

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΛΑΡΙΣΑ 2012



ΕΛΕΝΗ Θ. ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ  
ΙΑΤΡΟΣ  
ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ  
« ΠΡΟΠΟΝΤΙΣ »

# Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ

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

## **Τριμελής συμβουλευτική Επιτροπή**

**Χατζόγλου Χρυσή**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Παρασκευά Ευφροσύνη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Χατζόγλου Χρυσή**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Παρασκευά Ευφροσύνη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Γερμενής Αναστάσιος**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δανιήλ Ζωή**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Χατζηεθθυμίου Αποστολία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής της Σχολής  
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των  
γνωμών του συγγραφέα»

Νόμος 5343/1932, Άρθρο 202, Παρ.2

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

---

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Αποστολίδου Ελένη

ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Λάρισα

E-MAIL: apoeleni@yahoo.gr και elaposto@med.uth.gr

ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ: 1984

### ΣΠΟΥΔΕΣ

---

#### **2001-2007**

Φοίτηση στο τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βαθμός Πτυχίου: 8,53 «Άριστα»

#### **3/2008-2011**

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο: «Η επίδραση των μεταλλοπρωτεΐνασών στη διαπερατότητα του υπεζωκότα

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

---

1. Αγγλικά - Proficiency in English (Cambridge and Michigan)
2. Γαλλικά - Delf 1er Degré (Ministere Francais del' Education)
3. Γερμανικά - Zertificat B2 (Goethe Institut)

### ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

---

Πτυχίο ICT

### ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

---

**2012:** 1<sup>ο</sup> Βραβείο ολοκληρωμένης εργασίας στο 20<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο νοσημάτων θώρακα, Αθήνα, Hilton, 24-27/11/2011 με τίτλο: «Μελέτη της επίδρασης των

μεταλλοπρωτεΐναςών 2 και 9 στη διαπερατότητα του υπεζωκότα και των υπεύθυνων μηχανισμών δράσης»

**10/2008-05/2011:** Υπότροφος Ιδρύματος «ΠΡΟΠΟΝΤΙΣ» για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής

**2007:** Βραβείο ΙΚΥ για αποφοίτηση με βαθμό «άριστα»

**2006:** 2<sup>η</sup> θέση στην 10η Ολυμπιάδα Ιατρικής γνώσης, Λάρισα

**2003:** Υποτροφία και Βραβείο Ι.Κ.Υ για τις επιδόσεις στο δεύτερο ακαδημαϊκό έτος φοίτησης

#### ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ

---

Μέλος της Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας (ERS)

Μέλος της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας

Μέλος της οργάνωσης «Γιατροί του Κόσμου»

#### ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

---

**Από 24/6/2011 έως σήμερα**

Αγροτικός ιατρός στο Π.Ι Δομένικου-Κ.Υ. Ελασσόνας

**1/3/2011-14/6/2011**

Ιατρός στο κέντρο αποκατάστασης «ΑΡΩΓΗ»

**9/ 2008- 3/2011**

Συνεργάτης στο ιατρείο διακοπής καπνίσματος του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας

**5-15/8/2009 και 4-14/ 8/2010**

Ιατρός στην κατασκήνωση ΧΑΝΘ, Χαλκιδική για παιδιά με σακχαρώδη διαβήτη

#### ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

---

**Από 2009 έως σήμερα**

Συμμετοχή στη διδασκαλία εργαστηριακών ασκήσεων του μαθήματος Φυσιολογία ΙΙ στα ακαδημαϊκά έτη 2008-2009, 2009-2010 και 2010-2011 στο τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

11/2010

Εισηγήτρια σε Εκπαιδευτικό πρόγραμμα Νοσηλευτικών ειδικοτήτων με θέμα: «Φυσιολογία-Παθοφυσιολογία της αναπνοής», ΠΓΝ Λάρισας

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

1. E. Apostolidou, I. Tsilioni, C. Hatzoglou, P.A. Molyvdas and K.I. Gourgoulianis. **“Pleural transport physiology: insights from biological markers measurements in transudates”**. The Open Respiratory Medicine Journal (2011), 5: 70-72
2. E. Apostolidou, C. Hatzoglou, P.A. Molyvdas and K.I. Gourgoulianis. **“Matrix metalloproteinases 2 and 9 reduce epithelial sodium channel (ENaC) activity at pleural mesothelium”** *submitted to Journal of Physiology and Pathophysiology*
3. E. Apostolidou, E. Paraskeva, C. Hatzoglou, P.A. Molyvdas and K.I. Gourgoulianis. **“MMP2 and MMP9 increase permeability of sheep pleura in vitro”** *accepted for publication to BMC physiology*
4. M. Minas, E. Apostolidou, I. Goudouva, E. Makris, K. Gourgoulianis, C. Hatzoglou. **“Clinical phenotypes related to smoking cessation”** *to be submitted*

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

1. X. Χατζόγλου, K. Κατσάνου, E. Αποστολίδου, E. Γώγου, H. Μακρής, Σ. Ζαρογιάννης, K.Γουργουλιάνης. **«Κάπνισμα και μέθοδοι αντιμετώπισης. Εμπειρία ιατρείου διακοπής καπνίσματος ΠΠΓΝΛ Λάρισας»**. Interscientific Health Care (2009) 1: 21-27
2. E. Αποστολίδου, X. Χατζόγλου **«Επιπλοκές χρόνιας περτοναϊκής κάθαρσης: Ο ρόλος της λεπτίνης»**. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής (2011), 28: 466-474
3. Π. Μπλούχου, E. Γκουντουβά, E. Αποστολίδου, K.I Γουργουλιάνης, X. Χατζόγλου **«Παράγοντες που επιδρούν στην κινητοποίηση των καπνιστών για διακοπή του καπνίσματος»**. Διεπιστημονική φροντίδα υγείας (2011), 3: 113-121.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ-ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

---

1. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 19<sup>ο</sup> Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Πνευμονολογίας με τίτλο: **“MMP-mediated regulation of ENaC channel in pleural mesothelium”** Apostolidou E., Gourgoulisanis K., Molyvdas P.A., Paraskeva E., Hatzoglou C., 24-28/9/2011, Άμστερνταμ, Ολλανδία
2. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 19<sup>ο</sup> Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Πνευμονολογίας με τίτλο: **“Two year mortality of COPD in primary care in Greece: An observational study”** M. Minas, I. Verou-Katsarou, P. Mistridou, E. Apostolidou, C. Hatzoglou, K.I. Gourgoulisanis, 24-28/9/2011, Άμστερνταμ, Ολλανδία
3. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 18<sup>ο</sup> Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Πνευμονολογίας με τίτλο: **“Matrix metalloproteinases 2 and 9 increase the permeability of sheep pleura: mechanisms of action”** Apostolidou E., Gourgoulisanis K., Molyvdas P.A., Paraskeva E., Hatzoglou C., 18-22/9/2010, Βαρκελώνη, Ισπανία

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ-ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ) ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

---

1. Προφορική ανακοίνωση στο 10<sup>ο</sup> Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας με θέμα: **«Vascular Endothelial Growth Factor; Ένα μόριο κλειδί για την αγγειογένεση, πιθανός στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων»** Αποστολίδου E., Βλαχοστεργίος Π., Γεωργιάτσου E., Σόγκας Γ., 5/2004, Σ.Κ. Βελλίδης, Θεσσαλονίκη
2. Προφορική ανακοίνωση στο 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο γενικής ιατρικής με θέμα: **«Χαρακτηριστικά καπνισματικού ιστορικού των ασθενών που προσέρχονται στο ιατρείο διακοπής καπνίσματος του ΠΠΓΝΑ Λάρισας»** Η. Μακρής, E. Αποστολίδου, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 22-26/5/2009, Χαλκιδική
3. Προφορική ανακοίνωση στο 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο γενικής ιατρικής με θέμα: **«Εμπειρία ιατρείου διακοπής καπνίσματος Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας»** Η. Μακρής, E. Αποστολίδου, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 22-26/5/2009, Χαλκιδική
4. Προφορική ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Λιπιδιολογίας αθηρωσκλήρωσης και αγγειακής νόσου με θέμα: **«Η συμβολή του ιατρείου διακοπής καπνίσματος του ΠΠΓΝΑ Λάρισας σε ασθενείς με συνυπάρχοντες**

- παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης»** Η. Μακρής, Ε. Αποστολίδου, Ε. Γώγου, Ε. Γκουντουβά, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 8-10/10-2009, Αθήνα
5. Προφορική ανακοίνωση στο 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο με θέμα: **«Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 (MMP2, MMP9) στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών»** Ε. Αποστολίδου, Κ. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς, Χ. Χατζόγλου, 26-29/11-2009, Θεσσαλονίκη
6. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο με θέμα: **«Η επίδραση του φύλου στη διακοπή του καπνίσματος: Ποιος είναι ο νικητής στη μάχη της διακοπής του καπνίσματος;»** Η. Μακρής, Ε. Αποστολίδου, Ε. Γκουντουβά, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 26-29/11-2009, Θεσσαλονίκη
7. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο με θέμα: **«Τα αναπνευστικά συμπτώματα και οι νόσοι του αναπνευστικού ως κίνητρα για τη διακοπή του καπνίσματος»** Η. Μακρής, Ε. Αποστολίδου, Ε. Γκουντουβά, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 26-29/11-2009, Θεσσαλονίκη
8. Προφορική ανακοίνωση στο 22<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο γενικής ιατρικής με θέμα: **«Ο ρόλος των προηγούμενων προσπαθειών διακοπής στη διακοπή του καπνίσματος»** Ε. Γκουντουβά, Ε. Αποστολίδου, Η. Μακρής, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 7-11/4-2010, Κέρκυρα
9. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο με τίτλο: **«Οι απόψεις των φοιτητών της Λάρισας σχετικά με το νόμο απαγόρευσης του καπνίσματος σε δημόσιους χώρους»** Ε. Αποστολίδου, Α. Χατζηκυριάκου, Λ. Θεοδοσίου, Μ. Παπαϊωάννου, Α.Μ Σιδέρη, Χ. Τσελής, Δ. Γκουσιάρης, Μ.Παπαγιάννη, Κ.Ι Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 21-24/10/2010, Ρόδος
10. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο με τίτλο: **«Χαρακτηριστικά καπνισματικής συνήθειας στους φοιτητές που σπουδάζουν στη Λάρισα»** Ε. Αποστολίδου, Δ. Γιαννής, Κ. Καραμπάτου, Γ. Νάκου, Τ. Παπαδόπουλος, Π. Σκαλίγκου, Μ. Παπαγιάννη, Κ. Ι Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 21-24/10/2010, Ρόδος
11. Προφορική ανακοίνωση στο 4<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο επιστημόνων φροντίδας χρονίων πασχόντων με τίτλο: **«Χαρακτηριστικά των καπνιστών που συμβάλλουν στη διακοπή του καπνίσματος»** Ε. Γκουντουβά, Ε. Αποστολίδου, Η. Μακρής, Μ. Μηνάς, Β. Ζαρογιάννη, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 9-11/11/2010, Λάρισα



12. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο με τίτλο: «**Διαιτήс επιβίωση των ασθενών με ΧΑΠ στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας**» Μ. Μηνάς, Ι. Βέρου-Κατσαρού, Π. Μυστρίδου, Ε. Αποστολίδου, Χ. Χατζόγλου, Κ. Ι. Γουργουλιάνης, 24-27/11/2011, Αθήνα
13. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο με τίτλο: «**Κλινικοί φαινότυποι διακοπής καπνίσματος**» Μ. Μηνάς, Ε. Γκουντουβά, Ε. Αποστολίδου, Κ. Ι. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, 24-27/11/2011, Αθήνα

#### ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

---

«Ανατομία-φυσιολογία υπεζωκοτικής κοιλότητας», σελ 261-278, στο «Συμβολή του Εργαστηρίου στην εκτίμηση του πνευμονολογικού ασθενούς» Αποστολίδου Ε., Γουργουλιάνης Κ., Ζαρογιάννης Σ., Χατζόγλου Χ., Εκδόσεις της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας, Αθήνα 2009

#### ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

---

1. 7-8/5/2009: Approach to pleural cancers: State of the art, European School of oncology, Athens
2. 14-15/11/2009: Παγκόσμιο σεμινάριο για τη θεραπεία της εξάρτησης από το κάπνισμα, Global Healthcare Alliance for Treatment of tobacco dependence, Pfizer Inc, Athens, Greece
3. 12-14/3/2010: Εκπαιδευτικό σεμινάριο για την οργάνωση ιατρικών διακοπής καπνίσματος, ΕΠΕ, Λάρισα
4. 19-20/3/2010: Εκπαιδευτικό σεμινάριο «Μηχανικός αερισμός», Πανεπιστημιακή κλινική εντατικής θεραπείας Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας, Λάρισα

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την εκπόνηση της διατριβής και την ολοκλήρωσή της υπήρξε πολύτιμη βοήθεια από πολλούς στους οποίους εκφράζω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη που με καθοδήγησε στο δρόμο προς την έρευνα και τον Καθηγητή κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για την εκ μέρους του αποδοχή μου στο Εργαστήριο της Φυσιολογίας. Παράλληλα θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χρυσή Χατζόγλου για την πολύτιμη βοήθειά της, την απέραντη υπομονή της και τις ευκαιρίες που μου έχει προσφέρει. Επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ευφροσύνη Παρασκευά για την επιστημονική αρωγή και πολύτιμες συμβουλές της στις εργαστηριακές τεχνικές. Επιπλέον ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για τη σημαντική τεχνική υποστηρίξη του καθώς και τον κ. Σάκη Πουρνάρα, εργαζόμενο στην εταιρεία Σφαγεία Λάρισας Α.Ε. για τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια και των τεσσάρων χρόνων εκπόνησης της διατριβής. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ και να μην ευχαριστήσω το κοινωφελές Ίδρυμα «ΠΡΟΠΟΝΤΙΣ» που με εμπιστεύθηκε και με στήριξε οικονομικά για 2,5 χρόνια, προσφέροντας ανακούφιση από την ανάγκη ανεύρεσης οικονομικών πόρων και επιτρέποντας την πλήρη αφοσίωση στη διενέργεια της διατριβής. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Θεόδωρο και Σοφία, τις αδερφές μου Κυριακή και Γεωργία και το σύντροφό μου Παναγιώτη για τη συμπαράσταση και την ατέλειωτη υπομονή τους.

---

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η υπεζωκοτική συλλογή, η συλλογή δηλαδή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα, είναι δυνατόν να επιπλέξει την πορεία πολλών παθήσεων τόσο πνευμονικών όσο και εξωπνευμονικών. Οι παθοφυσιολογικές διαδικασίες που οδηγούν στη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα οφείλονται στη διαταραχή της ισορροπίας του ρυθμού παραγωγής και απορρόφησης του υγρού.

Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στη διάγνωση και παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών. Έτσι πολλές εργασίες αναφέρονται στη διαγνωστική χρησιμότητα δεικτών, όπως οι ιντερλευκίνες (IL) IL-1, -3, -6, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF- $\alpha$ ). Με εξαίρεση την ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), η οποία φάνηκε να αποτελεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην ανάδειξη των υπεζωκοτικών συλλογών φυματιώδους αιτιολογίας, η χρησιμότητα των υπολοίπων δεικτών δεν έχει αποδειχθεί ακόμη στην κλινική πράξη. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι κάποιοι βιολογικοί δείκτες συμβάλλουν στην παθογένεια της υπεζωκοτικής βλάβης. Για παράδειγμα, η IL-1 φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη υπεζωκοτικής ίνωσης και την εμφάνιση εγκυστωμένων υπεζωκοτικών συλλογών [1] ενώ ο VEGF σχετίζεται με την εμφάνιση αυξημένης διαπερατότητας στα τριχοειδή του υπεζωκότα σε κακοήθεις συλλογές και τον αυξημένο ρυθμό συσσώρευσης υπεζωκοτικού υγρού [2]. Μάλιστα σε ορισμένες μελέτες η χρήση anti-VEGF αντισωμάτων είναι αποτελεσματική στον έλεγχο των κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών [3].

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases-MMPs) δεν αποτελούν κυταροκίνες αλλά μία οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων που διαθέτουν ψευδάργυρο στο ενεργό τους κέντρο και η κύρια λειτουργία τους είναι η αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Αυτά τα ένζυμα παίζουν ρόλο σε ποικίλλες παθολογικές καταστάσεις και έχουν μετρηθεί στα διάφορα είδη υπεζωκοτικών συλλογών. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε ο ρόλος των δύο πιο συχνά απαντώμενων MMPs στις υπεζωκοτικές συλλογές, της MMP2 και MMP9, στην παθογένεια των συλλογών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλοπρωτεϊνών στη διαπερατότητα του υπεζωκότα και εξετάστηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των MMPs στη διαπερατότητα.

Τα παραπάνω αναμένεται να συμβάλλουν στον προσδιορισμό του ρόλου των MMPs στη συλλογή των υπεζωκοτικών συλλογών και μελλοντικά στην αναζήτηση νέων θεραπευτικών τεχνικών για την αντιμετώπισή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>1</b>
1. ANATOMIA ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ.....	2
1.1. Μακροσκοπικά ο υπεζωκότας.....	2
1.2. Ιστολογία υπεζωκότα.....	3
1.3. Αιμάτωση υπεζωκότα.....	7
1.4. Λεμφική παροχέτευση.....	7
1.5. Νεύρωση.....	9
2. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ.....	10
3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	11
3.1. Διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού.....	11
3.2. Παραγωγή υπεζωκοτικού υγρού.....	12
3.3. Παροχέτευση υπεζωκοτικού υγρού.....	13
3.3.1. Λεμφική παροχέτευση.....	13
3.3.2. Παθητική επαναρρόφιση από το πνευμονοκό πέταλο.....	15
3.3.3. Απορρόφιση διαμεσολαβούμενη από το μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης-εξωκυττάρωσης ή κυτταρικής μετάθεσης.....	15
3.3.4. Απορρόφιση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτείνες μεταφορείς.....	16
3.3.4.α. Επιθηλιακός διάυλος νατρίου (epithelial sodium channel- ENaC).....	17
3.3.4.β. Δομή ENaC-Βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	18
3.3.4.γ. Πρωτεολυτική διάσπαση ENaC.....	19
4. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ.....	22
4.1. Διΐδρώματα.....	23
4.2. Εξιδρώματα.....	24

5. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΣ (MATRIX METALLOPROTEINASES-MMPs).....	25
5.1. Εισαγωγή.....	25
5.2. Οι δομικές περιοχές των μεταλλοπρωτεϊνών.....	28
5.3. Ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών.....	29
5.4. Ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας.....	31
5.5. Υποστρώματα των μεταλλοπρωτεϊνών-Βιολογικές δράσεις.....	33
5.6. Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών στην παθολογία.....	34
5.6.1. Παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος.....	35
5.6.2. Κακοήθειες νεοπλασίες.....	35
5.6.3. Καρδιαγγειακές παθήσεις.....	36
5.6.4. Ρευματικές παθήσεις.....	36
5.6.5. Παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.....	37
5.6.6. Φλεγμονή και ανοσία.....	37
5.7. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στην υπεζωκοτική κοιλότητα.....	38
5.7.1. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στο φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό.....	38
5.7.2. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στις υπεζωκοτικές συλλογές.....	39
5.8. Αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών.....	40
5.8.1. Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs).....	40
5.8.2. Συνθετικοί αναστολείς.....	41
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>44</b>
1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
1.1. Επιλογή ουσιών και συγκεντρώσεων για τη μελέτη της επίδρασής τους στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου.....	45
1.2. Συλλογή και προετοιμασία ιστού.....	46
1.3. Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη της επίδρασης των MMPs στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου.....	47
1.3.1. Μελέτη διαπερατότητας βιολογικών μεμβρανών-Μέθοδος Ussing System.....	47
1.3.2. Μέτρηση διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος.....	49

1.3.3. Μέτρηση ευαίσθητου στην αμιλορίδη ρεύματος σε συνθήκες κλειστού κυκλώματος.....	51
1.4. Προετοιμασία κυτταρικών καλλιεργειών.....	53
1.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τη μελέτη της εντόπισης της οκκλουδίνης και κλαουδίνης.....	53
1.6. Ανοσοαποτύπωση για τη μελέτη της έκφρασης της οκκλουδίνης και κλαουδίνης.....	54
2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1. Επίδραση της MMP2 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου.....	57
3.1.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας.....	57
3.1.2. Πνευμονικός υπεζωκότας.....	61
3.1.3. Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP2.....	65
3.2. Επίδραση της MMP9 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου.....	66
3.2.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας.....	66
3.2.2. Πνευμονικός υπεζωκότας.....	70
3.2.3. Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP9.....	73
3.3. Επίδραση της MMP1 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου.....	74
3.3.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας.....	75
3.3.2. Πνευμονικός υπεζωκότας.....	77
3.4. Αναστολή της δράσης των MMP2 και MMP9 στη διαπερατότητα από τον αναστολέα TIMP2.....	78
3.4.1. MMP2.....	78
3.4.2. MMP9.....	79
3.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός: καμία μεταβολή στην κυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη των μεσοθηλιακών κυττάρων από τις MMPs.....	81

3.6. Ανοσοαποτύπωση: καμία μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη των μεσοθηλιακών κυττάρων από τις MMPs.....	83
3.7. Μεταβολή του ρεύματος ευαίσθητου στην αμιλορίδη από τις MMP2 και MMP9.....	85
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	103
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	105
SUMMARY.....	107
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

# 1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

Ο υπεζωκότας αποτελείται από δύο πέταλα, το πνευμονικό που καλύπτει τους πνεύμονες και το τοιχωματικό που καλύπτει το διάφραγμα και το θωρακικό τοίχωμα. Μεταξύ των πετάλων υπάρχει μικρή ποσότητα υγρού. Σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία το υπεζωκοτικό υγρό προέρχεται από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η κύρια λειτουργία του είναι να περιορίζει της δυνάμεις τριβής (δρώντας σαν λιπαντικό), επιτρέποντας την εκτεταμένη κίνηση των πνευμόνων εντός του θωρακικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων. Η απορρόφηση του υγρού γίνεται με τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα, με κυτταρικούς μηχανισμούς διακίνησης ύδατος και διαλυμένων ουσιών και στα είδη με λεπτό υπεζωκότα και με τις δυνάμεις Starling. Ο πνευμονικός υπεζωκότας συντελεί στο σχήμα των πνευμόνων περιορίζοντας την έκτασή της.

## 1.1. Μακροσκοπικά ο υπεζωκότας

Ο υπεζωκότας είναι ένας διπέταλος ορογόνοσ υμένασ ανάμεσα στα πέταλα του οποίου σχηματίζεται μια σχισμοειδής κοιλότητα, η υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα δύο αυτά πέταλα του υπεζωκότα είναι το πνευμονικό ή σπλαχνικό και το τοιχωματικό ή περίτονο.

Ο πνευμονικός υπεζωκότας επενδύει τις επιφάνειες του πνεύμονα εκτός από την περιοχή των πυλών και μιας γραμμής κάτω από της πύλεσ, εκεί όπου προσφύεται ο πνευμονικός σύνδεσμος. Καταδύεται στις μεσολόβιεσ σχισμές, συμφύεται χαλαρά με το πνευμονικό παρέγχυμα το οποίο καλύπτει, για αυτό και διαχωρίζεται εύκολα από αυτό. Στο ύψοσ των πυλών ανακάμπτει μετωπιαία και σχηματίζοντασ μια πτυχή, συνεχίζεται

ως μεσοπνευμόνιο πέταλο του περιτόνου υπεζωκότα. Η πτυχή αυτή ονομάζεται πνευμονικός σύνδεσμος, αποτελείται από τα δύο πέταλα του υπεζωκότα και δεν είναι ινώδης [4].

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των τοιχωμάτων του ημιθωρακίου. Παρά το γεγονός ότι εκτείνεται σαν ένας συνεχής σάκος που περιβάλλει την αντίστοιχη υπεζωκοτική κοιλότητα, διακρίνεται σε πλευρικό, τραχηλικό, διαφραγματικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα. Κατά την ανάκαμψη του πλευρικού προς το διαφραγματικό υπεζωκότα δημιουργείται το πλευροδιαφραγματικό κόλπωμα, μέσα στο οποίο εισχωρεί το κάτω χείλος του πνεύμονα κατά την εισπνοή. Ανάλογα κοιλώματα σχηματίζονται από τις ανακάμψεις του πλευρικού προς το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, μπροστά το στερνομεσοπνευμόνιο και πίσω το σπονδυλομεσοπνευμόνιο κόλπωμα [4].

Οι υπεζωκοτικές κοιλότητες είναι τελείως ανεξάρτητες η μία από την άλλη. Το γεγονός αυτό έχει κλινική σημασία διότι μπορεί ο ένας πνεύμονας να νοσεί χωρίς να επηρεάζει τη λειτουργία του άλλου, π.χ σε ατελεκτασία.

## **1.2. Ιστολογία υπεζωκότα**

Μικροσκοπικά ο υπεζωκότας αποτελείται από τις πέντε ακόλουθες στιβάδες: 1) μια μονήρης στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων με το βασικό της υμένα, 2) ένα δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού, 3) μια λεπτή ελαστική στιβάδα, 4) ένα δεύτερο δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού με αγγειακά και λεμφικά τριχοειδή και 5) μια ινοελαστική στιβάδα [5, 6]. Στις υπομεσοθηλιακές στιβάδες ανευρίσκονται κύτταρα όπως ινοβλάστες αλλά και τοπικά κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, όπως μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα [7].

Το πάχος του τοιχωματικού υπεζωκότα αυξάνει όσο αυξάνει και το μέγεθος του θηλαστικού που εξετάζεται. Στο πρόβατο το μέσο πάχος είναι 21-25 $\mu\text{m}$  και στον άνθρωπο είναι 30-40 $\mu\text{m}$  [5, 8]. Οι υπομεσοθηλιακές στιβάδες διαθέτουν άφθονες δέσμες κολλαγόνου και ελαστίνης και είναι λιγότερο κυτταροβριθείς σε σχέση με το πνευμονικό πέταλο. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας επικάθεται στην ενδοθωρακική περιτονία και συγχωνεύεται με το περίοστεο των πλευρών.

Σε ότι αφορά στον πνευμονικό υπεζωκότα, το πάχος του διαφέρει μεταξύ των θηλαστικών αλλά και μεταξύ των διαφόρων περιοχών του πνεύμονα. Σύμφωνα με τον Mc Laughlin μπορούμε να ταξινομήσουμε τα θηλαστικά σε δυο ομάδες με βάση το πάχος του πνευμονικού υπεζωκότα [9]: Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα είδη με λεπτό πνευμονικό πέταλο όπως οι σκύλοι, οι γάτες, τα κουνέλια, τα ποντίκια. Στα μικρά αυτά θηλαστικά η τελευταία ινοελαστική στιβάδα απουσιάζει. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα μεγάλα θηλαστικά με παχύ πνευμονικό πέταλο, δηλαδή τα πρόβατα, οι αγελάδες, τα άλογα και ο άνθρωπος. Το πάχος του πνευμονικού υπεζωκότα στα πρόβατα είναι 26-27 $\mu\text{m}$  στις κεφαλικές-κοιλιακές περιοχές ενώ στις ουραίες-ραχιαίες περιοχές κυμαίνεται από 54 $\mu\text{m}$  μέχρι 83 $\mu\text{m}$  [8]. Η διάκριση μεταξύ των θηλαστικών με παχύ ή λεπτό πνευμονικό υπεζωκότα είναι σημαντική από φυσιολογικής πλευράς γιατί η αιματική παροχή εξαρτάται από το πάχος του υπεζωκότα. Κολλαγόνες ίνες διαφορετικού μεγέθους και προσανατολισμού υπάρχουν στο σπλαχνικό πέταλο αν και οι ελαστικές ίνες υπερτερούν [7]. Οι ελαστικές αυτές ίνες συμβάλλουν στην ελαστική δύναμη επαναφοράς του πνεύμονα ενώ οι κολλαγόνες ίνες περιορίζουν τον όγκο αέρα στον οποίο ο πνεύμονας μπορεί να διαταθεί [10].

Τόσο ο τοιχωματικός όσο και ο σπλαχνικός υπεζωκότας επενδύονται από έναν ιδιαίτερο τύπο κυττάρων, τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται

επιθηλιόμορφα και όχι αμιγώς επιθηλιακά γιατί εμφανίζουν ενδιάμεσες ιδιότητες επιθηλιακών-μεσεγγυματικών κυττάρων [11]. Έχει φανεί ότι το μεσοθήλιο των θηλαστικών εμφανίζει παρόμοιες κυτταρολογικές και ιστοχημικές ιδιότητες, ανεξάρτητα από το ζώο και την ανατομική περιοχή (υπεζωκότας, περικάρδιο, περιτόναιο). Δύο είδη μεσοθηλιακών κυττάρων ανευρίσκονται στον υπεζωκότα, τα πλακώδη και τα κυβικά μεσοθηλιακά κύτταρα [12]. Τα πλακώδη-αποπλατυσμένα κύτταρα είναι ο κύριος τύπος κυττάρων που αποτελεί το μεσοθήλιο (εικόνα 1). Επικαλύπτουν τόσο το τοιχωματικό όσο και το πνευμονικό πέταλο. Τα κυβικά κύτταρα είναι πολύ πιο σπάνια σε σχέση με τα πλακώδη και εντοπίζονται κυρίως στον πλευρικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα καθώς και μετά από τραυματισμό ή διέγερση των ορογόνων επιφανειών. Διαθέτουν άφθονα οργανίδια και μικρολάχνες, υποδηλώνοντας μια περισσότερο μεταβολικά ενεργή κατάσταση [12]. Τα κυβικά κύτταρα είναι σημαντικά γιατί αποτελούν τα σημεία σχηματισμού των στομάτων, μικροσκοπικές δομές που θα περιγραφούν παρακάτω.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν εξειδικεύσεις της κυτταρικής επιφάνειας όπως είναι τα κυστίδια, οι κροσσοί και οι μικρολάχνες. Οι τελευταίες είναι πιο άφθονες στον κατώτερο πνευμονικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα [13] και αυξάνονται σε περίπτωση επιδιόρθωσης του μεσοθηλίου [14]. Αυξάνουν την διαθέσιμη επιφάνεια του υπεζωκότα για την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού και μέσω των γλυκοπρωτεϊνών και του επιφανειοδραστικού παράγοντα που παγιδεύουν έχει προταθεί ότι συμμετέχουν στη μείωση των τριβών στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει αναγνωριστεί ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα δεν αποτελούν «παθητικό φάκελο» για τους πνεύμονες, αλλά είναι μεταβολικώς ενεργά και συμμετέχουν σε διαδικασίες της: α) έκκριση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας του

υπεζωκότα [15, 16] β) έκκριση υαλουρονικού οξέως και επιφανειοδραστικού παράγοντα στην υπεζωκοτική κοιλότητα γ) αναγνώριση και φαγοκυττάρωση παθογόνων μικροοργανισμών και συμμετοχή στην άνοση αντίδραση [17] δ) αναγέννηση και επιδιόρθωση του μεσοθηλίου. Η διαδικασία της επούλωσης του μεσοθηλίου είναι ιδιαίτερη έτσι ώστε σε 7-10 ημέρες, ανεξάρτητα από το είδος και το μέγεθος της απογύμνωσης της μεσοθηλιακής επιφάνειας, να έχει επέλθει αποκατάσταση της βλάβης [18] και ε) προστασία από καρκινική διασπορά. Το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ στην υπεζωκοτική κοιλότητα προλαμβάνει την καρκινική επέκταση στον υπεζωκότα. Συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων και έτσι εμποδίζει την προσκόλλησή τους στα μεσοθηλιακά κύτταρα [19].



**Εικόνα 1.** Πλακώδες μεσοθήλιο-Ηλεκτρονική μικρογραφία σαρώσεως. Διακρίνονται ευκρινώς τα όρια μεταξύ των κυττάρων που δίνουν την εντύπωση «πλακόστρωτου». Bar, 12μm. (Προσαρμοσμένο από το: *The mesothelial cell. Int J Biochem Cell Biol* 2004;36, σελ. 9-16<sup>[20]</sup>).

### **1.3. Αιμάτωση υπεζωκότα**

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας λαμβάνει αίμα από τη συστηματική κυκλοφορία και συγκεκριμένα από της βρογχικές αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση γίνεται από της ομώνυμες φλέβες στην κάτω κοίλη φλέβα [21].

Η αιματική παροχή στον πνευμονικό υπεζωκότα εξαρτάται από το πάχος του τελευταίου. Έτσι στα θηλαστικά με λεπτό πνευμονικό πέταλο η αιμάτωση γίνεται από την πνευμονική αρτηρία ενώ στα θηλαστικά με παχύ πνευμονικό πέταλο από κλάδους της βρογχικής αρτηρίας [9]. Στο πρόβατο, ένα ζώο με παχύ υπεζωκότα, έχει βρεθεί ότι η αιματική παροχή είναι συστηματική [22]. Επειδή και ο άνθρωπος συγκαταλέγεται στα είδη με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα, η αιμάτωση πιθανόν προέρχεται και σε αυτόν από τη βρογχική αρτηρία. Η φλεβική παροχέτευση σε όλα τα είδη γίνεται από της πνευμονικές φλέβες που χαρακτηρίζονται από χαμηλές πιέσεις [22].

### **1.4. Λεμφική παροχέτευση**

Η υπεζωκοτική κοιλότητα διαθέτει δύο διαφορετικά συστήματα λεμφικής κυκλοφορίας. Τα λεμφικά αγγεία στο σπλαχνικό υπεζωκότα σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο στην επιφάνεια του πνεύμονα με κατεύθυνση τους βρογχοπνευμονικούς λεμφαδένες της πνευμονικής πύλης. Κάποια από τα λεμφικά διεισδύουν στο πνευμονικό παρέγχυμα και καταλήγουν στο περιβρογχικό λεμφικό δίκτυο.

Η λεμφική απαγωγή του τοιχωματικού υπεζωκότα καταλήγει στους παραστερνικούς, παρασπονδυλικούς λεμφαδένες, μεσοπνευμόνιους και τραχειοβρογχικούς λεμφαδένες. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του τοιχωματικού υπεζωκότα είναι η παρουσία των στομάτων, μικροσκοπικών δηλαδή δομών της

υπεζωκοτικής επιφάνειας που αποτελούν επέκταση των λεμφικών αγγείων στον υπεζωκοτικό χώρο.

Τα στόματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον von Recklinghausen το 1863 ως μικρά ανοίγματα μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων στην περιτοναϊκή πλευρά του διαφράγματος. Η συγκέντρωσή τους ποικίλλει στα διάφορα ζώα (στα κουνέλια 1-80/mm<sup>2</sup>, στα ποντίκια 300-400/mm<sup>2</sup>, στα πρόβατα 1000-2000/mm<sup>2</sup>) και στις διάφορες περιοχές του υπεζωκότα. Γενικά είναι μεγαλύτερη στις κατώτερες περιοχές του μεσοπνευμόνιου υπεζωκότα και στις κατώτερες και μεσοπλεύριες περιοχές του πλευρικού υπεζωκότα και η διάμετρός τους κυμαίνεται από 3 έως 12 μm [23]. Η παρουσία τους έχει τεκμηριωθεί όχι μόνο στην υπεζωκοτική αλλά και στις υπόλοιπες ορογόνες κοιλότητες (περιτοναϊκή, περικαρδιακή).

Τα στόματα σχηματίζονται στα σημεία συμβολής δύο ή περισσότερων κυβικών κυττάρων. Τα κυβικά κύτταρα επενδύονται εσωτερικά από ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφικών αγγείων [24, 25]. Το λεμφικό δίκτυο του τοιχωματικού υπεζωκότα κατά τόπους διατείνεται σχηματίζοντας ευρείς χώρους που ονομάζονται λεμφικοί κόλποι ή λεμφόκολποι. Τα στόματα αποτελούν συνέχεια των λεμφόκολπων προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και εντοπίζονται μόνο πάνω από αυτά. Τα στόματα όπως και τα λεμφικά αγγεία διαθέτουν βαλβίδες που επιτρέπουν τη μονόδρομη ροή ουσιών από την υπεζωκοτική κοιλότητα προς το λεμφικό αυλό. Επιπλέον τα περισσότερα από αυτά είναι κλειστά, αποτέλεσμα προσεκβολών των ενδοθηλιακών λεμφικών κυττάρων, και ανακαλύπτονται δύσκολα στο φωτομικροσκόπιο μετά από συνεχόμενες τομές [7].

Τα στόματα δεν αποτελούν στατικές δομές. Έχει προταθεί το περιοδικό άνοιγμα και κλείσιμο των διαφραγματικών στομάτων κατά τον αναπνευστικό κύκλο. Έτσι κατά τη διάρκεια της εισπνοής όταν το διάφραγμα συσπάται τα στόματα κλείνουν ενώ στην



εκπνοή όταν το διάφραγμα χαλαρώνει αυτά ανοίγουν [26]. Τα κλειστά στόματα φαίνεται να αποτελούν ένα είδος δεξαμενής καθώς επιστρατεύονται σε περίπτωση αυξημένων αναγκών απορρόφησης. Πράγματι έχει βρεθεί ο αριθμός των στομάτων αυξάνει σε ενδοθωρακική φυματίωση και καρκίνο [27], σε περιτοναϊκό ασκίτη [28] και σε πειραματική περιτονίτιδα σε ζώα [29].

