. Simone L, Gargano CD, Pisani F, Cibelli A, Mola MG, Frigeri A, et al. Aquaporin-1 inhibition reduces metastatic formation in a mouse model of melanoma. *J Cell Mol Med.* 2017;XX(X):1–9.
86. Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C. Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2007;453(4):421–32.
87. Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, Blied V Der, Cell M, Sesaki H, et al. *Cell Migration Integrating Signals from front to back.* 2003;302(December):1704–10.

88. Meng F, Rui Y, Xu L, Wan C, Jiang X, Li G. Aqp1 Enhances Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Regulation of FAK and  $\beta$ -Catenin. *Stem Cells Dev.* 2014;23(1):66–75.

132

89. Chen Y, Rice W, Gu Z, Li J, Huang J, Brenner MB, et al. Aquaporin 2 Promotes Cell Migration and Epithelial Morphogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(9):1506–17.

90. Kusayama M, Wada K, Nagata M, Ishimoto S, Takahashi H, Yoneda M, et al. Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2011;102(6):1128–36.

91. McCoy E, Sontheimer H. Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes 2008;55(10):1034–43.

92. Lang F, Föllner M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, et al. Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death. *Methods Enzymol.* 2007;428(07):209–25.

93. Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber SM, Fillon S, Tanneur V, et al. Cellular Physiology and Biochemistry Cell Volume in the Regulation of Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10(5–6):417–28.

94. Rouzaire-Dubois B, O'Regan S, Dubois JM. Cell size-dependent and independent proliferation of rodent neuroblastoma x glioma cells. *J Cell Physiol.* 2005;203(1):243–50.

95. Dubois J-M, Rouzaire-Dubois B. The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *Eur Biophys J.* 2004;33(3):227–32.

96. Nielsen M, Christensen ST, Hoffmann EK, Nielsen M, Christensen ST, Hoffmann EK. Effects of osmotic stress on the activity of MAPKs and PDGFR-  $\beta$  -mediated signal transduction in NIH-3T3 fibroblasts Effects of osmotic stress on the activity of MAPKs

- and PDGFR -mediated signal transduction in NIH-3T3 fibroblasts. 2016;(February 2008):1046–55.
97. Wang Z. Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;448(3):274–86.
  - 133
  98. Chen LX, Zhu LY, Jacob TJC, Wang LW. Roles of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Prolif*. 2007;40(2):253–67.
  99. Varela D, Simon F, Riveros A, Jørgensen F, Stutzin A. NAD(P)H Oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signals Chloride Channel Activation in Cell Volume Regulation and Cell Proliferation. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13301–4.
  100. Klebe S, Griggs K, Cheng Y, Driml J, Henderson DW, Reid G. Blockade of aquaporin 1 inhibits proliferation, motility, and metastatic potential of mesothelioma in vitro but not in an in vivo model. *Dis Markers*. 2015;2015.
  101. Ussing Hh, Zerahn K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiol Scand*. 1951;23(2–3):110–27.
  102. Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *AJP Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(6):G1151–66.
  103. Schmidt A, Ousingsawat J, Sousa M. Ussing Chamber Analysis of Murine Native Tissues and Polarized. 2007;(July):1–17.
  104. Thomas R, Cheah HM, Creaney J, Turlach BA, Lee YCG. Longitudinal Measurement of Pleural Fluid Biochemistry and Cytokines in Malignant Pleural Effusions. *Chest* 2016;149(6):1494–500.
  105. Yetkin O, Tek I, Kaya A, Ciledag A, Numanoglu N. A simple laboratory measurement for discrimination of transudative and exudative pleural effusion: Pleural viscosity.

