



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΧΡΥΣΗ ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ**

**ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ**

**ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ»**

υπό

**ΖΩΗΣ ΑΡΣΕΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**Κτηνίατρος ΑΠΘ**

**Υπότροφος ΙΚΥ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2017

© 2017 ΑΡΣΕΝΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (13<sup>η</sup>/05-07-2017 ΓΣΕΕΣ):

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής**  
**(Επιβλέπουσα)**      **Χατζόγλου Χρυσή**  
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Μολυβδάς Πασχάλης - Αδάμ**  
Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Ταϊτζόγλου Ιωάννης**  
Καθηγητής Φυσιολογίας των Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλονίκης
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Γερμενής Ε. Αναστάσιος**  
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Γουργουλιάνης Ι. Κωνσταντίνος**  
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Ζαρογιάννης Σωτήριος**  
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Παρασκευά Ευφροσύνη**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Υπότροφος Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.)  
για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Πρόγραμμα:

**«ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ Ι.Κ.Υ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SIEMENS»**



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της διατριβής. Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη που με εμπιστεύθηκε και με καθοδήγησε στο δρόμο προς την έρευνα. Παράλληλα, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κυρία Χρυσή Χατζόγλου για την αμέριστη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθειά της. Επίσης, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για την επιστημονική αρωγή του και τις χρήσιμες συμβουλές του καθώς και στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Ταϊτζόγλου για την επιστημονική συμπαράσταση και καθοδήγησή του. Συγχρόνως, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη για την επιστημονική καθοδήγηση και σημαντική συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ πολύ τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την τεχνική υποστήριξή του καθώς και όλους τους εργαζόμενους στα Σφαγεία Λάρισας ΑΕ και ιδιαίτερω τον κ. Σάκη Πουρνάρα για τη σημαντική βοήθειά του στην παροχή του πειραματικού υλικού. Επιπλέον, ευχαριστώ όλους τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άψογη συνεργασία μας. Τέλος, εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στο ΙΚΥ που με επέλεξε ως υπότροφο του Ιδρύματος και με στήριξε οικονομικά κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω και τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και συνεισφορά τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Αρσενοπούλου Ζωή

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **Προσωπικά Στοιχεία**

Επώνυμο / Όνομα

Διεύθυνση

Τηλέφωνο

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο

Υπηκοότητα

Ημερομηνία γέννησης

Φύλο

### **Εκπαίδευση**

2013 - Σήμερα

Τίτλος Διδακτορικής

Διατριβής

Πανεπιστήμιο

2012 - 2015

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα

Πανεπιστήμιο

Βαθμός

2007 - 2012

Πανεπιστήμιο

Βαθμός

### **Επαγγελματική εμπειρία**

2013 - Σήμερα

### **Ξένες γλώσσες**

**Αρσενοπούλου Ζωή**

Σάμου 12 Νεράιδα

GR-41334 Λάρισα

+30 2410610830      Κινητό: +30 6941402172

zoiarsenop@gmail.com και zoiarsenop@med.uth.gr

Ελληνική

3 Δεκεμβρίου 1989

Θήλυ

Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας  
Μελέτη της Επίδρασης Τεχνητών Νανοδομημένων Αργύρου στη  
Διαπερατότητα του Υπεζωκότα Προβάτου  
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Βιοτεχνολογία - Ποιότητα  
Διατροφής και Περιβάλλοντος  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Άριστα 9,40

Πτυχιούχος Κτηνιατρικής  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης  
GR-54627 Θεσσαλονίκη  
8,04

Υπεύθυνη Κτηνίατρος του Πειραματικού Χειρουργείου του Εργαστηρίου  
Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αγγλικά: Proficiency of Michigan

Γαλλικά: Delf 2nd Degre (Ενότητες A5, A6)

Γνώσεις πληροφορικής	Πιστοποιημένη γνώση Η/Υ: Key CERT IT Basic PLUS (Επεξεργασία Κειμένου, Υπολογιστικά Φύλλα, Υπηρεσίες Διαδικτύου, Παρουσιάσεις, Χρήση Η/Υ και Διαχείριση αρχείων, Βάσεις Δεδομένων). Καλός χειρισμός των εργαλείων Microsoft Office, Graphpad Prism, Image J.
Υποτροφίες	Υπότροφος Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Πρόγραμμα: «ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ Ι.Κ.Υ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SIEMENS».
Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά	<p>V.I. Peppas, <b>Z.V. Arsenopoulou</b>, S.G. Zarogiannis, T. Deligiorgi, R. Jagirdar, I. Makantasis, I. Stefanidis, V. Liakopoulos, P.A. Molyvdas, K.I. Gourgoulisanis, C. Hatzoglou. VEGF increases the permeability of sheep pleura ex vivo through VEGFR2 stimulation. <i>Cytokine</i> 2014;69(2):284-288.</p> <p><b>Zoi V. Arsenopoulou</b>, Ioannis A. Taitzoglou, Paschalis-Adam Molyvdas, Konstantinos I. Gourgoulisanis, Chrissi Hatzoglou, Sotirios G. Zarogiannis. Silver nanoparticles alter the permeability of sheep pleura and of sheep and human pleural mesothelial cell monolayers. <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i> 2017;50:212–215.</p> <p><b>Zoi V. Arsenopoulou</b>, Ioannis A. Taitzoglou, Paschalis-Adam Molyvdas, Konstantinos I. Gourgoulisanis, Chrissi Hatzoglou, Sotirios G. Zarogiannis. Silver nanoparticles alter cell adhesion and proliferation of sheep primary mesothelial cells. <i>In Vivo</i> 2017 Accepted.</p>
Επιστημονικά Συνέδρια Προφορικές ανακοινώσεις	<p><b><u>Z. Αρσενοπούλου</u></b>, Π.Α. Μολυβδάς, Κ. Γουργουλιάνης, Σ. Ζαρογιάννης, Χ. Χατζόγλου. Τα νανοσωματίδια αργύρου αυξάνουν τη λειτουργία του επιθηλιακού διαύλου νατρίου τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. 37<sup>ο</sup> Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Μάιος 2015, Βόλος, Ελλάδα.</p> <p><b><u>Z. Αρσενοπούλου</u></b>, Π.Α. Μολυβδάς, Κ. Γουργουλιάνης, Σ. Ζαρογιάννης, Χ. Χατζόγλου. Επιδράσεις μηχανοποιημένων νανοσωματιδίων σε υπεζωκότα προβάτου: νανοσωματίδια αργύρου αυξάνουν τη διακυτταρική μεταφορά νατρίου στον τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου. 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, Μάιος 2015, Αθήνα, Ελλάδα.</p>

**Προφορικές ανακοινώσεις**

**Z. Αρσενοπούλου**, Π.Α. Μολυβδάς, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, Σ. Ζαρογιάννης. Τα νανοσωματίδια αργύρου αυξάνουν την ιοντική διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου και μειώνουν τη μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων. 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2014, Αθήνα, Ελλάδα.

A. Γραμματικόπουλος, R. Jagirdar, Δ. Μαγουλιώτης, **Z. Αρσενοπούλου**, Β. Πέππα, Π.Α. Μολυβδάς, Κ. Γουργουλιάνης, Χ. Χατζόγλου, Σ. Ζαρογιάννης. Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη της λειτουργίας του ευαίσθητου σε αμιλορίδη επιθηλιακού διαύλου νατρίου (ENaC) χωρίς/με επίδραση εκχυλίσματος καπνού τσιγάρου σε τραχειακό επιθήλιο προβάτου. 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2014, Αθήνα, Ελλάδα.

**Z.V. Arsenopoulou**, P.A. Molyvdas,, K. Gourgoulisanis, C. Hatzoglou, S.G. Zarogiannis. Silver nanoparticles increase the ionic permeability of the pleura and partially inhibit the migration of pleural mesothelial cells. Ninth International Conference of Anticancer Research, October 2014, Sithonia, Greece.

**Z. Arsenopoulou**. Effects of silver nanoparticles on pleural mesothelium. Research Meeting of Hellenic Thoracic Society Pleural Interest Group, June 2014, Mati Attikis, Greece.

V. Peppas, E. Solenov, R. Jagirdar, **Z. Arsenopoulou**, C. Hatzoglou, P.A. Molyvdas, K. Gourgoulisanis, S. Zarogiannis. Gene expression profile of the ABCC family of transporters and associations of the gene expression patterns of the differentially expressed members in MPM. 8th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics, November 2013, Lamia, Greece.

**Ζωή Αρσενοπούλου**. Επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου στον υπεζωκότα: Μελέτες. Ερευνητική συνάντηση ομάδας νοσημάτων υπεζωκότα. Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Μάιος 2013, Μονή Πάου – Αργαλαστή Πηλίου, Ελλάδα.

**Αναρτημένες ανακοινώσεις**

**Zoi Arsenopoulou**, Paschalis Adam Molyvdas, Konstantinos Gourgoulisanis, Sotirios Zarogiannis, Chrissi Hatzoglou. Silver nanoparticles of 20nm in diameter increase epithelial sodium channel (ENaC) currents in isolated sheep pleura. European Respiratory Society International Congress, September 2015, Amsterdam, The Netherlands.



## Αναρτημένες ανακοινώσεις

Sotirios Zarogiannis, Alexandros Grammatikopoulos, Rajesh Jagirdar, Dimitris Magouliotis, Vassiliki Peppas, **Zoi Arsenopoulou**, Ioannis Makantasis, Paschalis Adam Molyvdas, Konstantinos Gourgoulisanis, Chrissi Hatzoglou. Electrophysiological study of the ENaC function of sheep tracheal epithelium with and without cigarette smoke extract exposure. European Respiratory Society International Congress, September 2015, Amsterdam, The Netherlands.