Σχετικά με τη ρύθμιση της δραστηριότητας των στομάτων λίγα πράγματα είναι γνωστά. Έχει προταθεί η συμμετοχή του VEGF στη διάνοιξη των κλειστών στομάτων και στη ρύθμιση της διαμέτρου τους και ο ρόλος της ενδοθηλίνης και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στη ρύθμιση του τόνου των στομάτων του πλατέως συνδέσμου της μήτρας [30, 31].

Τέλος διάφορες μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη ασυνεχειών μεταξύ των κυβικών μεσοθηλιακών κυττάρων που τις ονομάζουν πόρους. Διαμέσου αυτών των ασυνεχειών συστατικά του κολλαγόνου και της υπομεσοθηλιακής βασικής μεμβράνης μπορεί να είναι ορατά [4, 32].

### **1.5. Νεύρωση**

Νευρικές απολήξεις από τα μεσοπλεύρια νεύρα καταλήγουν στον πλευρικό υπεζωκότα καθώς και στην περιφερική μοίρα του διαφραγματικού υπεζωκότα. Ο ερεθισμός των περιοχών αυτών προκαλεί θωρακοκοιλιακό πόνο. Αντίθετα η κεντρική μοίρα του διαφράγματος και ο μεσοπνευμόνιος υπεζωκότας νερώνονται από το φρενικό νεύρο.

Ο πνευμονικός υπεζωκότας διαθέτει αυτόνομη μόνο νεύρωση και όχι σωματική με αποτέλεσμα να είναι αναισθητος σε αλγογόνα ερεθίσματα. Για αυτό η εμφάνιση

πλευριτικού τύπου πόνου στο θώρακα υποδηλώνει φλεγμονή ή διέγερση του τοιχωματικού και όχι του πνευμονικού υπεζωκότα [21].

## 2. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η υπεζωκοτική κοιλότητα περιέχει μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού. Το υπεζωκοτικό υγρό προέρχεται από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα και ο ρυθμός παραγωγής και απορρόφησής του είναι 1-1,2 λίτρα ανά ημέρα [33]. Ο όγκος του έχει βρεθεί πειραματικά ότι είναι 0,26 ml/kg και στις δύο υπεζωκοτικές κοιλότητες, που αντιστοιχεί περίπου σε 18 ml σε έναν άνθρωπο βάρους 70 kg [34].

Το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό περιέχει σημαντικό αριθμό κυττάρων σε σχέση με άλλα υγρά του σώματος π.χ αρθρικό υγρό ή εγκεφαλονωτιαίο. Σύμφωνα με τη μελέτη των Norren και συν., υπάρχουν 1700 κύτταρα ανά ml με τους υποπληθυσμούς να έχουν ως εξής: 75% μακροφάγα, 23% λεμφοκύτταρα, 1% μεσοθηλιακά κύτταρα ενώ σποραδικά μόνο ανευρίσκονται ουδετερόφιλα ή ηωσινόφιλα [34]. Ο αριθμός των ουδετερόφιλων στο υπεζωκοτικό υγρό είναι αυξημένος στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές και πλησιάζει το 1% των κυττάρων. Ο ολικός αριθμός κυττάρων δεν επηρεάζεται στους καπνιστές και είναι παρόμοιος με την ομάδα των μη καπνιστών [34]. Ανάλογη αύξηση των ουδετερόφιλων έχει παρατηρηθεί στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) των καπνιστών [35]. Στα ζώα οι περισσότερες μετρήσεις που έχουν γίνει στο υπεζωκοτικό υγρό έχουν δείξει μεγαλύτερη αναλογία μεσοθηλιακών κυττάρων και μικρότερη λεμφοκυττάρων σε σχέση με τον άνθρωπο [36, 37]. Τα μακροφάγα στο υπεζωκοτικό υγρό προέρχονται κυρίως από τα μεσοθηλιακά

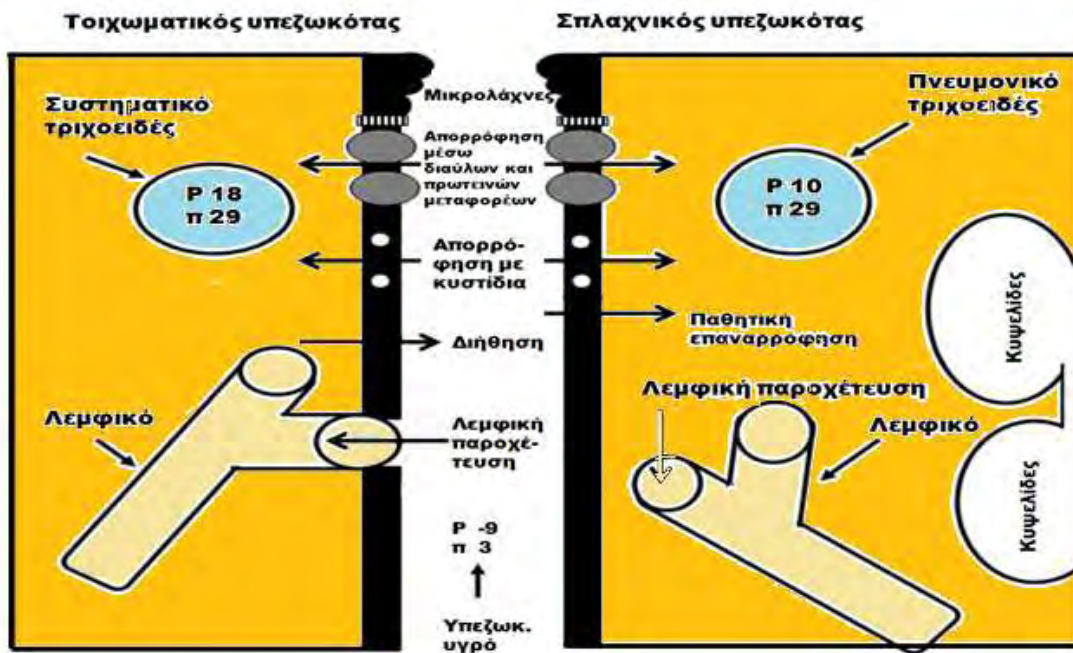
κύτταρα που αποφολιδώνονται ενώ μικρότερος αριθμός προέρχεται από τα μονοκύτταρα του αίματος ή τα κυψελιδικά μακροφάγα [38].

Η σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού είναι παρόμοια αλλά όχι ίδια με εκείνη του πλάσματος. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό (1g/dl) είναι μικρότερη απ' ό τι στο πλάσμα και η αλβουμίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της (50%). Η συγκέντρωση νατρίου και χλωρίου είναι μικρότερη κατά 2-5% και 6-9% αντίστοιχα σε σχέση με το πλάσμα ενώ τα διττανθρακικά είναι αυξημένα κατά 20-25% [37, 39]. Τα αυξημένα διττανθρακικά έχουν σαν αποτέλεσμα το υπεζωκοτικό υγρό να είναι περισσότερο αλκαλικό (pH=7,6) σε σχέση με το πλάσμα. Αντίθετα, η συγκέντρωση γλυκόζης και η  $P_{CO_2}$  είναι ίδιες στο υπεζωκοτικό υγρό και το πλάσμα.

### **3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ**

#### **3.1. Διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού**

Η υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να παρομοιαστεί με το διάμεσο χώρο οποιοδήποτε ιστού του σώματος. Η διήθηση υγρού σε αυτήν γίνεται από τα τριχοειδή αγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα, που είναι συστηματικής προέλευσης, ενώ η παροχέτευση γίνεται από τα στόματα των λεμφικών αγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Αντίστοιχα, στο διάμεσο χώρο των υπολοίπων ιστών η διήθηση του διαμέσου υγρού γίνεται στο αρτηριακό άκρο των τριχοειδών και η παροχέτευση από τα διάμεσα λεμφικά αγγεία. Η διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού απεικονίζεται συνοπτικά στο σχήμα 1.



**Σχήμα 1.** Σχηματική απεικόνιση της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού σε σκύλο. Οι τιμές των πιέσεων στο συστηματικό και πνευμονικό τριχοειδές και στο υπεζωκοτικό υγρό είναι σε  $cm H_2O$  και προέρχονται από πειραματικά δεδομένα [40].  $P$  η υδροστατική και  $\pi$  η κολλοειδωσμοτική πίεση. Το μέγεθος των βελών δεν είναι ανάλογο της ροής. Στον τοιχωματικό υπεζωκότα η διαβάθμιση της πίεσης, που ευνοεί τη διήθηση του υγρού, είναι  $[18 - (-9)] - (29 - 3) = 1 cm H_2O$ . Στο σπλαχνικό υπεζωκότα η διαβάθμιση πίεσης είναι  $[10 - (-9)] - (29 - 3) = -7 cm H_2O$ . Η αρνητική τιμή υποδηλώνει παθητική επαναρρόφηση υγρού. Ανάλογο μοντέλο ισχύει και στον άνθρωπο, στον οποίον η παθητική επαναρρόφηση αμφισβητείται (βλ κείμενο). Η απορρόφηση με κυστίδια, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα είδη με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα, δεν έχει αποδειχθεί.

### 3.2. Παραγωγή υπεζωκοτικού υγρού

Το υπεζωκοτικό υγρό αποτελεί υπερδιήθημα του πλάσματος διαμέσου των τριχοειδών αγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η κίνηση αυτή του υγρού, από τα τριχοειδή αγγεία στο διάμεσο ιστό του τοιχωματικού πετάλου και εν συνεχεία στην υπεζωκοτική κοιλότητα, γίνεται με βάση το νόμο του Starling:

$$J_v = L \times S [(P_{cap} - P_{pl}) - \sigma (\Pi_{cap} - \Pi_{pl})],$$

όπου  $J_v$  ο ρυθμός διήθησης,  $P$  και  $\Pi$  οι υδροστατικές και κολλοειδωσμοτικές δυνάμεις αντίστοιχα στα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα ( $cap$ ) και στο υπεζωκοτικό υγρό ( $pl$ ),  $L$  η υδραυλική αγωγιμότητα του υπεζωκότα,  $S$  η επιφάνεια του υπεζωκότα και  $\sigma$  η σταθερά ανάκλασης των πρωτεϊνών, ένα μέτρο που δείχνει την ικανότητα του υπεζωκότα να περιορίζει την κίνηση των πρωτεϊνών και άλλων μακροενώσεων. Στον άνθρωπο η υδροστατική πίεση στα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα, που ευνοεί τη μετακίνηση υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα, εκτιμάται ότι είναι 30 cm H<sub>2</sub>O. Αντίθετα η κολλοειδωσμοτική πίεση που συγκρατεί υγρό στα τριχοειδή είναι 34 cm H<sub>2</sub>O. Στο υπεζωκοτικό υγρό οι αντίστοιχες πιέσεις είναι -5 και 5 cm H<sub>2</sub>O. Οπότε η διαφορά υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης είναι: [(30-(-5))-(34-5)]=6 cm H<sub>2</sub>O, θετική διαφορά πιέσεων που ευνοεί τη διήθηση υγρού από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έχει βρεθεί και πειραματικά ότι η παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγαλύτερη στα ανώτερα τμήματα του υπεζωκότα και μειώνεται της κατώτερες περιοχές του [41].

### **3.3. Παροχέτευση υπεζωκοτικού υγρού**

Η παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού γίνεται με τέσσερις μηχανισμούς: λεμφική παροχέτευση, παθητική επαναρρόφηση (θηλαστικά με λεπτό υπεζωκότα), απορρόφηση με το μηχανισμό ενδοκυττάρωσης-εξωκυττάρωσης και απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτείνες φορείς.

#### *3.3.1. Λεμφική παροχέτευση*

Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι τα λεμφικά αγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό της απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού [42-45]. Οι Negrini και συν. έδειξαν ότι τα λεμφικά αγγεία επιτελούν το 75% της παροχέτευσης του υγρού σε σκύλους και κουνέλια [45] ενώ σύμφωνα με τους Broaddus και συν. το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 89% στα πρόβατα [42]. Αντίθετα τα λεμφικά αγγεία του πνευμονικού υπεζωκότα, τα οποία στερούνται στομάτων, δε συμβάλλουν στην παροχέτευση της υπεζωκοτικής κοιλότητας [42, 46].

Ο ρυθμός παροχέτευσης από τα στόματα αυξάνει σε περίπτωση συλλογής υπεζωκοτικού υγρού. Οι εφεδρείες των λεμφικών αγγείων είναι τόσο μεγάλες ώστε ο φυσιολογικός ρυθμός απορρόφησης από αυτά μπορεί να αυξηθεί περίπου είκοσι φορές [47]. Αν και δεν υπάρχουν άμεσες ενδείξεις από πειράματα σε ανθρώπους, φαίνεται ότι ο μηχανισμός της λεμφικής παροχέτευσης μπορεί να ανταπεξέλθει σε μερικές εκατοντάδες χιλιοστόλιτρα επιπλέον υγρού ανά ημέρα, χωρίς την ανάπτυξη πλευριτικής συλλογής. Για αυτό κάθε υπεζωκοτική συλλογή υποδηλώνει σοβαρή διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ παραγωγής υπεζωκοτικού υγρού και παροχέτευσής του. Για παράδειγμα, σε περίπτωση συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, ακόμα και μικρή ποσότητα πλευριτικής συλλογής υποδηλώνει σοβαρή πνευμονική υπερφόρτωση. Από την άλλη, η απουσία συλλογής δε σημαίνει ότι ο μηχανισμός παροχέτευσης δε βρίσκεται υπό σοβαρό στρες.

Τα πρόσφατα πειράματα των Bodega και συν. έδειξαν ότι η λεμφική παροχέτευση δεν είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες [48]. Αντίθετα, σε περιπτώσεις πλευριτικών συλλογών, η λεμφική παροχέτευση αυξάνει και ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό υπεζωκοτικής κάθαρσης.

### *3.3.2. Παθητική επαναρρόφηση από το πνευμονικό πέταλο*

Κάποιοι συγγραφείς έχουν υποστηρίξει την άποψη αυτή, ότι δηλαδή οι δυνάμεις του Starling ευνοούν την απορρόφηση υπεζωκοτικού υγρού από τον πνευμονικό υπεζωκότα [47]. Βασίζονται κυρίως σε πειραματικά δεδομένα που έδειξαν απορρόφηση από την πνευμονική επιφάνεια σκύλων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [47, 49, 50]. Η παθητική επαναρρόφηση είναι πιθανό να συμβαίνει στα θηλαστικά με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα, όπως το κουνέλι ή ο σκύλος, γιατί οι πιέσεις στα τριχοειδή είναι χαμηλές (αιμάτωση από την πνευμονική αρτηρία). Αντίθετα στα θηλαστικά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα (αιμάτωση από τη συστηματική κυκλοφορία), οι πιέσεις είναι υψηλότερες και δεν ευνοούν την απορρόφηση υγρού. Στον άνθρωπο η υδροστατική πίεση στο σπλαχνικό πέταλο είναι 24 cm H<sub>2</sub>O. Η πίεση αυτή είναι μικρότερη από εκείνη στα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα επειδή η παροχέτευση του πνευμονικού πετάλου γίνεται από τις πνευμονικές φλέβες, που χαρακτηρίζονται από χαμηλές πιέσεις. Η κολλοειδωσμοτική πίεση είναι 34 cm H<sub>2</sub>O, όμοια με εκείνη στο τοιχωματικό πέταλο. Η διαφορά επομένως υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης μεταξύ του πνευμονικού πετάλου και της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι: [24-(-5)]-(34-5)=0 cm H<sub>2</sub>O. Η μηδενική αυτή διαφορά πίεσης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δε συμβαίνει μετακίνηση υγρών μεταξύ του σπλαχνικού υπεζωκότα και της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Βέβαια στον άνθρωπο δεν έχει τεκμηριωθεί πειραματικά η μη συμμετοχή του πνευμονικού πετάλου στην επαναρρόφηση και οι πιέσεις που παρατίθενται παραπάνω αποτελούν απλές εκτιμήσεις.

### *3.3.3. Απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από το μηχανισμό της διακυττάρωσης ή κυτταρικής μετάθεσης*

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μεσοθηλιακών με το καλά αναπτυγμένο κυστιδιακό τους σύστημα καθώς και πρόσφατες πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν το μηχανισμό αυτό [51, 52]. Υπεζωκοτικό υγρό, μακρομοριακές ουσίες και σωματιδιακά υλικά πινοκυτταρώνονται από την κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, διασχίζουν το κυτταρόπλασμα μέσα σε κυστίδια και τελικά απελευθερώνονται από τη βασική επιφάνειά τους στο διάμεσο ιστό. Πολλοί συγγραφείς δε δέχονται τη σημασία της διακυττάρωσης στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού καθώς τα πειραματικά δεδομένα είναι ακόμα ανεπαρκή.

#### *3.3.4 Απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς*

Έμμεσες ενδείξεις συνηγορούν για την παρουσία διαύλων και πρωτεϊνών μεταφορέων στα μεσοθηλιακά κύτταρα επιφορτισμένων με την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού. Αυτές προέρχονται από πειράματα με τεχνητούς υδροθώρακες σε κουνέλια στα οποία η προσθήκη αναστολέων των διαύλων και πρωτεϊνών μεταφορέων οδηγεί σε καθυστέρηση της απορρόφησης του υδροθώρακα [53], [54-56]. Αλλά και πειράματα με την τεχνική Ussing αποκάλυψαν ότι η προσθήκη τέτοιων αναστολέων σε τεμάχια υπεζωκότα οδηγεί σε μεταβολή της αντίστασης, στοιχείο συνηγορητικό για τη διάβαση ιόντων μέσω διαύλων [57-59]. Έτσι προτάθηκε η παρουσία στα μεσοθηλιακά κύτταρα διαύλων  $\text{Na}^+$ , νερού, των αντιμεταφορέων  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , των συμμεταφορέων  $\text{Na}^+/\text{γλυκόζης}$  και  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , της αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Η παρουσία των παραπάνω στα μεσοθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε να ερμηνεύσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ηλεκτρολυτών ανάμεσα στο υπεζωκοτικό υγρό και το πλάσμα.

Πρόσφατα ο διάλυλος νατρίου αποκαλύφθηκε με μοριακές τεχνικές σε υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα [60], όπως επίσης και ο συμμεταφορέας νατρίου-



γλυκόζης [61, 62]. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν την ύπαρξη των παραπάνω στα μεσοθηλιακά κύτταρα και τεκμηριώνουν ένα ρόλο για τη συμμετοχή τους στην απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού.

Φαίνεται ότι ο κατώτερος τοιχωματικός υπεζωκότας είναι περισσότερο ηλεκτρικά δραστήριος σε σχέση με τον ανώτερο, επιτελεί δηλαδή μεγαλύτερη απορρόφηση μέσω διαύλων και πρωτεϊνών-μεταφορέων [63].

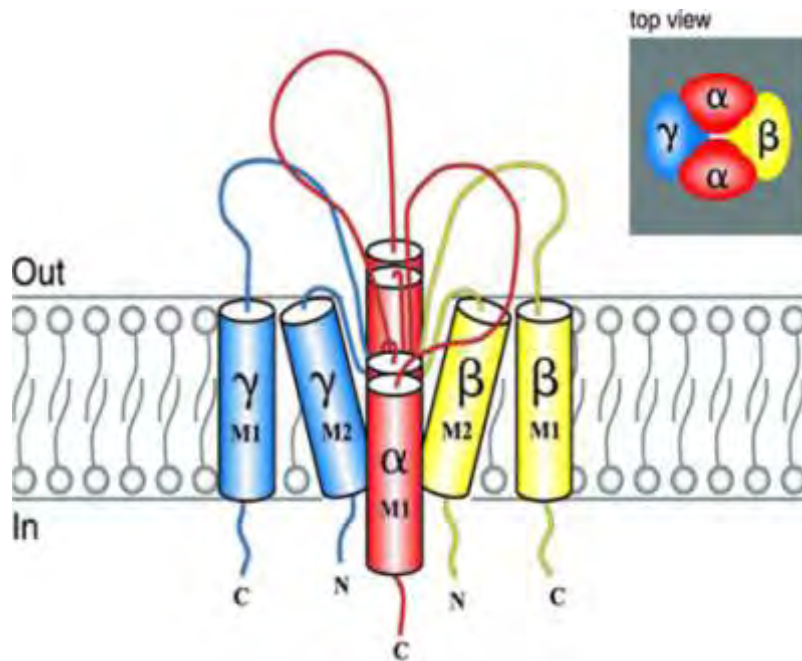
#### 3.3.4.α. Επιθηλιακός διάυλος νατρίου (epithelial sodium channel-ENaC)

Ο ENaC είναι ο επιθηλιακός διάυλος νατρίου. Βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια πολλών επιθηλιακών κυττάρων, όπως στα φλοιϊκά αθροιστικά σωληνάρια του νεφρού, στην ουροδόχο κύστη, στο κατιόν κόλον, τους ιδρωτοποιούς και σιελογόνους αδένες, στο ανώτερο και κατώτερο αναπνευστικό σύστημα [64, 65]. Βασική του λειτουργία είναι η απορρόφηση νατρίου από τα παραπάνω επιθήλια σύμφωνα με την ηλεκτροχημική κλίση που δημιουργείται από τη δραστηριότητα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPάσης}$  στη βασικοπλάγια επιφάνεια των κυττάρων. Στον πνεύμονα, ο διάυλος ENaC ρυθμίζει τον όγκο και τη σύσταση του υγρού που επενδύει τους αεραγωγούς. Ο ρόλος του είναι πολύ σημαντικός κατά τη γέννηση όπου και απορροφά το υγρό που βρίσκεται στους πνεύμονες [66] ενώ στη μετέπειτα ζωή θεωρείται σημαντικός μηχανισμός για την απορρόφηση του πνευμονικού οιδήματος [67]. Στην κυστική ίνωση η υπερδραστηριότητα του διαύλου, ως αποτέλεσμα ελαττωματικής έκκρισης από το διάυλο χλωρίου CFTR, συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της νόσου αν και ο μηχανισμός της υπερδραστηριότητας του διαύλου δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί [68].

### 3.3.4.β. Δομή ENaC-Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Ο διάλυλος ENaC αναστέλλεται από την αμιλορίδη και μάλιστα η αναστολή από χαμηλές συγκεντρώσεις αμιλορίδης θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για να καταταγεί ένας διάλυλος νατρίου στην κατηγορία των ENaC [69, 70]. Έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα πέντε υπομονάδες του διαύλου, οι α, β, γ, δ και ε υπομονάδες. Οι β και γ υπομονάδες ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του διαύλου, συγκεκριμένα ρυθμίζουν τις «αγώγιμες» υπομονάδες α, δ και ε. Ο ENaC θεωρείται φυλασσόμενος διάλυλος, δηλαδή ο πόρος του ανοίγει και κλείνει και έχουν μάλιστα περιγραφεί κινητικές για το άνοιγμα και κλείσιμο του πόρου του. Παρόλα αυτά, δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί ποιος είναι ο μηχανισμός φύλαξης της πύλης του [71]. Σε ενδογενείς ιστούς ο λειτουργικός διάλυλος νατρίου πιστεύεται ότι αποτελείται από τις α, β, γ υπομονάδες σε στοιχειομετρία 2α:1β:1γ (εικόνα 2) [72]. Υπάρχουν όμως ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι και άλλες στοιχειομετρίες είναι δυνατόν να ανευρεθούν [73].

Στα μεσοθηλιακά κύτταρα οι Nie HG et al. [74] αποκάλυψαν με μοριακές τεχνικές (RT-PCR, ανοσοφθορισμός) την παρουσία του διαύλου ENaC στα υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα (φυσιολογικά και καρκινικά). Ο διάλυλος στα κύτταρα αυτά αποτελείται από τις α,β,γ,δ υπομονάδες και η δραστηριότητά του αυξάνεται από τα κυκλικά νουκλεοτίδια cAMP και cGMP.



**Εικόνα 2.** Δομή διαύλου ENaC.

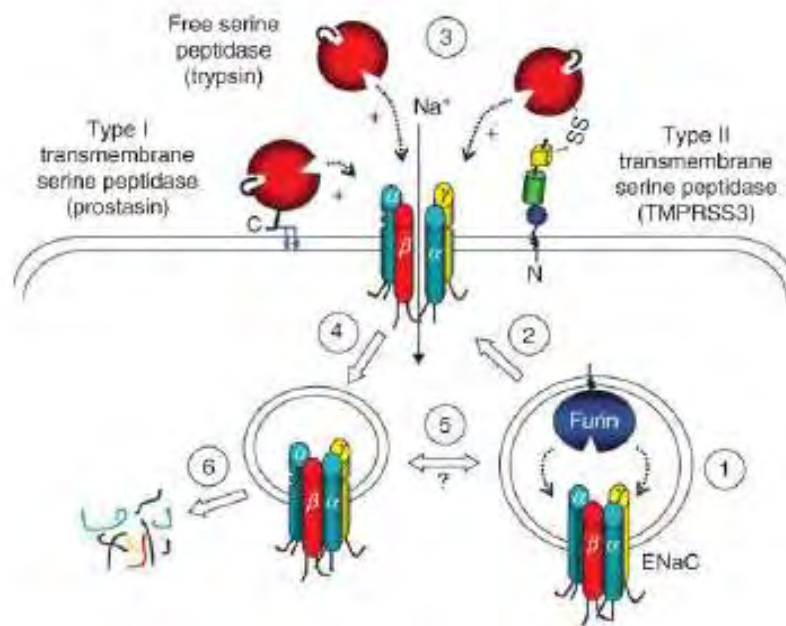
### 3.3.4γ. Πρωτεολυτική διάσπαση ENaC

Το 1997 προέκυψαν οι πρώτες ενδείξεις για την αυτοκρινή ρύθμιση του διαύλου ENaC από τη δράση κυτταροπλασματικών σερινοπρωτεασών. Οι Vallet και συν. [75] έδειξαν ότι η προσθήκη απροτινίνης σε A6 κύτταρα νεφρού βατράχου μειώνει το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα νατρίου ενώ η προσθήκη τρυψίνης το αυξάνει. Η απροτινίνη αποτελεί έναν ευρέως φάσματος αναστολέα των σερινοπρωτεασών. Οι παραπάνω ερευνητές κλωνοποίησαν μια μεμβρανική πρωτεάση υπεύθυνη για τη ρύθμιση του διαύλου νατρίου, την οποία ονόμασαν xCAP1 (*Xenopus Channel-Activating Peptidase 1*). Παρόμοια πειράματα με απροτινίνη ακολούθησαν σε κύτταρα θηλαστικών (νεφρικά επιθηλιακά, αεραγωγών, ρινικά, αεραγωγών με κυστική ίνωση κλπ) [76] και υποδείκνυαν, όπως στο βάτραχο, τη ρύθμιση του διαύλου ENaC από κάποια ενδογενή σερινοπρωτεάση.

Στα θηλαστικά και στον άνθρωπο το ορθόλογο ένζυμο της xCAP1 είναι πολύ πιθανόν η προστασίνη. Ονομάζεται έτσι γιατί αρχικά βρέθηκε σαν ένζυμο με

δραστηριότητα παρόμοια με της τρυψίνης που εκκρίνεται στο προστατικό υγρό [77]. Η προστασίνη έχει βρεθεί ότι εκφράζεται επίσης και σε άλλους ιστούς, όπως στο νεφρό, στους αεραγωγούς, στον πνεύμονα [78, 79], όπου συγκεκριμένα έχει βρεθεί στην κυτταρική επιφάνεια των πνευμονοκυττάρων τύπου II, των μακροφάγων και ελεύθερη στο υγρό που επαλείφει τους αεραγωγούς [80]. Έχει προταθεί ότι η προστασίνη αυξάνει τη δραστηριότητα του διαύλου ENaC στους αεραγωγούς και στον πνεύμονα [78].

Οι πρωτεάσες συμμετέχουν στη διαδικασία φυσιολογικής ωρίμανσης του ENaC. Ο ENaC είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 2α, 1β και 1γ υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα διαθέτει δύο διαμεμβρανικά τμήματα που συνδέονται με έναν μεγάλο εξωκυττάριο δακτύλιο με τα αμινο- και τα καρβοξυ- τελικά τμήματα να εντοπίζονται στον κυτταροπλασματικό χώρο. Μετά από τη σύνθεση των υπομονάδων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυτές υφίστανται μεταμεταφραστική τροποποίηση. Συγκεκριμένα γίνεται προσθήκη υδατανθρακικών αλυσίδων [81] και πρωτεολυτική διάσπαση της α υπομονάδας σε 2 σημεία και της γ υπομονάδας σε 1 σημείο από το ένζυμο furin του δικτύου Golgi [82]. Έχει δειχθεί ότι η διάσπαση αυτή στην α υπομονάδα απομακρύνει ένα ανασταλτικό πεπτίδιο 26 αμινοξέων από τον εξωκυττάριο δακτύλιο του διαύλου [83]. Η πλήρης ενεργοποίηση όμως του διαύλου απαιτεί και τη δράση της εξωκυττάριας προστασίνης: αυτή διασπά τη γ υπομονάδα σε ένα επιπρόσθετο σημείο από τη furin με αποτέλεσμα την απομάκρυνση επιπλέον ανασταλτικού πεπτιδίου 43 αμινοξέων [84]. Η διαδικασία ωρίμανσης του ENaC και ο ρόλος των πρωτεασών απεικονίζεται στην εικόνα 3.



**Εικόνα 3.** Στάδια φυσιολογικής ωρίμανσης του ENaC [76]. 1). Ο ENaC συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και υφίσταται τροποποίηση στο δίκτυο Golgi (πρωτεολυτική διάσπαση από το ένζυμο furin). 2). Εν συνεχεία εξωκυτταρώνεται στην κυτταρική μεμβράνη. 3). Διαμεμβρανικές αλλά και εξωκυττάρειες πρωτεάσες ενεργοποιούν επιπλέον το διάυλο. Ο μηχανισμός δράσης αυτών δεν είναι γνωστός. 4). Ο διάυλος ενδοκυτταρώνεται. 5). Ανακυκλώνεται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη ή 6). Υφίσταται διάσπαση στα λυσοσώματα. (Προσαρμοσμένο από το: *Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by peptidases*. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78, σελ. 23-46<sup>[76]</sup>).

Σήμερα είναι αρκετά σαφές ότι η δραστηριότητα και η ισορροπία σερίνοπρωτεασών-αντιπρωτεασών καθορίζει τη δραστηριότητα του διαύλου ENaC στο νεφρό και στο αναπνευστικό σύστημα. Όχι μόνο οι διαμεμβρανικές πρωτεάσες αλλά και πρωτεάσες από άλλες πηγές είναι δυνατό να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του ENaC. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η προστασίνη εκφράζεται και στα μακροφάγα και ότι υπάρχει στο υγρό που επαλείφει τους αεραγωγούς και ότι η ουδετεροφιλική ελαστάση μπορεί να ενεργοποιεί τον ENaC [85]. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του ENaC από τις εξωκυττάρειες πρωτεάσες δεν είναι γνωστός. Το μόνο που γνωρίζουμε σήμερα είναι ότι

αυτές αυξάνουν το χρόνο που ο διάυλος παραμένει ανοικτός (Po) [86]. Δεν είναι σαφές όμως αν διασπούν τον ίδιο τον ENaC, όπως συμβαίνει με το ενδοκυττάριο ένζυμο furin, ή αν δρουν έμμεσα, π.χ ενεργοποιούν άλλες πρωτεάσες ή καταστρέφουν/απομακρύνουν ανασταλτικές πρωτεΐνες του ENaC. Υπέρ της άμεσης διάσπασης του ENaC είναι οι ακόλουθες ενδείξεις: η εξωγενής ελαστάση προκαλεί διάσπαση του ENaC στη γ υπομονάδα αυτού (αν και σε σημείο που είναι διαφορετικό από εκείνο της φυσιολογικής βιοσυνθετικής οδού) [87], η ανάλυση των πεπτιδικών υποστρωμάτων της προστασίνης υποδεικνύει ότι ο ENaC θα μπορούσε να αποτελεί υπόστρωμα [88] κλπ. Από την άλλη, ενδείξεις υποστηρίζουν ότι δεν απαιτείται η άμεση πρωτεόλυση του ENaC από τις πρωτεάσες, π.χ οι Bengrine και συν. [89] βρήκαν ότι η εξωκυτάρια τρυψίνη ενεργοποιεί τον ENaC δρώντας μέσω υποδοχέα. Πιθανό να ισχύουν περισσότεροι από ένας μηχανισμοί για την ενεργοποίηση του ENaC.

#### **4. ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ**

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ισορροπία των δυνάμεων του Starling που εμπλέκονται στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού και να επηρεάσουν το ρυθμό παραγωγής ή/και απορρόφησης του υγρού. Οι αιτίες πρόκλησης υπεζωκοτικής συλλογής μπορεί να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: α) αυτές που τροποποιούν την ισορροπία των ενδουπεζωκοτικών πιέσεων, β) αυτές που εμποδίζουν τη λεμφική παροχέτευση και γ) αυτές που αυξάνουν τη διαπερατότητα του μεσοθηλίου του υπεζωκότα και του ενδοθηλίου των τριχοειδών. Οι αιτίες που τροποποιούν τη διαπερατότητα των δυνάμεων του Starling είναι συνήθως εξωυπεζωκοτικές, αυτές που μειώνουν τη λεμφική παροχέτευση αφορούν στα ενδουπεζωκοτικά ή εξωυπεζωκοτικά

λεμφαγγεία και αυτές που αυξάνουν τη διαπερατότητα του μεσοθηλιακού φραγμού είναι ενδοϋπεζωκοτικές [23]. Εκτός από την πρώτη περίπτωση, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού αυξάνει πάνω από το φυσιολογικό. Αυτό το χαρακτηριστικό οδηγεί στο διαχωρισμό των υπεζωκοτικών συλλογών σε διϋδρώματα (με φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης) και εξιδρώματα. Στην κλινική πρακτική ο διαχωρισμός των διϋδρωμάτων από τα εξιδρώματα γίνεται με τα κριτήρια του Light [21]. Σύμφωνα με αυτά μια υπεζωκοτική συλλογή χαρακτηρίζεται εξιδρωματική όταν ο λόγος πρωτεΐνης υγρού/πλάσματος είναι μεγαλύτερος από 0,5, ο λόγος LDH υγρού/LDH πλάσματος είναι μεγαλύτερος από 0,6 και η LDH υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγαλύτερη από τα 2/3 της ανώτερης φυσιολογικής τιμής του πλάσματος.

#### **4.1. Διϋδρώματα**

Η αυξημένη συστηματική αρτηριακή πίεση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διϋδρωμάτων, όπως έχει δειχθεί πειραματικά σε ποντίκια. Το ίδιο ισχύει και για την αύξηση στη φλεβική πίεση της πνευμονικής κυκλοφορίας, αφού η αύξηση αυτή εμποδίζει την επαναρρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού από το πνευμονικό πέταλο και μάλιστα αντιστρέφει τη διαβάθμιση πιέσεων, οδηγώντας τελικά σε διήθηση υγρού αντί επαναρρόφηση. Αυτός είναι ο μηχανισμός για τη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος σε ασθενείς με καρδιακή νόσο [90]. Η ελάττωση της πίεσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ατελεκτασίας μεγάλου τμήματος ή ολόκληρου του πνεύμονα, μπορεί να οδηγήσει επίσης στη δημιουργία διϋδρωματικής συλλογής. Επιπλέον, η μείωση της κολλοειδοσμοωτικής πίεσης στη συστηματική κυκλοφορία, όπως στο νεφρωσικό σύνδρομο ή στην ηπατική κίρρωση, έχει ενοχοποιηθεί για τη δημιουργία διϋδρωμάτων, αν και αυτό έχει αμφισβητηθεί δεδομένου της συνύπαρξης

μειωμένης κολλοειδοσμητικής πίεσης και στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Τέλος, διϊδρωματική συλλογή μπορεί να προκύψει ως επιπλοκή περιτοναϊκής συλλογής οποιασδήποτε αιτιολογίας. Πιθανός μηχανισμός είναι η μετακίνηση υγρού από την περιτοναϊκή στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω διαφραγματικών λεμφαγγείων ή μέσω διαφραγματικών ελλειμμάτων λόγω της υφιστάμενης διαφοράς πίεσης μεταξύ των δύο κοιλοτήτων [23].