- Respir Med. 2006;100(7):1286–90.
106. Fitzgerald DB, Leong SL, Budgeon CA, Murray K, Rosenstengal A, Smith NA, et al. Relationship of pleural fluid pH and glucose: A multi-centre study of 2,971 cases. *J Thorac Dis.* 2019;11(1):123–30.
107. Paul Chubb SA, Williams RA. Biochemical analysis of pleural fluid and ascites. *Clin* 134  
*Biochem Rev.* 2018;39(2):39–50.
108. Porcel JM, Light RW. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. *Am Fam Physician.* 2006;73(7):1211–20.
109. Fujii N, Matsuo Y, Matsunaga T, Endo S, Sakai H, Yamaguchi M, et al. Hypotonic stress-induced down-regulation of claudin-1 and -2 mediated by dephosphorylation and clathrin-dependent endocytosis in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem.* 2016;291(47):24787–99.
110. Benson K, Cramer S, Galla HJ. Impedance-based cell monitoring: Barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):1–11.
111. Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sato T, Sugatani J. Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial madin-darby canine kidney cells. *J Cell Physiol.* 2011;226(6):1471–8.
112. Ziemens A, Sonntag SR, Wulfmeyer VC, Edemir B, Bleich M, Himmerkus N. Claudin 19 is regulated by extracellular osmolality in rat kidney inner medullary collecting duct cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
113. Inokuchi H, Takei T, Aikawa K, Shimizu M. The effect of hyperosmosis on paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(2):328–34.
114. Lanaspá MA, Andres-Hernando A, Rivard CJ, Dai Y, Berl T. Hypertonic stress increases



- claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in IMCD3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(41):15797–802.
115. Miermont A, Lee SWL, Adriani G, Kamm RD. Quantitative screening of the effects of hyper-osmotic stress on cancer cells cultured in 2- or 3-dimensional settings. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
116. Jagirdar RM, Apostolidou E, Molyvdas PA, Gourgoulisanis KI, Hatzoglou C, 135 Zarogiannis SG. Influence of AQP1 on cell adhesion, migration, and tumor sphere formation in malignant pleural mesothelioma is substratum-and histological-type dependent. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(6):L489–95.
117. Shukla A, Hillegass JM, MacPherson MB, Beuschel SL, Vacek PM, Butnor KJ, et al. ERK2 is essential for the growth of human epithelioid malignant mesotheliomas. *Int J Cancer*. 2011;129(5):1075–86.
118. Kadota K, Suzuki K, Sima CS, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD. Pleomorphic epithelioid diffuse malignant pleural mesothelioma: A clinicopathological review and conceptual proposal to reclassify as biphasic or sarcomatoid mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(5):896–904.
119. Fassina A, Cappellesso R, Guzzardo V, Dalla Via L, Piccolo S, Ventura L, et al. Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma. *Mod Pathol*. 2012;25(1):86–99.
120. Katkova LE, Baturina GS, Bondar AA, Jagirdar RM, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, et al. Benign Pleural Mesothelial Cells Have Higher Osmotic Water Permeability than Malignant Pleural Mesothelioma Cells and Differentially Respond to Hyperosmolality. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(4):869–78.
121. Cheng YY, Wright CM, Kirschner MB, Williams M, Sarun KH, Sytnyk V, et al. KCa1.1, a calcium-activated potassium channel subunit alpha 1, is targeted by miR-17-5p and

- modulates cell migration in malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer*. 2016;15(1):1–12.
122. Chimote AA, Adragna NC, Lauf PK. Ion transport in a human lens epithelial cell line exposed to hyposmotic and apoptotic stress. *J Cell Physiol*. 2010;223(1):110–22.
123. Chen Z, Zhang Z, Gu Y, Bai C. Impaired migration and cell volume regulation in aquaporin 5-deficient SPC-A1 cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;176(3):110–7.
- 136
124. Li J, Gao W, Zhang Y, Cheng F, Eriksson JE, Etienne-Manneville S, et al. Engagement of vimentin intermediate filaments in hypotonic stress. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):13168–76.
125. Hijmans JG, Bammert TD, Stockelman KA, Reiakvam WR, Greiner JJ, DeSouza CA. High glucose-induced endothelial microparticles increase adhesion molecule expression on endothelial cells. *Diabetol Int*. 2019;10(2):143–7.
126. Masterton S, Ahearne M. The Effect of Calcium and Glucose Concentration on Corneal Epithelial Cell Lines Differentiation, Proliferation, and Focal Adhesion Expression. *Biores Open Access*. 2019;8(1):74–83.
127. Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):328–34.
128. Pennig J, Scherrer P, Gissler MC, Anto-Michel N, Hoppe N, Fünér L, et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
129. Debray-García Y, Sánchez EI, Rodríguez-Muñoz R, Venegas MA, Velazquez J, Reyes JL. Diabetes and exposure to peritoneal dialysis solutions alter tight junction proteins