**Z.V. Arsenopoulou**, P.A. Molyvdas, K.I. Gourgoulisanis, S.G. Zarogiannis, C. Hatzoglou. Effects of silver nanoparticles on pleural sodium transport and on migratory and adhesive properties of pleural mesothelial cells. 1<sup>st</sup> International Congress of Controlled Release Society-Greek local chapter, May 2015, Athens, Greece.

**Z. Arsenopoulou**, D.S.M. Chatzileontiadou, D.D. Leonidas, C.Hatzoglou, K.I. Gourgoulisanis, S.G. Zarogiannis, N.A.A. Balatsos. Effects of silver nanoparticles and poly(A)-specific ribonuclease on the motility of pleural mesothelial cells. Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Νοέμβριος 2014, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

**Z. Arsenopoulou**, R. Jagirdar, E.I. Solenov, C.Hatzoglou, P.A. Molyvdas, K.I. Gourgoulisanis, S.G. Zarogiannis. Computational genomic analysis of the gene expression profile of fluid transporting proteins in malignant pleural mesothelioma based on Gene Ontology annotations. 12th European Conference on Computational Biology, July 2013, Berlin, Germany.

## Μέλος των Επιστημονικών Εταιρειών

- Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία
- Διεθνής Εταιρεία Υπολογιστικής Βιολογίας
- Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος
- Ελληνική Εταιρεία Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς
- ΓΕΩΤ.Ε.Ε.

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ  
ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ  
ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ ΠΡΟΒΑΤΟΥ»**

**ΑΡΣΕΝΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Χατζόγλου Χρυσή** Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Μολυβδάς Πασχάλης - Αδάμ** Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Ταϊτζόγλου Ιωάννης** Καθηγητής Φυσιολογίας των Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

## Περίληψη

Η εκτεταμένη χρήση των τεχνητών νανοσωματιδίων έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις του υπεζωκότα. Κλινικά δεδομένα έχουν ενοχοποιήσει τα νανοσωματίδια για την ανάπτυξη υπεζωκοτικών συλλογών ενώ μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι τα νανοσωματίδια μπορούν να δημιουργήσουν φλεγμονή, ίνωση και κακοήθεις νεοπλασίες του υπεζωκότα. Τα νανοσωματίδια αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, έχουν πολλές εφαρμογές σε καταναλωτικά προϊόντα και ιατρικές συσκευές, λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους, αυξάνοντας τις πιθανότητες έκθεσης σε αυτά. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων τεχνητών νανοσωματιδίων αργύρου στον υπεζωκότα. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις αυτών των νανοσωματιδίων στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου και των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Επίσης, εξετάστηκε η πιθανή τοξική δράση των νανοσωματιδίων στα μεσοθηλιακά κύτταρα καθώς και οι επιδράσεις τους σε ορισμένες κυτταρικές λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων, όπως η προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια αργύρου αύξησαν την διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου σε πειράματα *ex vivo* μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια για 30 λεπτά. Αντίθετα, μεγαλύτερη έκθεση της τάξης των 24 ωρών σε *in vivo* πειράματα οδήγησε σε μείωση της διαπερατότητας των μεσοθηλιακών κυτταρικών μονοστιβάδων. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής έδειξαν επίσης ότι τα νανοσωματίδια αργύρου είχαν χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας και προξένησαν μεταβολές στις κυτταρικές λειτουργίες, που εξαρτώνται από το μέγεθος των

νανοσωματιδίων και τη συγκέντρωσή τους. Τα νανοσωματίδια αργύρου αύξησαν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου με πιο έντονες επιδράσεις και από τα δύο μεγέθη στη χαμηλή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων. Σε αντίθεση με τα πρωτογενή κύτταρα, στην ανθρώπινη μεσοθηλιακή κυτταρική σειρά που μελετήθηκε, τα νανοσωματίδια αργύρου αύξησαν την προσκόλληση στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης με μεγαλύτερες επιδράσεις και από τα δύο μεγέθη νανοσωματιδίων στην υψηλή συγκέντρωση. Στην κυτταρική μετανάστευση ωστόσο, αλλαγές σημειώθηκαν στα ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα μόνο μετά την έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου υψηλής συγκέντρωσης και μεγέθους 20 nm για 8 ώρες. Τέλος, οι αναστολές της ενδοκυττάρωσης προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην προσκόλληση και μετανάστευση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα υπό την επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης και μέσω μικροσπηλαίων να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα.

## Abstract

The extended use of engineered nanoparticles has been associated with the development of pleural pathology. Nanoparticles have been linked with pleural effusion development in exposed factory workers, while in experimental animal studies it has been shown that they induce inflammation, fibrosis and carcinogenesis in the pleura. Silver nanoparticles (AgNPs) are widely used in medical and domestic products due to their antimicrobial properties, increasing the risk of exposure. The scope of this study was to investigate the effects of engineered AgNPs on the permeability of sheep pleura and of pleural mesothelial cells. The potential toxic effects of AgNPs and their effects on mesothelial cell functions, were also examined. The results of this study suggest that acute (30 mins) exposure increases the pleural permeability *ex vivo* while longer (24 hrs) exposure *in vivo* leads to late decrease of the pleural cell monolayers permeability. The findings also showed that AgNPs had low but stable levels of cytotoxicity and changed cell functions, depending on their size and concentration. AgNPs increased the adhesion and proliferation of sheep primary pleural mesothelial cells with more pronounced effects in the low concentration (0,2 µg/ml) of AgNPs of both sizes. Contrary to the above, AgNPs increased the adhesion of human pleural mesothelial cells with greater effects of both nanoparticle sizes at higher concentrations (2 µg/ml). Regarding cell migration, only the high concentration of 20 nm AgNPs partially inhibited migration of human mesothelial cells. Finally, endocytosis inhibitors induced significant changes in the adhesion and migration of human mesothelial cells in the presence of AgNPs. As a result, the mechanisms of clathrin and caveolin dependent endocytosis play an important role in the uptake of nanoparticles from human pleural mesothelial cells.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	18
<b>Κεφάλαιο 1 Ανατομία του υπεζωκότα</b> .....	19
1.1 Μακροσκοπική εικόνα του υπεζωκότα .....	20
1.2 Ιστολογική εικόνα του υπεζωκότα .....	21
1.3 Αγγεία και νεύρα του υπεζωκότα .....	22
1.4 Λεμφαγγεία του υπεζωκότα .....	23
1.5 Υπεζωκοτικό υγρό .....	23
<b>Κεφάλαιο 2 Μεσοθηλιακά κύτταρα</b> .....	25
2.1 Τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων και χαρακτηριστικά τους .....	26
2.2 Ρόλος και λειτουργίες του μεσοθηλίου .....	30
2.3 Επούλωση και αναγέννηση του μεσοθηλίου .....	31
2.4 Μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων .....	32
<b>Κεφάλαιο 3 Φυσιολογία του υπεζωκοτικού υγρού</b> .....	34
3.1 Παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού .....	35
3.2 Παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού .....	36
3.2.1 Παροχέτευση από τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα .....	36
3.2.2 Παθητική επαναρρόφηση από τον σπλαχνικό υπεζωκότα .....	37
3.2.3 Απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς .....	38
3.2.4 Απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από την ενδοκυττάρωση .....	39

<b>Κεφάλαιο 4 Υπεζωκοτική συλλογή .....</b>	<b>40</b>
4.1 Διιδρώματα .....	41
4.2 Εξιδρώματα .....	42
<b>Κεφάλαιο 5 Διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών .....</b>	<b>44</b>
<b>Κεφάλαιο 6 Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας .....</b>	<b>48</b>
6.1 Κατηγορίες, εφαρμογές και ιδιότητες των νανοσωματιδίων .....	49
6.2 Είσοδος νανοσωματιδίων στα κύτταρα .....	57
6.2.1 Μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης .....	58
<b>Κεφάλαιο 7 Επιδράσεις νανοσωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα .....</b>	<b>64</b>
7.1 Κλινικά δεδομένα για νανοσωματίδια .....	64
7.2 Αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων με δομές του πνεύμονα .....	67
7.3 Νανοσωματίδια και καρκινογένεση .....	69
7.4 Επιδράσεις νανοσωματιδίων στον υπεζωκότα .....	70
7.5 Νανοσωματίδια αργύρου .....	74
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>79</b>
<b>Κεφάλαιο 1 Υλικό και Μέθοδοι .....</b>	<b>80</b>
1.1 Νανοσωματίδια αργύρου και αντιδραστήρια.....	80
1.2 Συλλογή δειγμάτων υπεζωκότα προβάτου.....	81
1.3 Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη της επίδρασης των AgNPs στη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου.....	82
1.3.1 Επώαση του υπεζωκότα προβάτου με AgNPs.....	82
1.3.2 Μέθοδος Ussing System.....	83
1.3.3 Μέτρηση ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος.....	85