#### **4.2. Εξιδρώματα**

Εξιδρωματική συλλογή μπορεί να δημιουργηθεί ως αποτέλεσμα παρεμπόδισης της παροχέτευσης πρωτεΐνης και κυττάρων διαμέσω των λεμφαγγείων. Η παρεμπόδιση της λεμφικής παροχέτευσης μπορεί να αφορά στα υπεζωκοτικά λεμφαγγεία, όπως σε απόφραξη αυτών από φλεγμονώδεις ή νεοπλασματικές εξεργασίες του υπεζωκότα, ή στα εξωυπεζωκοτικά λεμφαγγεία, όπως σε υποπλασία του λεμφικού συστήματος ή απόφραξη του θωρακικού πόρου από νεοπλασίες. Η πλειονότητα των εξιδρωμάτων είναι αποτέλεσμα αυξημένης διαπερατότητας των ενδοθηλιακών και μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνεται με δύο κύριους μηχανισμούς: τη δημιουργία νέων οπών (gaps) μεταξύ των κυττάρων και τη δημιουργία διακυττάρων μονοπατιών απορρόφησης μέσω κυστιδίων. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι δυνατό να διαθέτουν κάποιους από τους παραπάνω μηχανισμούς, εφόσον κάποιες από τις ουσίες που είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου έχουν απομονωθεί στα εξιδρώματα. Η προέλευση αυτών των ουσιών μπορεί να είναι εξωυπεζωκοτική ή από το ίδιο το μεσοθήλιο, αφού τα ενεργοποιημένα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ποικιλία κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα [20].



Σε σχέση με το παρελθόν είναι σαφές ότι η δημιουργία των μεσοκυττάρων χασμάτων στη φλεγμονή (intercellular gaps) αποτελεί τόσο ενεργητικό φαινόμενο, που οφείλεται στη σύσπαση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όσο και παθητικό, λόγω ανακατανομής των πρωτεϊνών των διακυτταρικών συνδέσεων της κυτταρικής μεμβράνης [91]. Πολλοί φλεγμονώδεις παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση ή την εντόπιση ή να προκαλέσουν μεταφραστική τροποποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων. Επιπλέον κάποιοι από αυτούς μπορεί να δρουν μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας: ο TGF- $\beta$  αυξάνει τη διαπερατότητα σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της MMP9 [92] και ο TNF- $\alpha$  αυξάνει την παρακυττάρια ροή σε επιθηλιακά κύτταρα νεφρού μέσω της δράσης της MMP9 [93].

## **5. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (Matrix metalloproteinases-MMPs)**

### **5.1. Εισαγωγή**

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (Matrix Metalloproteinases-MMPs) συνιστούν μια υποοικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών, συγκεκριμένα αποτελούν ένζυμα που διαθέτουν ψευδάργυρο στο ενεργό τους κέντρο. Ο κύριος ρόλος των MMPs, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, είναι η υδρόλυση της εξωκυττάριας ουσίας που αφορά σχεδόν όλα τα συστατικά της. Βρίσκονται είτε στον εξωκυττάριο χώρο είτε αγκυροβολημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (MT-Membrane type ή μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεϊνάσες). Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι ορισμένες από τις MMPs, όπως η MMP1, MMP2, και MMP11, βρίσκονται στον ενδοκυττάριο χώρο δρώντας σε πρωτεΐνες του κυτοσολίου [94-96]. Οι περισσότερες

MMPs εκκρίνονται ως ανενεργά ένζυμα (ζυμογόνα ή προένζυμα) και ενεργοποιούνται στον εξωκυττάριο χώρο με την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων (πλασμίνη, ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου κλπ.).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι ένζυμα που δρουν σε ουδέτερο pH. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να παραχθούν σε γενικές γραμμές από καρκινικά κύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα όλων των τύπων, ορισμένα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε ιστούς που βρίσκονται σε σταθερή ήρεμη κατάσταση, η δραστηριότητά τους είναι χαμηλή ενώ σε ιστούς που υφίστανται αναδιαμόρφωση η δραστηριότητά τους αυξάνεται [97]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αναστέλλονται από τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs- Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) και από την α<sub>2</sub>-μακροσφαιρίνη. Υπάρχουν τέσσερις μορφές των TIMPs, καθεμία από τις οποίες συνδέεται μη ομοιοπολικά με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες σε στοιχειομετρία 1:1 και τις αναστέλλει.

Η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται από ίνες (κολλαγόνες, ελαστικές) και από τη θεμέλια ουσία (γλυκοζαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες, προσφυτικές γλυκοπρωτεΐνες) [98]. Βρίσκεται σε μία συνεχή κατάσταση ανανέωσης, ο ρυθμός της οποίας διαφέρει ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες. Η επούλωση των ελκών, η εμβρυογένεση, η φυσιολογική αναδόμηση των ιστών, η οστεοαρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αγγειογένεση, το μεταστατικό δυναμικό των όγκων, η αθηροσκλήρυνση αποτελούν μερικές από τις φυσιολογικές ή παθολογικές διαδικασίες που διαμεσολαβούνται από τις MMPs. Η αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας δεν αποτελεί έργο μοναδικό των MMPs αλλά εμπλέκονται και άλλα ένζυμα όπως οι σερινοπρωτεάσες (πλασμίνη, tPA), οι κυστεΐνοπρωτεάσες, οι ασπαρτυλπρωτεάσες και οι γλυκοσιδάσες [98].

Στον άνθρωπο έχουν ανακαλυφθεί είκοσι τέσσερα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών, στα δε ποντίκια αυτά είναι είκοσι πέντε. Με την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του γενετικού υλικού είναι φανερό ότι η λίστα των ενζύμων έχει συμπληρωθεί. Η πρώτη μεταλλοπρωτεϊνάση, η *Xenopus collagenase* (δεν υπάρχει στον άνθρωπο), ανακαλύφθηκε το 1961 από την ουρά γυρίνου που βρισκόταν σε διαδικασία μεταμόρφωσης [99]. Το τελευταίο μέλος, η επιλυσίνη ή MMP28, ανακαλύφθηκε το 2001.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των μεταλλοπρωτεϊνών δείχνει ότι τα ένζυμα αυτά εξελίχθηκαν νωρίς, πριν το διαχωρισμό των σπονδυλωτών από τα ασπόνδυλα, από ένα ένζυμο με απλούστερη δομή. Μάλιστα η εντεροτοξίνη του *Bacteroides fragilis* διαθέτει χαρακτηριστική αλληλουχία αμινοξέων που συνδέεται με ένα άτομο ψευδαργύρου και η οποία παρουσιάζει ομοιότητα με την αντίστοιχη της MMP1 [100]. Η ηλικία των μεταλλοπρωτεϊνών είναι πολύ παλιά, αν συλλογιστεί κανείς ότι τα βακτήρια εμφανίστηκαν πριν 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια.

Σχετικά με την ονοματολογία των μεταλλοπρωτεϊνών, τα αρχικά μέλη είχαν ονομαστεί περιγραφικά με βάση την ειδικότητα υποστρώματος π.χ κολλαγενάση, τύπου IV ζελατινάση, τύπου V ζελατινάση κλπ. Καθώς όμως ο αριθμός των μελών συνεχώς πλήθαινε και πολλά από τα μέλη εμφάνιζαν παρόμοια ειδικότητα υποστρώματος, προτάθηκε και ίσχυσε η αριθμητική ονοματολογία με βάση τη σειρά ανακάλυψης των ενζύμων [97]. Έτσι σήμερα αριθμούνται είκοσι πέντε μεταλλοπρωτεϊνάσες, MMP1-28, με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες 4, 5, 6 να απουσιάζουν καθώς αποδείχθηκε ότι είναι ίδιες με άλλα ήδη περιγραφόμενα μέλη της οικογένειας. Με βάση τη δομή τους και την ειδικότητα υποστρώματος, οι 24 ανθρώπινες MMPs ταξινομούνται σε 6 κατηγορίες: τις

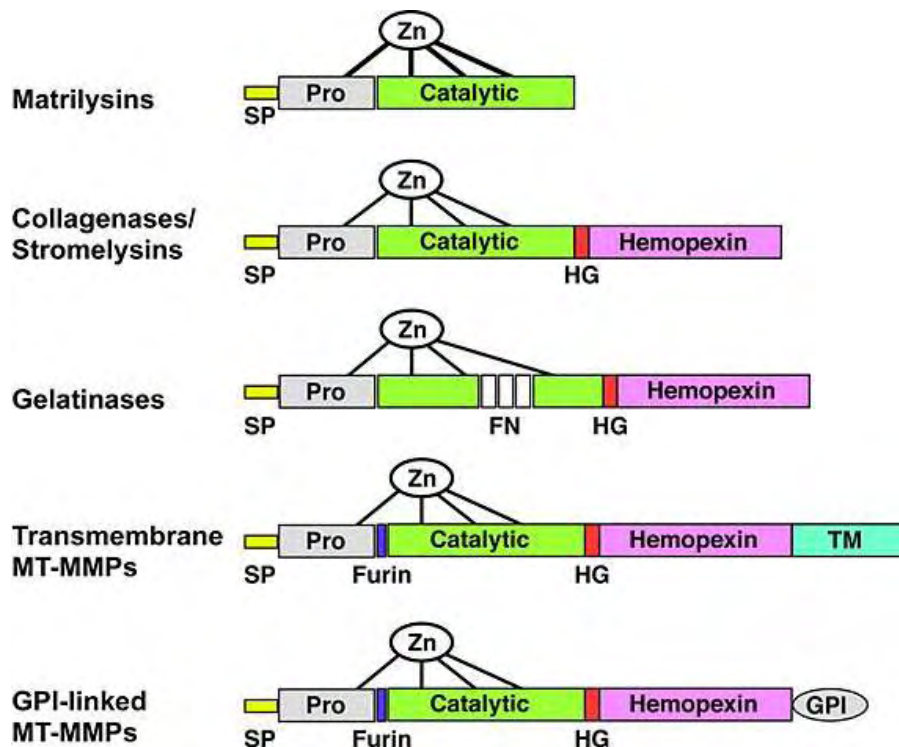
κολλαγενάσες, τις ζελατινάσες, τις ματριλυσίνες, τις στρωμελυσίνες, τις μεμβρανικές μεταλλοπρωτεΐνάσες και όλες τις υπόλοιπες.

## 5.2. Οι δομικές περιοχές των μεταλλοπρωτεϊνών

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες αποτελούνται γενικά από 5 δομικές περιοχές (domains):

- 1) τη σηματοδοτική αλληλουχία (signal peptide). Αποτελείται από είκοσι περίπου αμινοξέα και αποκόπτεται κατά τη μετάφραση στο ενδοπλασματικό δίκτυο.
- 2) το προπεπτίδιο (propeptide). Αποτελείται από 80-90 αμινοξέα. Η λειτουργία του είναι να διατηρεί το ένζυμο σε ανενεργή μορφή μέχρι να δοθεί το σήμα/ερέθισμα για την ενεργοποίησή του. Το προπεπτίδιο περιέχει τον «διακόπτη κυστεΐνης» (“cysteine switch region”), μία συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των ειδών, που διατηρεί τις MMPs σε ανενεργό μορφή μέσω σύνδεσης της Cys με τον  $Zn^{+2}$  του ενεργού κέντρου. Η διαταραχή της αλληλεπίδρασης Cys- $Zn^{+2}$ , είτε με φυσικούς είτε με χημικούς παράγοντες, καταλήγει σε διάσπαση του προπεπτιδίου και πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου.
- 3) την καταλυτική περιοχή (catalytic domain). Αποτελείται από 160-170 αμινοξέα. Διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε ιστιδίνες για τη σύνδεση με τον ψευδάργυρο. Η περιοχή αυτή **HEXXHXXGXXH** είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και οι τρεις ιστιδίνες συνδέουν τον καταλυτικό ψευδάργυρο του ενεργού κέντρου
- 4) τη συνδετική περιοχή (hinge region). Η περιοχή αυτή συνδέει την καταλυτική περιοχή με την περιοχή της αιμοπεξίνης.
- 5) την περιοχή της αιμοπεξίνης ή βιτρονεκτίνης (hemopexin-like or vitronectin-like domain). Η καρβοξυτελική αυτή περιοχή αποτελείται από 200 περίπου αμινοξέα με

τέσσερις επαναλήψεις που εμφανίζουν ομοιότητα με το μόριο της αιμοπεξίνης και της βιτρονεκτίνης. Η εικόνα 4 απεικονίζει τα δομικά τμήματα των μεταλλοπρωτεϊνών.



**Εικόνα 4.** Τα δομικά τμήματα των μεταλλοπρωτεϊνών (Προσαρμοσμένο από το: *MMPs: Role in cardiovascular development and disease Front biosci 2006;11*, σελ. 447-478<sup>[101]</sup>).

### 5.3. Ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών

Η ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί με:

1) Πρωτεόλυση. Αυτή αφορά τις μεταλλοπρωτεϊνάσες που εκκρίνονται ως προένζυμα (proMMPs), δηλαδή στην ανενεργή τους μορφή. Η πλασμίνη είναι ένα πολύ πιθανό ένζυμο που ενεργοποιεί τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί

τουλάχιστον *in vitro* τις proMMP1, proMMP3, proMMP10, proMMP13 [102]. Εν συνεχεία οι ενεργοποιημένες μεταλλοπρωτεϊνάσες συμβάλλουν στη διάσπαση και ενεργοποίηση άλλων ενζύμων. Η πλασμίνη, ή οποιαδήποτε άλλη πρωτεάση, διασπά το προπεπτιδίο σε μια αρχική περιοχή αυτού, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση τμήματος μόνο του προπεπτιδίου. Η απομάκρυνση αυτού του τμήματος οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του υπόλοιπου προπεπτιδίου, συμπεριλαμβανομένου και του δεσμού Cys-Zn<sup>+2</sup>, και στη δημιουργία ενδιάμεσων μορφών των μεταλλοπρωτεϊνάσων που είναι μερικώς μόνο ενεργές. Η πλήρης ενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται με υδρόλυση και του υπόλοιπου προπεπτιδίου από τις ενδιάμεσες ή ενεργές μεταλλοπρωτεϊνάσες [103, 104].

2) Χημικοί παράγοντες. Οξειδωτικές ουσίες όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) μπορεί να ενεργοποιήσει τις proMMPs και η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να συμβαίνει σε συνθήκες φλεγμονής ή ισχαιμίας [105, 106]. Μια υπερβολική όμως αντίδραση είναι σε θέση να απενεργοποιήσει το ένζυμο λόγω τροποποίησης αμινοξέων που είναι σημαντικά για την εκδήλωση καταλυτικής δραστηριότητας [107].

Η ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνάσων *in vitro* μπορεί να γίνει με χημικούς παράγοντες όπως υδραργυρικά παράγωγα (HgCl<sub>2</sub>, APMA-aminophenylmercuric acetate), αντιδραστήρια θειόλης, οξειδωτικές ουσίες. Οι παραπάνω ουσίες αντιδρούν άμεσα με την κυστεΐνη του προπεπτιδίου, αποσταθεροποιούν το δεσμό Cys-Zn<sup>+2</sup> με αποτέλεσμα τη διάσπαση και ενεργοποίηση του ενζύμου. Απορρυπαντικές ουσίες, όπως το SDS (sodium dodecyl sulfate) και χαοτροπικοί παράγοντες ενεργοποιούν επίσης τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, προκαλώντας χωροταξικές μεταβολές στο ένζυμο και αποδιατάσσοντας τη σύνδεση της κυστεΐνης με τον ψευδάργυρο του ενεργού κέντρου.

3) Φυσικοί παράγοντες. Το χαμηλό pH και η υψηλή θερμοκρασία μπορούν να ενεργοποιήσουν τις μεταλλοπρωτεΐνάσες.

#### **5.4. Ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας**

Η ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών γίνεται σε τέσσερα επίπεδα, τα οποία είναι: η μεταγραφική ρύθμιση, η διαμερισματοποίηση, η ενεργοποίηση των ανενεργών μορφών (ζυμογόνων) και η απενεργοποίηση του ενζύμου (εικόνα 5).

##### **1. Μεταγραφική ρύθμιση.**

Αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμονικοί παράγοντες αλλά και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ουσία καθορίζουν την έκφραση των γονιδίων των μεταλλοπρωτεϊνών [108].

##### **2. Διαμερισματοποίηση.**

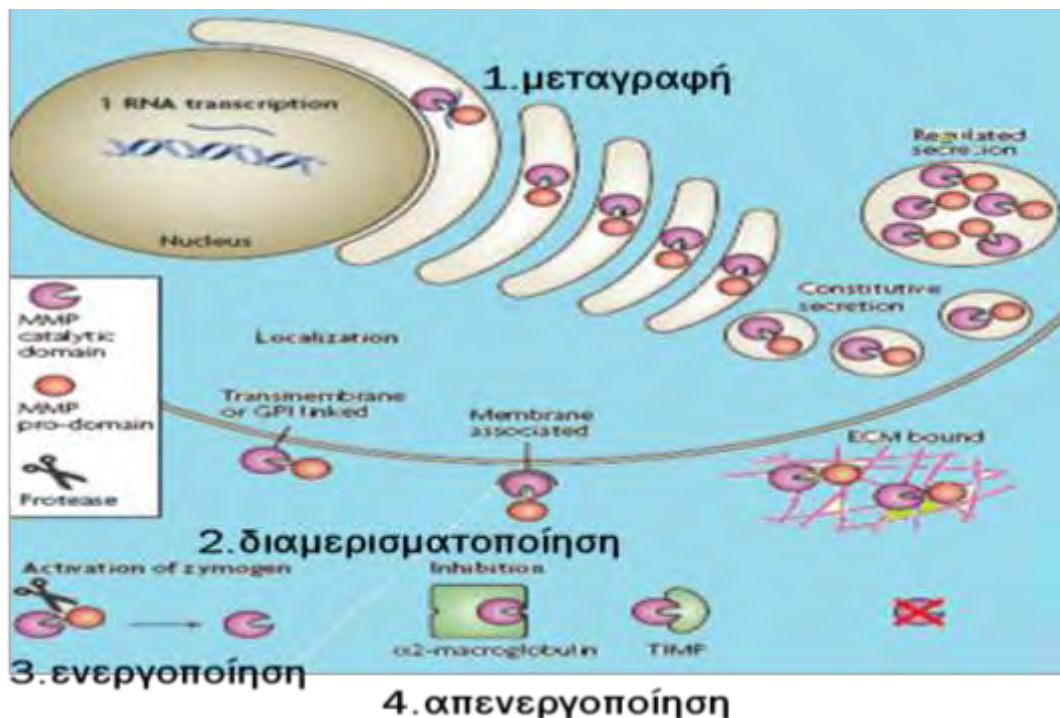
Η διαμερισματοποίηση αναφέρεται στο πού και πώς εκκρίνεται μια μεταλλοπρωτεΐνωση στο περικυττάριο περιβάλλον. Τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται σε συγκεκριμένα διαμερίσματα για να δράσουν σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Μια βασική αρχή είναι ότι τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν αδιάκριτα ένζυμα, όπως είναι οι πρωτεάσες, που διαθέτουν ένα τεράστιο καταστροφικό δυναμικό [109]. Έτσι οι διαμεμβρανικές MMPs εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και στοχεύουν την καταλυτική τους δραστηριότητα σε υποστρώματα του γειτνιάζοντος περιβάλλοντός τους. Αλλά και οι εκκρινόμενες MMPs εκκρίνονται με συγκεκριμένο τρόπο και προσδένονται πολλές φορές σε συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης ή της εξωκυττάριας ουσίας. Έτσι επιτυγχάνεται μια υψηλή τοπική συγκέντρωση του ενζύμου και ρυθμίζεται αποτελεσματικά η δραστηριότητά του.

### 3. Ενεργοποίηση ζυμογόνου.

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των προενζύμων (ζυμογόνων) έχουν ήδη περιγραφεί.

### 4. Απενεργοποίηση ενεργού ενζύμου.

Η απενεργοποίηση των ενεργών μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να γίνει με τη δράση των φυσικών αναστολέων TIMPs και της  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνης. Η ενδοκυττάρωση και η ανακύκλωση των διαμεμβρανικών MMPs ελέγχει επίσης τη δραστηριότητά τους. Όχι μόνο οι διαμεμβρανικές αλλά και άλλες MMPs, όπως η MMP2, 9, 13, ενδοκυττάρωνονται μέσω του LRP υποδοχέα (Lipoprotein Receptor-related Protein) [110, 111]. Τέλος πολλά ένζυμα έχουν τη δυνατότητα αυτοκατάλυσης και αποδόμησης των ενεργών μορφών, όπως συμβαίνει με τη MMP-2 και -9.



**Εικόνα 5.** Ρύθμιση της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών σε τέσσερα επίπεδα: μεταγραφή, διαμερισματοποίηση, ενεργοποίηση και απενεργοποίηση. (Τροποποιημένο από το: *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling Mol cell Biol* 2007;σελ.221-233<sup>[112]</sup> )



## 5.5. Υποστρώματα των μεταλλοπρωτεϊνών-βιολογικές δράσεις

Ιστορικά, όταν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες πρωτοανακαλύφθηκαν θεωρήθηκαν ως ένζυμα με βασική τους λειτουργία την αποδόμηση των δομικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Πράγματι αυτό επαληθεύθηκε και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορούν στο σύνολό τους να υδρολύσουν σχεδόν κάθε πρωτεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο. Η παραπάνω γνώση έχει επεκταθεί κατά πολύ. Η εξωκυττάρια ουσία δε θεωρείται πια ως ένα απλό δίκτυο που παρέχει δομική υποστήριξη στα κύτταρα. Αντίθετα αποτελεί μία «δεξαμενή» βιολογικά δραστικών μορίων, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες TGF- $\beta$ , IGF, VEGF [113]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορούν να δράσουν στο «ρεξερβουάρ» αυτό και να επηρεάσουν ποικιλοτρόπως τις κυτταρικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, τόσο η MMP2 όσο και η MMP9 μπορούν να ελευθερώσουν ενεργό TGF- $\beta$  από την ανενεργό μορφή του που είναι συνδεδεμένη στην εξωκυττάρια ουσία, προωθώντας έτσι την καρκινική διεύθυνση και αγγειογένεση [114]. Οι MMPs μπορούν επίσης να απελευθερώσουν τον IGF από τη δεσμευτική του πρωτεΐνη και με αυτόν τον τρόπο να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [115]. Επιπλέον απελευθερώνουν VEGF από τη σύνδεσή του με τον αυξητικό παράγοντα CTGF (Connective Tissue Growth Factor) και παρέχουν έτσι το έναυσμα για την αγγειογενετική διαδικασία [116]. Η υδρόλυση του πλασμινογόνου από τις MMP3, 7, 9, 12 οδηγεί στην απελευθέρωση θραύσματος παρόμοιου με την αγγειοστατίνη, αποδίδοντας στις MMPs και αντι-αγγειογενετική δράση [117]. Επιπλέον ορισμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας μπορεί να επιδείξουν «κρυπτογενή» βιολογική δραστηριότητα με την πρωτεόλυσή τους. Με άλλα λόγια η διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας μπορεί να απελευθερώσει κλάσματα με διαφορετική βιολογική δραστηριότητα από ότι οι πρόδρομές τους ουσίες. Παραδείγματος χάριν, η διάσπαση της λαμινίνης από

την MMP2 και την MT<sub>1</sub>-MMP προωθεί τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων του μαζικού αδένου [118, 119]. Η διάσπαση του κολλαγόνου I είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και την επαναθηλιοποίηση [120]. Η υδρόλυση της βασικής μεμβράνης από την MMP3 οδηγεί σε απόπτωση των μαζικών επιθηλιακών κυττάρων [121].

Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα υποστρώματα των μεταλλοπρωτεϊνών περιλαμβάνουν όχι μόνο την εξωκυττάρια ουσία αλλά και αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης. Έτσι οι μεταλλοπρωτεΐνες μπορούν να απελευθερώσουν ενεργό TNF-α από το πρόδρομο μόριο που εδράζεται στην κυτταρική επιφάνεια [122] αλλά και να διασπάσουν τον υποδοχέα TNF-α στην κυτταρική επιφάνεια οδηγώντας σε θραύσμα του υποδοχέα που ανταγωνίζεται τη δράση του TNF-α [123]. Η υδρόλυση της E-καδερίνης και του αντιγόνου επιφανείας CD<sub>44</sub> οδηγεί σε αυξημένη διεισδυτική συμπεριφορά [124, 125], η υδρόλυση του υποδοχέα IL-2Rα από την MMP9 μειώνει την κυτταρική ανταπόκριση στην IL-2, η υδρόλυση της IL-1β από τις MMP1, 2, 9 σημαίνει αντιφλεγμονώδη δράση των παραπάνω μεταλλοπρωτεϊνών [126], όπως επίσης και η διάσπαση της χημειοελκτικής πρωτεΐνης MCP-3 (Monocyte Chemoattractant Protein-3) [127]. Έτσι βλέπουμε ότι οι δράσεις των MMPs είναι αρκετά πολύπλοκες και τα ένζυμα αυτά μπορούν να ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η κυτταρική μετανάστευση, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση.

## **5.6. Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών στην παθολογία**

Οι μεταλλοπρωτεΐνες συμμετέχουν στην παθογένεια των παρακάτω καταστάσεων:

### *5.6.1. Παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος*

Η MMP9 έχει ιδιαίτερα ενοχοποιηθεί στην παθογένεια του άσθματος. Αυξημένα επίπεδα MMP9 έχουν βρεθεί στα πτύελα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και στο αίμα ασθματικών ασθενών και τα ουδετερόφιλα θεωρούνται η πηγή προέλευσης αυτών [128]. Η σοβαρότητα του άσθματος μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της και στο σοβαρό άσθμα ανιχνεύονται υψηλότερες τιμές του ενζύμου στα πτύελα και στο αίμα από ότι στο ήπιο άσθμα [129]. Η MMP9 συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου και μελέτες σε knock-out ποντίκια συνηγορούν υπέρ αυτού [130]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες παίζουν ρόλο όχι μόνο στη φλεγμονή του άσθματος αλλά και στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών που συνοδεύει τη φλεγμονή: οι MMP2 και 9 ευθύνονται πιθανότατα για τη διαταραγμένη επιδιόρθωση της εξωκυττάριας ουσίας στο άσθμα και τους επανειλημμένους κύκλους παραγωγής και αποδόμησης αυτής [131].

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της ΧΑΠ (Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια). Ιδιαίτερα η MMP12 (ή μεταλλοελαστάση) πιστεύεται ότι παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην παθογένεια του εμφυσήματος. Η διαγραφή του γονιδίου της MMP12 στα ποντίκια προστατεύει από την ανάπτυξη εμφυσήματος μετά από μακροχρόνια έκθεση στον καπνό του τσιγάρου [132].

### *5.6.2. Κακοήθεις νεοπλασίες*

Η σχέση των μεταλλοπρωτεϊνών με τους διάφορους όγκους έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τη διεθνή βιβλιογραφία. Περισσότερα από 1500 άρθρα σχετικά με το ρόλο των MMPs στον καρκίνο έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία 15 χρόνια. Σύμφωνα με αυτά:

- Οι MMPs ανιχνεύονται σε μεγάλη ποικιλία όγκων. Διαφορετικοί τύποι όγκων δείχνουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των ενζύμων.

- Οι MMP2, 7, 9 και ιδιαίτερα η 14 φαίνεται ότι εκφράζονται στους περισσότερους καρκινικούς όγκους [133].
- Η ποσότητα των MMPs (ενεργού και ανενεργού ενζύμου) είναι σημαντικά υψηλότερη στο μικροπεριβάλλον του όγκου από ότι σε φυσιολογικούς ιστούς.
- Ο αριθμός των διαφορετικών ενζύμων που εκφράζεται σε κάθε όγκο τείνει να αυξηθεί με την πρόοδο του όγκου. Αλλά και τα επίπεδα έκαστης MMPs τείνουν να αυξάνονται με την αύξηση του σταδίου του όγκου [134, 135].
- Αν και η αρχική άποψη ήταν ότι οι MMPs παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, είναι πλέον δεκτό ότι το στρώμα με τις ινοβλάστες και τα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή των μεταλλοπρωτεϊνών [136].

#### *5.6.3. Καρδιαγγειακές παθήσεις*

Οι MMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι MMP1, 2, 3, 9 ανευρίσκονται στην αθηρωματική πλάκα και συμβάλλουν στη ρήξη της [137]. Επιπλέον οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόοδο των ανευρυσμάτων [138], το μυοκαρδιακό έμφραγμα και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα [139, 140].

#### *5.6.4. Ρευματικές παθήσεις*

Η αρθρίτιδα υπήρξε η πρώτη ασθένεια της οποίας η παθογένεια συνδέθηκε με τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών. Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη συμμετοχή των ενζύμων, κυρίως των κολλαγενασών, στην καταστροφή του συνδετικού ιστού που επιτελείται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και οστεοαρθρίτιδα [141, 142].

#### *5.6.5. Παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος*

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες συμμετέχουν στις ισχαιμικές καταστάσεις του εγκεφάλου. Τα επίπεδα των ενεργών ενζύμων MMP2 και MMP9 είναι σημαντικά αυξημένα μετά από εγκεφαλική ισχαιμία [143] τοπικά στον ιστό. Σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η MMP2 έχει ενοχοποιηθεί για την αρχική και γρήγορη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [144, 145] ενώ η MMP9 για την καθυστερημένη-μετά από είκοσι τέσσερις ώρες βλάβη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [146].

#### *5.6.6. Φλεγμονή και ανοσία*

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία είτε ενισχύοντας είτε μειώνοντας την ένταση αυτής. Πολλές από τις δράσεις τους οφείλονται στη διάσπαση χημειοκινών και των υποδοχέων τους ή στη διάσπαση κυτταροκινών και των υποδοχέων τους, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει είτε στην ενεργοποίηση είτε στην απενεργοποίηση των παραπάνω και αυτό με τη σειρά του να επηρεάσει τη διαδικασία της φλεγμονής. Για παράδειγμα, οι MMPs μπορούν να διασπάσουν και τις τέσσερις ανθρώπινες MCPs (Monocyte Chemoattractant Proteins) οδηγώντας σε απενεργοποίησή τους ή ακόμα και στην παραγωγή κλασμάτων με ανταγωνιστική δράση των υποδοχέων [147]. Από την άλλη, μπορούν να δημιουργήσουν χημειοελκτική διαβάθμιση δρώντας σε συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας που οδηγούν σε απελευθέρωση κλασμάτων με χημειοελκτική δράση. Πολλές κυτταροκίνες, όπως IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , VEGF, EGF, FGF, TGF- $\beta$ 1 και ο TNF- $\alpha$  μπορούν είτε να ενεργοποιηθούν είτε να απενεργοποιηθούν από τις μεταλλοπρωτεΐνάσες και έτσι να ενισχύσουν ή να αμβλύνουν τη φλεγμονή [148].

Οι MMPs συμβάλλουν και στη διαδικασία επιδιόρθωσης της βλάβης που ακολουθεί τη φλεγμονή. Έτσι ο τραυματισμός επάγει την έκφραση ποικίλων μεταλλοπρωτεϊνών από τα επιθηλιακά κύτταρα. π.χ της MMP1 για την επούλωση των δερματικών ελκών και της MMP7 για την επανεπιθηλιοποίηση των πνευμόνων και του εντέρου [148]. Η MMP7 συμβάλλει και στην έμφυτη ανοσία γιατί ενεργοποιεί τις ντιφενσίνες ή αμυντίνες (defensins) στο έντερο, πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση, και προστατεύει έτσι από βακτηριδιακή μόλυνση [149].

Μια ιδιαίτερη δράση που έχει αποδοθεί στις μεταλλοπρωτεϊνάσες τα τελευταία χρόνια είναι η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας που συνοδεύει τη φλεγμονή. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν ενοχοποιηθεί για την ισχαιμική βλάβη ιστών όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, το μεσεντέριο, ο νεφρός [150, 151]. Ο μηχανισμός για την αύξηση της διαπερατότητας έχει μελετηθεί κυρίως σε κυτταρικές καλλιέργειες και οι υπάρχουσες ενδείξεις συνηγορούν υπέρ της διάσπασης των πρωτεϊνών των αποφρακτικών συνδέσεων.

## **5.7. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στην υπεζωκοτική κοιλότητα**

### *5.7.1. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στο φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό*

Όπως είναι αναμενόμενο, δεν υπάρχουν μελέτες που να μετρούν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες στο υπεζωκοτικό υγρό υγιών ατόμων. Οι Marshall et al., χρησιμοποιώντας καλλιέργειες μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα, διαπίστωσαν τη συνεχή παραγωγή MMP2 και TIMP1 από τα μεσοθηλιακά κύτταρα υπό βασικές συνθήκες [152]. Η διέγερση με TNF- $\alpha$  και II- $\beta$  οδηγεί σε σημαντική αύξηση στην παραγωγή της MMP1 και MMP9 ενώ αυξάνει σε μέτριο μόνο βαθμό την έκκριση

TIMP1. Η συνεχής έκκριση της MMP2 από τα μεσοθηλιακά κύτταρα επιβεβαιώθηκε και από μεταγενέστερες μελέτες [153, 154].

#### *5.7.2. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στις υπεζωκοτικές συλλογές*

Τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών έχουν μετρηθεί κατά καιρούς στις διάφορες υπεζωκοτικές συλλογές. Οι Hurewitz και συν. [155] διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα των MMP2 και MMP9 και στα τρία είδη συλλογών που μελέτησαν (διϊδρωματικές, παρανεοπλασματικές, παραπνευμονικές). Με δοκιμασίες υποστρώματος έδειξαν ότι τόσο σε διϊδρώματα όσο και σε εξιδρώματα η δραστηριότητα των ενζύμων είναι παρόμοια. Οι Eickelberg και συν. [154] υποστήριξαν ότι τόσο σε διϊδρωματικές όσο και σε εξιδρωματικές συλλογές ανιχνεύονται οι MMP1, MMP2 και TIMP-1, στοιχείο που συνυγορεί υπέρ της συνεχούς έκφρασής τους από τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Η MMP9 ανιχνεύεται κυρίως σε εξιδρώματα (και μόνο στο 20% των διϊδρωμάτων) και μάλιστα η αύξησή της είναι μεγαλύτερη σε παρανεοπλασματικές σε σχέση με παραπνευμονικές συλλογές. Στη μελέτη αυτή ανιχνεύθηκε η ενεργή ισομορφή της MMP2 στις παρανεοπλασματικές και παραπνευμονικές συλλογές, όχι όμως σε διϊδρώματα. Αντίθετα, ενεργή MMP9 δεν ανιχνεύθηκε σε κανενός είδος συλλογή. Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της MMP9 και του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων στο υπεζωκοτικό υγρό, για αυτό οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η MMP9 στις υπεζωκοτικές συλλογές παράγεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα μετά από διέγερσή τους. Μάλιστα οι συγγραφείς πρότειναν τη διαγνωστική αξία του λόγου των συγκεντρώσεων των MMPs στο υπεζωκοτικό υγρό (MMP2/MMP9 υπεζωκοτικού υγρού) στη διαφορική διάγνωση των διϊδρωματικών από τις παρανεοπλασματικές και παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές. Οι Iglesias και συν. [153] μέτρησαν τα

επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό με ELISA. Βρήκαν υψηλά επίπεδα των MMP2 και TIMP-1 σε όλες τις υπεζωκοτικές συλλογές, στοιχείο συνηγορητικό υπέρ της συνεχούς έκφρασής τους από τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Η MMP2 ήταν υψηλότερη σε εξιδρώματα σε σχέση με τα διϊδρώματα, ίσως λόγω της παραγωγής της από μακροφάγα κύτταρα. Οι MMP1, MMP8 και MMP9 βρέθηκαν σε υψηλές τιμές μόνο στα εξιδρώματα και μάλιστα κυρίως στην κατηγορία των εμπυημάτων/επιπλεγμένων παραπνευμονικών συλλογών. Υποστήριξαν ότι η MMP1 παράγεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα κατόπιν διέγερσής τους, ενώ η MMP8 και 9 απελευθερώνονται από τα ουδετεροφιλικά κοκκία. Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη [156], στις φυματιώδεις συλλογές τα επίπεδα της MMP9 ξεπερνούν εκείνα των παραπνευμονικών συλλογών και τα επιθηλιοειδή μακροφάγα ευθύνονται για την σύνθεσή της. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν αυξημένα επίπεδα MMP2 και MMP9 σε υπεζωκοτικές συλλογές φυματιώδους και κακοήθους αιτιολογίας [157].