- and glucose transporters of rat peritoneal mesothelial cells. *Life Sci.* 2016;161:78–89.
130. Lai KN, Li FK, Lan HY, Tang S, Tsang a W, Chan DT, et al. Expression of aquaporin-1 in human peritoneal mesothelial cells and its upregulation by glucose in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:1036–45.
131. Wu H, Walker J, Damhuis RA, Brewster DH, Wild SH. Metformin and survival of people with type 2 diabetes and pleural mesothelioma: A population-based retrospective cohort study. *Lung Cancer.* 2016;99:194–9.137
132. Chertow BS, Kadzielawa R, Burger AJ. Benign pleural effusions in long-standing diabetes mellitus. *Chest.* 1991;99(5):1108–11.
133. Brown TC, Murtha TD, Rubinstein JC, Korah R, Carling T. SLC12A7 alters adrenocortical carcinoma cell adhesion properties to promote an aggressive invasive behavior. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):1–13.
134. Lunn JA, Rozengurt E. Hyperosmotic stress induces rapid focal adhesion kinase phosphorylation at tyrosines 397 and 577: Role of Src family kinases and Rho family GTPases. *J Biol Chem.* 2004;279(43):45266–78.
135. Laszlo V, Valko Z, Ozsvar J, Kovacs I, Garay T, Hoda MA, et al. The FAK inhibitor BI 853520 inhibits spheroid formation and orthotopic tumor growth in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Med.* 2019;97(2):231–42.
136. Kanteti R, Mirzapoiiazova T, Riehm JJ, Dhanasingh I, Mambetsariev B, Wang J, et al. Focal adhesion kinase a potential therapeutic target for pancreatic cancer and malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(4):316–27.
137. Küper C, Beck FX, Neuhofer W. NFAT5-mediated expression of S100A4 contributes to proliferation and migration of renal carcinoma cells. *Front Physiol.* 2014;5 AUG(August):1–10.
138. Küper C, Beck FX, Neuhofer W. NFAT5 contributes to osmolality-induced MCP-1

- expression in mesothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2012;2012.
139. Aramburu J, López-Rodríguez C. Brx shines a light on the route from hyperosmolarity to NFAT5. *Sci Signal.* 2009;2(65):5–8.
140. Sato H, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tomida S, Aoe K, Shien K, et al. Therapeutic potential of targeting S100A11 in malignant pleural mesothelioma. *Oncogenesis.* 2018;7(1).
141. Stathopoulos GT, Psallidas I, Moustaki A, Moschos C, Kollintza A, Karabela S, et al. A  
138  
central role for tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in malignant pleural effusion. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(20):1464–76.
142. Lansley SM, Cheah HM, Lee YCG. Role of MCP-1 in pleural effusion development in a carrageenan-induced murine model of pleurisy. *Respirology.* 2017;22(4):758–63.
143. Wondergem R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Conner TD, et al. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J Physiol.* 2001;532(3):661–72.
144. Wang L, Liu Y, Wang H, Liu X, Chen J, Wang MH, et al. Epoxyeicosatrienoic acids attenuating hypotonic-induced apoptosis of IMCD cells via  $\gamma$ -ENaC inhibition. *PLoS One.* 2014;9(4):2–8.