1.4 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα.....	86
1.5 Πειράματα επίδρασης των AgNPs στη διακυτταρική διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα.....	87
1.6 Πειράματα κυτταροτοξικότητας.....	90
1.7 Πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης.....	90
1.8 Πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	91
1.9 Πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης.....	92
1.10 Στατιστική Ανάλυση.....	94
<b>Κεφάλαιο 2 Αποτελέσματα.....</b>	<b>95</b>
2.1 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ και στο $I_{EQ}$ τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.....	95
2.2 Τύποι των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα που χρησιμοποιήθηκαν.....	98
2.3 Επιδράσεις των AgNPs στη διακυτταρική διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα.....	100
2.3.1 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου.....	100
2.3.2 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.....	103
2.4 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα.....	105
2.4.1 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου.....	105
2.4.2 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.....	107
2.5 Επιδράσεις των AgNPs στην προσκόλληση και στη μορφολογία των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου.....	109
2.6 Επιδράσεις των AgNPs στον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου.....	112



2.7	Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.....	114
2.8	Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A.....	116
2.9	Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A με χρήση αναστολέων της ενδοκυττάρωσης.....	118
2.10	Επιδράσεις των AgNPs 20 nm συγκέντρωσης 2 µg/ml στην κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A με χρήση αναστολέων της ενδοκυττάρωσης.....	120
	<b>Κεφάλαιο 3 Συζήτηση.....</b>	<b>122</b>
	<b>Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα.....</b>	<b>132</b>
	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>134</b>

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## Κεφάλαιο 1 Ανατομία του υπεζωκότα

Ο υπεζωκότας είναι ο ορογόνος υμένας του κύτους του θώρακα, που επαλείφει τα τοιχώματα της κοιλότητας αυτής και την εξωτερική επιφάνεια των πνευμόνων. Αποτελείται από δύο πέταλα, το σπλαχνικό, που καλύπτει όλο τον πνεύμονα και τις μεσολόβιες σχισμές, και το τοιχωματικό, που καλύπτει την έσω επιφάνεια του θώρακα, το μεσαύλιο και το διάφραγμα [1]. Μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα σχηματίζεται ένας σχισμοειδής χώρος, η υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κοιλότητα αυτή στα πρόβατα φθάνει έως τα 20 μm. Στους ανθρώπους υπολογίζεται ότι έχει παρόμοιο μέγεθος [2]. Η υπεζωκοτική κοιλότητα περιέχει μικρή ποσότητα υγρού, το υπεζωκοτικό υγρό. Η κύρια λειτουργία του υγρού είναι να περιορίζει τις δυνάμεις τριβής, δρώντας ως λιπαντικό, προς διευκόλυνση της διολισθήσεως του ενός πετάλου επί του άλλου κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων. Σε φυσιολογικές συνθήκες το υπεζωκοτικό υγρό παράγεται από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η απορρόφηση του υγρού γίνεται μέσω των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα, μέσω παθητικής επαναρρόφησης από τον σπλαχνικό υπεζωκότα (δυνάμεις του Starling), μέσω απορρόφησης διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς καθώς και μέσω απορρόφησης διαμεσολαβούμενη από ενδοκυττάρωση του μεσοθηλίου [3].

## 1.1 Μακροσκοπική εικόνα του υπεζωκότα

Ο υπεζωκότας είναι ένας διπέταλος ημιδιαφανής υμένας ανάμεσα στα πέταλα του οποίου σχηματίζεται η υπεζωκοτική κοιλότητα. Στον άνθρωπο και στα μηρυκαστικά, το μεσαύλιο διαχωρίζει πλήρως τη δεξιά από την αριστερή υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα δύο πέταλα του υπεζωκότα είναι το σπλαχνικό ή πνευμονικό και το τοιχωματικό ή περίτονο [2].

Ο σπλαχνικός υπεζωκότας περιβάλλει τις επιφάνειες του πνεύμονα εκτός της περιοχής των πυλών και εκτός του σημείου όπου προσφύεται ο πνευμονικός σύνδεσμος. Καταδύεται στις μεσολόβιες σχισμές και συμφύεται χαλαρά με το πνευμονικό παρέγχυμα. Στο ύψος των πυλών ανακάμπει μετωπιαία, σχηματίζει μια πτυχή και συνεχίζει ως μεσοπνευμόνιο πέταλο του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η πτυχή αυτή αποτελεί τον πνευμονικό σύνδεσμο και απαρτίζεται από τα δύο πέταλα του υπεζωκότα [4].

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας επενδύει την εσωτερική επιφάνεια των τοιχωμάτων του ημιθωρακίου και υποδιαιρείται στον πλευρικό, στο διαφραγματικό και στο μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα. Όταν ανακάμπει ο πλευρικός προς το διαφραγματικό υπεζωκότα σχηματίζεται το πλευροδιαφραγματικό κόλπωμα, μέσα στο οποίο εισέρχεται το κάτω χείλος του πνεύμονα κατά την εισπνοή. Στις ανακάμψεις του πλευρικού προς το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα δημιουργούνται ανάλογα κολπώματα όπως το στερνομεσοπνευμόνιο εμπρός και το σπονδυλομεσοπνευμόνιο κόλπωμα πίσω [4].

## 1.2 Ιστολογική εικόνα του υπεζωκότα

Ο υπεζωκότας, από ιστολογικής απόψεως, αποτελείται από πέντε στιβάδες. Μια μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων με το βασικό της υμένα, ένα δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού, μια λεπτή ελαστική στιβάδα, ένα δεύτερο δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού με αγγειακά και λεμφικά τριχοειδή και μια ινοελαστική στιβάδα. Στις στιβάδες κάτω από τα μεσοθηλιακά κύτταρα περιέχονται κύτταρα όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα [5].

Όσον αφορά το πάχος του υπεζωκότα, ο τοιχωματικός αυξάνει όσο αυξάνει και το μέγεθος του ζώου που μελετάται. Στον ποντικό το μέσο πάχος είναι 7,8  $\mu\text{m}$ , στο πρόβατο 21-25  $\mu\text{m}$  και στον άνθρωπο 30-40  $\mu\text{m}$ . Στον τοιχωματικό υπεζωκότα, οι στιβάδες κάτω από τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν άφθονες ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης αλλά λιγότερα κύτταρα σε σχέση με τον σπλαχνικό υπεζωκότα [6].

Ο σπλαχνικός υπεζωκότας έχει πάχος που ποικίλει μεταξύ των ζώων αλλά και μεταξύ των διαφόρων περιοχών του πνεύμονα. Τα ζωικά είδη μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες με βάση το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα είδη με λεπτό πνευμονικό πέταλο όπως οι σκύλοι, οι γάτες, οι κόνικλοι και οι ποντικοί, στα οποία η τελευταία ινοελαστική στιβάδα απουσιάζει. Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται τα είδη με παχύ πνευμονικό πέταλο όπως τα μηρυκαστικά, τα ιπποειδή και ο άνθρωπος. Στα πρόβατα το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα είναι 26-27  $\mu\text{m}$  στις κεφαλικές-κοιλιακές περιοχές ενώ στις ουραίες-ραχιαίες περιοχές κυμαίνεται από 54  $\mu\text{m}$  μέχρι 83  $\mu\text{m}$  [6]. Η παροχή αίματος στον υπεζωκότα εξαρτάται από το πάχος του και γι αυτό το λόγο η ταξινόμηση των ειδών σε ομάδες ανάλογα με το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα, θεωρείται σημαντική. Στον σπλαχνικό

υπεζωκότα υπάρχουν κολλαγόνες ίνες διαφορετικού μεγέθους και προσανατολισμού. Οι ελαστικές ίνες υπερτερούν και συμβάλλουν στην ελαστική δύναμη επαναφοράς του πνεύμονα. Αντίθετα, οι κολλαγόνες ίνες περιορίζουν τον όγκο αέρα στον οποίο ο πνεύμονας μπορεί να διαταθεί [5].

### **1.3 Αγγεία και νεύρα του υπεζωκότα**

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αιματώνεται από τις βρογχικές αρτηρίες (συστηματική κυκλοφορία) και η φλεβική παροχέτευση γίνεται από τις ομώνυμες φλέβες στην κάτω κοίλη φλέβα [1]. Η παροχή αίματος στον σπλαχνικό υπεζωκότα, όπως έχει αναφερθεί, εξαρτάται από το πάχος του τελευταίου. Έτσι στα είδη με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα η αιμάτωση γίνεται από την πνευμονική αρτηρία ενώ στα είδη με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα γίνεται από τους κλάδους της βρογχικής αρτηρίας. Στο πρόβατο που έχει παχύ υπεζωκότα, η κύρια πηγή αίματος είναι η συστηματική (βρογχική) κυκλοφορία. Στον άνθρωπο που κατατάσσεται στα είδη με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα, η αιμάτωση προέρχεται και σε αυτόν από τη βρογχική αρτηρία. Η φλεβική παροχέτευση σε όλα τα είδη γίνεται από τις πνευμονικές φλέβες [6].

Στον πλευρικό υπεζωκότα και στην περιφερική μοίρα του διαφραγματικού υπεζωκότα φθάνουν νευρικές απολήξεις από τα μεσοπλεύρια νεύρα. Όταν κάποια από αυτές τις περιοχές ερεθίζεται, ο πόνος εκδηλώνεται στο προσκείμενο θωρακικό τοίχωμα. Η κεντρική μοίρα του διαφράγματος και ο μεσοπνευμόνιος υπεζωκότας νευρώνονται από το φρενικό νεύρο. Αντίθετα ο σπλαχνικός υπεζωκότας διαθέτει

αυτόνομη νεύρωση, με αποτέλεσμα η εμφάνιση πλευριτικού πόνου στο θώρακα να υποδηλώνει φλεγμονή του τοιχωματικού και όχι του σπλαχνικού υπεζωκότα [1].