## **5.8. Αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών**

### *5.8.1. Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs)*

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αναστέλλονται από τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs-Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Υπάρχουν τέσσερις μορφές των TIMPs (TIMP1-4), καθεμία από τις οποίες συνδέεται μη ομοιοπολικά με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες σε στοιχειομετρία 1:1. Σε ποικίλλες παθήσεις, όπως ο καρκίνος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η περιοδοντίτιδα, έχει βρεθεί μία ανισορροπία στη σχέση MMPs και TIMPs με αποτέλεσμα την υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη δραστηριότητα των MMPs [158]. Ο TIMP-1 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με



MB 30 Kda. Έχει βρεθεί ότι παράγεται από πολλά διαφορετικά κύτταρα σε ιστούς και κυτταρικές καλλιέργειες, όπως ινοβλάστες, κύτταρα αρθρικού χόνδρου, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, αιμοπετάλια και μακροφάγα [159]. Ο TIMP-1 έχει βρεθεί σχεδόν σε κάθε ανθρώπινο σωματικό υγρό και φαίνεται ότι αποτελεί μία πρωτεΐνη με ευρεία κατανομή και θεμελιώδη σημασία στον άνθρωπο [160]. Τα ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα παράγουν υπό φυσιολογικές συνθήκες μικρές ποσότητες TIMP-1 αλλά κατόπιν διέγερσής τους με τις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1β η παραγωγή και έκκριση TIMP-1 στην υπεζωκοτική κοιλότητα αυξάνεται [152, 153]. Αναστέλλει όλες τις MMPs, εκτός από τις διαμεμβρανικές MMPs (MT-MMPs). Επίσης αναστέλλει την MMP1 δύο φορές πιο αποτελεσματικά από ότι TIMP-2 [158]. Ο TIMP-2 ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα στα εξιδρώματα ενώ τα επίπεδά του στα διύδρωματα είναι ακόμη χαμηλότερα και πολλές φορές μη ανιχνεύσιμα [154]. Τα επίπεδα TIMP-2 είναι πολύ χαμηλότερα από εκείνα του TIMP-1 σε αντίστοιχα είδη υπεζωκοτικών συλλογών [153]. Αναστέλλει την MMP2 και MMP9 2-9 φορές πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τον TIMP-1 [161]. Ο TIMP-3 συνδέεται ισχυρά με την εξωκυττάρια ουσία ενώ ο TIMP-4 ρυθμίζεται αυστηρά και η παρουσία του περιορίζεται στο νευρωνικό ιστό, στους όρχεις και ωοθήκες, στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες [162]. Η εφαρμογή των TIMPs σαν θεραπευτικό εργαλείο στα καρδιαγγειακά νοσήματα και στις νεοπλασίες είτε μέσω γονιδιακής θεραπείας είτε μέσω χορήγησης της πρωτεΐνης βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο [163]. Παρ'όλα αυτά είναι πολλά υποσχόμενη, κυρίως εξαιτίας της αποτυχίας των συνθετικών αναστολέων στην εφαρμογή τους σε κλινικές μελέτες.

#### *5.8.2. Συνθετικοί αναστολείς*

Οι πρώτοι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών που κατασκευάστηκαν (πρώτης γενεάς ή πεπτιδικοί αναστολείς) αποτελούνταν από έναν πεπτιδικό σκελετό, με αλληλουχία αμινοξέων τέτοια ώστε να αναγνωρίζεται από την μεταλλοπρωτεΐνάση-στόχο και έναν χηλικό παράγοντα, ο οποίος μπορούσε να δεσμεύσει τον ψευδάργυρο του ενεργού κέντρου. Οι δεύτερης γενεάς ή μη πεπτιδικοί αναστολείς σχεδιάστηκαν για να βελτιώσουν τα μειονεκτήματα των αναστολέων της πρώτης γενεάς που ήταν το ευρύ φάσμα δράσης τους αλλά και η μη ευνοϊκή φαρμακοκινητικής τους (φτωχή απορρόφηση από το στόμα, γρήγορη κάθαρση). Αποτελούν κατά κύριο λόγο μη πεπτιδικά παράγωγα συνδεδεμένα με υδροξυαμικό οξύ και σχεδιάστηκαν με βάση τη γνώση της καταλυτικής περιοχής της μεταλλοπρωτεΐνάσης-στόχου είτε με κρυσταλλογραφία X είτε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR-Nuclear Magnetic Resonance). Άλλες κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών είναι οι τετρακυκλίνες και τα διφωσφονικά [164]. Οι χημικά τροποποιημένες τετρακυκλίνες μπορούν όχι μόνο να δεσμεύουν τον ψευδάργυρο αλλά να μειώνουν και την έκφρασή τους. Η δοξυκυκλίνη (εμπορική ονομασία Periostat) είναι το μόνο φάρμακο που έχει λάβει έγκριση από τον FDA και χρησιμοποιείται στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής για τη θεραπεία της περιοδοντίτιδας. Οι δόσεις που χρησιμοποιούνται είναι μικρότερες από αυτές για την επίτευξη αντιμικροβιακού αποτελέσματος και δεν αναφέρονται ανεπιθύμητες ενέργειες.

Τα αποτελέσματα από τις κλινικές μελέτες με τους αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών ήταν αποθαρρυντικά. Πολλοί λόγοι ευθύνονται για την αποτυχία αυτή με κυριότερο το μεγάλο αριθμό των μεταλλοπρωτεϊνών που μπορούσε να αναστείλει κάθε ουσία (ευρέως φάσματος αναστολείς). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή μεταλλοπρωτεϊνών με ευνοϊκή επίδραση στην πρόοδο του καρκίνου,

δηλαδή με αντι-καρκινική δράση. Αλλά και η εμφάνιση παρενεργειών δυσχέραινε σημαντικά την πρόοδο των κλινικών μελετών. Η σημαντικότερη από αυτές ήταν η εμφάνιση ενός μυοσκελετικού συνδρόμου με πόνο, ερύθημα, τενοντίτιδα που δεν απαντούσε στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και ήταν δοσο- και χρονο- εξαρτώμενο [165]. Η ανάγκη για μακροχρόνια χορήγηση των αναστολέων καθιστούσε την παρενέργεια αυτή καθώς και άλλες μη ανεκτές. Τέλος, ο σχεδιασμός των κλινικών μελετών δεν ήταν ιδανικός. Πολλές φορές μάλιστα λόγω της δυσκολίας στην οργάνωση μελετών φάσης II πραγματοποιήθηκαν απευθείας μεικτές μελέτες II/III [165]. Ένα άλλο πρόβλημα στις κλινικές μελέτες ήταν η συμμετοχή σε αυτές ασθενών με πολύ προχωρημένο στάδιο της νόσου. Η προσεκτική ανάλυση υποομάδων ασθενών που συμμετείχαν σε κλινικές μελέτες αποκάλυψε ότι οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να είναι ωφέλιμοι σε πρωιμότερα στάδια της νόσου [166].

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.1. Επιλογή ουσιών και συγκεντρώσεων για τη μελέτη της επίδρασής τους στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες οι οποίες επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι MMPs 1, 2 και 9 επειδή αυτές έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στις εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές. Επιλέχθηκαν με βάση τα μετρηθέντα επίπεδα στις υπεζωκοτικές συλλογές τέσσερις συγκεντρώσεις για τη μελέτη της επίδρασής τους στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου: 0,1, 1, 10 και 20 ng/ml.

Τα ένζυμα MMP2 και MMP9 (Calbiochem, California, USA) αγοράστηκαν σε ενεργή μορφή σε αρχική συγκέντρωση 0,1 mg/ml και η αραίωσή τους σε μικρότερες συγκεντρώσεις έγινε με διαλύτη που περιείχε 50 mM HEPES, 10mM CaCl<sub>2</sub> και 0,005% BRIJ-35. Αντίθετα, η MMP1 (Sigma-Aldrich, Germany), λόγω μη υπαρκτής της σε ενεργή μορφή, παραγγέλθηκε σε ανενεργή μορφή (ζυμογόνο) και υπέστη επεξεργασία με την ουσία AminoPhenylMercuricAcetate (APMA) για την ενεργοποίησή της. Η ουσία APMA αποτελεί ένα υδραργυρικό παράγωγο και έχει χρησιμοποιηθεί από τα ερευνητικά εργαστήρια για την *in vitro* ενεργοποίηση των MMPs. Η διαδικασία της ενεργοποίησης της MMP1 βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Stricklin και συν. [167] και είχε ως εξής: η MMP1 επώαστηκε με APMA 1mM σε αναλογία 1:10 (APMA:προένζυμο) για 1 ώρα στου 37 °C. Η συγκέντρωση 1mM APMA έχει βρεθεί πως είναι η βέλτιστη για την ενεργοποίηση των MMPs και ότι η 1 ώρα επαρκεί για την πλήρη ενεργοποίηση της MMP1 [167]. Η αρχική συγκέντρωση της

MMP1 ήταν 0,2 mg/ml και ακολούθησε αραίωσή της σε μικρότερες συγκεντρώσεις με τη χρήση διαλύτη 25 mM MES.

Ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών-2 (TIMP-2) είναι 2-10 φορές πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τον TIMP-1 στην αναστολή των ενζύμων MMP2 και MMP9 και αυτός είναι ο λόγος που επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων [168]. Η χρήση του TIMP-2 έγινε για να επιβεβαιωθεί η ειδική δράση των MMPs στην αντίσταση του υπεζωκότα.

Η αμιλορίδη αποτελεί ένα υδρόφοβο θετικά φορτισμένο μόριο που αναστέλλει αντιστρεπτά τον επιθηλιακό διάυλο νατρίου ENaC αποφράσσοντας την είσοδο του πόρου του [69]. Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση στην παρούσα μελέτη είναι  $10^{-4}$  M με σκοπό τη μέτρηση του ρεύματος που είναι ευαίσθητο στην αμιλορίδη. Η χρήση της αμιλορίδης έγινε στην παρούσα μελέτη για τη διερεύνηση του ρεύματος που είναι ευαίσθητο στην αμιλορίδη, δηλαδή για τη διερεύνηση του ρεύματος που διέρχεται από τον επιθηλιακό διάυλο νατρίου (ENaC).

## **1.2. Συλλογή και προετοιμασία ιστού**

Χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα από ενήλικα θηλυκά πρόβατα. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο σφαγείο αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου (χρόνος απομόνωσης λιγότερο από 1 λεπτό). Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποκολλήθηκε προσεκτικά από το θωρακικό τοίχωμα των ζώων ενώ κομμάτια πνεύμονα μεταφέρθηκαν αυτούσια στο εργαστήριο. Ο ιστός τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM), στους  $4^{\circ}\text{C}$  και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών από το θάνατο του ζώου. Μέριμνα ελήφθη ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης να υποστεί όσο το δυνατό

λιγότερους χειρισμούς. Τα τμήματα του υπεζωκότα διατηρήθηκαν σε διάλυμα Krebs-Ringer, του οποίου η σύνθεση (σε Mm) ήταν: 117,5 NaCl, 1,15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24,99 NaHCO<sub>3</sub>, 5,65 KCl, 1,18MgSO<sub>4</sub>, 2,52 CaCl<sub>2</sub>, και 5.55 γλυκόζη. Ο υπεζωκότας μπορούσε να διατηρηθεί σε διάλυμα Krebs-Ringer στους 4°C έτσι ώστε από ένα μόνο ζώο να γίνουν πολλά πειράματα.

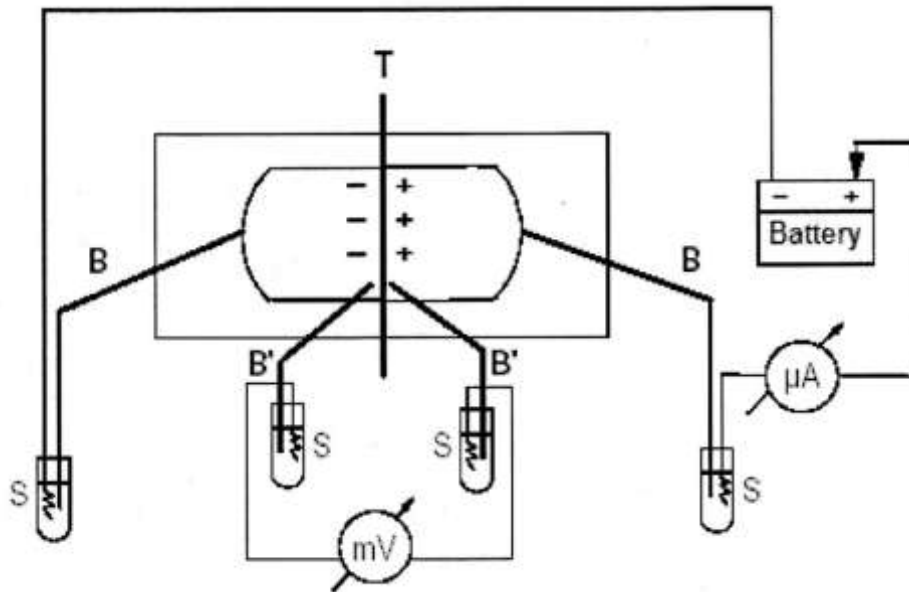
Τμήματα πνευμονικού υπεζωκότα αποκολλήθηκαν προσεκτικά από τον υποκείμενο ιστό και εξετάστηκαν οπτικά για την ύπαρξη οπών ή εναπομείναντος προσκολλημένου πνευμονικού ιστού. Η απομόνωση του τοιχωματικού υπεζωκότα πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και για τον πνευμονικό υπεζωκότα.

### **1.3. Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη της επίδρασης των MMPs στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου**

#### *1.3.1. Μελέτη διαπερατότητας βιολογικών μεμβρανών-Μέθοδος Ussing System*

Η μέθοδος Ussing System αποτελεί μία κλασική μέθοδο για τη μελέτη της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Ο θάλαμος σχεδιάστηκε αρχικά από το Γερμανό Hans Ussing για να μελετήσει τη μεταφορά ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχων [169]. Σήμερα η μέθοδος αυτή έχει τύχει μεγάλης εφαρμογής όχι μόνο για τη μελέτη της διαπερατότητας των ιστών αλλά και κυτταρικών στρωμάτων. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου φαίνεται στο σχήμα 2. Ο ιστός (T) είναι τοποθετημένος σαν επίπεδο στρώμα σε μία αντλία και εκατέρωθεν αυτού υπάρχει διάλυμα Krebs-Ringer. Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού μετράται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (B', B'') που το καθένα απέχει 3mm από την επιφάνεια του ιστού. Το δυναμικό καταγράφεται σε ένα βολτόμετρο (mV). Με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) και

ενός διαιρητή τάσης ( $\mu\text{A}$ ), ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B, B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm ένα από την επιφάνεια του ιστού.



**Σχήμα 2.** Διάγραμμα της συσκευής *Ussing System*. **B**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (**S**) για τη χορήγηση ρεύματος. **B'**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (**S**) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. **mV**: μιλιβολτόμετρο  **$\mu\text{A}$** : μικροαμπερόμετρο. **Battery**: μπαταρία **T**: ιστός. (Προσαρμοσμένο από: *Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: ussing-type chamber experiments* *Artif Organs* 2005<sup>[170]</sup> )

Με τη διάταξη αυτή μπορούν να υπολογιστούν διάφορες παράμετροι ενός ιστού, όπως η αντίσταση ( $R$ ), το ρεύμα ( $I$ ) και η τάση ( $V$ ). Η αντίσταση δίνεται από τον τύπο:  $R = \rho \cdot l / A$ , όπου  $R$  είναι η ωμική αντίσταση του ιστού,  $\rho$  η ειδική αντίσταση που οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή,  $l$  το πάχος του υλικού και  $A$  το εμβαδό της περιοχής που μετράται. Είναι σαφές από τα παραπάνω ότι όταν διατηρούνται



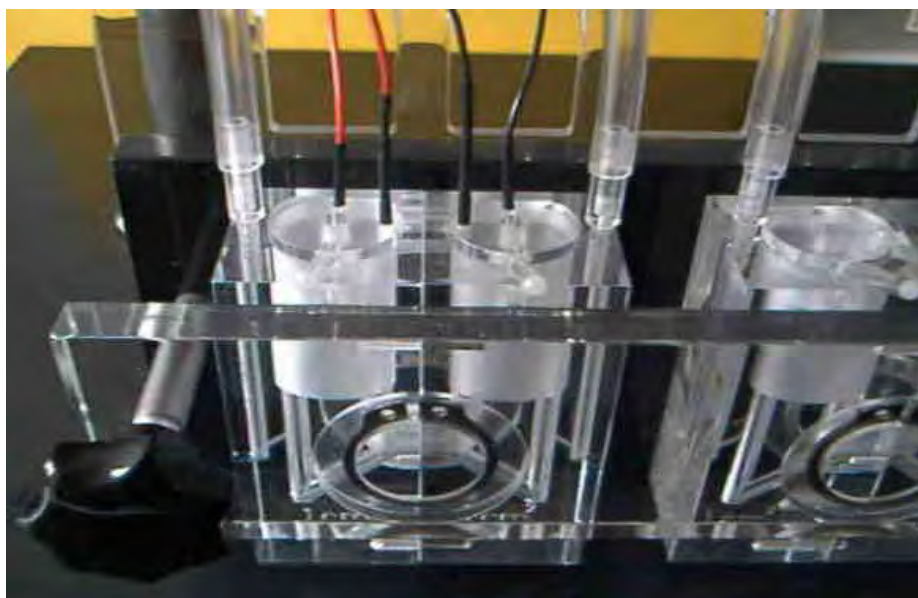
σταθερά τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του υλικού  $I$  και  $A$ , η ωμική αντίσταση που εμφανίζει οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, και ως εκ τούτου αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής [171]. Σύμφωνα με το νόμο του Ohm, η αντίσταση υπολογίζεται με τον τύπο:  $R=\Delta V/\Delta I$ . Ο απλούστερος τρόπος για τη μέτρηση αντίστασης στον ιστό, είναι η εφαρμογή συγκεκριμένης τάσης κατά μήκος της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος σε αυτήν. Το αμπερόμετρο μετράει το ρεύμα και η τεχνική αυτή ονομάζεται *Σύνδεση Τάσης/δυναμικού* (Voltage Clamp). Μια παραλλαγή της σύνδεσης δυναμικού είναι η μέτρηση του *ρεύματος κλειστού κυκλώματος* ( $I_{sc}$ ), κατά το οποίο ο ιστός βραχυκυκλώνεται, δηλαδή η τάση στον ιστό ρυθμίζεται να είναι μηδενική ( $V=0$ ). Πολλά εργαστήρια μετρούν κατά προτίμηση το ρεύμα κλειστού κυκλώματος επειδή πιστεύουν ότι η ροή των ιόντων στο χρόνο αντανακλά ακριβέστερα την απορροφητική ή εκκριτική λειτουργία του ιστού. Παρόλα αυτά η μέτρηση αυτή παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η μετακίνηση ηλεκτρολυτών του κυτταροπλάσματος κατά τη φορά της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού και η καταπόνηση του ιστού ως αποτέλεσμα της συνεχούς εφαρμογής ρεύματος σε αυτόν. Ένας άλλος τρόπος μέτρησης είναι η εφαρμογή ρεύματος συγκεκριμένης έντασης και ισχύος ανά συγκεκριμένα διαστήματα από την πηγή ρεύματος. Το βολτόμετρο μετράει την τάση στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή και με βάση το νόμο του Ohm υπολογίζεται η αντίσταση (*μέτρηση ανοικτού κυκλώματος*).

### *1.3.2. Μέτρηση διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος*

Ο ιστός τοποθετήθηκε ως επίπεδο στρώμα μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (Dipl. –Ing. K. Mussler, Scientific Instruments, Aachen, Germany) οι

οποίοι περιείχαν από 4 ml Krebs (εικόνα 6). Αυτό εξασφαλίζει την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, ενώ συνεχώς διοχετεύονταν στον κάθε ημιθάλαμο αέριο σύστασης 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Η επιφάνεια του εκτεθειμένου στο υγρό ιστό ήταν 1 cm<sup>2</sup>. Λόγω του ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων εξαρτάται από τη θερμοκρασία όπως επίσης και η δραστηριότητα των MMPs, οι μετρήσεις της διαμεσοθηλιακής αντίστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37°C.

Η διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ), εκφραζόμενη σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl, το καθένα εκ των οποίων ήταν τοποθετημένο σε απόσταση 3 mm εκατέρωθεν της μεμβράνης, σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες γινόταν μέτρηση της  $R_{TM}$  κάθε ένα λεπτό μετά από τη χορήγηση συνεχούς ρεύματος έντασης 50  $\mu\text{A}$  και διάρκειας 200 msec με τη βοήθεια ζεύγους ηλεκτροδίων που βρίσκονταν τοποθετημένα σε απόσταση 3 cm εκατέρωθεν της μεμβράνης.



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

Μπορούσαν να πραγματοποιηθούν παράλληλα μέχρι και 6 πειράματα κάθε φορά σε αντίστοιχους θαλάμους και η καταγραφή γινόταν μέσω λογισμικού σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Clamp Version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany). Πριν την τοποθέτηση του ιστού είχε υπολογισθεί από το σύστημα η αντίσταση του υγρού και η τάση στα ηλεκτρόδια και αυτά αφαιρούνταν αυτόματα κατά τη μέτρηση  $R_{TM}$  του ιστού. Μετά την τοποθέτηση του ιστού ακολουθούσε μία περίοδος ηρεμίας από 10 έως 40 λεπτά για τη σταθεροποίηση των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων και ακολουθούσε η προσθήκη της μελετώμενης MMPs ή του TIMP2.

Η επιφάνεια του υπεζωκότα που πρόσκειται στη βασική μεμβράνη του ιστού αναφέρεται ως πλαγιοβασική επιφάνεια ενώ αυτή που αντικρίζει την υπεζωκοτική κοιλότητα αναφέρεται ως κορυφαία επιφάνεια. Οι MMPs και ο TIMP2 προστέθηκαν τόσο στην κορυφαία όσο και στην βασικοπλάγια επιφάνεια του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα και οι ηλεκτρικοί παράμετροι καταγράφηκαν για διάστημα 40 λεπτών (στα λεπτά 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40). Οι μεταβολές στην αντίσταση ( $R_{TM}$ ) εκφράστηκαν ως επί % μεταβολή από την αρχική τιμή ( $\Delta R_{TM}$ ). Όλες οι τιμές που παρουσιάζονται αποτελούν μέσους όρους τουλάχιστον έξι πειραμάτων ( $n=6$ ).

### *1.3.3. Μέτρηση ευαίσθητου στην αμιλορίδη ρεύματος σε συνθήκες κλειστού κυκλώματος*

Προκειμένου να εξετασθεί η επίδραση των MMPs στη λειτουργία του ENaC πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με την τεχνική Ussing σε κλειστό κύκλωμα, δηλαδή η τάση στον ιστό ρυθμίστηκε να είναι μηδενική ( $V=0$ ). Κάθε 6 δευτερόλεπτα η τάση μεταβαλλόταν σε τιμές διαφορετικές από το 0 έτσι ώστε να μπορεί να υπολογισθεί η αντίσταση. Τμήματα τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα επεξεργάστηκαν όπως

περιγράφηκε προηγουμένως και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους Ussing. Μετά την απόκτηση σταθερής τιμής ρεύματος κλειστού κυκλώματος (Isc), προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline- PBS) για τα πειράματα ελέγχου (control) ή MMP2 ή MMP9 σε συγκεντρώσεις 0,1 ng/ml και 20 ng/ml. Πειράματα στη βασικοπλάγια επιφάνεια του τοιχωματικού και σπλαχνικού υπεζωκότα δεν πραγματοποιήθηκαν επειδή ο ENaC εντοπίζεται μόνο στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων όπως έχει δείχθει από παλιότερες μελέτες [57, 60]. Μετά από επώαση της μεμβράνης με το PBS ή το ένζυμο διάρκειας 40 λεπτών, προστέθηκε σε όλα τα πειράματα αμιλορίδη σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M στην κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης με σκοπό τον υπολογισμό του ρεύματος (Isc) που αποδίδεται στη δραστηριότητα του ENaC. Το ρεύμα αυτό ορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ των τιμών του Isc ακριβώς πριν την προσθήκη αμιλορίδης και 5 λεπτά αργότερα. Η ίδια τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί και σε παλιότερες μελέτες για τον υπολογισμό του ευαίσθητου στην αμιλορίδη ρεύματος (Isc amiloride-sensitive) [80, 172]. Ακολούθησε σύγκριση του ευαίσθητου στην αμιλορίδη ρεύματος μεταξύ πειραμάτων control και πειραμάτων στα οποία ο υπεζωκότας επώαστηκε με MMP2 ή MMP9.

Οι Nie και συν. μελέτησαν την ευαισθησία του ρεύματος Isc στην αμιλορίδη σε τμήματα τοιχωματικού υπεζωκότα ποντικού και προσδιόρισαν την τιμή  $IC_{50}$  στα 133  $\mu$ M. Παρόμοια συγκέντρωση επιλέχθηκε και για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης ( $10^{-4}$ M), αφού η συγκέντρωση αυτή είναι αρκετά μικρή έτσι ώστε να αναστέλλεται μόνο ο ENaC και να μην προκύπτουν μη ειδικές δράσεις. Η ουσία Dimethyl Sulfoxide (DMSO) χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της αμιλορίδης και για αυτό εξετάστηκε εάν μπορεί να επηρεάσει το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα.

#### **1.4. Προετοιμασία κυτταρικών καλλιιεργειών**

Πρωτογενείς καλλιέργειες από μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου ετοιμάστηκαν σύμφωνα με την εργασία της Stylianou και συν [173]. Σύντομα, τμήματα από ακέραιο σπλαχνικό υπεζωκότα προβάτου ετοιμάστηκαν αμέσως μετά το θάνατο του ζώου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες και κομμάτια περίπου 6 τ.εκ. τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα M199, που περιείχε επιπρόσθετα 10% βόειο εμβρυικό ορό, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε πάγο στο εργαστήριο, ξεπλύθηκε με PBS και υπεβλήθη σε ενζυματική αποδόμηση. Το δείγμα επώαστηκε για 20 λεπτά στους 37°C στο διάλυμα αποδόμησης που περιείχε 0,125% τρυψίνη, 0,01% EDTA and 0,1% γλυκόζη σε διάλυμα PBS. Μετά την επώαση ο υπεζωκότας απορρίφθηκε και το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 100 χιλ στροφές για πέντε λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που προέκυψε απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 ml ίδιου θρεπτικού μέσου και τοποθετήθηκε σε φλάσκα 25 τ.εκ. Αλλαγή στο θρεπτικό μέσο γινόταν κάθε 3 ή 4 ημέρες. Καλλιέργειες οι οποίες επιμολύνθηκαν με ατρακτόμορφα κύτταρα, τα οποία πιθανόν αντιπροσώπευαν ινοβλάστες, δε χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Η ανάπτυξη συνέχειας των κυτταρικών καλλιιεργειών θεωρήθηκε προϋπόθεση για την πειραματική τους χρήση. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης μετά το πρώτο ή δεύτερο σπάσιμο.

#### **1.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τη μελέτη της εντόπισης της οκκλουδίνης και κλαουδίνης**

Μεσοθηλιακά κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, οι οποίες είχαν προηγουμένως επικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη. Τα κύτταρα ανέπτυξαν συνοχή

μετά από περίπου επτά ημέρες. Μετά από δύο διαδοχικά πλυσίματα των καλυπτριδών με PBS, τα κύτταρα επώαστηκαν με MMP2 ή MMP9, διαλυμένες σε θρεπτικό υλικό που δεν περιείχε ορό (ο ορός περιέχει αναστολείς και ουσίες που θα μπορούσαν να απενεργοποιήσουν τις MMPs), σε συγκέντρωση 10 µg/ml για 1 ώρα στους 37°C και εν συνεχεία μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σαν control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επώαστηκαν με MMPs αλλά μόνο με θρεπτικό μέσο ελεύθερο ορού. Αφού ξεπλύθηκαν με PBS, τα κύτταρα κατέστησαν διαπερατά με επώαση με 1% Triton X-100 σε PBS για 15 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με PBS και εν συνεχεία τοποθέτησή τους σε διάλυμα μπλοκαρίσματος, το οποίο περιείχε 3% BSA και 0,1% Tween-20 σε PBS, για 16 ώρες. Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της οκκλουδίνης (αραίωση 1:50, Zymed Laboratory, San Fransisco, USA) και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κλαουδίνης-1 (αραίωση 1:50, Zymed Laboratory, San Fransisco, USA). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με 1% BSA/0.1% Tween-20/PBS και επώαστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα κουνελιού συζευγμένο με CY3 για την οκκλουδίνη (αραίωση 1:50) και συζευγμένο με FITC για την κλαουδίνη (αραίωση 1:50) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος στις καλυπτρίδες τοποθετήθηκε Vectahield με DAPI. Τραβήχτηκαν φωτογραφίες με κάμερα Leica DFC48 (LAS software version V2.3.1R1), η οποία ήταν συνδεδεμένη με μικροσκόπιο Axioscope 40 Zeiss.

## **1.6. Ανοσοαποτύπωση για τη μελέτη της έκφρασης της οκκλουδίνης και κλαουδίνης**

Μεσοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα και από αυτά αποκτήθηκε κυτταρικό εκχύλισμα, όπως έχει περιγραφεί από τους Giebel και συν [174]. Σύντομα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο διάλυμα PBS και ακολούθησε ζύσιμο των πιάτων με 200 µl διάλυμα λύσης (0.1% Triton X-100 σε 100Mm διάλυμα PO<sub>4</sub>). Το κυτταρικό εκχύλισμα επώαστηκε για 30 λεπτά σε πάγο και υπεβλήθη σε φυγοκέντρηση στις 100 χιλ στροφές για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα απορρίφθηκε και το υπερκείμενο διαχωρίστηκε σε τέσσερα ισομεγέθη τμήματα όγκου 20 µl έκαστο. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford και καθένα από τα παραπάνω τμήματα περιείχε 15 µg πρωτεΐνης. Δύο τμήματα χρησιμοποιήθηκαν σαν control και το ένα από αυτά επώαστηκε στους 37°C για μία ώρα. Στα υπόλοιπα τμήματα προστέθηκε MMP2 ή MMP9 σε συγκέντρωση 5 µg/ml και επώαστηκαν στους 37°C για μία ώρα. Στο τέλος της περιόδου επώασης προστέθηκε SDS σε όλα τα τμήματα και ακολούθησε ο βρασμός τους στους 95°C για 3 λεπτά. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 10% για ηλεκτροφόρηση και εν συνεχεία έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ποιότητα της μεταφοράς ελέγχθηκε με χρώση Ponceau. Ακολούθησε μπλοκάρισμα της μεμβράνης με 5% γάλα σε PBS-Tween-20 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα (πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της οκκλουδίνης και της κλαουδίνης σε αραιώση 1:250) για 16 ώρες στους 4°C. Μετά από τρία πλυσίματα με PBS-Tween-20, η μεμβράνη επώαστηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με δευτερογενές αντίσωμα κουνελιού συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:3000. Οι ανοσοαντιδραστικές μπάντες ανιχνεύθηκαν με ενισχυμένο χημειοβιοφωτισμό (Roche).

## 2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση προγράμματος Graph Pad Prism-5<sup>η</sup> έκδοση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερά απόκλιση (Σ.Α.). Τα ευρήματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις παρακάτω στατιστικές μεθόδους: paired t-test, unpaired t-test, ANOVA, όπου αυτά ήταν εφαρμόσιμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η τιμή του  $p$  ήταν μικρότερη του 0,05 ( $p < 0,05$ ), πολύ στατιστικά σημαντική διαφορά όταν η τιμή του  $p$  ήταν μικρότερη από 0,001 ( $p < 0,001$ ) και εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά όταν η τιμή του  $p$  ήταν μικρότερη από 0,0001 ( $p < 0,0001$ ).



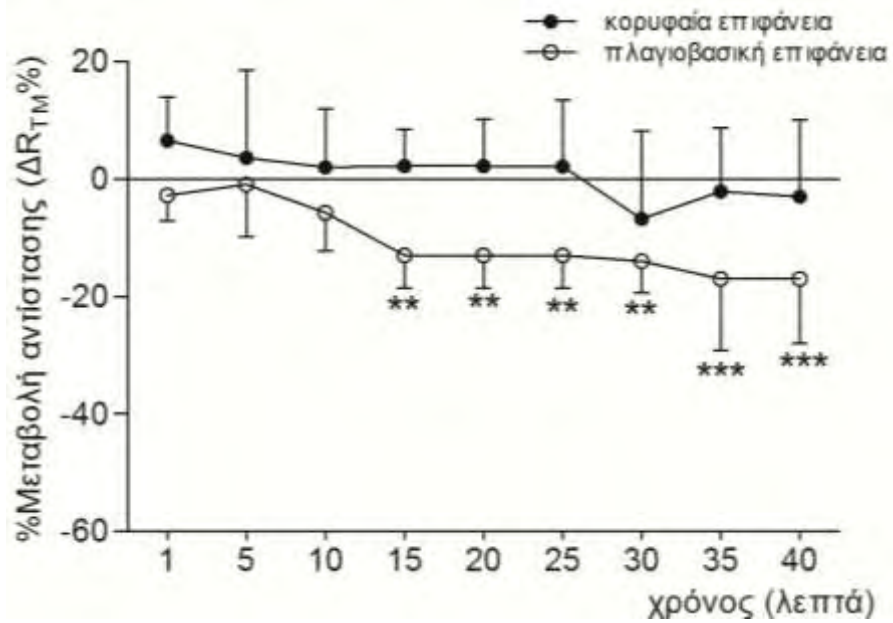
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ

Η αντίσταση αναφοράς (Krebs-ιστός) του τοιχωματικού υπεζωκότα είναι  $15 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$  ενώ του πνευμονικού  $17 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$ . Στα πειράματα αναφοράς η αντίσταση του ιστού διατηρείται σταθερή στη διάρκεια 40 min του πειράματος (τα αποτελέσματα δε φαίνονται).

#### 3.1. Επίδραση της MMP2 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου

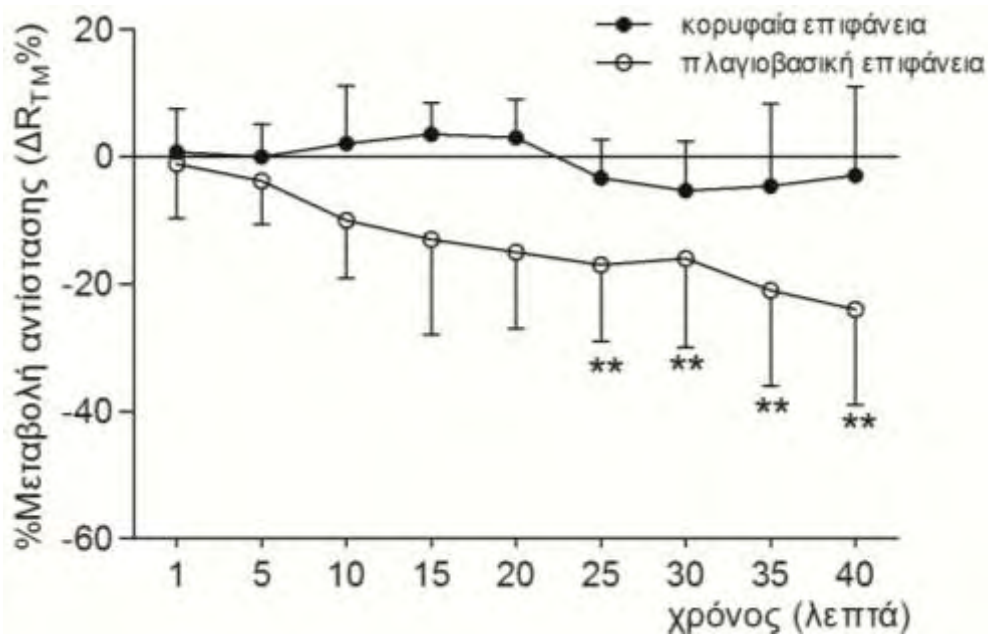
##### 3.1.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας

Η επώαση του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου με τη μικρότερη συγκέντρωση της MMP2, δηλαδή 0,1 ng/ml, οδηγεί σε μείωση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ) όταν η MMP2 προστεθεί στην πλαγιοβασική επιφάνεια του υπεζωκότα, όχι όμως και στην κορυφαία (Σχήμα 3). Η πτώση της  $R_{TM}$  στην πλαγιοβασική επιφάνεια αρχίζει το 15<sup>ο</sup> λεπτό και γίνεται μέγιστη στο 40<sup>ο</sup> λεπτό ( $-17\% \pm 10\%$ ,  $p < 0,0001$ ), οπότε και τερματίζεται το πείραμα (Σχήμα 3).