#### **1.4 Λεμφαγγεία του υπεζωκότα**

Τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα αποτελούν ένα πυκνό δίκτυο στην επιφάνεια του πνεύμονα με κατεύθυνση τους βρογχοπνευμονικούς λεμφαδένες της πνευμονικής πύλης. Μερικά από τα λεμφαγγεία εισχωρούν στο πνευμονικό παρέγχυμα και καταλήγουν στο περιβρογχικό λεμφικό δίκτυο. Τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα δεν επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα [1].

Σε ότι αφορά τον τοιχωματικό υπεζωκότα, η λεμφική απαγωγή καταλήγει στους παραστερνικούς, παρασπονδυλικούς λεμφαδένες, μεσοπνευμόνιους και τραχειοβρογχικούς λεμφαδένες. Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου των στομάτων, μικροσκοπικών δηλαδή δομών που αποτελούν επέκταση των λεμφαγγείων στον υπεζωκοτικό χώρο [2].

#### **1.5 Υπεζωκοτικό υγρό**

Το υπεζωκοτικό υγρό διηθείται στην υπεζωκοτική κοιλότητα από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα και υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει σε μικρή ποσότητα. Ο ρυθμός παραγωγής και απορρόφησης του κυμαίνεται σε 1-1,2 λίτρα την ημέρα. Στον άνθρωπο ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού εκτιμάται σε 0,26 ml/kg και

στις δύο υπεζωκοτικές κοιλότητες. Για παράδειγμα, σε έναν άνθρωπο βάρους 70 kg αντιστοιχούν περίπου 18 ml υγρού. Στα πρόβατα η παραγωγή του υγρού υπολογίζεται σε 0,01 ml/kg/h, στους κονίκλους περιέχεται 1 ml υπεζωκοτικού υγρού στην κοιλότητα, ενώ σε σκύλους περιέχονται 2,4 ml [3].

Το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό είναι διαυγές, άχρωμο και περιέχει σημαντικό αριθμό κυττάρων. Στους κονίκλους και στους σκύλους περιέχονται 1500-2000 κύτταρα/mm<sup>3</sup> εκ των οποίων 9-30% είναι μεσοθηλιακά κύτταρα, 61-77% μονοκύτταρα και 7-11% λεμφοκύτταρα. Στον άνθρωπο περιέχονται περίπου 1700 κύτταρα/mm<sup>3</sup> από τα οποία 75% είναι μακροφάγα, 23% λεμφοκύτταρα και 1% μεσοθηλιακά κύτταρα [7].

Η σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού μοιάζει με εκείνη του πλάσματος. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού είναι μικρότερη από τη συγκέντρωση πρωτεϊνών του πλάσματος. Μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών η αλβουμίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό το οποίο ανέρχεται σε 50%. Στους ποντικούς η συγκέντρωση πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού υπολογίζεται σε 2,5 g/dl ενώ στα πρόβατα, όπου ο υπεζωκότας μοιάζει ανατομικά με αυτόν των ανθρώπων, η συγκέντρωση πρωτεϊνών είναι 1 g/dl [6]. Η συγκέντρωση νατρίου είναι μικρότερη κατά 2-5% από εκείνη του πλάσματος και η συγκέντρωση χλωρίου είναι μικρότερη κατά 6-9% σε σχέση με το πλάσμα. Ωστόσο, η συγκέντρωση διττανθρακικών είναι αυξημένη κατά 20-25% σε σχέση με το πλάσμα και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το υπεζωκοτικό υγρό να είναι περισσότερο αλκαλικό (pH=7,6) σε σχέση με το πλάσμα. Αντιθέτως, η συγκέντρωση γλυκόζης και η μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα (Pco<sub>2</sub>) είναι ίδιες στο υπεζωκοτικό υγρό και στο πλάσμα [3].



## Κεφάλαιο 2 Μεσοθηλιακά κύτταρα

Το μεσοθήλιο περιβάλλει την επιφάνεια τριών ορογόνων κοιλοτήτων (υπεζωκοτική, περιτοναϊκή και περικαρδιακή κοιλότητα) και τα όργανα που βρίσκονται μέσα σε αυτές τις κοιλότητες. Διακρίνεται στο σπλαχνικό μεσοθήλιο που περιβάλλει τα όργανα, όπως για παράδειγμα τους πνεύμονες, και στο τοιχωματικό μεσοθήλιο που επενδύει το τοίχωμα της ορογόνου κοιλότητας. Στα διάφορα είδη το μεσοθήλιο παρουσιάζει παρόμοιες κυτταρολογικές και ιστοχημικές ιδιότητες, ανεξάρτητα από το είδος του ζώου και την ανατομική περιοχή [8].

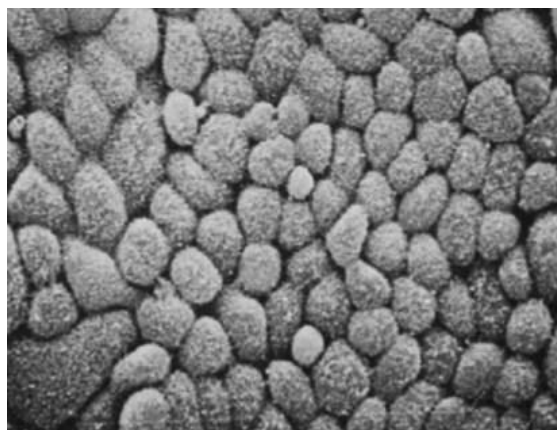
Το μεσοθήλιο αποτελείται από μια μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα θεωρούνται επιθηλιόμορφα και όχι αμιγώς επιθηλιακά, καθώς έχουν ιδιότητες μεταξύ επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων. Όσον αφορά την ιστολογική εικόνα του μεσοθηλίου, τα μεσοθηλιακά κύτταρα επικάθονται πάνω σε μία βασική μεμβράνη η οποία έχει από κάτω ένα στρώμα συνδετικού ιστού. Το στρώμα αυτό ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική περιοχή και το είδος ζώου. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν διάμετρο από 6 έως 12  $\mu\text{m}$  και συνδέονται μεταξύ τους με στενές συνδέσεις και δεσμοσωμάτια [9].

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως είναι η έκκριση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας του υπεζωκότα, η έκκριση υαλουρονικού οξέως και επιφανειοδραστικού παράγοντα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Επίσης, συμμετέχουν στην αναγνώριση και στη φαγοκυττάρωση παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και στην αναγέννηση του μεσοθηλίου. Η διαδικασία της επούλωσης και αναγέννησης του μεσοθηλίου ολοκληρώνεται σε 7-10 ημέρες, ανεξάρτητα από το είδος και το μέγεθος της βλάβης της μεσοθηλιακής

επιφάνειας. Το υαλουρονικό οξύ που εκκρίνεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα, συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσκόλλησή τους στα μεσοθηλιακά κύτταρα και επομένως η διασπορά καρκινικών κυττάρων στον υπεζωκότα [7].

## 2.1 Τύποι μεσοθηλιακών κυττάρων και χαρακτηριστικά τους

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα διακρίνονται στα πλακώδη και στα κυβοειδή. Τα πλακώδη κύτταρα είναι ο κύριος τύπος κυττάρων του μεσοθηλίου (**Εικόνα 1**) και επενδύουν τόσο το τοιχωματικό όσο και το πνευμονικό πέταλο [9]. Τα πλακώδη κύτταρα είναι αποπεπλατυσμένα και επιμήκη, έχουν έναν κεντρικό πυρήνα και τα οργανίδια τους βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα. Στα κύτταρα αυτά υπάρχουν μικροϊνίδια και μικροσωληνίσκοι, λίγα μιτοχόνδρια, όχι καλά αναπτυγμένο σύμπλεγμα Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και λίγες, κοντές μικρολάχνες [10].



**Εικόνα 1.** Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικής σάρωσης πλακώδους μεσοθηλίου [9].

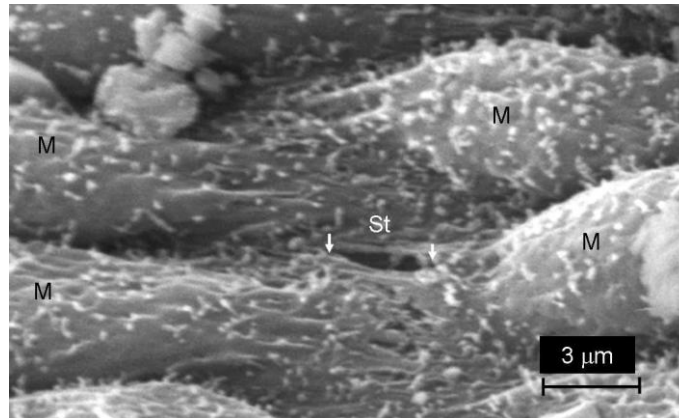
Τα κυβοειδή κύτταρα είναι λιγότερα σε σχέση με τα πλακώδη και βρίσκονται κυρίως στον πλευρικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα. Επίσης εμφανίζονται μετά από τραυματισμό ή διέγερση των ορογόνων επιφανειών. Σε αντίθεση με τα πλακώδη κύτταρα, τα κυβοειδή περιέχουν άφθονα μιτοχόνδρια, καλά αναπτυγμένο σύμπλεγμα Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, μεγαλύτερο πυρήνα, περισσότερα μικροϊνίδια και μικροσωληνίσκους καθώς και μεγαλύτερο αριθμό μικρολαχνών που είναι μακριές. Τα κυβοειδή κύτταρα είναι περισσότερο μεταβολικά ενεργά και έχουν αυξημένη εκκριτική λειτουργία [10]. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα σημεία σχηματισμού των στομάτων, ιδιαίτερα σημαντικές μικροσκοπικές δομές που θα περιγραφούν παρακάτω.