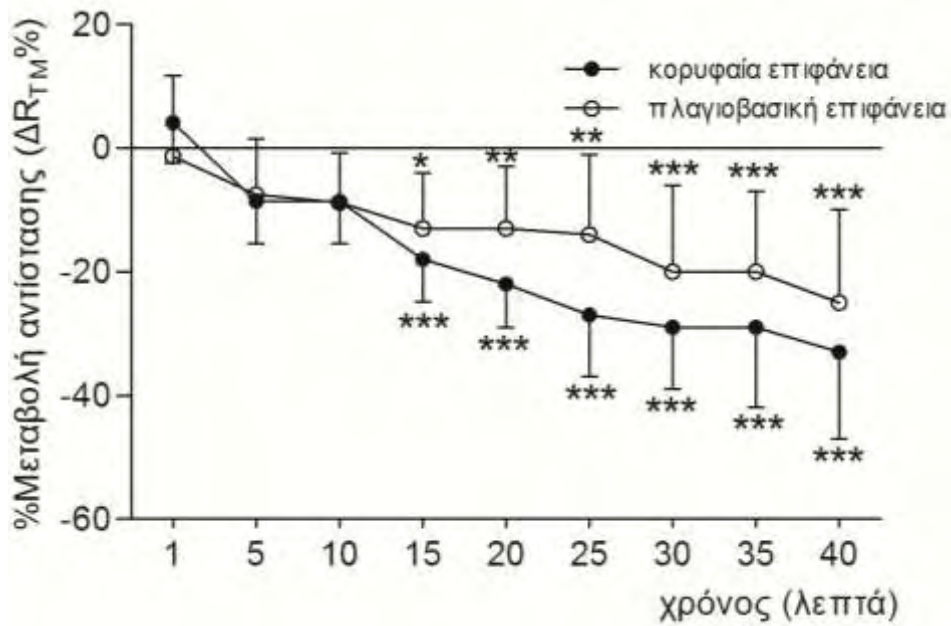
**Σχήμα 3.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 0,1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

Όταν ο τοιχωματικός υπεζωκότας επωαστεί με 1 ng/ml MMP2, το αποτέλεσμα στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση είναι ανάλογο με εκείνο της μικρότερης συγκέντρωσης 1 ng/ml (Σχήμα 4). Συγκεκριμένα, πάλι δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή της  $R_{TM}$  στην κορυφαία επιφάνεια του υπεζωκότα ενώ στην πλαγιοβασική επιφάνεια η  $R_{TM}$  αρχίζει να ελαττώνεται από το 25<sup>ο</sup> λεπτό ( $-17 \pm 12\%$ ,  $p<0,01$ ) και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η μεταβολή είναι  $-24 \pm 15\%$  ( $p<0,01$ ).



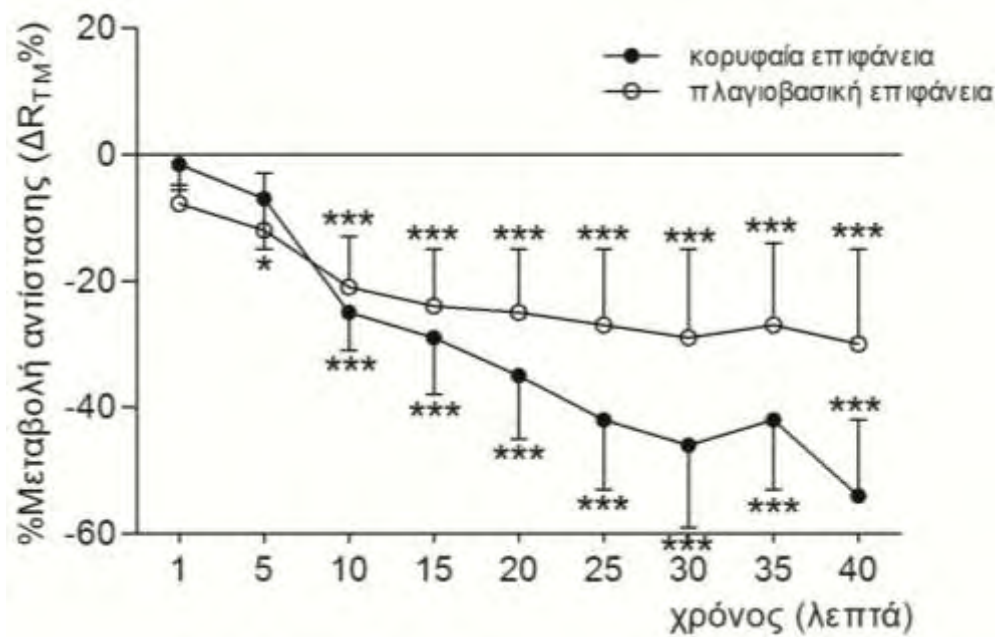
**Σχήμα 4.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \*\* $p<0,001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

Σε αντίθεση με τις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις, η επώαση του υπεζωκότα με 10 ng/ml MMP2 οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$  τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 5). Η πτώση αυτή ξεκινάει από το 15<sup>ο</sup> λεπτό και συνεχίζεται προοδευτικά μέχρι το 40<sup>ο</sup> λεπτό, οπότε και είναι  $-33 \pm 13\%$  ( $p<0,0001$ ) για την κορυφαία και  $-25 \pm 14\%$  ( $p<0,0001$ ) για την πλαγιοβασική επιφάνεια. Μάλιστα η πτώση της  $R_{TM}$  φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην κορυφαία επιφάνεια από ότι στην πλαγιοβασική σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάσαμε.



**Σχήμα 5.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 10 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

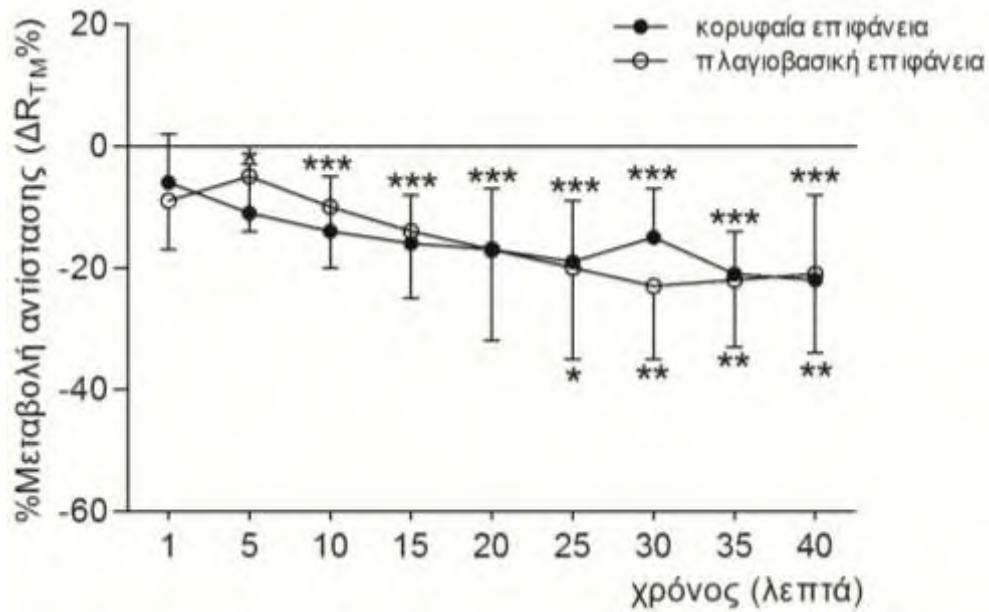
Η προσθήκη 20 ng/ml MMP2 στον τοιχωματικό υπεζωκότα οδηγεί σε μεγάλη πτώση της  $R_{TM}$  (Σχήμα 6). Πιο συγκεκριμένα, η πτώση της αντίστασης στην κορυφαία επιφάνεια ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό (-25%,  $p<0,0001$ ) και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό είναι  $-54 \pm 12\%$  ( $p<0,0001$ ). Στην πλαγιοβασική επιφάνεια η ελάττωση στη  $R_{TM}$  αρχίζει στο 5<sup>ο</sup> λεπτό και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η μεταβολή της  $R_{TM}$  είναι  $-30 \pm 15\%$  ( $p<0,0001$ ).



**Σχήμα 6.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 20 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

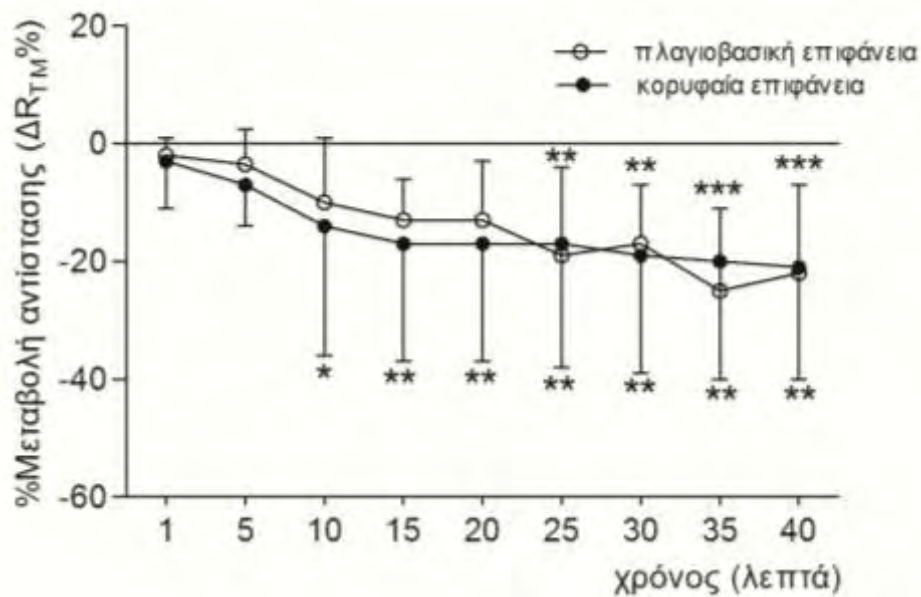
### 3.1.2. Πνευμονικός υπεζωκότας

Σε αντίθεση με το τοιχωματικό πέταλο, η προσθήκη 0,1 ng/ml MMP2 στο πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα οδηγεί σε ελάττωση της  $R_{TM}$  και στις δύο επιφάνειές του, δηλαδή κορυφαία και πλαγιοβασική (Σχήμα 7). Συγκεκριμένα, στην κορυφαία επιφάνεια η πτώση στην αντίσταση ξεκινάει 5 λεπτά μετά την προσθήκη του ενζύμου, μειώνεται προοδευτικά και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό είναι  $-22 \pm 14\%$  ( $p<0,0001$ ). Στη δε πλαγιοβασική επιφάνεια, η πτώση στη  $R_{TM}$  αρχίζει με κάποια καθυστέρηση στο 25<sup>ο</sup> λεπτό και είναι  $-20\%$  ( $p<0,05$ ) και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η ελάττωση είναι παρόμοια ( $-21 \pm 13\%$ ,  $p<0,01$ ).



**Σχήμα 7.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 0,1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , βασικοπλάγια επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

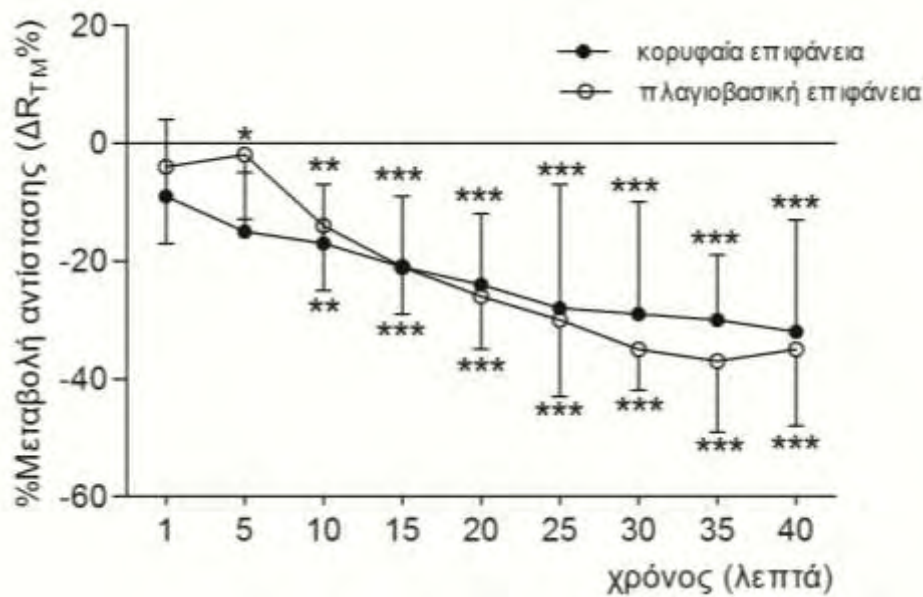
Όταν προσθέτουμε 1 ng/ml MMP2 στο πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα, το αποτέλεσμα είναι παρόμοιο με εκείνο της μικρότερης συγκέντρωσης 0,1 ng/ml (Σχήμα 8). Στην πλαγιοβασική επιφάνεια η πτώση της αντίστασης αρχίζει με καθυστέρηση 25 λεπτών και είναι  $-22 \pm 15\%$  ( $p<0,0001$ ) στο 40<sup>ο</sup> λεπτό, στη δε κορυφαία επιφάνεια η πτώση της  $R_{TM}$  αρχίζει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό και καταλήγει να είναι  $-21 \pm 19\%$  στο 40 λεπτό ( $p<0,001$ ).



**Σχήμα 8.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

Η προσθήκη 10 ng/ml MMP2 στον πνευμονικό υπεζωκότα οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$  που ξεκινάει από το 5<sup>ο</sup> λεπτό για την κορυφαία και από το 10<sup>ο</sup> λεπτό για την πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 9). Στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η ελάττωση της  $R_{TM}$  είναι παρόμοια στις δύο επιφάνειες:  $-32 \pm 19\%$  για την κορυφαία και  $-35 \pm 13\%$  για την πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p<0,0001$  και στις δύο επιφάνειες).

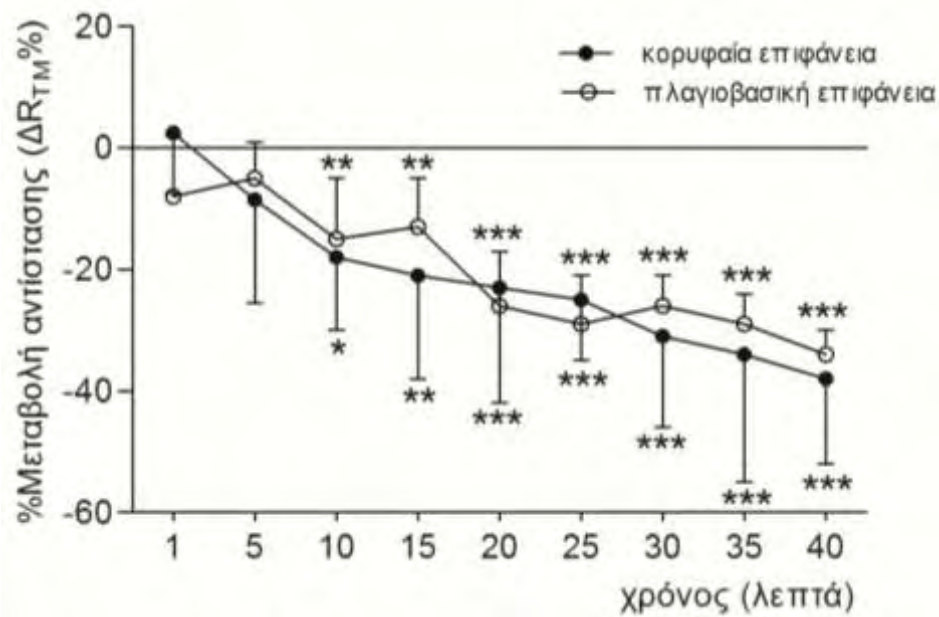




**Σχήμα 9.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 10 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

Τέλος, όταν προστεθούν 20 ng/ml MMP2 στον πνευμονικό υπεζωκότα το αποτέλεσμα στην αντίσταση μοιάζει με εκείνο της μικρότερης συγκέντρωσης 10 ng/ml (Σχήμα 10). Η πτώση στη  $R_{TM}$  είναι  $-38 \pm 14\%$  στην κορυφαία και  $-34 \pm 4\%$  στην πλαγιοβασική επιφάνεια στο 40<sup>ο</sup> λεπτό.



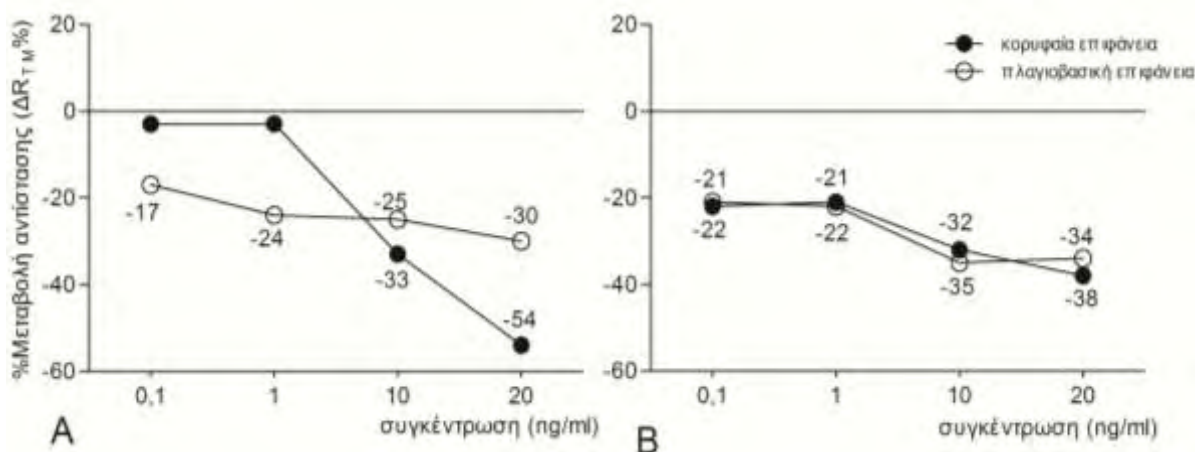


**Σχήμα 10.** Επίδραση MMP2 συγκέντρωσης 20 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ \*\*\*,  $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP2.

### 3.1.3. Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP2

Προκειμένου να εξεταστεί εάν η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της MMP2 επηρεάζει το μέγεθος της απάντησης, δηλαδή το ποσοστό πτώσης της  $R_{TM}$ , κατασκευάστηκε η καμπύλη δόσης-απάντησης (Σχήμα 11). Από την καμπύλη αυτή συμπεραίνεται ότι στον τοιχωματικό υπεζωκότα η μέγιστη επίδραση στη διαπερατότητα εμφανίζεται με τη χρήση της υψηλότερης συγκέντρωσης 20 ng/ml (-54% στην κορυφαία επιφάνεια και -30% στην πλαγιοβασική επιφάνεια). Στον πνευμονικό υπεζωκότα η μέγιστη πτώση στην  $R_{TM}$  εντοπίζεται στα 20 ng/ml για την κορυφαία επιφάνεια (-38%) και στα 10 ng/ml για την πλαγιοβασική επιφάνεια (-35%). Η MMP2 στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα δεν δρα στις συγκεντρώσεις 0,1

και 1 ng/ml ενώ στις συγκεντρώσεις 10 και 20 ng/ml εμφανίζεται μεγαλύτερη πτώση της  $R_{TM}$  στην κορυφαία απ' ό τι στην πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 11A). Στο σπλαχνικό υπεζωκότα η MMP2 φαίνεται να έχει το ίδιο αποτέλεσμα στη μεταβολή της  $R_{TM}$  τόσο στην κορυφαία όσο και πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 11B).



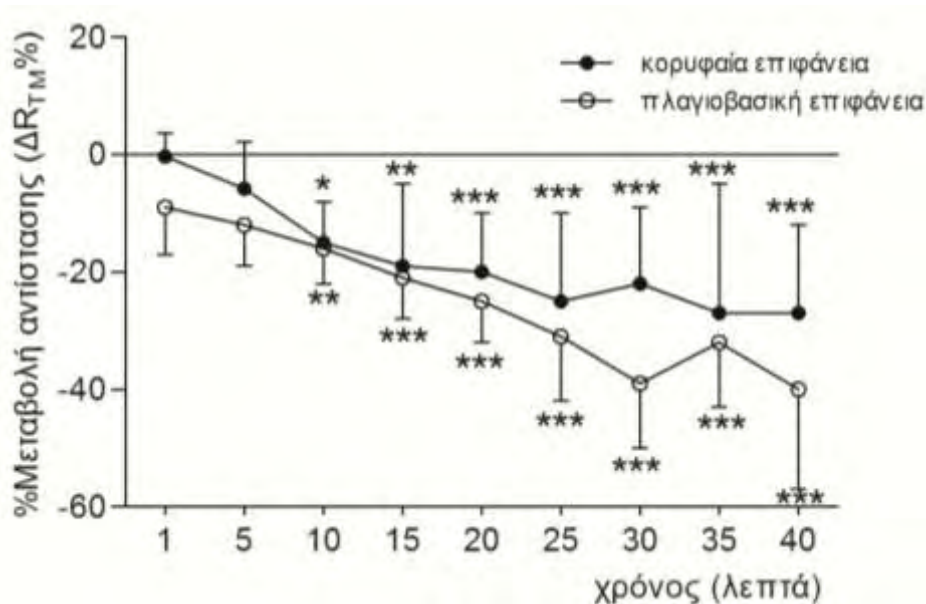
**Σχήμα 11.** Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP2, όπου φαίνεται το ποσοστό μεταβολής της  $R_{TM}$  στις τέσσερις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0,1, 1, 10 και 20ng/ml). Οι τιμές γύρω από τα σημεία δείχνουν το ποσοστό μεταβολής της  $R_{TM}$  στο 40<sup>ο</sup> λεπτό του πειράματος. A, τοιχωματικός υπεζωκότας, B, πνευμονικός υπεζωκότας.

### 3.2. Επίδραση της MMP9 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου

#### 3.2.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας

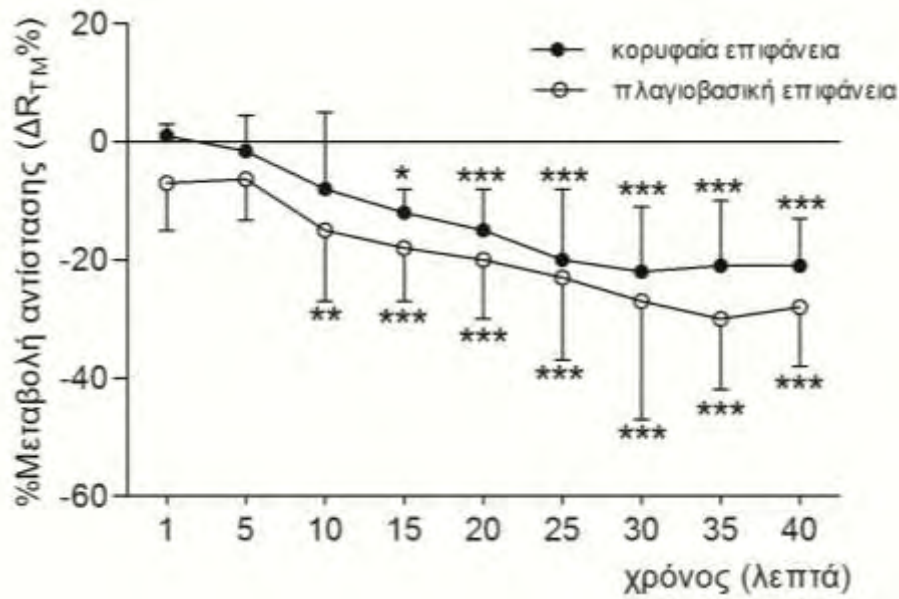
Όταν ο τοιχωματικός υπεζωκότας επωάζεται με 0,1 ng/ml MMP9, παρατηρείται μείωση στη  $R_{TM}$  και στην κορυφαία και στην πλαγιοβασική επιφάνεια, η οποία ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό μετά την προσθήκη της MMP9, αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου

και στο 40 λεπτό είναι  $-27 \pm 15\%$  ( $p < 0,0001$ ) στην κορυφαία επιφάνεια και  $-40\% \pm 17\%$  στην πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p < 0,0001$ , Σχήμα 12).



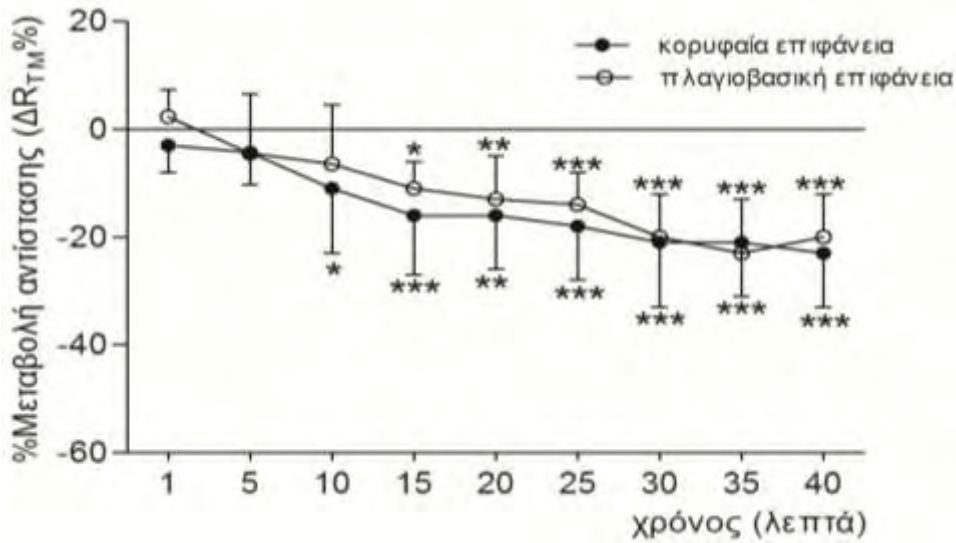
**Σχήμα 12.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 0,1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

Η προσθήκη 1 ng/ml MMP9 στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$  που είναι μεγαλύτερη για την πλαγιοβασική απ' ότι για την κορυφαία επιφάνεια (Σχήμα 13), όπως ομοίως συμβαίνει με τη χαμηλότερη συγκέντρωση 0,1 ng/ml. Συγκεκριμένα, η πτώση της  $R_{TM}$  είναι  $-21\% \pm 8\%$  ( $p < 0,0001$ ) στην κορυφαία και  $-28\% \pm 10\%$  ( $p < 0,0001$ ) στην πλαγιοβασική επιφάνεια στο 40<sup>ο</sup> λεπτό του πειράματος.

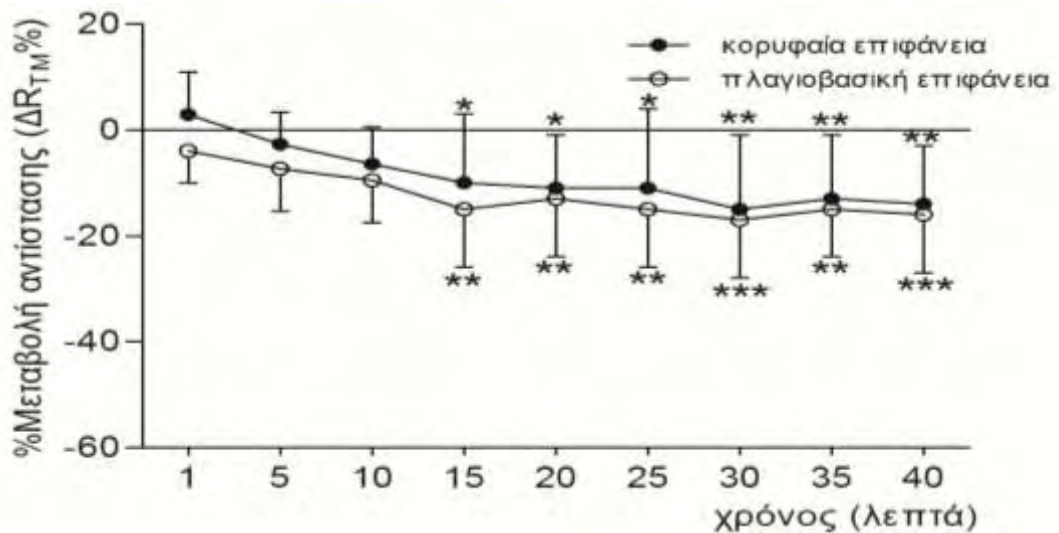


**Σχήμα 13.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

Για τη συγκέντρωση 10 ng/ml η μείωση στη  $R_{TM}$  είναι  $-23 \pm 10\%$  στην κορυφαία επιφάνεια και  $-20 \pm 8\%$  στην πλαγιοβασική επιφάνεια στο 40<sup>ο</sup> λεπτό του πειράματος (Σχήμα 14). Για τη συγκέντρωση 20 ng/ml η ελάττωση στη  $R_{TM}$  είναι  $-14 \pm 11\%$  στην κορυφαία και  $-16 \pm 11\%$  στην πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 15). Οι τιμές αυτές αναφέρονται στο 40<sup>ο</sup> λεπτό του πειράματος.



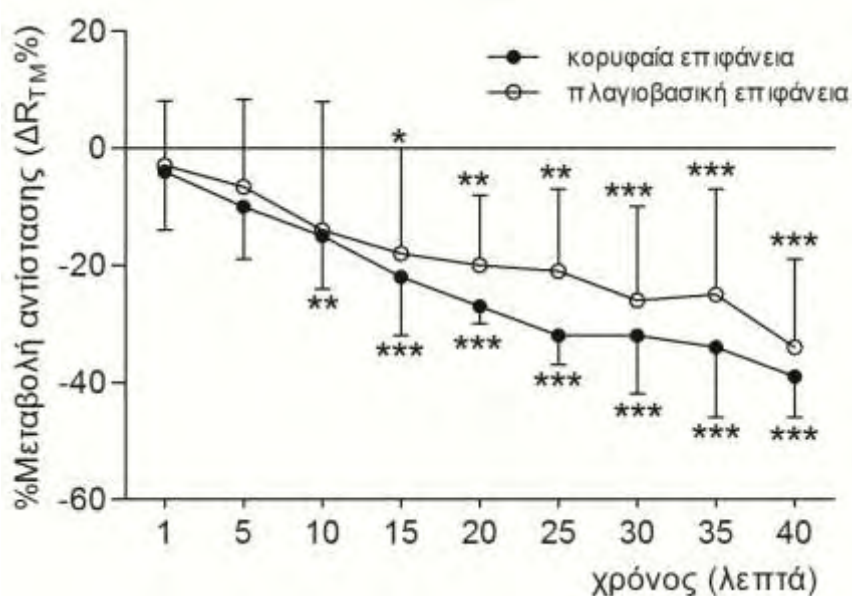
**Σχήμα 14.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 10 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.



**Σχήμα 15.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 20 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

### 3.2.2. Πνευμονικός υπεζωκότας

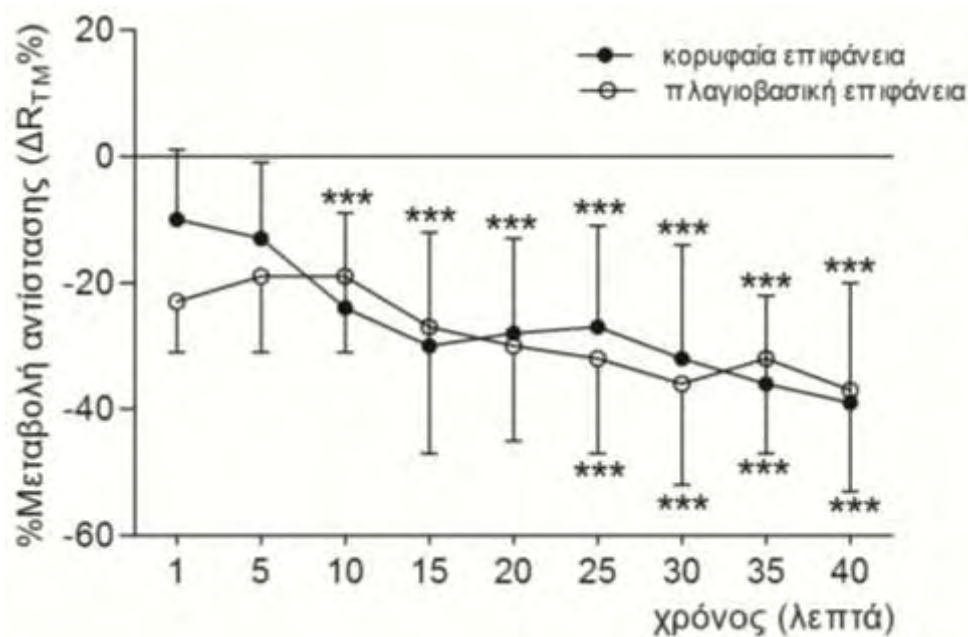
Όταν η MMP9 προστεθεί στον πνευμονικό υπεζωκότα σε συγκέντρωση 0,1 ng/ml, τότε παρατηρείται ελάττωση στη  $R_{TM}$ , η οποία ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό για την κορυφαία και 15<sup>ο</sup> λεπτό για την πλαγιοβασική επιφάνεια και είναι  $-15 \pm 9\%$  και  $-18 \pm 15\%$  αντίστοιχα (Σχήμα 16). Στο 40<sup>ο</sup> λεπτό, όταν τερματίζεται το πείραμα, η πτώση στην αντίσταση είναι  $-39 \pm 7\%$  για την κορυφαία και  $-34 \pm 15\%$  για την πλαγιοβασική επιφάνεια. Η πτώση στην κορυφαία επιφάνεια είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στην πλαγιοβασική σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.



**Σχήμα 16.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 0,1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

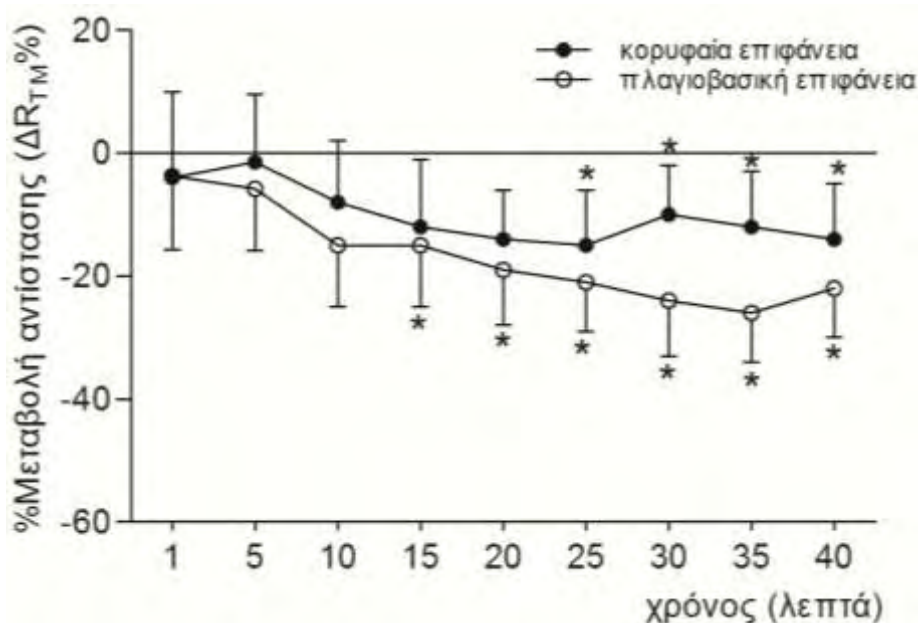


Η επώαση του πνευμονικού υπεζωκότα με 1 ng/ml MMP9 οδηγεί σε εξαιρετικά στατιστικά σημαντική πτώση της  $R_{TM}$  που ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό στην κορυφαία επιφάνεια ( $-24 \pm 15\%$ ) και το 15<sup>ο</sup> λεπτό στην πλαγιοβασική επιφάνεια ( $-27 \pm 20\%$ , Σχήμα 17). Σε όλη της διάρκεια της πειραματικής περιόδου η μεταβολή στη  $R_{TM}$  είναι παρόμοια μεταξύ της κορυφαίας και πλαγιοβασικής επιφάνειας και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η μεταβολή αυτή είναι  $-39 \pm 19\%$  για την κορυφαία και  $-37 \pm 16\%$  για την πλαγιοβασική επιφάνεια.



**Σχήμα 17.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$  \*\*\* $p < 0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

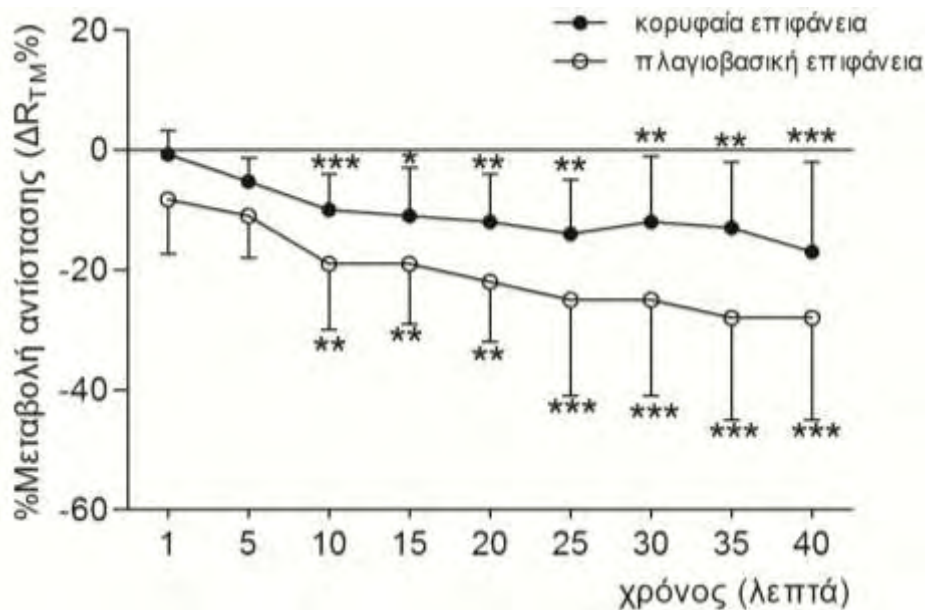
Σε συγκέντρωση 10 ng/ml MMP9, η πτώση της  $R_{TM}$  αρχίζει στο 25<sup>ο</sup> λεπτό για την κορυφαία επιφάνεια και στο 15<sup>ο</sup> λεπτό για την πλαγιοβασική επιφάνεια του υπεζωκότα. Στο 40<sup>ο</sup> λεπτό η ελάττωση της  $R_{TM}$  είναι  $-14 \pm 9\%$  και  $-22 \pm 8\%$  στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια αντίστοιχα ( $p < 0,05$ , Σχήμα 18).



**Σχήμα 18.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 10 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$  \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

Τέλος, η επώαση του πνευμονικού υπεζωκότα με 20 ng/ml MMP9 οδηγεί σε ελάττωση της  $R_{TM}$ , που ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, αυξάνεται προοδευτικά και στο 40<sup>ο</sup> λεπτό είναι  $-17 \pm 13\%$  για την κορυφαία επιφάνεια ( $p < 0,0001$ ) και  $-28 \pm 17\%$  για την πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p < 0,0001$ , Σχήμα 19).

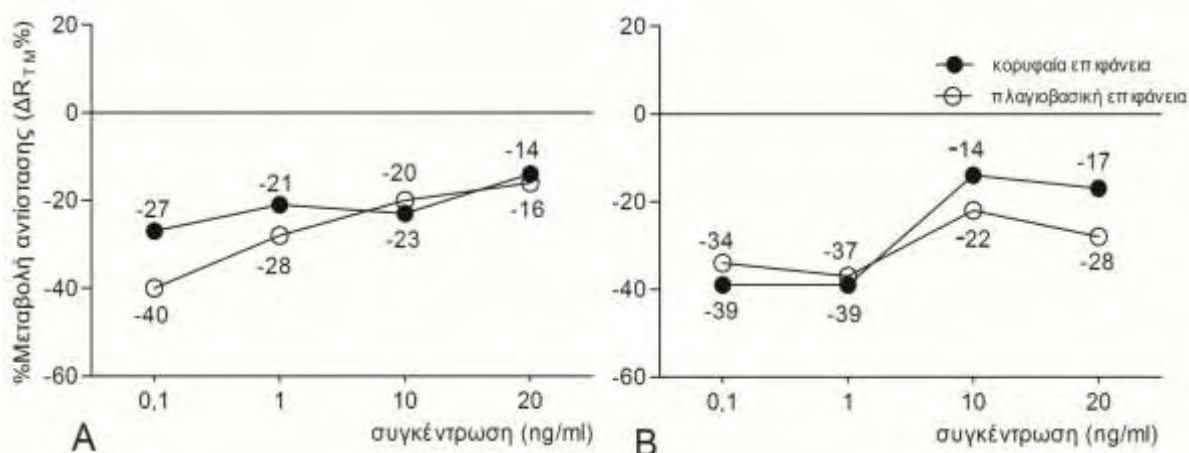




**Σχήμα 19.** Επίδραση MMP9 συγκέντρωσης 20 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$  \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP9.

### 3.2.3. Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP9

Η καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP9 φανερώνει ότι στον τοιχωματικό υπεζωκότα η μέγιστη επίδραση της MMP9 στη  $R_{TM}$  προκύπτει στη χαμηλή συγκέντρωση 0,1 ng/ml και είναι -40% για την πλαγιοβασική και -27% για την κορυφαία επιφάνεια (Σχήμα 20A). Στο δε πνευμονικό υπεζωκότα, η μέγιστη ελάττωση στη  $R_{TM}$  εμφανίζεται σε συγκέντρωση 1 ng/ml τόσο για την κορυφαία όσο και για την πλαγιοβασική επιφάνεια (Σχήμα 20B) και είναι -39 και -37% αντίστοιχα. Στον τοιχωματικό υπεζωκότα η πτώση της  $R_{TM}$  είναι μεγαλύτερη στην πλαγιοβασική απ' ό τι στην κορυφαία επιφάνεια για τις συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 20 ng/ml. Το αντίθετο συμβαίνει για τη συγκέντρωση 10 ng/ml.

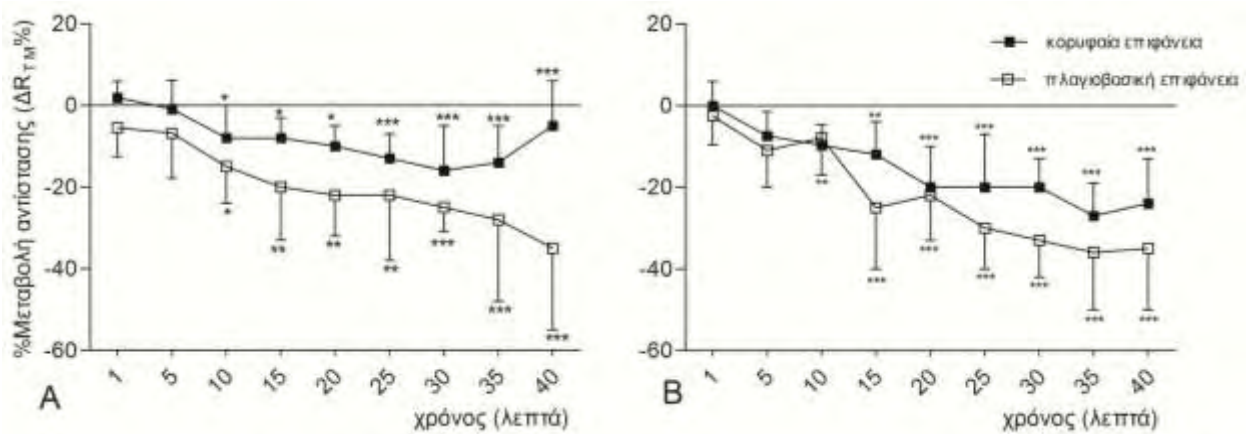


**Σχήμα 20.** Καμπύλη δόσης-απάντησης για την MMP9, όπου φαίνεται το ποσοστό μεταβολής της  $R_{TM}$  στις τέσσερις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0,1, 1, 10 και 20ng/ml). Οι τιμές γύρω από τα σημεία δείχνουν το ποσοστό μεταβολής της  $R_{TM}$  στο 40<sup>ο</sup> λεπτό του πειράματος. A, τοιχωματικός υπεζωκότας, B, πνευμονικός υπεζωκότας

### 3.3. Επίδραση της MMP1 στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου

Επειδή η ουσία APMA χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της MMP1 χωρίς να ακολουθήσει απομάκρυνσή της από αυτήν, απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της επίδρασης της MMP1 στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα ήταν η μελέτη της επίδρασης της ουσίας APMA στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα.

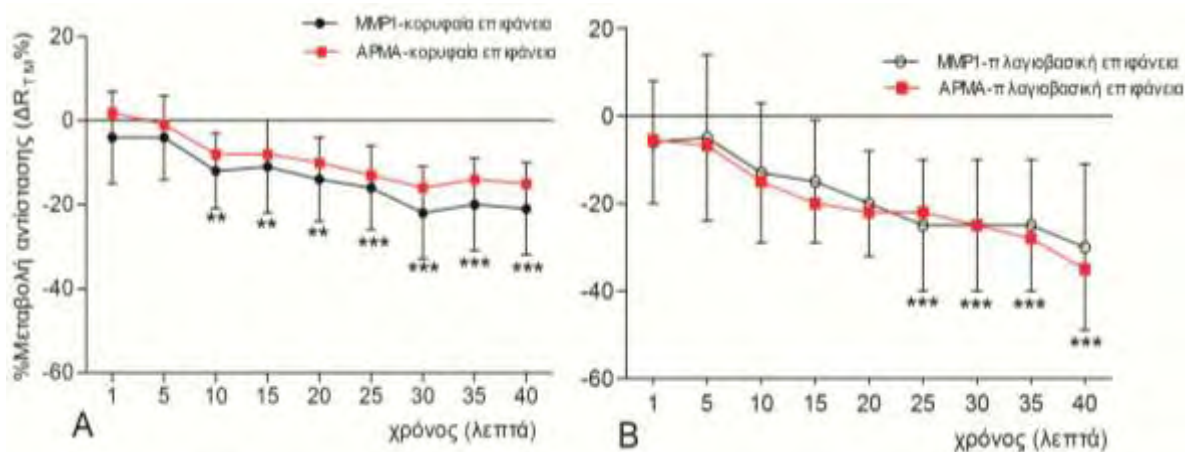
Πραγματοποιήθηκαν πειράματα στον τοιχωματικό και πνευμονικό υπεζωκότα και στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 21, η ουσία APMA οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$  που είναι στατιστικά σημαντική. Μάλιστα στην πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα η ελάττωση της  $R_{TM}$  είναι  $-35 \pm 20\%$  (Σχήμα 21A) στο 40<sup>ο</sup> λεπτό ενώ στο πνευμονικό πέταλο η αντίστοιχη μείωση είναι ίδιου μεγέθους, δηλαδή  $-35 \pm 15\%$  (Σχήμα 21B).



**Σχήμα 21.** Επίδραση της ουσίας APMA, προστιθέμενης στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού (A) και πνευμονικού (B) υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$  Σ.Α. κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$  \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη APMA

### 3.3.1. Τοιχωματικός υπεζωκότας

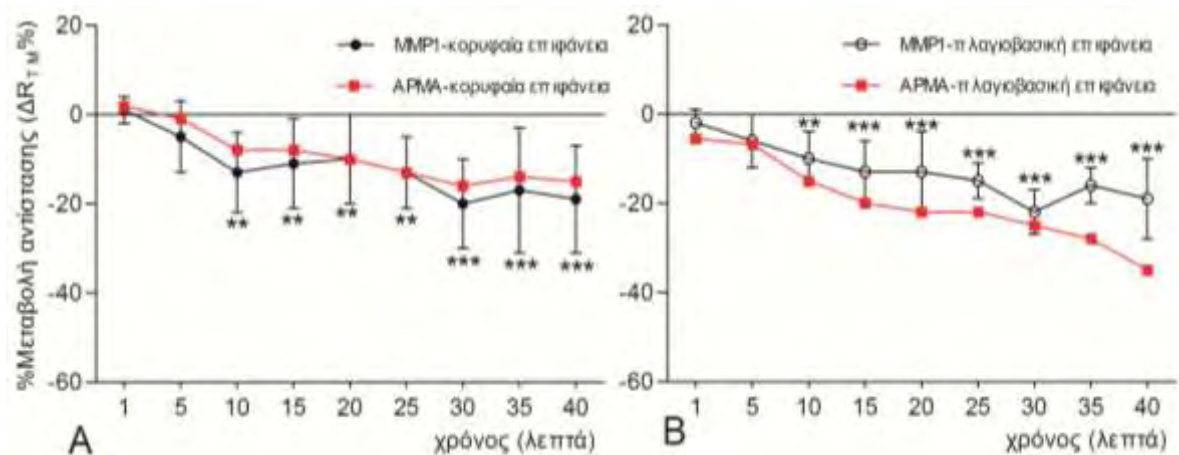
Η προσθήκη 0,1 ng/ml MMP1 στην κορυφαία επιφάνεια του υπεζωκότα οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$ , η οποία ξεκινάει από το 10<sup>ο</sup> λεπτό, αυξάνεται βαθμιαία και το 40<sup>ο</sup> λεπτό είναι  $-21 \pm 11\%$  ( $p<0,0001$ , Σχήμα 22A). Στην πλαγιοβασική επιφάνεια η ελάττωση της  $R_{TM}$  ξεκινάει από το 25<sup>ο</sup> λεπτό και είναι  $-30 \pm 19\%$  ( $p<0,0001$ , Σχήμα 22B).



**Σχήμα 22.** Επίδραση της MMP1 0,1 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$   $\Sigma.A.$  κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$   $**p<0,001$ ,  $***p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP1. Στα διαγράμματα φαίνεται συγκριτικά με κόκκινη γραμμή η επίδραση του APMA, που χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της MMP1.

Η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της MMP1 και του APMA στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα με τη χρήση του στατιστικού τεστ two-way ANOVA και Bonferonni post-test, έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p>0,05$  σε όλες τις χρονικές στιγμές).

Η προσθήκη 20 ng/ml MMP1 στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα (Σχήμα 23) δε διέφερε ως προς την πτώση της  $R_{TM}$  σε σχέση με τη μικρότερη συγκέντρωση 0,1 ng/ml. Και πάλι η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της MMP1 και του APMA στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα με τη χρήση του στατιστικού τεστ two-way ANOVA και Bonferonni post-test, έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p>0,05$  σε όλες τις χρονικές στιγμές).



**Σχήμα 23.** Επίδραση της MMP1 20 ng/ml, προστιθέμενης στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του τοιχωματικού υπεζωκότα, στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του υπεζωκότα προβάτου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι  $\pm$   $\Sigma.A.$  κορυφαία επιφάνεια  $n=6$ , πλαγιοβασική επιφάνεια  $n=6$   $**p<0,001$ ,  $***p<0,0001$  σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς, που είναι η τιμή αντίστασης πριν την προσθήκη MMP1. Στα διαγράμματα φαίνεται συγκριτικά με κόκκινη γραμμή η επίδραση του APMA, που χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της MMP1.

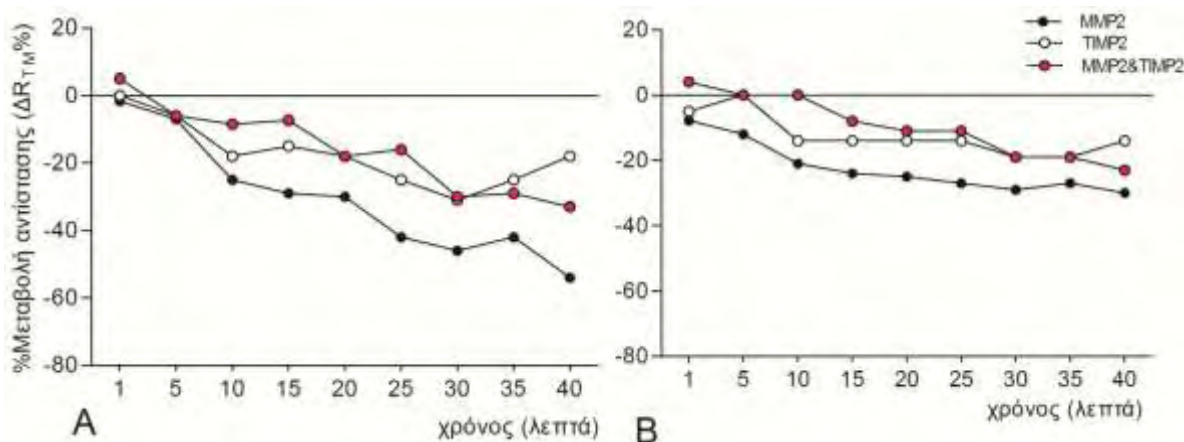
### 3.3.2. Πνευμονικός υπεζωκότας

Στον πνευμονικό υπεζωκότα το αποτέλεσμα της επίδρασης της MMP1 συγκέντρωσης 0,1 και 20 ng/ml στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια ήταν παρόμοιο με εκείνο για τον τοιχωματικό υπεζωκότα (αποτελέσματα δε φαίνονται). Και πάλι η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της MMP1 και του APMA στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα με τη χρήση του στατιστικού τεστ two-way ANOVA και Bonferonni post-test, έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια ( $p > 0,05$  σε όλες τις χρονικές στιγμές).

### 3.4. Αναστολή της δράσης των MMP2 και MM9 στη διαπερατότητα από τον αναστολέα TIMP-2

#### 3.4.1. MMP2

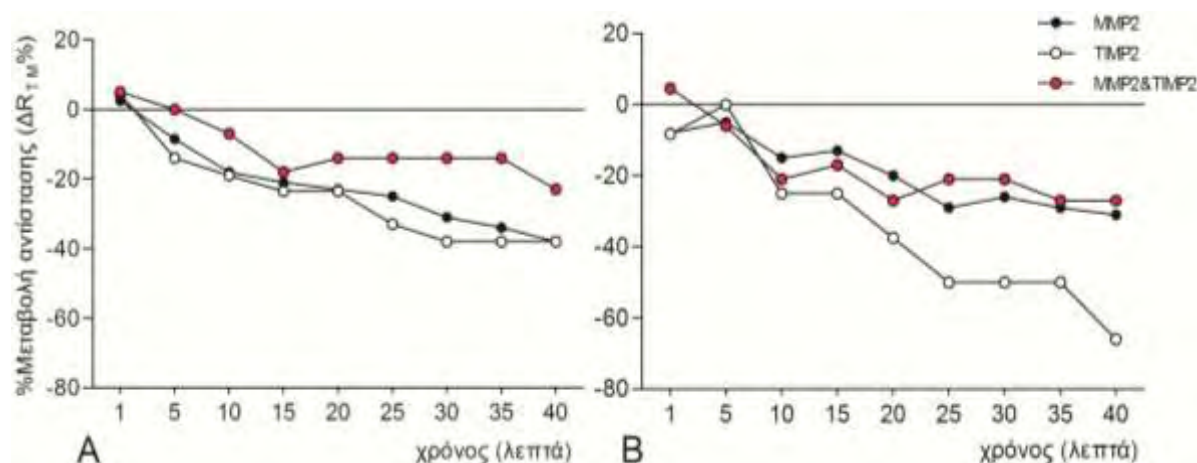
Η προσθήκη του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-2 σε συγκέντρωση 200 ng/ml ταυτόχρονα με τη MMP2 στον τοιχωματικό και πνευμονικό υπεζωκότα τείνει να αναστείλλει μερικώς τη δράση της MMP2, δηλαδή να μπλοκάρει την πτώση της αντίστασης που προκαλεί η MMP2. Η δράση αυτή ισχύει τόσο για την κορυφαία όσο και για την πλαγιοβασική επιφάνεια του υπεζωκότα (σχήμα 24 και 25). Η συγκέντρωση της MMP2 που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι αυτή που προκαλεί τη μέγιστη πτώση στην αντίσταση, δηλαδή 20 ng/ml.



**Σχήμα 24.** Αναστολή της πτώσης της  $R_{TM}$  που προκαλεί η MMP2 από τον αναστολέα TIMP2 στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του τοιχωματικού υπεζωκότα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι.  $n=6$  για την MMP2,  $n=2$  για το TIMP2,  $n=3$  για το συνδυασμό MMP2 και TIMP2. Συγκέντρωση MMP2=20 ng/ml, συγκέντρωση TIMP2=200 ng/ml.



Η προσθήκη μόνο του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-2 στον υπεζωκότα προβάτου προκαλεί πτώση της αντίστασης που είναι ιδιαίτερος υψηλή στη βασικοπλάγια επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα ( $\Delta R_{TM}=-66\%$ ). Εντούτοις τα πειράματα που έγιναν με την προσθήκη του TIMP-2 ήταν ενδεικτικά (n=2).

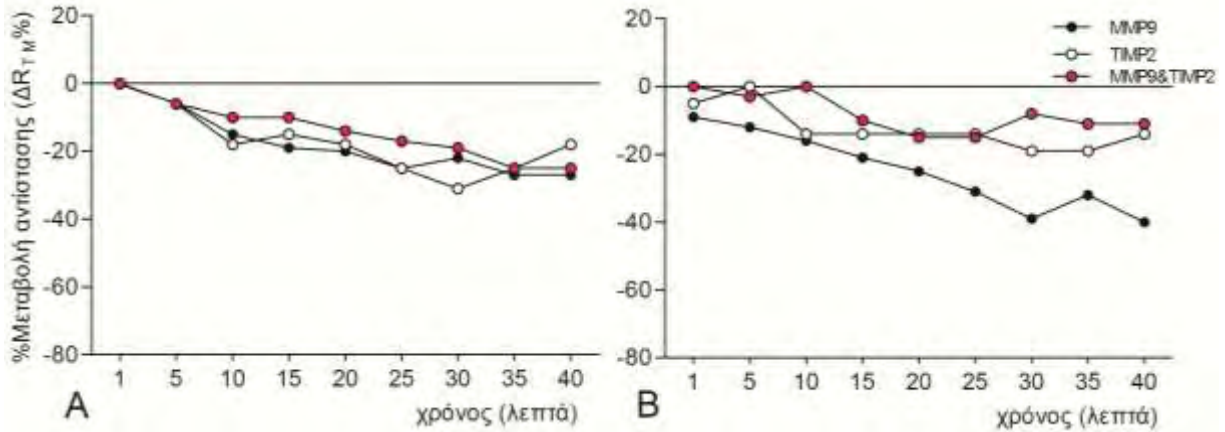


**Σχήμα 25.** Αναστολή της πτώσης της  $R_{TM}$  που προκαλεί η MMP2 από τον αναστολέα TIMP2 στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του πνευμονικού υπεζωκότα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι. n=6 για την MMP2, n=2 για το TIMP2, n=2 για το συνδυασμό MMP2 και TIMP2. Συγκέντρωση MMP2=20 ng/ml, συγκέντρωση TIMP2=200 ng/ml.

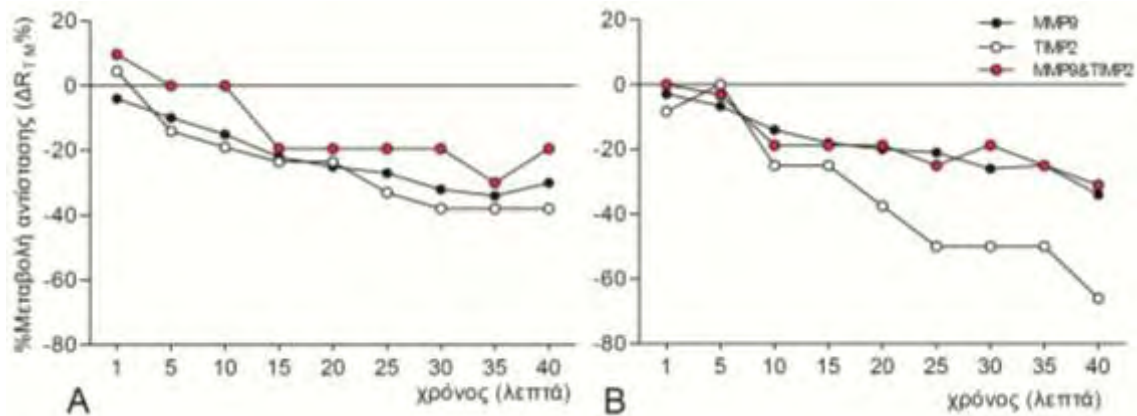
### 3.4.2. MMP9

Παρόμοια με την MMP2, η προσθήκη του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP2 σε συγκέντρωση 200 ng/ml ταυτόχρονα με τη MMP9 στον τοιχωματικό και πνευμονικό υπεζωκότα τείνει να αναστείλλει μερικώς τη δράση της MMP9, δηλαδή να μπλοκάρει την πτώση της αντίστασης που προκαλεί η MMP9. Η δράση αυτή ισχύει τόσο για την κορυφαία όσο και για την πλαγιοβασική επιφάνεια του υπεζωκότα (σχήμα 26 και 27). Η συγκέντρωση της MMP9 που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των

πειραμάτων είναι αυτή που προκαλεί τη μέγιστη πτώση στην αντίσταση, δηλαδή 0,1 ng/ml.



**Σχήμα 26.** Αναστολή της πτώσης της  $R_{TM}$  που προκαλεί η MMP9 από τον αναστολέα TIMP2 στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του τοιχωματικού υπεζωκότα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι.  $n=6$  για την MMP9,  $n=2$  για το TIMP2,  $n=2$  για το συνδυασμό MMP9 και TIMP2. Συγκέντρωση MMP9=0,1 ng/ml, συγκέντρωση TIMP2=200 ng/ml.

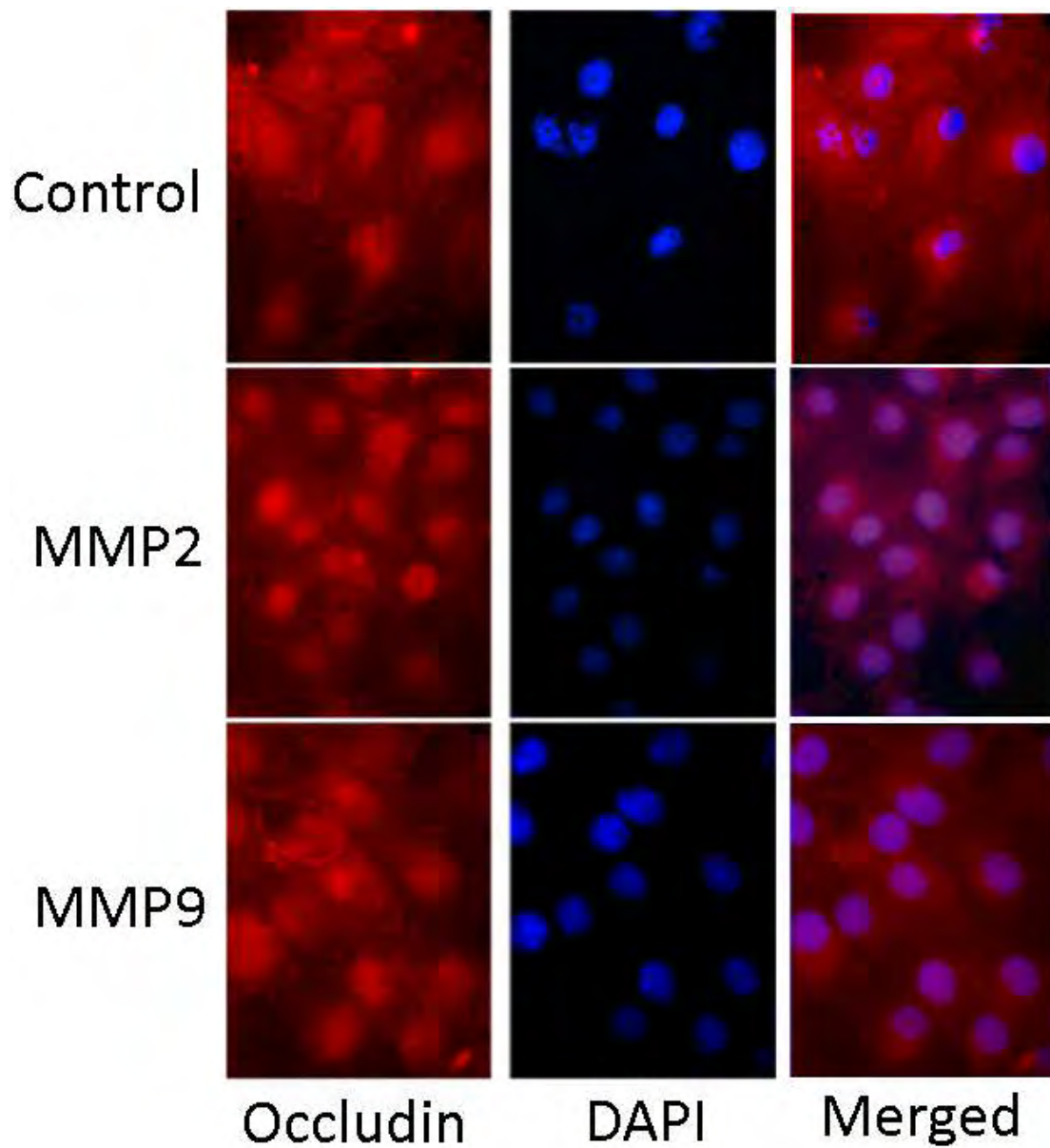


**Σχήμα 27.** Αναστολή της πτώσης της  $R_{TM}$  που προκαλεί η MMP9 από τον αναστολέα TIMP2 στην κορυφαία (A) και πλαγιοβασική επιφάνεια (B) του πνευμονικού υπεζωκότα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι.  $n=6$  για την MMP9,  $n=2$  για το TIMP2,  $n=2$  για το συνδυασμό MMP9 και TIMP2. Συγκέντρωση MMP9=0,1 ng/ml, συγκέντρωση TIMP2=200 ng/ml.

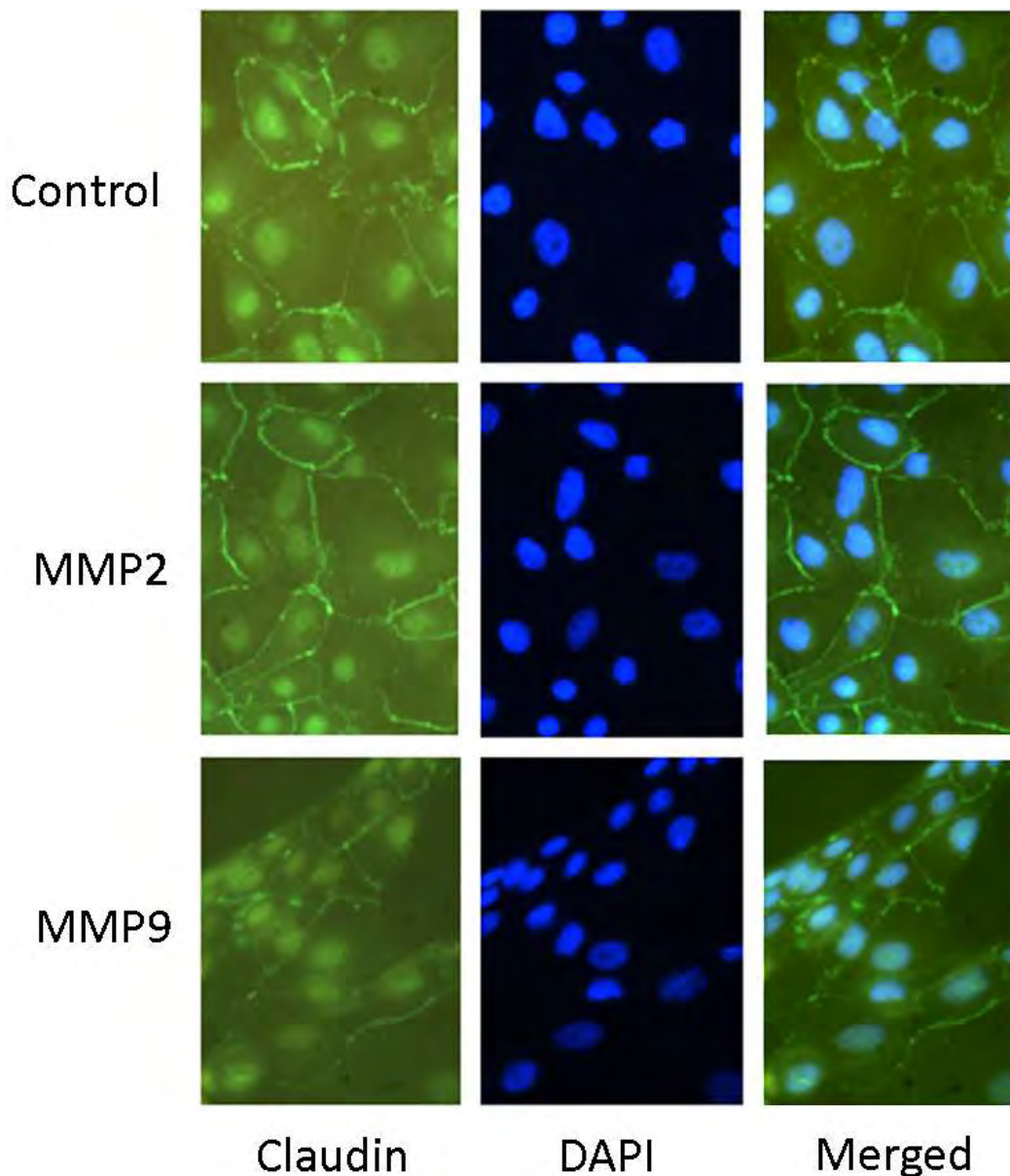


### **3.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός: καμία μεταβολή στην κυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη των μεσοθηλιακών κυττάρων από τις MMPs**

Στη συνέχεια μελετήθηκε εάν η ελάττωση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ), όπως προέκυψε με τα πειράματα με την τεχνική Ussing, συνοδεύεται από απώλεια των πρωτεϊνών των αποφρακτικών συνδέσεων στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα στα πειράματα control εμφανίζουν σαφή χρώση της οκκλουδίνης (εικόνα 7) και της κλαουδίνης-1 (εικόνα 8) στην περιφέρεια του κυττάρου. Η χρώση είναι συνεχής και συμπίπτει με την πορεία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Επειδή τα κύτταρα είναι συνεκτικά, χωρίς δηλαδή την ύπαρξη ασυνεχειών μεταξύ τους, και επειδή η οκκλουδίνη και η κλαουδίνη είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, μία συνεχής γραμμή ομοιάζουσα με «μελικηρύθρα» είναι εμφανής σε ορισμένες περιοχές. Εκτός από την οκκλουδίνη και κλαουδίνη, και ο πυρήνας χρωματίζεται μη ειδικά. Η επώαση των μεσοθηλιακών κυττάρων με τις MMP2 και MMP9 δεν αλλάζει ούτε την εντόπιση ούτε την ένταση της χρώσης των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη (εικόνα 7 και 8, αντίστοιχα).



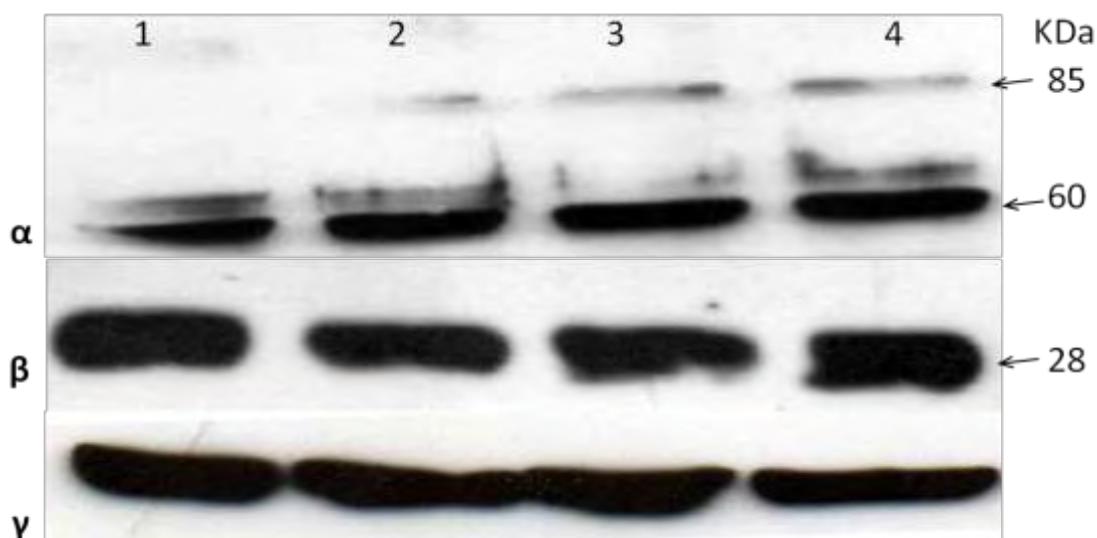
**Εικόνα 7.** Χρώση ανοσοφθορισμού των μεσοθηλιακών κυττάρων με αντίσωμα έναντι της οκκλουδίνης. Τόσο τα κύτταρα control όσο και τα κύτταρα που επωάστηκαν με MMP2 ή MMP9 παρουσίασαν ένα συνεχές πρότυπο χρώσης της κυτταρική μεμβράνης. Οι κυτταρικοί πυρήνες βάφτηκαν με χρώση DAPI.



**Εικόνα 8.** Χρώση ανοσοφθορισμού των μεσοθηλιακών κυττάρων με αντίσωμα έναντι της κλαουδίνης-1. Τόσο τα κύτταρα control όσο και τα κύτταρα που επώαστηκαν με MMP2 ή MMP9 παρουσίασαν ένα συνεχές πρότυπο χρώσης της κυτταρική μεμβράνης. Οι κυτταρικοί πυρήνες βάφτηκαν με χρώση DAPI.

**3.6. Ανοσοαποτύπωση:** καμία μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη των μεσοθηλιακών κυττάρων από τις MMPs

Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με κυτταρικό εκχύλισμα μεσοθηλιακών κυττάρων δεν έδειξαν μεταβολή στις ζώνες που αντιστοιχούν στην οκκλουδίνη και κλαουδίνη-1 μετά από επώση με τις MMP2 και MMP9 (εικόνα 9). Συγκεκριμένα η οκκλουδίνη μεταναστεύει σχηματίζοντας δύο κύριες ζώνες, η μία εκ των οποίων έχει MB 60 KDa και η άλλη μεταξύ 60 και 65 KDa. Μια τρίτη επιπρόσθετη ζώνη σχηματίζεται στα 85 KDa (εικόνα 9α). Η κλαουδίνη ανιχνεύεται σαν μία μπάντα με MB 28 KDa (εικόνα 9β). Δεν παρατηρείται ούτε απώλεια της έντασης των ζωνών που αντιστοιχούν στην οκκλουδίνη και κλαουδίνη μετά από επώση με τις MMPs ούτε εμφάνιση πρωτεολυτικών θραυσμάτων. Αυτά τα ευρήματα φανερώνουν ότι οι MMP2 και MMP9 δε διασπούν τις αποφρακτικές συνδέσεις των μεσοθηλιακών κυττάρων.