Οι μικρολάχνες εντοπίζονται και στους δύο τύπους μεσοθηλιακών κυττάρων, προεξέχουν από την επιφάνειά τους και ποικίλουν σε μήκος, σχήμα και πυκνότητα. Στον άνθρωπο έχουν μήκος που κυμαίνεται από 0,5 έως 3 μm ενώ στο πρόβατο το μήκος τους είναι 6 μm. Οι μικρολάχνες έχουν διάμετρο 0,1 μm και είναι άφθονες στον κατώτερο πνευμονικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα [3]. Σε περίπτωση βλάβης και επιδιόρθωσης του μεσοθηλίου αυξάνονται σε αριθμό. Οι μικρολάχνες συμμετέχουν στην απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού και στη μείωση των τριβών ανάμεσα στους πνεύμονες και το θωρακικό τοίχωμα [6].

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα περιέχουν επίσης ένα σύστημα κυστιδίων. Τα κυβοειδή κύτταρα έχουν πιο καλά ανεπτυγμένο σύστημα κυστιδίων από τα πλακώδη. Η συγκέντρωση των κυστιδίων αντιστοιχεί στον αριθμό των μικρολαχνών. Τα κυστίδια συμμετέχουν στη μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος του μεσοθηλίου [10].

Τα στόματα αποτελούν δομές των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Σε αυτά αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο von Recklinghausen το 1863. Τα περιέγραψε ως μικρά ανοίγματα μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων στην περιτοναϊκή μοίρα του διαφράγματος. Η πυκνότητα των στομάτων ποικίλλει τόσο μεταξύ των διαφόρων ειδών ζώων (στους κονίκλους είναι 1-80/mm<sup>2</sup>, στους ποντικούς 300-400/mm<sup>2</sup>, στα πρόβατα 1000-2000/mm<sup>2</sup>) όσο και μεταξύ των διαφόρων περιοχών του υπεζωκότα. Περισσότερα στόματα εντοπίζονται στις κατώτερες περιοχές του μεσοπνευμόνιου υπεζωκότα και στις κατώτερες και μεσοπλευρίες περιοχές του πλευρικού υπεζωκότα [11].

Τα στόματα ορίζονται ως ανοίγματα της επιφάνειας του τοιχωματικού υπεζωκότα με διάμετρο από 3 έως 10 μm, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2** [12]. Τα σημεία σχηματισμού τους είναι τα σημεία συμβολής δύο ή περισσότερων κυβοειδών κυττάρων. Τα κυβοειδή κύτταρα καλύπτονται εσωτερικά από ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων [7]. Το λεμφικό δίκτυο του τοιχωματικού υπεζωκότα σχηματίζει τους λεμφικούς κόλπους ή λεμφόκολπους. Στη συνέχεια των λεμφόκολπων προς την υπεζωκοτική κοιλότητα βρίσκονται τα στόματα. Αυτά επιτρέπουν τη μονόδρομη ροή ουσιών από την υπεζωκοτική κοιλότητα προς το λεμφικό αυλό, μέσω των βαλβίδων που έχουν. Τα στόματα οδηγούν στο υπομεσοθηλιακό λεμφαγγειακό σύστημα και επιτρέπουν την γρήγορη απομάκρυνση υγρού, κυττάρων, βακτηρίων και μορίων από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα περισσότερα από αυτά είναι κλειστά λόγω προσεκβολών των ενδοθηλιακών λεμφικών κυττάρων [5].



**Εικόνα 2.** Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικής σάρωσης τοιχωματικού υπεζωκότα ποντικού. Διακρίνονται τα μεσοθηλιακά κύτταρα (M) και ένα στόμα (λευκά βέλη, St) που έχει διάμετρο περίπου 3  $\mu\text{m}$  [12].

Κατά τον αναπνευστικό κύκλο τα στόματα του διαφράγματος ανοίγουν και κλείνουν περιοδικά. Τα στόματα κλείνουν στην εισπνοή όταν το διάφραγμα συσπάται και ανοίγουν στην εκπνοή όταν το διάφραγμα χαλαρώνει [7]. Η παροχέτευση μέσω των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα δεν αποτελεί τον κύριο τρόπο απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες [13]. Κατά τη δημιουργία όμως μεγάλου όγκου υπεζωκοτικών συλλογών, η παροχέτευση μέσω των στομάτων αυξάνεται σημαντικά ενώ η απομάκρυνση υγρού και πρωτεϊνών μέσω των άλλων μονοπατιών αυξάνεται πολύ λιγότερο [3]. Αυτός ο μηχανισμός έχει δειχθεί σε μελέτες όπου προκλήθηκαν τεχνητοί υδροθώρακες σε κονίκλους και φαίνεται να μην μπορεί να απορροφηθεί άλλο υγρό, όταν η ποσότητα της υπεζωκοτικής συλλογής αυξάνεται περισσότερο από 20 φορές σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες [13].

## 2.2 Ρόλος και λειτουργίες του μεσοθηλίου

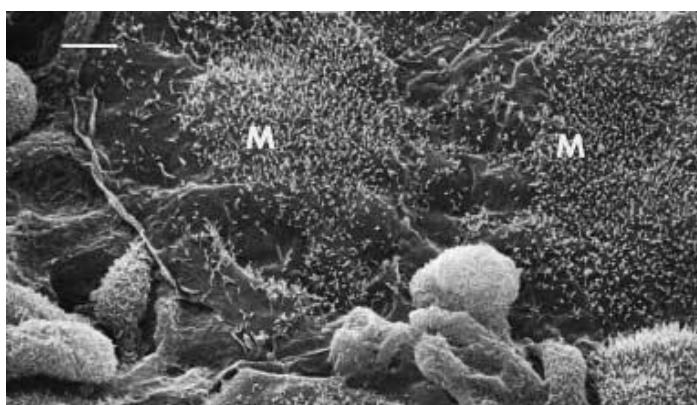
Το μεσοθήλιο αποτελεί ένα προστατευτικό φραγμό και ρόλος του είναι η μείωση των τριβών για την ελεύθερη κίνηση οργάνων και ιστών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν υαλουρονικό οξύ. Αυτό εγκλωβίζεται πάνω στις μικρολάχνες και ρόλος του είναι να προστατεύει τα κύτταρα από φυσική βλάβη, από μολύνσεις μικροοργανισμών ή από την ανάπτυξη όγκου. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν επίσης την φωσφατιδυλοχολίνη η οποία συμμετέχει στην μείωση των τριβών μεταξύ των ορογόνων μεμβρανών [10].

Ανάμεσα στις λειτουργίες του μεσοθηλίου είναι η μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος των ορογόνων κοιλοτήτων. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα που διαθέτουν πολλές μικρολάχνες, αυξάνουν την επιφάνειά τους και βοηθούν στην απορρόφηση. Η μεταφορά ουσιών και μορίων διαμέσου του μεσοθηλίου μπορεί να γίνει μέσω πινοκυτταρικών κυστιδίων ή μέσω της παρακυτταρικής οδού και των στομάτων [9].

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν μεταβολικώς ενεργά κύτταρα και συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής, εκκρίνοντας διάφορες ουσίες όπως προσταγλαδίνες, κυτταροκίνες, χυμοκίνες, μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, αυξητικούς παράγοντες, ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Αυτές οι ουσίες είναι μεσολαβητές της φλεγμονής και εκκρίνονται όταν υπάρχουν εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως ο αμιάντος και οι βακτηριακές ενδοτοξίνες, με στόχο την αποκατάσταση της δομής και λειτουργίας του μεσοθηλίου [10].

## 2.3 Επούλωση και αναγέννηση του μεσοθηλίου

Η αναγέννηση του μεσοθηλίου γίνεται με αργό ρυθμό και μπορεί να διεγερθεί από διάφορους παράγοντες και από φυσική πρόκληση βλάβης για να αυξηθεί ο ρυθμός της. Η διαδικασία της επούλωσης και αναγέννησης του μεσοθηλίου αρχίζει με την εμφάνιση των ουδετερόφιλων και μακροφάγων, συνήθως μέσα σε 24 ώρες από τον τραυματισμό. Η ολοκλήρωσή της γίνεται μέσα σε 7 έως 10 ημέρες, όταν η προσβεβλημένη περιοχή καλύπτεται και πάλι από φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της επούλωσης, τα μεσοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται γύρω από την πληγή και πολλά από αυτά μεταναστεύουν κατά μήκος του τραυματισμένου μεσοθηλίου από την άκρη της πληγής προς το κέντρο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Η επούλωση του μεσοθηλίου δεν επιτυγχάνεται μόνο με πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των κυττάρων όπως συμβαίνει στο επιθήλιο, καθώς όλα τα τραύματα του μεσοθηλίου, ανεξάρτητα από το είδος και την έκτασή τους, επουλώνονται πλήρως μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα, δηλαδή μέσα σε 7 έως 10 ημέρες [10].