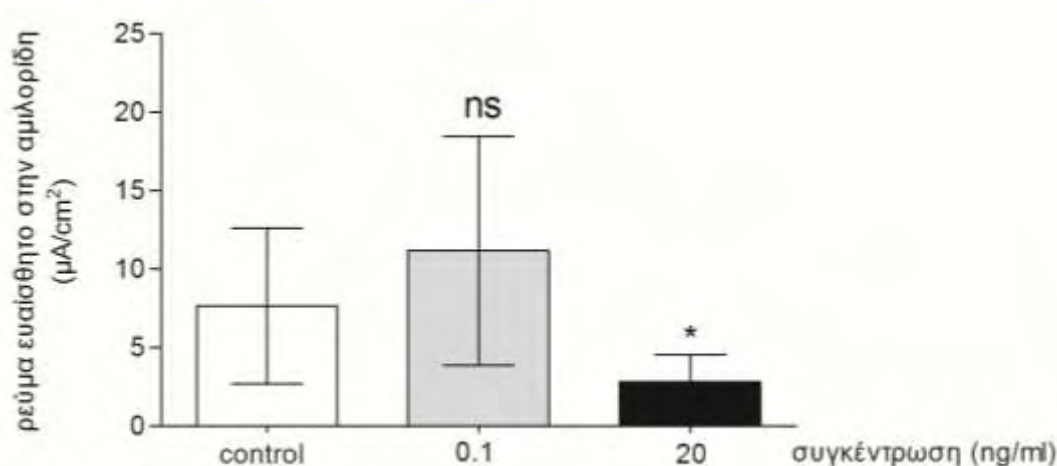
**Εικόνα 9.** Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών των TJs μετά από επώσή τους με τις MMPs. Η οκκλουδίνη μεταναστεύει σε 3 ζώνες με MB 60, 85 και >60 KDa (**α**) και η κλαουδίνη εμφανίζεται σαν μία μπάντα 28 KDa (**β**). Ζώνη 1=control, χωρίς επώση, ζώνη 2=control, επώση για 1 ώρα στους 37°C, ζώνη 3=επώση με MMP2 για 1 ώρα στους 37°C, ζώνη 4=επώση με MMP9 για 1 ώρα στους 37°C. Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης φορώθηκαν σε κάθε ζώνη (15μg/ζώνη, όπως αποδεικνύεται και από την ίση ποσότητα της ακτίνης που φορώθηκε σε όλες τις ζώνες (**γ**)). Καμία μεταβολή στις πρωτεΐνες των TJs οκκλουδίνη και κλαουδίνη δεν παρατηρήθηκε μετά την επώση με MMPs.

### 3.7. Μεταβολή του ρεύματος ευαίσθητου στην αμιλορίδη από τις MMP2 και MMP9

Προκειμένου να μελετηθεί εάν οι MMPs επηρεάζουν τη διακυττάρια διαπερατότητα και την ενεργό μεταφορά νατρίου από τον ENaC στα μεσοθηλιακά κύτταρα, εφαρμόστηκαν πειράματα με την τεχνική Ussing σε συνθήκες κλειστού κυκλώματος. Στα control πειράματα (στα οποία προστέθηκε PBS) που εκτελέστηκαν στον τοιχωματικό υπεζωκότα, η αμιλορίδη ελαττώνει αμέσως το ρεύμα κλειστού κυκλώματος (Isc) κατά 53% ( $p < 0,05$ ) και η αντίσταση  $R_{TM}$  αυξάνεται κατά 10% ( $p < 0,001$ ). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει ότι οι επιθηλιακοί διάυλοι νατρίου ENaC είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή του Isc. Αυτό υποδηλώνει ότι στο μεσοθήλιο του τοιχωματικού υπεζωκότα το Isc δημιουργείται κατά κύριο λόγο από τη δραστηριότητα του ENaC. Αντίθετα, στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα η αμιλορίδη δεν ασκεί στατιστικά σημαντική μεταβολή ούτε στο Isc ούτε στη  $R_{TM}$  (τα δεδομένα δεν απεικονίζονται) και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίον δεν εφαρμόστηκαν πειράματα με τις MMPs στο σπλαχνικό πέταλο του υπεζωκότα. Η ουσία DMSO χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της αμιλορίδης. Η ουσία αυτή δεν μεταβάλλει με στατιστικά σημαντικό τρόπο το Isc και τη  $R_{TM}$  (μείωση του Isc κατά  $5,5 \mu A/cm^2$ ,  $p > 0,05$  και αύξηση του  $R_{TM}$  κατά 12%,  $p > 0,05$ ).

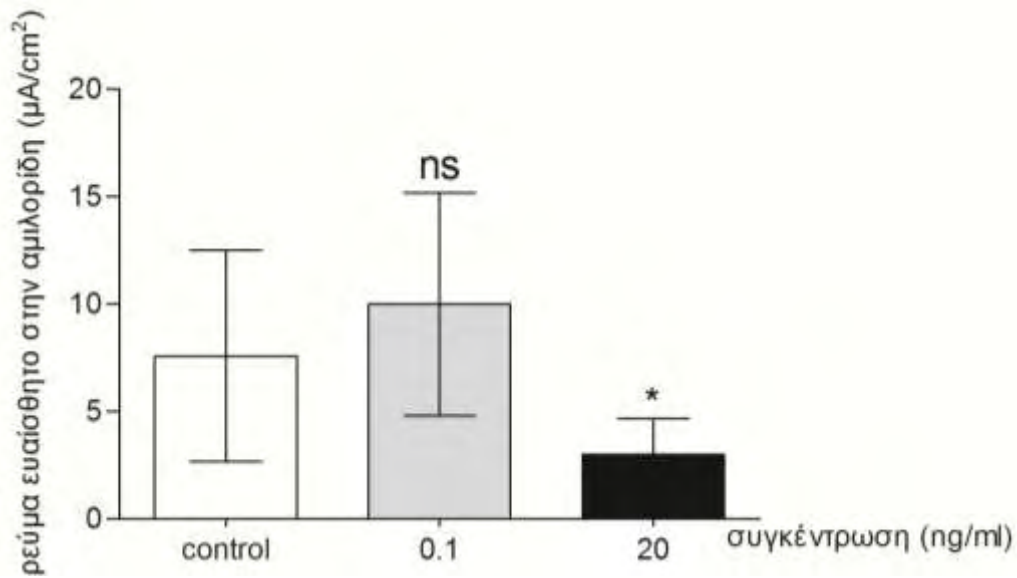
Στα control πειράματα το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα είναι  $7,6 \pm 4,9 \mu A/cm^2$ . Όταν  $0,1 \text{ ng/ml}$  MMP2 προστίθενται στον υπεζωκότα, το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα αυξάνεται από  $7,6 \pm 4,9 \mu A/cm^2$  σε  $11,17 \pm 7,2 \mu A/cm^2$  χωρίς η μεταβολή αυτή να εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα (εικόνα 10). Αντίθετα, η προσθήκη  $20 \text{ ng/ml}$  MMP2 στον υπεζωκότα, οδηγεί σε σημαντική ελάττωση του

ευαίσθητου στην αμιλορίδη ρεύματος από 7,6 σε  $2,8 \pm 1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (σχήμα 28,  $p=0,028$ ).



**Σχήμα 28.** Επίδραση της MMP2 στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  T.A. (τυπική απόκλιση).  $n=9$  για control,  $n=6$  για 0,1 και 20 ng/ml. ns: στατιστικά μη σημαντικό συγκριτικά με την τιμή control, \*  $p < 0,05$  συγκριτικά με την τιμή control. Η MMP2 σε συγκέντρωση 20 ng/ml ελαττώνει το ρεύμα ευαίσθητο στην αμιλορίδη.

Όταν 0,1 ng/ml MMP9 προστίθενται στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα, προκύπτει αύξηση του ρεύματος ευαίσθητου στην αμιλορίδη για τη χαμηλή συγκέντρωση των 0,1 ng/ml (από 7,6 σε  $10 \pm 5,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, σημαντική μείωση του ευαίσθητου ρεύματος στην αμιλορίδη προκύπτει για την υψηλή συγκέντρωση των 20 ng/ml (από 7,6 σε  $3 \pm 1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p=0,048$ ). Οι μεταβολές αυτές απεικονίζονται στο σχήμα 29.



**Σχήμα 29.** Επίδραση της MMP9 στην κορυφαία επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους  $\pm$  T.A. (τυπική απόκλιση).  $n=9$  για control,  $n=6$  για 0,1 και 20 ng/ml. ns: στατιστικά μη σημαντικό συγκριτικά με την τιμή control, \*  $p < 0,05$  συγκριτικά με την τιμή control. Η MMP9 σε συγκέντρωση 20 ng/ml ελαττώνει το ρεύμα ευαίσθητο στην αμιλοριδία.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη οι MMP2 και MMP9 ελαττώνουν τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του τοιχωματικού και πνευμονικού πετάλου του υπεζωκότα σε *in vitro* πειράματα. Η ελάττωση αυτή συνηγορεί υπέρ της αύξησης της διαπερατότητας του υπεζωκότα από τις MMPs. Δύο κύρια μονοπάτια, μέσω των οποίων είναι δυνατόν να αυξηθεί η διαπερατότητα μελετήθηκαν: το παρακυττάριο μονοπάτι, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες των αποφρακτικών συνδέσεων (TJs), και το διακυττάριο μονοπάτι, το οποίο περιλαμβάνει την απορρόφηση νατρίου από το διάυλο ENaC. Μετά από επώαση των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων με τις MMP2 και MMP9, η εντόπιση των πρωτεϊνών των αποφρακτικών συνδέσεων στα μεσοθηλιακά κύτταρα δε διαταράσσεται και η έκφραση των πρωτεϊνών οκκλουδίνη και κλαουδίνη παραμένει ανέπαφη. Οι MMPs μειώνουν τη δραστηριότητα του ENaC, όταν χρησιμοποιηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως φάνηκε από τη μείωση του ρεύματος που είναι ευαίσθητο στην αμιλορίδη.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι MMPs ανευρίσκονται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η ισορροπία των MMPs στην υπεζωκοτική κοιλότητα εξυπηρετεί πιθανόν την αποδόμηση και ανανέωση της εξωκυττάριας ουσίας που βρίσκεται υπό τα μεσοθηλιακά κύτταρα και η οποία φυσιολογικά συμβαίνει με χαμηλούς ρυθμούς. Σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής και επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων, έχει δειχθεί ότι η έκκριση των MMPs συμβαίνει κυρίως στην πλαγιοβασική επιφάνεια, εκεί δηλαδή όπου εντοπίζεται η εξωκυττάρια ουσία, το κύριο υπόστρωμα των μεταλλοπρωτεϊνών [175, 176]. Σε καλλιέργειες όμως επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων οι MMPs εκκρίνονται



σχεδόν αποκλειστικά στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, όπου επηρεάζουν την παρακυττάρια διαπερατότητα πιθανώς μέσω της διάσπασης των αποφρακτικών συνδέσεων [93]. Στην εργασία των Marshall και συν., οι συγγραφείς μελέτησαν την έκφραση και έκκριση των MMP2 και MMP9 από τα μεσοθηλιακά κύτταρα αλλά δεν εξέτασαν την κατεύθυνση της έκκρισης των ενζύμων αυτών, δηλαδή εάν αυτή γίνεται προς την κορυφαία ή την πλαγιοβασική επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων [152]. Η γνώση αυτή θα μπορούσε να θέσει βάσιμες υποθέσεις σχετικά με το φυσιολογικό ρόλο των μεταλλοπρωτεϊνών στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έτσι η έκκρισή τους στην πλαγιοβασική επιφάνεια εξυπηρετεί πιθανόν την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας και της βασικής μεμβράνης που συμβαίνει φυσιολογικά με χαμηλό ρυθμό. Αντίθετα η έκκρισή τους στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, δηλαδή στην κοιλότητα του υπεζωκότα, χρησιμεύει ίσως στην αποφυγή ανάπτυξης συνεχειών και τη διατήρηση μιας λείας υπεζωκοτικής επιφάνειας για την ελαχιστοποίηση των τριβών. Είναι δυνατόν η έκκριση να συμβαίνει και προς τις δύο κατευθύνσεις ή μόνο προς τη μία πλευρά.

Σε εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές ποικίλλης αιτιολογίας έχουν βρεθεί αυξημένα τα επίπεδα των MMP2 και MMP9 και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίον επιλέχθηκαν οι παραπάνω μεταλλοπρωτεϊνάσες για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης [153, 154, 157]. Η MMP2 εκφράζεται και εκκρίνεται υπό βασικές συνθήκες στην υπεζωκοτική κοιλότητα από τα μεσοθηλιακά κύτταρα [152]. Στα εξιδρώματα τα υψηλά επίπεδα MMP2 μπορεί να οφείλονται σε αυξημένη έκφραση ως αποτέλεσμα διέγερσης των μεσοθηλιακών κυττάρων από κυτταροκίνες αλλά και κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα, μπορεί να συμβάλλουν στην απελευθέρωση υψηλών επιπέδων MMP2 [153]. Σε αντίθεση με τη MMP2, η MMP9 ανευρίσκεται κυρίως σε εξιδρωματικές

υπεζωκοτικές συλλογές και προέρχεται είτε από τα κύτταρα φλεγμονής (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) είτε από διέγερση των μεσοθηλιακών κυττάρων, όπως συμβαίνει με τη MMP2 [154, 177]. Οι MMPs μπορούν να υδρολύσουν σχεδόν όλα τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας και σήμερα είναι γνωστό ότι αποδομούν όχι μόνο την εξωκυττάρια ουσία αλλά και άλλες πρωτεΐνες, όπως αυξητικούς παράγοντες, μόρια εντοπισμένα στην κυτταρική επιφάνεια και κυτταροκίνες που απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο [127, 178]. Ο ρόλος των MMPs στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών ενδέχεται να είναι πολυσήμαντος. Για παράδειγμα, είναι δυνατό οι MMPs να διευκολύνουν τη χημειοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, να ενισχύουν το μεταστατικό δυναμικό των όγκων, να ευθύνονται για επιπλοκές όπως η παχυπλευρίτις ή να αυξάνουν τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών και μεσοθηλιακών κυττάρων και να συμβάλλουν κατ'αυτόν τον τρόπο στη συσσώρευση υπεζωκοτικού υγρού. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί το τελευταίο ενδεχόμενο, κατά πόσο δηλαδή επηρεάζουν οι MMPs τη διαπερατότητα του υπεζωκότα.

Η μείωση στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα προβάτου, που προέκυψε μετά την επώαση με τις MMP2 και MMP9, υποδηλώνει ότι οι MMPs αυξάνουν πράγματι τη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Όπως αναμένεται για οποιοδήποτε ένζυμο, η μείωση στην αντίσταση του υπεζωκότα είναι χρονοεξαρτώμενη με τη μέγιστη ελάττωση να προκύπτει στο 40<sup>ο</sup> λεπτό. Σε ότι αφορά τη δόσοεξαρτώμενη δράση των MMPs, μία αξιοπρόσεκτη διαφορά προέκυψε: για την MMP2 η μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε, δηλαδή 20 ng/ml. Αντίθετα, για την MMP9 η μεγαλύτερη αύξηση στη διαπερατότητα προέκυψε στη χαμηλότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε, δηλαδή 0,1

ng/ml. Η αιτιολογία της παραπάνω διαφοράς είναι δύσκολο να επεξηγηθεί, ίσως όμως διαφορές στην κινητική των ενζύμων και στην ειδικότητα υποστρώματος, δηλαδή στις διαφορετικές μεταξύ των ενζύμων υδρολυόμενες πρωτεΐνες, να παίζουν κάποιο ρόλο.

Σχετικά με την MMP2, καμία μεταβολή στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση δεν προέκυψε μετά από επώαση της κορυφαίας επιφάνειας του τοιχωματικού υπεζωκότα με 0,1 και 1 ng/ml ενζύμου. Η αμετάβλητη αντίσταση του τοιχωματικού υπεζωκότα στις χαμηλές συγκεντρώσεις MMP2 θα μπορούσε να θεωρηθεί προστατευτική, δεδομένου ότι η MMP2 εκφράζεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα και υπάρχει φυσιολογικά σε μικρές ποσότητες στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα η δράση της MMP2 στην αντίσταση φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην κορυφαία σε σχέση με την πλαγιοβασική επιφάνεια του υπεζωκότα. Στο πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα η δράση της MMP2 στην αντίσταση φαίνεται να είναι παρόμοια στην κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια. Επιπλέον η MMP2 καθυστερεί να δράσει στην πλαγιοβασική επιφάνεια του τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα σε συγκέντρωση 1 ng/ml και στην πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα σε συγκέντρωση 0,1 ng/ml, αφού σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η πτώση στη  $R_{TM}$  ξεκινάει από το 25<sup>ο</sup> λεπτό.

Σχετικά με την MMP9, στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα η πτώση της  $R_{TM}$  είναι μεγαλύτερη στην πλαγιοβασική απ'ότι στην κορυφαία επιφάνεια στις συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 20 ng/ml. Το αντίθετο ισχύει για τη συγκέντρωση 10 ng/ml.

Σχετικά με την MMP1, δεν ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της μελέτης της επίδρασης της στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου, λόγω της σημαντικής επίδρασης της ουσίας APMA στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα. Η ουσία APMA αποτελεί ένα υδραργυρικό παράγωγο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την

ενεργοποίηση της ανενεργούς μορφής της MMP1, σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας (Sigma Aldrich). Πτώση στη διαμεσοθηλιακή  $R_{TM}$  από υδραργυρικά παράγωγα έχει καταγραφεί επίσης από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, στην οποία η επώαση τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου με  $HgCl_2$  οδηγεί σε ταχύτετη πτώση στη  $R_{TM}$  [59]. Τα υδραργυρικά παράγωγα αναστέλλουν τους διαύλους ακουαπορίνης (AQP) που εντοπίζονται στα μεσοθηλιακά κύτταρα, και οι οποίοι επιτρέπουν την ελεύθερη δίοδο νερού διαμέσου της μεσοθηλιακής στιβάδας. Συγχρόνως με το νερό, ορισμένοι διάλυτοι AQP επιτρέπουν και τη δίοδο ιόντων [179] με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη πτώση στη  $R_{TM}$  του υπεζωκότα. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, ο υδράργυρος αποτελεί τοξική ουσία για τα μεσοθηλιακά κύτταρα, κάτι το οποίο θα μπορούσε επίσης να ερμηνεύσει την παρατηρούμενη αυξημένη διαπερατότητα που προκαλεί η ουσία APMA στην παρούσα μελέτη [180].

Ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών-2 (TIMP-2) χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα με την τεχνική Ussing για να διαπιστωθεί εάν δύναται να αναστέλλει την πτώση της  $R_{TM}$  που προκαλούν οι MMP2 και MMP9. Πράγματι φάνηκε ότι η ταυτόχρονη προσθήκη MMP2 ή MMP9 με τον TIMP-2 οδηγούν σε μερική αναστολή της πτώσης της  $R_{TM}$  απ'ότι η προσθήκη μόνο του ενζύμου. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε τόσο στο τοιχωματικό όσο και στο πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα και τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια, αν και δεν υπήρξε ιδιαίτερα εμφανές στην πλαγιοβασική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα. Εξάλλου η προσθήκη μόνο του TIMP-2 στον υπεζωκότα οδηγεί σε πτώση της  $R_{TM}$ , η οποία προσεγγίζει το -66% στην πλαγιοβασική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα. Ορισμένες μελέτες αποδίδουν στους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-1, -2 και -3 δράση αυξητικού παράγοντα και έχουν μάλιστα βρεθεί υποδοχείς

αυτών σε κύτταρα [159]. Μάλιστα για τον TIMP-2 αναφέρεται ότι η μέγιστη δράση του σαν αυξητικός παράγοντας επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση 10 ng/ml [181]. Είναι πιθανόν ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για τον TIMP-2 και η πτώση της  $R_{TM}$  να αποδίδεται σε δράση του TIMP-2 σε αυτούς τους υποδοχείς. Η αναστολή της δράσης των MMPs στη διαπερατότητα από τον TIMP-2 επιβεβαιώνει ότι η πτώση της  $R_{TM}$  είναι αποτέλεσμα της δράσης των MMPs.

Εν συνεχεία ερευνήθηκε ο πιθανός μηχανισμός που μπορεί να δικαιολογήσει την επίδραση των MMPs στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση και μελετήθηκε εάν οι πρωτεΐνες των αποφρακτικών συνδέσεων, οκκλουδίνη και κλαουδίνη, μπορεί να υδρολυθούν από τις MMPs. Οι αποφρακτικές συνδέσεις (TJs) αποτελούν έναν ειδικό τύπο διακυτταρικών συνδέσεων που εντοπίζονται στην κορυφαία περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων. Περιβάλλουν το κύτταρο σαν μία συνεχής, περιμετρική δομή και σχηματίζουν έναν ημιδιαπερατό φραγμό για την παθητική διάχυση ιόντων, μικρών μη φορτισμένων μορίων αλλά και κυττάρων [182]. Οι κύριες λειτουργίες των αποφρακτικών συνδέσεων είναι η ρύθμιση της παρακυττάριας διαπερατότητας (“barrier function”), η διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων (“fence function”) αλλά και κυτταρικές λειτουργίες όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των κυττάρων [183]. Οι κλαουδίνες (MB 20-27 KDa) αποτελούν τη σημαντικότερη πρωτεΐνη των αποφρακτικών συνδέσεων και έχουν περιγραφεί 24 μέλη της οικογένειας στον άνθρωπο που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια [184]. Υπάρχει οργανο- και ιστο-ειδική έκφραση των κλαουδινών: ορισμένες, όπως η κλαουδίνη-1, εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς των θηλαστικών, ενώ άλλες εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς ή σε συγκεκριμένες περιόδους της ανάπτυξης [184]. Η οκκλουδίνη αποτελεί μία

διαμεμβρανική πρωτεΐνη των αποφρακτικών συνδέσεων με MB 60 KDa και παρουσιάζει τέσσερις διαφορετικές ισομορφές, όλες από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA [185]. Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στην άποψη ότι ο ρόλος της οκκλουδίνης δεν είναι καθοριστικός για το σχηματισμό και τη λειτουργία των αποφρακτικών συνδέσεων αλλά μάλλον ρυθμιστικός [186, 187]. Στα μεσοθηλιακά κύτταρα οι αποφρακτικές συνδέσεις έχουν πλάτος 8-9 nm και μοιάζουν με εκείνες του φλεβικού ενδοθηλίου, όπως έχει αποκαλυφθεί από μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου [188, 189]. Η πρωτεϊνική σύσταση των αποφρακτικών συνδέσεων σε υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα δεν έχει μέχρι τώρα μελετηθεί με μοριακές τεχνικές, αν και έχει δειχθεί η παρουσία της οκκλουδίνης σε μεσοθηλιακά κύτταρα περιτοναίου [190] και της κλαουδίνης-1 σε βλαστικά κύτταρα ωοθήκης, που θεωρείται ότι έχουν κοινή προέλευση με τα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα [191].

Τα πειράματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την οκκλουδίνη και την κλαουδίνη κατέδειξαν τη συνεχή χρώση τους στην κυτταρική περιφέρεια η οποία δεν αποδυναμωνόταν και παρέμεινε στην κυτταρική μεμβράνη μετά την επώαση με τις MMPs. Σύμφωνα με μελέτες ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές καλλιέργειες, η οκκλουδίνη εντοπίζεται αρχικά στο κυτταρόπλασμα, εγκλεισμένη σε κοκκία, εν συνεχεία στην πλαγιοβασική κυτταροπλασματική μεμβράνη και μόνο σε συνθήκες αυξημένης συνεκτικότητας των κυττάρων η οκκλουδίνη μεταναστεύει στις αποφρακτικές συνδέσεις της κορυφαίας επιφάνειας, συμβάλλοντας στη μείωση της παρακυττάριας διαπερατότητας [192, 193]. Μεταβολές στο επίπεδο φωσφορυλίωσης καθορίζουν πιθανότατα την τελική κατάληξη και εντόπιση της οκκλουδίνης [192]. Παρομοίως για την κλαουδίνη, έχει εντοπιστεί στο βασικό διαμέρισμα της κυτταρικής μεμβράνης και έχει ειπωθεί η φωσφορυλίωσή της προωθεί την ενσωμάτωσή της στις

αποφρακτικές συνδέσεις [194]. Στην παρούσα μελέτη, καμία χρώση της οκκλουδίνης και κλαουδίνης δε φάνηκε στο κυτταρόπλασμα παρά μόνο στην κυτταρική μεμβράνη, πιθανότατα στα σημεία σχηματισμού των αποφρακτικών συνδέσεων.

Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης αποκάλυψαν ότι η οκκλουδίνη και κλαουδίνη εκφράζονται στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα υπό φυσιολογικές συνθήκες και δε διασπώνται από τις MMPs. Πιο συγκεκριμένα για την οκκλουδίνη, η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση αποκάλυψε τρεις κύριες ζώνες στα ακόλουθα MB: 60 KDa, 85 KDa και μία ευρεία ζώνη > 60 KDa. Αυτές οι ζώνες είναι πιθανό να οφείλονται στην ύπαρξη διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης ή σε μεταμεταφραστική τροποποίηση, π.χ φωσφορυλίωση. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η οκκλουδίνη εμφανίζει πολλαπλές ζώνες μετανάστευσης στα περισσότερα θηλαστικά ως αποτέλεσμα της ευρείας φωσφορυλίωσής της σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Μάλιστα σε επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα σκύλου εμφανίζονται περισσότερες από 10 μπάντες σε MB μεταξύ 62 και 82 KDa [192, 195]. Κάποιος βαθμός φωσφορυλίωσης ίσως να εξηγεί τις πολλές ζώνες μετανάστευσης της οκκλουδίνης, όπως προέκυψε στην παρούσα μελέτη. Εκτός από το πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης, όπως αυτό περιγράφηκε ανωτέρω στις μεθόδους, επιπλέον πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος με MMP2 και MMP9 συγκέντρωσης 10 µg/ml για τρεις ώρες. Και πάλι όμως καμία μεταβολή στις ζώνες της οκκλουδίνης και κλαουδίνης δεν προέκυψε. Εναλλακτικά, σε κάποια πειράματα επώαστηκαν απευθείας τα μεσοθηλιακά κύτταρα (αντί του κυτταρικού εκχυλίσματος) στα πιάτα με MMPs συγκέντρωσης 10 µg/ml για μία ώρα και ακολούθησε λήψη του κυτταρικού εκχυλίσματος με διάλυμα λύσης που περιείχε: 0,5 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X,

0,2 mM PMSF και 0,5 Mm DTT. Οι πρωτεΐνες οκκλουδίνη και κλαουδίνη παρέμειναν ανεπηρέαστες από τη δράση των MMPs.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με εκείνα παλιότερων μελετών, σύμφωνα με τα οποία οι MMPs αυξάνουν την παρακυττάρια διαπερατότητα μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης των TJs. Συγκεκριμένα, οι MMPs έχουν συσχετισθεί με την αύξηση της τριχοειδικής διαπερατότητας που ακολουθεί την ισχαιμική βλάβη στον εγκέφαλο [150], στο μυοκάρδιο [196], στους πνεύμονες [197] και στους νεφρούς [198]. Αυτές οι μελέτες αποδίδουν στις MMPs θεμελιώδη ρόλο στην πορεία της φλεγμονώδους εξεργασίας και στην αύξηση της τριχοειδικής διαπερατότητας στη φλεγμονή. Ενδεικτικές είναι οι παρακάτω μελέτες κυτταρικών καλλιιεργειών και *in vivo* πειραμάτων, στις οποίες έχει δειχθεί ότι οι MMPs υδρολύουν τις αποφρακτικές συνδέσεις οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα: σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (HUVEC) οι MMPs διασπούν την οκκλουδίνη (εμφάνιση κλάσματος 50 KDa στην ανοσοαποτύπωση) και αυξάνουν την παρακυττάρια ροή ραδιοσημασμένης δεξτράνης. Στον ανοσοφθορισμό υπάρχει ανακατανομή της οκκλουδίνης από την κυτταρική μεμβράνη σε όλο το κυτταρόπλασμα [193]. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου οι MMPs αυξάνουν τη διαπερατότητά τους λόγω διάσπασης της οκκλουδίνης ενώ η κλαουδίνη παραμένει ανέπαφη. Στην ανοσοαποτύπωση εμφανίζεται κλάσμα της οκκλουδίνης μεγέθους 51 Kda [199]. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς, οι MMP2 και MMP9 διασπούν την οκκλουδίνη, όχι όμως την κλαουδίνη-5, και μειώνουν την αντίσταση των κυτταρικών καλλιιεργειών. Στην ανοσοαποτύπωση οι MMPs μειώνουν την ένταση της μάντας της οκκλουδίνης και στον ανοσοφθορισμό το αποτέλεσμα είναι παρόμοιο [174]. Η πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας σε αρουραίους οδηγεί μετά από 2 ώρες σε αύξηση της



δραστηριότητας της MMP2, αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μειωμένη ένταση της οκκλουδίνης και κλαουδίνης-5 στην ανοσοϊστοχημεία εγκεφάλου. Μετά από 24 ώρες αυξάνεται η δραστηριότητα της MMP9, υπάρχει πλήρη απώλεια της κλαουδίνης-5 σε τομές εγκεφάλου και στην ανοσοαποτύπωση υπάρχει θραύσμα της κλαουδίνης-5 μεγέθους 17 KDa [150]. Τα ποικίλλα πρότυπα διάσπασης των πρωτεϊνών των TJs από τις MMPs υποδηλώνουν ότι υπάρχει ιστοειδική υδρόλυση των TJs από τις MMPs.

Το επόμενο βήμα ήταν να μελετηθεί εάν οι MMPs επηρεάζουν τη διακυττάρια ροή ουσιών μέσω του διαύλου ENaC. Ο ENaC βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων, συμμετέχει στην απορρόφηση νατρίου και νερού από τον υπεζωκοτικό χώρο και είναι μία σημαντική οδός για την απομάκρυνση νατρίου από την υπεζωκοτική κοιλότητα [57]. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν ότι οι MMP2 και MMP9 αυξάνουν το ρεύμα που είναι ευαίσθητο στην αμιλοριδία σε συγκέντρωση 0,1 ng/ml αλλά η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Το μεγάλο εύρος του ρεύματος κλειστού κυκλώματος (Isc) πριν την προσθήκη των MMPs ευθύνεται πιθανόν για το παραπάνω. Η τάση για αύξηση του ρεύματος ENaC από τις MMPs υποδηλώνει πιθανόν τον προστατευτικό τους ρόλο στη συσσώρευση του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έτσι, οι MMPs συμβάλλουν πιθανόν στην απομάκρυνση υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα με ενίσχυση της απορρόφησης νατρίου και κατ' επέκταση υγρού, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της φλεγμονής όταν οι συγκεντρώσεις των MMPs στα υπεζωκοτικά εξιδρώματα είναι σχετικά χαμηλές. Από την άλλη μεριά, οι MMP2 και MMP9 μειώνουν το ρεύμα του ENaC στην υψηλή συγκέντρωση 20 ng/ml που μελετήθηκε. Αυτή η μείωση υποδηλώνει ότι οι MMP2 και MMP9 αναστέλλουν την επαναρρόφηση νατρίου και υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα και συνεπώς οι

MMPs σε υψηλές συγκεντρώσεις συμβάλλουν στη συσσώρευση του υπεζωκοτικού υγρού.

Το εύρημα ότι οι MMPs μειώνουν το ρεύμα ENaC σε συγκέντρωση 20 ng/ml δεν αναμενόταν για τον ακόλουθο λόγο: η μείωση του ρεύματος ENaC ελαττώνει την απορρόφηση νατρίου από το μεσοθήλιο και αυτό θα μεταφραζόταν ως αυξημένη αντίσταση του ιστού και μειωμένη διαπερατότητα. Όμως η διαμεσοθηλιακή αντίσταση αυξάνεται μετά από επώαση με τις MMPs στα πειράματα με την τεχνική Ussing και την εφαρμογή ανοικτού κυκλώματος. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι, επειδή οι MMPs αποτελούν πολυλειτουργικά ένζυμα, η επίδρασή τους στον υπεζωκότα προβάτου αποτελεί τη συνισταμένη πολλών και αποκλίνοντων δράσεων. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι οι MMPs υδρολύουν ή αποδιοργανώνουν την βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς τους [175, 200]. Επιπλέον οι προσφυτικές συνδέσεις, και συγκεκριμένα η πρωτεΐνη καδερίνη, αποτελούν επίσης υπόστρωμα για τις MMPs και η υδρόλυσή τους οδηγεί σε αποσυγκρότηση των TJs και αύξηση της διαπερατότητας [198, 201]. Στην παρούσα μελέτη δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι οι MMP2 και MMP9 διασπών περισσότερες από μία πρωτεΐνες (για παράδειγμα τον ENaC και τη βασική μεμβράνη των μεσοθηλιακών κυττάρων συγχρόνως ή και τις προσφυτικές συνδέσεις). Ένας πιθανός μηχανισμός, μέσω του οποίου οι MMP2 και MMP9 ελαττώνουν το ρεύμα ENaC στη συγκέντρωση 20 ng/ml, είναι η πρωτεολυτική διάσπαση του ENaC από τις MMPs, αν και έμμεση ενεργοποίηση διαύλων μέσω υποδοχέων έχει αναφερθεί. Δεν γνωρίζουμε επίσης με ποιον τρόπο οι MMPs διεγείρουν το ρεύμα ENaC στη συγκέντρωση 0,1 ng/ml. Ένα παρόμοιο διφασικό δοσοεξαρτώμενο φαινόμενο έχει επίσης αναφερθεί για τις σερινοπρωτεάσες: υψηλά επίπεδα σερινοπρωτεασών, όπως η

καλλικρεΐνη και η τρυψίνη, αποδομούν το διάλυτο ENaC και αναστέλλουν τη μεταφορά νατρίου στην κύστη γυρίνου [202, 203] ενώ χαμηλότερα επίπεδα σερινοπρωτεασών έχει βρεθεί ότι διεγείρουν το ρεύμα ENaC. Σίγουρα τα αποτελέσματα αυτά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης με μελέτες υποστρώματος και την εκτέλεση πειραμάτων *in vivo*.

Αν και η  $R_{TM}$  θεωρείται ένας καθιερωμένος δείκτης της διαμεσοθηλιακής διαπερατότητας, ο ρόλος του μεσοθηλίου στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού παραμένει σημείο αντιπαράθεσης. Στην παρούσα μελέτη η τιμή της  $R_{TM}$  στον τοιχωματικό υπεζωκότα βρέθηκε  $15 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$  ενώ η αντίστοιχη τιμή στον πνευμονικό υπεζωκότα  $17 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$ . Οι τιμές αυτές των αντιστάσεων είναι αρκετά χαμηλές και κατατάσσουν τον υπεζωκότα στους ιστούς με «χαλαρές» αποφρακτικές συνδέσεις, όπως το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και η χοληδόχος κύστη [204, 205]. Παρόμοιες τιμές διαμεσοθηλιακής αντίστασης στον υπεζωκότα έχουν καταγράψει και προηγούμενες μελέτες [57]. Οι χαμηλές αυτές τιμές  $R_{TM}$  υποδηλώνουν ότι η παρακυττάρια δίοδος ουσιών και νερού διαμέσου του μεσοθηλίου είναι υψηλή και ότι η αντίσταση που προβάλλει αυτό στην παρακυττάρια ροή είναι σχεδόν αμελητέα. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, οι Zocchi και Agostoni υποστηρίζουν ότι ο υπεζωκότας και το μεσοθήλιο δεν είναι τόσο διαπερατά όσο πιστεύεται και ότι το υπεζωκοτικό υγρό αποτελεί υπερδιήθημα διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων του τοιχωματικού υπεζωκότα αλλά και του μεσοθηλιακού φραγμού [206]. Σύμφωνα με δικές τους μελέτες, η διαπερατότητα της μεσοθηλιακής μονοστιβάδας σε μικρομοριακές και μακρομοριακές ενώσεις είναι παρόμοια με εκείνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών [206, 207] και το μεσοθήλιο του υπεζωκότα δεν αποτελεί έναν παθητικό φάκελο αλλά έναν πραγματικό φραγμό στη διάβαση ουσιών διαμέσου αυτού. Οι ίδιοι

ερευνητές έχουν διατυπώσει την άποψη ότι η βίαιη απογύμνωση του υπεζωκότα από το υποκείμενο πνευμονικό παρέγχυμα ή από το θωρακικό τοίχωμα καταστρέφει τις αποφρακτικές συνδέσεις και επηρεάζει τη διαπερατότητα του ιστού. Το ίδιο μπορεί να συμβεί απ' την έκθεση του μεσοθηλίου στον αέρα [208]. Τα παραπάνω συμβαίνουν πράγματι σε κάποιο βαθμό στην παρούσα μελέτη, παρά την προσπάθεια ο χειρισμός στον υπεζωκοτικό ιστό να είναι όσο το δυνατό μικρότερος. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι το μεσοθήλιο μπορεί να είναι σημαντικό υπό ορισμένες συνθήκες στη δημιουργία υπεζωκοτικών συλλογών. Π.χ έχει δειχθεί ότι το λιποπολυσακχαρίδιο των Gram (-) μικροβίων, η θρομβίνη, τα βακτήρια και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) αυξάνουν τη μεσοθηλιακή διαπερατότητα και συμβάλλουν κατ' αυτόν τον τρόπο στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών [2, 209, 210]. Επίσης έχει βρεθεί ότι το μεσοθήλιο του πνευμονικού υπεζωκότα δεν αποτελεί σημαντικό φραγμό υπό φυσιολογικές συνθήκες σε σκύλους αλλά αποτελεί φραγμό σε περίπτωση πνευμονικού οιδήματος ως αποτέλεσμα αυξημένων υδροστατικών πιέσεων [211]. Παρόμοια στην παρούσα μελέτη η αύξηση της διαπερατότητας που προκαλούν οι MMP2 και MMP9 θα μπορούσε να σημαίνει την ευκολότερη διήθηση του υγρού από το διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα.

Η επιλογή των προβάτων για τη διεξαγωγή πειραμάτων στην παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στην ομοιότητα που εμφανίζει ο υπεζωκότας του προβάτου, σε ότι αφορά τη μορφολογία και τη φυσιολογική του λειτουργία, με εκείνη του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, και στον υπεζωκότα προβάτου και σε εκείνον του ανθρώπου, ο πνευμονικός υπεζωκότας είναι παχύς και η αιμάτωσή του συμβαίνει από τη συστηματική κυκλοφορία [9]. Και στα δύο είδη το μεσοθήλιο του υπεζωκότα αποτελείται από δύο είδη μεσοθηλιακών κυττάρων: τα πλακώδη κύτταρα, που είναι

λιγότερο στεγανά χάριν στις καλά ανεπτυγμένες αποφρακτικές συνδέσεις και τα κυβοειδή κύτταρα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαπερατότητα λόγω του χαμηλότερου αριθμού αποφρακτικών συνδέσεων [212]. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, αφού η τιμή της  $R_{TM}$  στον τοιχωματικό υπεζωκότα βρέθηκε  $15 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$  ενώ η αντίστοιχη στον πνευμονικό υπεζωκότα είναι ελαφρώς υψηλότερη  $17 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$ . Στην επιλογή των προβάτων ως κατάλληλου πειραματικού μοντέλου συνέβαλλε επίσης η αφθονία τους, που δεν έθετε περιορισμό στον αριθμό των πειραμάτων που διεξάγονταν κάθε φορά, η ευκολία στην πρόσβαση και στο χειρισμό τους και η προηγούμενη εμπειρία στη χρήση του συγκεκριμένου πειραματικού ζώου από το εργαστήριο φυσιολογίας, όπου διεξήχθη η παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν για πρώτη φορά έναν σημαντικό ρόλο για τις MMPs στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών. Στα υπεζωκοτικά εξιδρώματα οι MMP2 και MMP9 ανευρίσκονται αυξημένες, όπως έχει βρεθεί από προγενέστερες μελέτες. Στην παρούσα μελέτη προτείνουμε έναν ρόλο για τις MMP2 και MMP9 στη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Οι TJs δεν επηρεάζονται στα μεσοθηλιακά κύτταρα από τις MMPs αλλά η δραστηριότητα του ENaC παρεμποδίζεται από τις MMPs. Είναι πιθανόν ότι υπάρχουν περισσότεροι από ένας μηχανισμοί μέσω των οποίων οι MMPs αυξάνουν τη διαμεσοθηλιακή διαπερατότητα. Εάν επιβεβαιωθεί η δράση των MMPs στη διαμεσοθηλιακή διαπερατότητα, τότε η ανάπτυξη και η χρήση αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών στην κλινική πράξη θα μπορούσε να φανεί πολύτιμη στην αντιμετώπιση των υπεζωκοτικών συλλογών.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνηγορούν υπέρ των ακόλουθων συμπερασμάτων:

1. Τόσο η MMP2 όσο και η MMP9 μειώνουν τη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) στο τοιχωματικό και πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα. Η πτώση της  $R_{TM}$  υποδηλώνει ότι οι MMPs αυξάνουν τη διαπερατότητα του υπεζωκότα.
2. Η πτώση στην  $R_{TM}$  ξεκινάει σε γενικές γραμμές μεταξύ του 10<sup>ου</sup> και 15<sup>ου</sup> λεπτού και αυξάνεται προοδευτικά στη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (χρονοεξαρτώμενη δράση των MMPs).
3. Παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη δράση των MMP2 και MMP9, η οποία όμως διαφέρει μεταξύ των δύο MMPs: Για την MMP2, η μεγαλύτερη πτώση στην  $R_{TM}$  παρατηρείται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (20 ng/ml) ενώ για την MMP9 η μεγαλύτερη πτώση στη  $R_{TM}$  προέκυψε στη μικρότερη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε (0,1 ng/ml).
4. Ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών-2 (TIMP-2) φαίνεται να αναστέλλει μερικώς τη δράση της MMP2 και MMP9 στη διαπερατότητα. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η πτώση της  $R_{TM}$  είναι αποτέλεσμα της δράσης των MMPs.
5. Ερευνήθηκαν οι μηχανισμοί που μπορεί να ευθύνονται για την αύξηση της διαπερατότητας που προκαλούν οι MMP2 και MMP9 στον υπεζωκότα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν δύο μονοπάτια διαπερατότητας: το παρακυττάριο, μέσω των πρωτεϊνών των αποφρακτικών συνδέσεων και το διακυττάριο, μέσω της δραστηριότητας του επιθηλιακού διαύλου  $Na^+$  (ENaC).
6. Οι πρωτεΐνες των αποφρακτικών συνδέσεων οκκλουδίνη και κλαουδίνη-1 παραμένουν αμετάβλητες μετά από επώαση των μεσοθηλιακών κυττάρων με τις

MMP2 και MMP9, όπως φάνηκε σε πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης. Αυτό σημαίνει ότι οι MMPs δε διασπών τις αποφρακτικές συνδέσεις.

7. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που καταδεικνύει την παρουσία της οκκλουδίνης και κλαουδίνης-1 σε υπεζωκοτικά μεσοθηλιακά κύτταρα, καθώς δεν υπάρχουν παρόμοιες αναφορές στη βιβλιογραφία.
8. Η δραστηριότητα του ENaC μελετήθηκε μέσω της μέτρησης του ευαίσθητου ρεύματος στην αμιλορίδη. Το ευαίσθητο ρεύμα στην αμιλορίδη σε ιστό αναφοράς είναι  $7,6 \pm 4,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .
9. Όταν ο υπεζωκότας επωαστεί με 0,1 ng/ml MMP2 ή MMP9, τότε το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα αυξάνεται αλλά η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.
10. Όταν ο υπεζωκότας επωαστεί με 20 ng/ml MMP2 ή MMP9, τότε το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα ελαττώνεται στατιστικά σημαντικά. Αυτό υποδηλώνει ότι οι MMPs μειώνουν την απορρόφηση νατρίου από την κορυφαία επιφάνεια του υπεζωκότα και συμβάλλουν στη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.
11. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που παρέχει ενδείξεις για την επίδραση των MMPs στη δραστηριότητα του ENaC.
12. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν έναν ρόλο των MMP2 και MMP9 στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών.

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση των μεταλλοπρωτεϊνών 2 (MMP2) και 9 (MMP9) στη διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ) του τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα προβάτου, χρησιμοποιώντας την τεχνική Ussing system. Η τιμή αναφοράς της  $R_{TM}$  του τοιχωματικού υπεζωκότα βρέθηκε  $15 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$ , ενώ αυτή του πνευμονικού βρέθηκε  $17 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$ . Τόσο η MMP2 όσο και η MMP9 μείωσαν τη  $R_{TM}$  τόσο στην κορυφαία όσο και στην πλαγιοβασική επιφάνεια και τόσο στο τοιχωματικό και στο πνευμονικό πέταλο του υπεζωκότα. Η πτώση της  $R_{TM}$  υποδηλώνει ότι οι MMPs αυξάνουν τη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Η πτώση στη  $R_{TM}$  ξεκινούσε μεταξύ του 10<sup>00</sup> και 15<sup>00</sup> λεπτού και αυξανόταν προοδευτικά στη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (χρονοεξαρτώμενη δράση των MMPs). Επιπλέον, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη δράση των MMP2 και MMP9, η οποία όμως διέφερε μεταξύ των δύο MMPs: Για την MMP2, η μεγαλύτερη πτώση στη  $R_{TM}$  παρατηρήθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (20 ng/ml) ενώ για την MMP9 η μεγαλύτερη πτώση στη  $R_{TM}$  προέκυψε στη μικρότερη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε (0,1 ng/ml). Η ταυτόχρονη επώαση του υπεζωκότα με τις MMPs και τον ιστικό αναστολλέα των μεταλλοπρωτεϊνών-2 (TIMP-2) κατέστειλε τη δράση των MMPs στον υπεζωκότα.

Εν συνεχεία, ερευνήθηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την αύξηση της διαπερατότητας που προκαλούν οι MMP2 και MMP9 στον υπεζωκότα. Μελετήθηκαν δύο μονοπάτια διαπερατότητας: το παρακυττάριο, μέσω των πρωτεϊνών των αποφρακτικών συνδέσεων και το διακυττάριο, μέσω της δραστηριότητας του επιθηλιακού διαύλου  $\text{Na}^+$  (ENaC). Οι πρωτεΐνες των αποφρακτικών συνδέσεων



οκκλουδίνη και κλαουδίνη-1 παρέμειναν αμετάβλητες μετά από επώαση των μεσοθηλιακών κυττάρων με τις MMP2 και MMP9, όπως φάνηκε σε πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης. Αυτό σημαίνει ότι οι MMPs δε διασπών τις αποφρακτικές συνδέσεις.

Η δραστηριότητα του ENaC μελετήθηκε μέσω της μέτρησης του ευαίσθητου ρεύματος στην αμιλορίδη. Η αμιλορίδη αποτελεί έναν αναστολέα του ENaC. Το ευαίσθητο ρεύμα στην αμιλορίδη σε ιστό αναφοράς ήταν  $7,6 \pm 4,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Όταν ο υπεζωκότας επώαστηκε με  $0,1 \text{ ng/ml}$  MMP2 ή MMP9, τότε το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα αυξήθηκε αλλά η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Όταν ο υπεζωκότας επώαστηκε με  $20 \text{ ng/ml}$  MMP2 ή MMP9, τότε το ευαίσθητο στην αμιλορίδη ρεύμα ελαττώθηκε στατιστικά σημαντικά ( $p < 0,05$ ). Αυτό υποδηλώνει ότι οι MMPs μειώνουν την απορρόφηση νατρίου από την κορυφαία επιφάνεια του υπεζωκότα και συμβάλλουν στη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν στον τοιχωματικό υπεζωκότα. Στον πνευμονικό υπεζωκότα η προσθήκη αμιλορίδης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο ρεύμα κλειστού κυκλώματος και στην αντίσταση.

Συμπερασματικά, οι MMPs αυξάνουν τη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου χωρίς να επιδρούν στις πρωτεΐνες οκκλουδίνη και κλαουδίνη των αποφρακτικών συνδέσεων. Μειώνουν όμως τη δραστηριότητα του διαύλου ENaC, παρεμποδίζοντας την απορρόφηση νατρίου και νερού από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Είναι πιθανό οι MMPs να επιδρούν και σε άλλες πρωτεΐνες-στόχους, πλην του διαύλου ENaC, όπως οι προσφυτικές συνδέσεις των μεσοθηλιακών κυττάρων ή η βασική τους μεμβράνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν τη συμμετοχή των MMP2 και MMP9 στην παθογένεια των υπεζωκοτικών συλλογών.

## SUMMARY

In the present study the effect of metalloproteinases 2 (MMP2) and 9 (MMP9) on the transmesothelial resistance ( $R_{TM}$ ) of sheep's parietal and visceral pleura was studied using the Ussing chamber technique. Basal transmesothelial resistance of parietal pleura was found  $15 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$ , whereas that of visceral pleura was found to be  $17 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$ . Both MMP2 and MMP9 reduced  $R_{TM}$  at the apical and basolateral side of the pleura and at parietal and visceral pleura. The decline in  $R_{TM}$  suggests that MMPs increase pleural permeability. The decline in  $R_{TM}$  started between the 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> min and increased progressively thereafter until the experiment was terminated (time-dependent effect of MMPs). Furthermore, a dose-dependent effect of MMP2 and MMP9 was observed. This effect differed between the two MMPs: For MMP2, the greater decline in  $R_{TM}$  occurred at the higher concentration studied (20 ng/ml) whereas for MMP9 the greater decline in  $R_{TM}$  occurred at the lower concentration applied (0.1 ng/ml). The simultaneous incubation of MMPs with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppressed the effect of MMPs on pleural permeability.

Afterward, the possible mechanisms through which MMP2 and MMP9 augment pleural permeability were investigated. Two permeability pathways were examined: the paracellular pathway, specifically tight junction proteins, and the transcellular pathway, specifically the activity of epithelial sodium channel (ENaC). Tight junction proteins occludin and claudin-1 remained intact after incubation of pleural mesothelial cells with MMP2 and MMP9, as it was indicated by indirect immunofluorescence and western blot experiments. This suggests that MMPs do not disturb tight junction proteins.

The activity of ENaC was investigated via amiloride-sensitive current measurements. Amiloride is an ENaC inhibitor. In control experiments, the amiloride-sensitive current was  $7.6 \pm 4.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . When the pleura was incubated with 0.1 ng/ml of MMP2 or MMP9, the amiloride-sensitive current increased but this was not statistically significant. On the other hand, when the pleura was incubated with 20 ng/ml of MMP2 or MMP9, the amiloride-sensitive current decreased statistically significant ( $p < 0.05$ ). This finding indicates that MMPs reduce sodium absorption from the apical side of the pleura and thus they contribute to pleural fluid formation. The above results refer to the parietal pleura. On visceral pleura amiloride did not alter neither the short circuit current nor the tissue resistance.

To conclude, MMPs increase the permeability of sheep pleura, without affecting tight junction proteins occludin and claudin-1. MMPs are able to reduce ENaC activity, and thus hinder sodium and water absorption from the pleural space. It is possible that MMPs disrupt other protein-targets, except for ENaC, i.e. proteins of adherens junctions or basement membrane. The above results suggest a role for MMP2 and MMP9 in pathophysiology of pleural fluid formation.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chung CL, Chen CH, Sheu JR, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines, transforming growth factor-beta1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. *Chest* 2005; 128(2): 690-697.
2. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB, Jr., Ellis LM. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999; 5(11): 3364-3368.
3. Yano S, Shinohara H, Herbst RS, Kuniyasu H, Bucana CD, Ellis LM, Fidler IJ. Production of experimental malignant pleural effusions is dependent on invasion of the pleura and expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor by human lung cancer cells. *Am J Pathol* 2000; 157(6): 1893-1903.
4. Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G. Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study. *Chest* 1988; 93(1): 149-153.
5. Bernaudin J.F. FJ, ed. Anatomy of the blood and lymphatic circulation of the pleural serosa In: *The The Pleura in Health and Disease* J. Chretien, J. Bignon, A. Hirsch Dekker, New York, 1985.
6. Wang NS. Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19(2): 229-240.
7. Michailova KN, Usunoff KG. Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006; 183: i-vii, 1-144, back cover.
8. Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Staub NC. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. *Anat Rec* 1984; 208(3): 401-409.
9. R.F. McLaughlin TWS, Canada R.O A study of the subgross pulmonary anatomy of varioua mammals. *Am J Anat* 1961(108): 149-159.
10. Lemos M, Pozo RM, Montes GS, Saldiva PH. Organization of collagen and elastic fibers studied in stretch preparations of whole mounts of human visceral pleura. *Ann Anat* 1997; 179(5): 447-452.

11. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4): 621-642.
12. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002; 7(3): 171-191.
13. Wang NS. The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110(5): 623-633.
14. Madison LD, Bergstrom-Porter B, Torres AR, Shelton E. Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells. Formation of microvilli and vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol* 1979; 82(3): 783-797.
15. Harvey W, Amlot PL. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *J Pathol* 1983; 139(3): 337-347.
16. Rennard SI, Jaurand MC, Bignon J, Kawanami O, Ferrans VJ, Davidson J, Crystal RG. Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130(2): 267-274.
17. Visser CE, Steenbergen JJ, Betjes MG, Meijer S, Arisz L, Hoefsmit EC, Krediet RT, Beelen RH. Interleukin-8 production by human mesothelial cells after direct stimulation with staphylococci. *Infect Immun* 1995; 63(10): 4206-4209.
18. Whitaker D, Papadimitriou J. Mesothelial healing: morphological and kinetic investigations. *J Pathol* 1985; 145(2): 159-175.
19. Jones LM, Gardner MJ, Catterall JB, Turner GA. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13(5): 373-380.
20. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(1): 9-16.
21. Light R, ed. Anatomy of the Pleura. In: Pleural Diseases. 4 ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001.
22. Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Roos PJ, Staub NC. Structure, blood supply, and lymphatic vessels of the sheep's visceral pleura. *Am J Anat* 1982; 165(3): 277-294.
23. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 2002; 20(6): 1545-1558.
24. Leak LV, Rahil K. Permeability of the diaphragmatic mesothelium: the ultrastructural basis for "stomata". *Am J Anat* 1978; 151(4): 557-593.

25. Nakatani T, Shinohara H, Matsuda T. On the ovarian bursa of the golden hamster. II. Intercellular connections in the bursal epithelium and passage of ferritin from the cavity into lymphatics. *J Anat* 1986; 148: 1-12.
26. Tsilibary EC, Wissig SL. Lymphatic absorption from the peritoneal cavity: regulation of patency of mesothelial stomata. *Microvasc Res* 1983; 25(1): 22-39.
27. Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111(1): 12-20.
28. Li J, Zhao Z, Zhou J, Yu S. A study of the three-dimensional organization of the human diaphragmatic lymphatic lacunae and lymphatic drainage units. *Ann Anat* 1996; 178(6): 537-544.
29. Michailova KN. Postinflammatory changes of the diaphragmatic stomata. *Ann Anat* 2001; 183(4): 309-317.
30. Li JC TB, Giovanni Z. Discovery of frog pericardial lymphatic stomata. *Acta Zool Sin* 2000; 46: 372-375.
31. Doboszynska T, Andronowska A, Modzelewska B. Immunohistochemical localisation of ET-1 and eNOS in lymphatic stomata of the porcine broad ligament of the uterus. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39(1): 15-22.
32. Shinohara H. Distribution of lymphatic stomata on the pleural surface of the thoracic cavity and the surface topography of the pleural mesothelium in the golden hamster. *Anat Rec* 1997; 249(1): 16-23.
33. Stewart PB. The rate of formation and lymphatic removal of fluid in pleural effusions. *J Clin Invest* 1963; 42: 258-262.
34. Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 Pt 1): 1023-1026.
35. Costabel U, Guzman J. Effect of smoking on bronchoalveolar lavage constituents. *Eur Respir J* 1992; 5(7): 776-779.
36. Miserocchi G, Agostoni E. Contents of the pleural space. *J Appl Physiol* 1971; 30(2): 208-213.
37. Sahn SA, Willcox ML, Good JT, Jr., Potts DE, Filley GF. Characteristics of normal rabbit pleural fluid: physiologic and biochemical implications. *Lung* 1979; 156(1): 63-69.

38. Efrati P, Nir E. Morphological and cytochemical investigation of human mesothelial cells from pleural and peritoneal effusions: a light and electron microscopy study. *Isr J Med Sci* 1976; 12(7): 662-673.
39. Rolf LL, Travis DM. Pleural fluid-plasma bicarbonate gradients in oxygen-toxic and normal rats. *Am J Physiol* 1973; 224(4): 857-861.
40. Agostoni E, Zocchi L. Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space. *Clin Chest Med* 1998; 19(2): 241-260.
41. Negrini D, Miserocchi G. Size-related differences in parietal extrapleural and pleural liquid pressure distribution. *J Appl Physiol* 1989; 67(5): 1967-1972.
42. Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, Berthiaume Y, Staub NC. Removal of pleural liquid and protein by lymphatics in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988; 64(1): 384-390.
43. Courtice FC, Simmonds WJ. Absorption of fluids from the pleural cavities of rabbits and cats. *J Physiol* 1949; 109(1-2): 117-130.
44. Courtice FC, Simmonds WJ. Physiological significance of lymph drainage of the serous cavities and lungs. *Physiol Rev* 1954; 34(3): 419-448.
45. Negrini D, Pistolesi M, Miniati M, Bellina R, Giuntini C, Miserocchi G. Regional protein absorption rates from the pleural cavity in dogs. *J Appl Physiol* 1985; 58(6): 2062-2067.
46. Wang PM, Lai-Fook SJ. Regional pleural filtration and absorption measured by fluorescent tracers in rabbits. *Lung* 1999; 177(5): 289-309.
47. Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 1997; 10(1): 219-225.
48. Bodega F, Agostoni E. Contribution of lymphatic drainage through stomata to albumin removal from pleural space. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 142(2-3): 251-263.
49. Agostoni E, Piper J. Capillary pressure and distribution of vascular resistance in isolated lung. *Am J Physiol* 1962; 202: 1033-1036.
50. Kinasevitz GT, Fishman AP. Influence of alterations in Starling forces on visceral pleural fluid movement. *J Appl Physiol* 1981; 51(3): 671-677.
51. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol* 2002; 93(5): 1806-1812.

52. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Albumin transcytosis in mesothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(1): L3-11.
53. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. Electrolyte transport across the pleura of rabbits. *Respir Physiol* 1991; 86(1): 125-138.
54. Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol* 1990; 81(1): 19-27.
55. Zocchi L, Raffaini A, Agostoni E. Effect of adrenaline and alpha-agonists on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits. *Exp Physiol* 1997; 82(3): 507-520.
56. Zocchi L, Agostoni E, Raffaini A. Effect on phloridzin on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits. *Exp Physiol* 1996; 81(6): 957-967.
57. Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol* 2001; 90(4): 1565-1569.
58. Sarkos S, Hatzoglou C, Dahabre J, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 132(2): 233-237.
59. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Eleftheriadis T, Stefanidis I. Aquaporin-1 and sodium transport in the peritoneal membrane--need for more research? *Kidney Int* 2006; 70(9): 1663; author reply 1663-1664.
60. Nie HG, Tucker T, Su XF, Na T, Peng JB, Smith PR, Idell S, Ji HL. Expression and Regulation of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels by Nucleotides in Pleural Mesothelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008.
61. Sironi C, Bodega F, Porta C, Monaco A, Zocchi L, Agostoni E. Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter is also expressed in mesothelium of species with thick visceral pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 161(3): 261-266.
62. Sironi C, Bodega F, Porta C, Zocchi L, Agostoni E. Expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT1) in visceral and parietal mesothelium of rabbit pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 159(1): 68-75.
63. Kouritas VK, Hatzoglou C, Foroulis CN, Gourgoulisanis KI. Human parietal pleura present electrophysiology variations according to location in pleural cavity. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008; 7(4): 544-547.



64. Lindemann B. Fluctuation analysis of sodium channels in epithelia. *Annu Rev Physiol* 1984; 46: 497-515.
65. Palmer LG. Epithelial Na channels: function and diversity. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 51-66.
66. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996; 12(3): 325-328.
67. Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 2002; 82(3): 569-600.
68. Knowles MR, Stutts MJ, Yankaskas JR, Gatzky JT, Boucher RC, Jr. Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 1986; 7(2): 285-297.
69. Garty H. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channels. *FASEB J* 1994; 8(8): 522-528.
70. Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M, Barbry P. Molecular biology of the amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Exp Physiol* 1996; 81(3): 483-492.
71. Rossier BC. The epithelial sodium channel (ENaC): new insights into ENaC gating. *Pflugers Arch* 2003; 446(3): 314-316.
72. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002; 82(3): 735-767.
73. Weisz OA, Johnson JP. Noncoordinate regulation of ENaC: paradigm lost? *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(5): F833-842.
74. Nie HG, Tucker T, Su XF, Na T, Peng JB, Smith PR, Idell S, Ji HL. Expression and regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by nucleotides in pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40(5): 543-554.
75. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 1997; 389(6651): 607-610.
76. Planes C, Caughey GH. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by peptidases. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78: 23-46.

77. Yu JX, Chao L, Chao J. Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem* 1994; 269(29): 18843-18848.
78. Donaldson SH, Hirsh A, Li DC, Holloway G, Chao J, Boucher RC, Gabriel SE. Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 8338-8345.
79. Yu JX, Chao L, Chao J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostasin mRNA. *J Biol Chem* 1995; 270(22): 13483-13489.
80. Planes C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, Matthay M, Clerici C, Rossier B. In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(6): L1099-1109.
81. Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Kleyman TR. Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48491-48494.
82. Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR. Maturation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem* 2003; 278(39): 37073-37082.
83. Carattino MD, Sheng S, Bruns JB, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. The epithelial Na<sup>+</sup> channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit. *J Biol Chem* 2006; 281(27): 18901-18907.
84. Bruns JB, Carattino MD, Sheng S, Maarouf AB, Weisz OA, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. Epithelial Na<sup>+</sup> channels are fully activated by furin- and prostasin-dependent release of an inhibitory peptide from the gamma-subunit. *J Biol Chem* 2007; 282(9): 6153-6160.
85. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels and increases airway epithelial Na<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(5): L813-819.
86. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Serine protease activation of near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(1): C190-194.

87. Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC. A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 2007; 282(1): 58-64.
88. Shipway A, Danahay H, Williams JA, Tully DC, Backes BJ, Harris JL. Biochemical characterization of prostasin, a channel activating protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 953-963.
89. Bengrine A, Li J, Hamm LL, Awayda MS. Indirect activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by trypsin. *J Biol Chem* 2007; 282(37): 26884-26896.
90. Wiener-Kronish JP, Matthay MA. Pleural effusions associated with hydrostatic and increased permeability pulmonary edema. *Chest* 1988; 93(4): 852-858.
91. Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* 2002; 200(6): 561-574.
92. Behzadian MA, Wang XL, Windsor LJ, Ghaly N, Caldwell RB. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(3): 853-859.
93. Leone AK, Chun JA, Koehler CL, Caranto J, King JM. Effect of proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on epithelial barrier function and matrix metalloproteinase-9 in Madin Darby canine kidney cells. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19(1-4): 99-112.
94. Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol* 2005; 166(5): 1555-1563.
95. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J* 2004; 18(6): 690-692.
96. Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25527-25536.

97. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8): 2145-2154.
98. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod* 2000; 27(3): 227-233.
99. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48: 1014-1022.
100. Das S, Mandal M, Chakraborti T, Mandal A, Chakraborti S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253(1-2): 31-40.
101. Brauer PR. MMPs--role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 2006; 11: 447-478.
102. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86(1): 324-333.
103. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29(44): 10261-10270.
104. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; 29(24): 5783-5789.
105. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297(5584): 1186-1190.
106. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(12): 4322-4326.
107. Galleguillos D, Vecchiola A, Fuentealba JA, Ojeda V, Alvarez K, Gomez A, Andres ME. PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* 2004; 279(3): 2005-2011.
108. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(2): 197-250.

109. Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(1): 2-13.
110. Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 13693-13698.
111. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 8403-8408.
112. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3): 221-233.
113. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
114. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(2): 163-176.
115. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994; 269(41): 25742-25746.
116. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 2002; 277(39): 36288-36295.
117. Lijnen HR, Uguw F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 1998; 37(14): 4699-4702.
118. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; 277(5323): 225-228.
119. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 2000; 148(3): 615-624.

120. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137(6): 1445-1457.
121. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267(5199): 891-893.
122. Mizgerd JP, Spieker MR, Doerschuk CM. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol* 2001; 166(6): 4042-4048.
123. Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 1997; 9(10): 770-780.
124. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 1): 111-118.
125. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; 153(5): 893-904.
126. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271(25): 14657-14660.
127. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; 289(5482): 1202-1206.
128. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1-3): 133-144.
129. Mattos W, Lim S, Russell R, Jatakanon A, Chung KF, Barnes PJ. Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma: effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids. *Chest* 2002; 122(5): 1543-1552.
130. Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, Maes T, Dhulst A, Louis R, Foidart JM, Noel A, Pauwels R. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into

the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2003; 171(2): 1016-1022.

131. Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 19683-19690.

132. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277(5334): 2002-2004.

133. Golubkov VS, Chekanov AV, Doxsey SJ, Strongin AY. Centrosomal pericentrin is a direct cleavage target of membrane type-1 matrix metalloproteinase in humans but not in mice: potential implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* 2005; 280(51): 42237-42241.

134. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87(9): 1215-1221.

135. Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res* 1990; 50(19): 6184-6191.

136. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348(6303): 699-704.

137. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94(6): 2493-2503.

138. Kadoglou NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin* 2004; 20(4): 419-432.

139. Chapman RE, Spinale FG. Extracellular protease activation and unraveling of the myocardial interstitium: critical steps toward clinical applications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(1): H1-H10.

140. Deschamps AM, Spinale FG. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20(3): 211-216.
141. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006; 11: 529-543.
142. Celiker MY, Ramamurthy N, Xu JW, Wang M, Jiang Y, Greenwald R, Shi YE. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by systemic tissue inhibitor of metalloproteinases 4 gene delivery. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12): 3361-3368.
143. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997; 238(1-2): 53-56.
144. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29(10): 2189-2195.
145. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(6): 624-633.
146. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998; 29(5): 1020-1030.
147. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002; 100(4): 1160-1167.
148. Vartak DG, Gemeinhart RA. Matrix metalloproteases: underutilized targets for drug delivery. *J Drug Target* 2007; 15(1): 1-20.
149. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999; 286(5437): 113-117.
150. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is



- reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27(4): 697-709.
151. Caron A, Desrosiers RR, Beliveau R. Ischemia injury alters endothelial cell properties of kidney cortex: stimulation of MMP-9. *Exp Cell Res* 2005; 310(1): 105-116.
152. Marshall BC, Santana A, Xu QP, Petersen MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, Welgus HG. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1792-1799.
153. Iglesias D, Alegre J, Aleman C, Ruiz E, Soriano T, Armadans LI, Segura RM, Angles A, Monasterio J, de Sevilla TF. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in exudative pleural effusions. *Eur Respir J* 2005; 25(1): 104-109.
154. Eickelberg O, Sommerfeld CO, Wyser C, Tamm M, Reichenberger F, Bardin PG, Soler M, Roth M, Perruchoud AP. MMP and TIMP expression pattern in pleural effusions of different origins. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(6): 1987-1992.
155. Hurewitz AN, Zucker S, Mancuso P, Wu CL, Dimassimo B, Lysik RM, Moutsiakis D. Human pleural effusions are rich in matrix metalloproteinases. *Chest* 1992; 102(6): 1808-1814.
156. Park KJ, Hwang SC, Sheen SS, Oh YJ, Han JH, Lee KB. Expression of matrix metalloproteinase-9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration* 2005; 72(2): 166-175.
157. Vatansever S, Gelisgen R, Uzun H, Yurt S, Kosar F. Potential role of matrix metalloproteinase-2,-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1,-2 in exudative pleural effusions. *Clin Invest Med* 2009; 32(4): E293-300.
158. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006; 85(12): 1074-1084.
159. Hayakawa T. Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Funct* 1994; 19(3): 109-114.
160. Kodama S, Yamashita K, Kishi J, Iwata K, Hayakawa T. A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix* 1989; 9(1): 1-6.

161. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31(1): 34-45.
162. Young DA, Phillips BW, Lundy C, Nuttall RK, Hogan A, Schultz GA, Leco KJ, Clark IM, Edwards DR. Identification of an initiator-like element essential for the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4) gene. *Biochem J* 2002; 364(Pt 1): 89-99.
163. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 19): 3719-3727.
164. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(6-7): 1156-1168.
165. Fingleton B. MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(1): 61-68.
166. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 2002; 86(12): 1864-1870.
167. Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 1983; 258(20): 12252-12258.
168. Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 1991; 266(20): 13070-13075.
169. 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): 110-127.
170. Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Kourti P, Poultisidi A, Mertens PR, Gourgoulis K, Molyvdas PA. Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: ussing-type chamber experiments. *Artif Organs* 2005; 29(11): 919-922.
171. Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* 2004; 3 Suppl 2: 123-126.

172. Nakhoul NL, Hering-Smith KS, Gambala CT, Hamm LL. Regulation of sodium transport in M-1 cells. *Am J Physiol* 1998; 275(6 Pt 2): F998-F1007.
173. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990; 37(6): 1563-1570.
174. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 2005; 85(5): 597-607.
175. Lacherade JC, Van De Louw A, Planus E, Escudier E, D'Ortho MP, Lafuma C, Harf A, Delclaux C. Evaluation of basement membrane degradation during TNF-alpha-induced increase in epithelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(1): L134-143.
176. Unemori EN, Bouhana KS, Werb Z. Vectorial secretion of extracellular matrix proteins, matrix-degrading proteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases by endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265(1): 445-451.
177. Campbell EJ, Cury JD, Lazarus CJ, Welgus HG. Monocyte procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. Identification, characterization, and regulation of secretion. *J Biol Chem* 1987; 262(33): 15862-15868.
178. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 1996; 271(19): 11376-11382.
179. Yool AJ, Weinstein AM. New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1. *News Physiol Sci* 2002; 17: 68-72.
180. Jiang J, Hu J, Bai C. Role of aquaporin and sodium channel in pleural water movement. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 139(1): 83-88.
181. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298(1): 29-32.
182. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6): C1213-1228.
183. Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 331-338.

184. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004: 117(Pt 12): 2435-2447.
185. Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schoneberg T, Fromm M, Schulzke JD. Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002: 298(5): 657-666.
186. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996: 134(4): 1031-1049.
187. Balda MS, Flores-Maldonado C, Cereijido M, Matter K. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem* 2000: 78(1): 85-96.
188. Kluge T, Hovig T. The ultrastructure of human and rat pericardium. II. Intercellular spaces and junctions. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967: 71(4): 547-563.
189. Pelin K, Hirvonen A, Linnainmaa K. Expression of cell adhesion molecules and connexins in gap junctional intercellular communication deficient human mesothelioma tumour cell lines and communication competent primary mesothelial cells. *Carcinogenesis* 1994: 15(11): 2673-2675.
190. Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, Horiuchi T. Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. *J Artif Organs* 2006: 9(4): 241-250.
191. Zhu Y, Brannstrom M, Janson PO, Sundfeldt K. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer* 2006: 118(8): 1884-1891.
192. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 1997: 137(6): 1393-1401.

193. Wachtel M, Frei K, Ehler E, Fontana A, Winterhalter K, Gloor SM. Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* 1999; 112 ( Pt 23): 4347-4356.
194. Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 2004; 300(1): 202-212.
195. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(7): 1206-1237.
196. Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(7): 1431-1442.
197. Yano M, Omoto Y, Yamakawa Y, Nakashima Y, Kiriya M, Saito Y, Fujii Y. Increased matrix metalloproteinase 9 activity and mRNA expression in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20(6): 679-686.
198. Covington MD, Burghardt RC, Parrish AR. Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells requires MT1-MMP (MMP-14). *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(1): F43-51.
199. Lohmann C, Krischke M, Wegener J, Galla HJ. Tyrosine phosphatase inhibition induces loss of blood-brain barrier integrity by matrix metalloproteinase-dependent and -independent pathways. *Brain Res* 2004; 995(2): 184-196.
200. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL, Jr., del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004; 35(4): 998-1004.
201. Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007; 56(9): 2380-2387.
202. Garty H, Edelman IS. Amiloride-sensitive trypsinization of apical sodium channels. Analysis of hormonal regulation of sodium transport in toad bladder. *J Gen Physiol* 1983; 81(6): 785-803.
203. Orce GG, Castillo GA, Margolius HS. Inhibition of short-circuit current in toad urinary bladder by inhibitors of glandular kallikrein. *Am J Physiol* 1980; 239(5): F459-465.

204. Fromter E, Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol* 1972; 235(53): 9-13.
205. Crone C, Christensen O. Electrical resistance of a capillary endothelium. *J Gen Physiol* 1981; 77(4): 349-371.
206. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Macromolecule transfer through mesothelium and connective tissue. *J Appl Physiol* 2000; 89(6): 2165-2173.
207. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Equivalent radius of paracellular "pores" of the mesothelium. *J Appl Physiol* 1999; 87(2): 538-544.
208. Agostoni E, Zocchi L. Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 159(3): 311-323.
209. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J* 1997; 10(10): 2411-2418.
210. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 2003; 21(3): 539-544.
211. Ashino Y, Tanita T, Ono S, Suzuki S, Koike K, Fujimura S. Roles of the visceral pleura in the production of pleural effusion in permeability pulmonary edema. *Tohoku J Exp Med* 1997; 182(4): 283-296.
212. Wheeldon EB, Mariassy AT, McSporran KD. The pleura: a combined light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study in the sheep. II. Response to injury. *Exp Lung Res* 1983; 5(2): 125-140.