**Εικόνα 3.** Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ενός ορογόνου υμένα 48 ώρες μετά τον τραυματισμό. Στην άκρη της βλάβης διακρίνονται μεγάλα πεπλατυσμένα μεσοθηλιακά κύτταρα (M), με μικρολάχνες που προεξέχουν [10].

Η προέλευση των νέων μεσοθηλιακών κυττάρων, που συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης και αναγέννησης του μεσοθηλίου, δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη. Μπορεί να προέρχονται από ώριμα ή πολλαπλασιαζόμενα μεσοθηλιακά κύτταρα γειτονικών ή απέναντι ορογόνων επιφανειών καθώς και από προϋπάρχοντα μεσοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται ελεύθερα στο υγρό της ορογόνου κοιλότητας [10]. Επίσης πιστεύεται ότι είναι πιθανό να προκύπτουν μετά από μετασχηματισμό μακροφάγων ή υπομεσοθηλιακών πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων σε μεσοθηλιακά κύτταρα που μεταναστεύουν στην επιφάνεια του τραύματος ή μπορεί να προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα της κυκλοφορίας που βρίσκονται στο μυελό των οστών [5].

## **2.4 Μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων**

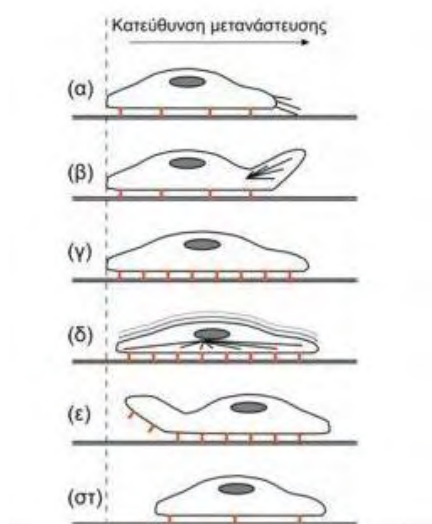
Μία από τις κυτταρικές λειτουργίες είναι η μετανάστευση η οποία κατευθύνεται από χημειοτακτικά ή άλλου είδους ερεθίσματα. Η μετανάστευση περιλαμβάνει συνήθως αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος που οδηγούν σε αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού [14].

Δομές που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι τα φιλοπόδια, τα ελασματοπόδια και τα ινίδια πίεσης. Τα φιλοπόδια είναι προεξοχές της μεμβράνης, που δρουν ως αισθητήρες των κινούμενων ερεθισμάτων και περιέχουν μακριά και παράλληλα ινίδια ακτίνης. Τα ελασματοπόδια είναι προεξοχές του κυτταροπλάσματος, που σχηματίζονται στο κύτταρο που



μεταναστεύει και συγκεκριμένα στο άκρο που προηγείται και προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης. Έχουν μήκος περίπου 1 έως 5  $\mu\text{m}$  και εύρος 2  $\mu\text{m}$ . Τα ινίδια πίεσης είναι ινίδια ακτίνης και έχουν ανεστραμμένη πολικότητα. Τα ινίδια αυτά συνδέονται με μόρια  $\alpha$ -ακτινίνης και μυσσίνης και κατανέμονται κατά μήκος των συσταλτών ινιδίων [14].

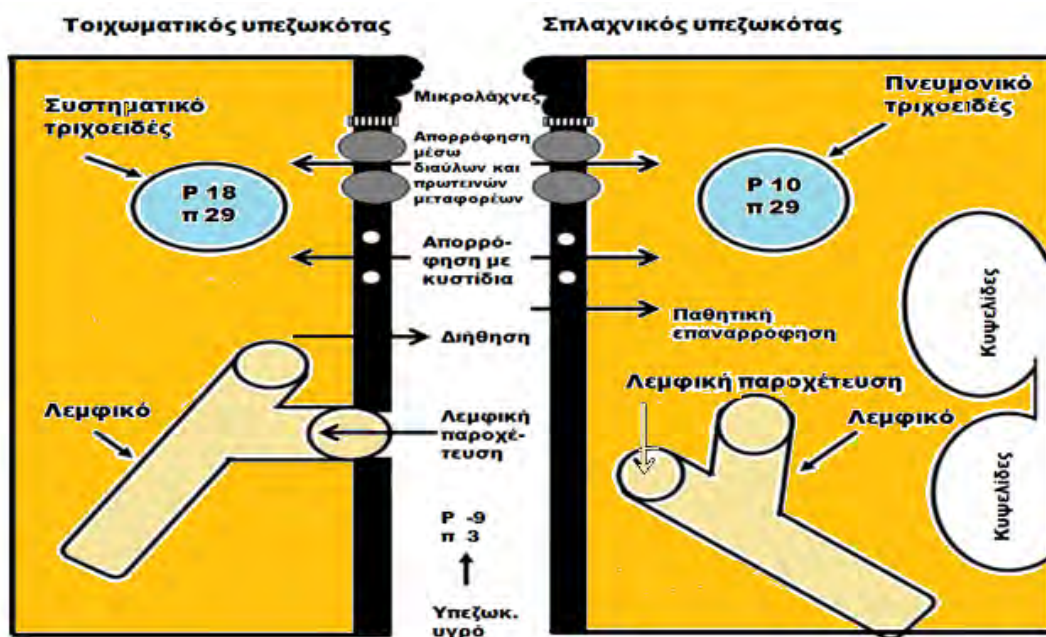
Και οι τρεις προαναφερθέντες δομές είναι απαραίτητες για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης. Η μετανάστευση είναι μία κυτταρική λειτουργία η οποία διακρίνεται στα παρακάτω στάδια (**Εικόνα 4**): α) τα φιλοπόδια ανιχνεύουν το σήμα της μετανάστευσης, β) δημιουργούνται τα ελασματοπόδια και εκτελείται αμοιβαδοειδή κίνηση προς τα εμπρός, γ) το κύτταρο προσκολλάται σε προεξοχές της εξωκυττάριας μήτρας, δ) τα ινίδια πίεσης ρυθμίζουν τη συστολή του σώματος του κυττάρου για να διευκολυνθεί η κίνηση προς τα εμπρός, ε) το πίσω τμήμα του κυττάρου απελευθερώνεται και στ) ανακυκλώνονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση και τη μεταγωγή σήματος του κυττάρου [14].



**Εικόνα 4.** Βασικά στάδια της κυτταρικής μετανάστευσης [14].

### Κεφάλαιο 3 Φυσιολογία του υπεζωκοτικού υγρού

Η παραγωγή του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα γίνεται από τα τριχοειδή αγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η παροχέτευση του υγρού γίνεται μέσω των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα, μέσω παθητικής επαναρρόφησης από τον σπλαχνικό υπεζωκότα, μέσω απορρόφησης διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς καθώς και μέσω απορρόφησης διαμεσολαβούμενη από ενδοκυττάρωση του μεσοθηλίου [3]. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού απεικονίζονται σχηματικά στην **Εικόνα 5**.



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση της διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού σε σκύλο. Η υδροστατική πίεση συμβολίζεται με P και η κολλοειδωσμοτική με π. Οι τιμές των πιέσεων στο συστηματικό και πνευμονικό τριχοειδές και στο υπεζωκοτικό υγρό προέρχονται από πειραματικά δεδομένα και εκφράζονται σε cm H<sub>2</sub>O. Η διαβάθμιση της πίεσης στον τοιχωματικό υπεζωκότα ισούται με  $[18-(-9)]-(29-3)=1$  cm H<sub>2</sub>O ενώ στο σπλαχνικό υπεζωκότα υπολογίζεται σε  $[10-(-9)]-(29-3)= -7$  cm H<sub>2</sub>O όπου η αρνητική τιμή δείχνει

παθητική επαναρρόφιση του υγρού. Παρόμοιο μοντέλο ισχύει και στον άνθρωπο. Παραλλαγή σχήματος από [15].

### 3.1 Παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού

Ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού ρυθμίζεται από την ισορροπία της παραγωγής και παροχέτευσης του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Η κίνηση του υπεζωκοτικού υγρού βασίζεται στις δυνάμεις του Starling, την απαγωγή του υγρού από τα στόματα του τοιχωματικού υπεζωκότα και την ανταλλαγή υγρού και ηλεκτρολυτών διαμέσου των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα [11]. Οι δυνάμεις του Starling στηρίζονται στις υδροστατικές και κολλοειδωσμοτικές πιέσεις των τριχοειδών και του υπεζωκοτικού υγρού. Σύμφωνα με το νόμο του Starling ισχύει:  $J_v = L \times S [(P_{cap} - P_{pl}) - \sigma (\Pi_{cap} - \Pi_{pl})]$ , όπου  $J_v$  ο ρυθμός διήθησης,  $P$  οι υδροστατικές δυνάμεις και  $\Pi$  οι κολλοειδωσμοτικές δυνάμεις 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. Η σταθερά ανάκλασης δείχνει την ικανότητα του υπεζωκότα να περιορίζει την κίνηση των πρωτεϊνών [6]. Από την μία πλευρά, η υδροστατική πίεση των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότα ευνοεί τη μετακίνηση υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και στον άνθρωπο υπολογίζεται ότι είναι 30 cm H<sub>2</sub>O. Από την άλλη πλευρά, η κολλοειδωσμοτική πίεση διατηρεί το υγρό στα τριχοειδή και εκτιμάται ότι είναι 34 cm H<sub>2</sub>O. Οι πιέσεις αυτές στο υπεζωκοτικό υγρό είναι -5 και 5 cm H<sub>2</sub>O αντίστοιχα. Επομένως η διαφορά υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης είναι:  $[(30 - (-5)) - (34 - 5)] = 6$  cm H<sub>2</sub>O.

Αυτή η θετική διαφορά πιέσεων υποδηλώνει τη διήθηση υγρού από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Πειραματικά έχει βρεθεί ότι η παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγαλύτερη στα ανώτερα τμήματα του υπεζωκότα και μικρότερη στα κατώτερα τμήματά του [6].

### **3.2 Παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού**

Η παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού μπορεί να γίνει μέσω των ακόλουθων μηχανισμών: παροχέτευση από τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα, παθητική επαναρρόφιση από τον σπλαχνικό υπεζωκότα, απορρόφιση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς, απορρόφιση διαμεσολαβούμενη από την ενδοκυττάρωση [3].

#### **3.2.1 Παροχέτευση από τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα**

Έχει βρεθεί ότι η παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού γίνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα. Διάφορες μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι τα λεμφαγγεία επιτελούν το 75% της απομάκρυνσης του υγρού σε σκύλους και κόνικλους ενώ στα πρόβατα το ποσοστό αυτό εκτιμάται σε 89% [7]. Σε αντίθεση με τον τοιχωματικό υπεζωκότα, τα λεμφαγγεία του σπλαχνικού υπεζωκότα, τα οποία στερούνται στομάτων, δεν συμμετέχουν στην παροχέτευση του υπεζωκοτικού υγρού [6].

Η παροχέτευση μέσω των στομάτων των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα δεν είναι ο κυριότερος τρόπος απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό έδειξαν τα αποτελέσματα μιας μελέτης όπου έγινε πρόκληση υδροθώρακων σε κόνικλους. Πιο συγκεκριμένα, έγινε πρόκληση μικρού ( $0,12 \text{ ml kg}^{-1}$ ) και μεγάλου ( $2,4 \text{ ml kg}^{-1}$ ) υδροθώρακα, που περιείχε ραδιοσημασμένη αλβουμίνη και δεξτράνη. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το ποσοστό της συνολικής ραδιοσημασμένης αλβουμίνης και δεξτράνης που απορροφήθηκε από τους μικρούς και μεγάλους υδροθώρακες ήταν 39% και 64% αντίστοιχα. Σε περίπτωση υπεζωκοτικής συλλογής η παροχέτευση από τα στόματα των λεμφαγγείων αυξάνει ενώ η απομάκρυνση νερού και διαλυμένων ουσιών με τους άλλους μηχανισμούς αυξάνει πολύ λιγότερο σε σχέση με την παροχέτευση μέσω των στομάτων [13].

### **3.2.2 Παθητική επαναρρόφηση από τον σπλαχνικό υπεζωκότα**

Πειραματικά δεδομένα σε σκύλους έδειξαν ότι οι δυνάμεις του Starling συμβάλλουν στην απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα. Σε ζώα με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα όπως είναι ο κόνικλος ή ο σκύλος, οι πιέσεις στα τριχοειδή είναι χαμηλές και επομένως είναι δυνατή η παθητική επαναρρόφηση. Αντίθετως, σε οργανισμούς με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα όπως είναι ο άνθρωπος και το πρόβατο, οι πιέσεις είναι υψηλότερες και επομένως δεν ευνοείται η παθητική επαναρρόφηση του υγρού [3].

Στον άνθρωπο η υδροστατική πίεση στον σπλαχνικό υπεζωκότα είναι μικρότερη από εκείνη στα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα και εκτιμάται ότι

είναι 24 cm H<sub>2</sub>O. Η κολλοειδωσμοτική πίεση είναι 34 cm H<sub>2</sub>O, όμοια με εκείνη στον τοιχωματικού υπεζωκότα. Επομένως η διαφορά υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης είναι: [(24-(-5))-(34-5)]=0 cm H<sub>2</sub>O. Η μηδενική αυτή διαφορά πίεσης δεν ευνοεί την παθητική επαναρρόφιση του υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα [6].

### 3.2.3 Απορρόφιση διαμεσολαβούμενη από διαύλους και πρωτεΐνες μεταφορείς

Μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρόφιση του υπεζωκοτικού υγρού μπορεί να γίνει και μέσω διαύλων και πρωτεϊνών μεταφορέων που υπάρχουν και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα. Σε πειράματα πρόκλησης τεχνητών υδροθωράκων σε κονίκλους έγινε προσθήκη αναστολέων διαύλων και πρωτεϊνών μεταφορέων, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού. Στους κονίκλους χορηγήθηκαν αναστολείς όπως η αμιλορίδη (αναστολέας του αντιμεταφορέα Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), η βουμετανίδη (αναστολέας του αντιμεταφορέα Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), η ουαμπαΐνη (αναστολέας της αντλίας Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) και παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό της απορρόφησης του υγρού, 1 ώρα μετά την πρόκληση του υδροθώρακα, έφθανε στο 20-30% του ποσοστού απορρόφησης των μαρτύρων [3].

Επίσης, έχουν γίνει ex vivo πειράματα με την συσκευή Ussing, στα οποία βρήκαν ότι η προσθήκη τέτοιων αναστολέων σε τμήματα υπεζωκότα οδήγησε σε μεταβολή της αντίστασης, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η άποψη για τη διακίνηση των ιόντων μέσω διαύλων [16, 17]. Προτάθηκε επομένως στα μεσοθηλιακά κύτταρα η παρουσία διαύλων Na<sup>+</sup>, νερού, των αντιμεταφορέων Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, των

συμμεταφορέων  $\text{Na}^+$ /γλυκόζης,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  και της αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Η παρουσία του διαύλου  $\text{Na}^+$  [18] και του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+$ /γλυκόζης επιβεβαιώθηκε στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών [19]. Έχει βρεθεί επίσης, ότι η απορρόφηση μέσω διαύλων και πρωτεϊνών μεταφορέων είναι μεγαλύτερη στα κατώτερα τμήματα του τοιχωματικού υπεζωκότα σε σχέση με τα ανώτερα [20].

### **3.2.4 Απορρόφηση διαμεσολαβούμενη από την ενδοκυττάρωση**

Το καλά αναπτυγμένο σύστημα κυστιδίων των μεσοθηλιακών κυττάρων μαζί με τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών φαίνεται να υποστηρίζουν την απορρόφηση μέσω του μηχανισμού της ενδοκυττάρωσης. Πινοκυτταρικά κυστίδια στην κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων εγκλωβίζουν το υπεζωκοτικό υγρό, μακρομοριακές ουσίες και σωματιδιακά υλικά, στη συνέχεια διαπερνούν το κυτταρόπλασμα και απελευθερώνονται από τη βασική επιφάνεια των κυττάρων στο διάμεσο ιστό [3].

## Κεφάλαιο 4 Υπεζωκοτική συλλογή

Υπεζωκοτική συλλογή ονομάζουμε την παθολογική άθροιση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η παθολογική διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού μπορεί να οφείλεται σε διαταραχή των μηχανισμών παραγωγής και απορρόφησης του υγρού. Οι μηχανισμοί παθολογικής διακίνησης του υγρού διακρίνονται στους μηχανισμούς που μεταβάλλουν την ισορροπία των δυνάμεων του Starling, σε αυτούς που διαταράσσουν τη λεμφική παροχέτευση και σε αυτούς που αυξάνουν τη διαπερατότητα των τριχοειδών και των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Στους δύο τελευταίους μηχανισμούς η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού αυξάνει πάνω από το φυσιολογικό. Έτσι οι υπεζωκοτικές συλλογές χωρίζονται σε διδρώματα (με φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης) και σε εξιδρώματα [11].

Στην κλινική πράξη ο διαχωρισμός των διδρωμάτων από τα εξιδρώματα γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια του Light [21]. Αν ισχύει ένα από τα παρακάτω κριτήρια το υπεζωκοτικό υγρό είναι εξίδρωμα:

1. Ο λόγος των πρωτεϊνών του υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του ορού είναι μεγαλύτερος από 0,5.
2. Ο λόγος της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) του υπεζωκοτικού υγρού προς την LDH του ορού είναι μεγαλύτερος από 0,6.
3. Τα επίπεδα της LDH του υπεζωκοτικού υγρού είναι μεγαλύτερα από τα 2/3 της ανώτερης φυσιολογικής τιμής του ορού.



Η θεραπεία των υπεζωκοτικών συλλογών συνίσταται στην αντιμετώπιση της πρωτογενούς αιτίας δημιουργίας της συλλογής ή σε επεμβατικές τεχνικές απομάκρυνσης του υπεζωκοτικού υγρού (θωρακοκέντηση, θωρακοσκόπηση, κλειστή βιοψία υπεζωκότα). Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση έγινε αναφορά σε ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το ρυθμό απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού και επομένως να αποτελέσουν μία μη επεμβατική μέθοδο αντιμετώπισης των υπεζωκοτικών συλλογών [22]. Συγκεκριμένα *in vivo* μελέτες σε ποντικούς και κονίκλους καθώς και *ex vivo* μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας σε ιστούς υπεζωκότα προβάτου και ανθρώπου, έδειξαν ότι αδρενεργικοί αγωνιστές και κορτικοστεροειδή αυξάνουν την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού [3, 23-25] ενώ αντίθετα η παρακεταμόλη και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη μπορούν να την εμποδίσουν [26]. Μία πολύ πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε και σε ασθενείς ότι η προνοσοκομειακή χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων μπορεί να παρατείνει τη νοσηλεία και να οδηγήσει σε πιο περίπλοκες υπεζωκοτικές συλλογές [27].

#### **4.1 Διιδρώματα**

Η εμφάνιση των διιδρωμάτων υποδηλώνει νόσο εξωπνευμονική και εξω-υπεζωκοτική. Τα διιδρώματα οφείλονται σε ανισορροπία των πιέσεων εκατέρωθεν της ενδοθηλιακής μεμβράνης των τριχοειδών του πνεύμονα και του υπεζωκότα. Η αύξηση της συστηματικής αρτηριακής πίεσης μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διιδρωμάτων. Επίσης η αύξηση της φλεβικής πίεσης της πνευμονικής κυκλοφορίας είναι η κύρια αιτία υπεζωκοτικής συλλογής σε καρδιακές παθήσεις. Η αύξηση αυτή εμποδίζει την επαναρρόφηση του υγρού από τον σπλαχνικό υπεζωκότα και οδηγεί

στην διήθηση του υγρού από την επιφάνεια των πνευμόνων. Με αυτόν τον τρόπο υπεζωκοτική συλλογή δημιουργείται σε αυξημένης υδροστατικής πίεσης και αυξημένης διαπερατότητας πνευμονικό οίδημα [3].

Η μειωμένη πίεση στην υπεζωκοτική κοιλότητα, σε ατελεκτασία του πνεύμονα, μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία διδρωμάτος. Η μείωση της κολλοειδοσμοτικής πίεσης στη συστηματική κυκλοφορία, όπως συμβαίνει στο νεφρωσικό σύνδρομο ή στην ηπατική κίρρωση, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διδρωματική συλλογή. Τέλος, σε επιπλοκή περιτοναϊκής συλλογής μπορεί να προκληθεί διδρωματική συλλογή από την μεταφορά του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω των διαφραγματικών λεμφαγγείων ή μέσω των διαφραγματικών ελλειμμάτων λόγω της διαφοράς πίεσης μεταξύ των δύο κοιλοτήτων. Άλλα πιο σπάνια αίτια διδρωματικής συλλογής είναι η συμπιεστική περικαρδίτιδα, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και η υπολευκωματιναιμία [11].

## **4.2 Εξιδρώματα**

Τα εξιδρώματα οφείλονται σε αυξημένη διαπερατότητα της ενδοθηλιακής μεμβράνης των τριχοειδών του πνεύμονα και του υπεζωκότα. Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνεται είτε με τη δημιουργία νέων ανοιγμάτων μεταξύ των κυττάρων είτε με τη δημιουργία διακυττάρων μονοπατιών, από τη σύντηξη των κυστιδίων με την κυτταρική μεμβράνη. Στις εξιδρωματικές συλλογές έχουν βρεθεί κάποιες από τις ουσίες που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου, η προέλευση των οποίων μπορεί να είναι εξωυπεζωκοτική ή από τα ίδια τα μεσοθηλιακά κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα [9].

Τα εξιδρώματα δημιουργούνται όταν παρεμποδίζεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και κυττάρων μέσω των λεμφαγγείων. Η μείωση της παροχέτευσης από τα λεμφαγγεία μπορεί να αφορά στα υπεζωκοτικά λεμφαγγεία, όπως σε απόφραξη αυτών από φλεγμονώδεις παράγοντες ή στα εξωϋπεζωκοτικά λεμφαγγεία, όπως σε υποπλασία του λεμφικού συστήματος ή απόφραξη του θωρακικού πόρου [11]. Στον **Πίνακα 1** απεικονίζονται τα αίτια των υπεζωκοτικών συλλογών σύμφωνα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν (διδρώματα ή εξιδρώματα).

**Πίνακας 1.** Αίτια υπεζωκοτικών συλλογών

<b>ΔΙΔΡΩΜΑΤΑ</b>	
Καρδιακή ανεπάρκεια Κίρρωση Νεφρική ανεπάρκεια Νεφρωσικό σύνδρομο Περιτοναϊκή κάθαρση Μυξοίδημα	Συμπιεστική περικαρδίτιδα Υπολευκωματιναιμία Ουροθώρακας Ατελεκτασία Πνευμονική εμβολή Στένωση μιτροειδούς
<b>ΕΞΙΔΡΩΜΑΤΑ</b>	
<b>Νεοπλάσματα</b> Κακήθες μεσοθηλίωμα Μεταστατικό καρκίνωμα Λέμφωμα <b>Λοιμώδη νοσήματα</b> Βακτηριακές λοιμώξεις Ιογενής πλευρίτιδα Φυματιώδης πλευρίτιδα Μυκητσιακή πλευρίτιδα Παρασιτική πλευρίτιδα <b>Νοσήματα κολλαγόνου</b> Ρευματοειδής αρθρίτιδα Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος Σύνδρομο Churg-Strauss Μικτή νόσος του συνδετικού ιστού Ανοσοβλαστική λεμφαδενοπάθεια Σύνδρομο Sjogren Κοκκιωμάτωση Wegener	<b>Νοσήματα ΓΕΣ</b> Ρήξη οισοφάγου Παγκρεατίτιδα Ενδοκοιλιακό απόστημα <b>Μετά από χειρουργικές επεμβάσεις</b> Χειρουργείο κοιλιάς Μετά από αορτοστεφανιαία παράκαμψη Μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα <b>Άλλα</b> Πνευμονική εμβολή Έκθεση σε αμιάντο Σαρκοείδωση Αμυλοείδωση Φαρμακευτική πλευρίτιδα Ουραιμική πλευρίτιδα Σύνδρομο υπερδιέγερσης ωθηκών Χυλοθώρακας Αιμοθώρακας

## Κεφάλαιο 5 Διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών

Η κυτταρική μεμβράνη οριοθετεί το κύτταρο διατηρώντας τη δομή του και διαχωρίζει τον ενδοκυττάριο από τον εξωκυττάριο χώρο. Λειτουργεί ως φραγμός στη διαπερατότητα ουσιών καθώς με τους μηχανισμούς που διαθέτει, ελέγχει την είσοδο και την έξοδο ουσιών από το κύτταρο. Οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η μεταφορά ουσιών και ύδατος μέσω της κυτταρικής μεμβράνης αφορούν τη δίοδο μέσα από τη διπλοστιβάδα λιπιδίων της μεμβράνης ή μέσα από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες [28].

Οι δύο κύριοι μηχανισμοί μεταφοράς είναι η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά. Η διάχυση είναι το κύριο φαινόμενο με το οποίο γίνεται η παθητική μεταφορά και οφείλεται στη θερμική κίνηση των μορίων ή ιόντων (κίνηση Brown). Εξαιτίας της κινήσεως αυτής και χωρίς την ανάγκη δαπάνης οποιασδήποτε μορφής ενέργειας, παρατηρείται μία κίνηση των σωματιδίων από τη θέση υψηλότερης συγκέντρωσης προς τη θέση της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Η ροή αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις. Η ενεργητική μεταφορά είναι η διακίνηση ιόντων ή ουσιών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια πρωτεϊνών φορέων. Ο μηχανισμός αυτός επιτελείται αντίθετα προς το ενεργειακό πρηνές, δηλαδή από χαμηλή συγκέντρωση σε υψηλή. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται επιπλέον κατανάλωση ενέργειας [28].

Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν πολικότητα λόγω της ασύμμετρης κατανομής των μεμβρανικών μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της κορυφαίας επιφάνειας. Η πολικότητα αυτή εξασφαλίζεται μέσω των στενών συνδέσεων που υπάρχουν μεταξύ

των κυττάρων, τα σημεία δηλαδή όπου τα κύτταρα εφάπτονται με τα γειτονικά τους επιθηλιακά κύτταρα. Οι στενές συνδέσεις αποτελούν φραγμό για την μεταφορά ιόντων και μορίων μεταξύ των κυττάρων καθώς και για την μετακίνηση πρωτεϊνών και λιπιδίων μεταξύ της κορυφαίας και της βασεοπλευρικής επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης. Επομένως η μεταφορά διαμέσου των επιθηλίων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: μέσω της διακυτταρικής οδού (μέσα από τα κύτταρα) και μέσω της παρακυτταρικής οδού (μεταξύ των κυττάρων). Η μεταφορά υγρών και ουσιών διακυτταρικά γίνεται με τη διάχυση και την ενεργητική μεταφορά, μηχανισμοί που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η παρακυτταρική μεταφορά ουσιών αποδίδεται στις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων [29].

Οι στενές συνδέσεις παρουσιάζουν διαφορετική διαπερατότητα και μορφολογικά χαρακτηριστικά, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκονται και ανάλογα με την φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση του ιστού [30]. Η αρχιτεκτονική δομή των στενών συνδέσεων αποτελείται από διαμεμβρανικές και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με έναν ενεργό κυτταροσκελετό. Οι πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων μπορούν να χωριστούν σε 3 ομάδες: 1) τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων, 2) τις πρωτεΐνες των πλακών των στενών συνδέσεων και 3) τις πρωτεΐνες δεύτερης τάξης των πλακών των στενών συνδέσεων. Τα πρωτεϊνικά μόρια των πλακών (πρώτης και δεύτερης τάξης) ελέγχουν τη διασύνδεση μεταξύ του μεμβρανικού τμήματος των στενών συνδέσεων (ενσωματωμένων πρωτεϊνών) και του κυτταροσκελετού [31].

Οι πρωτεΐνες της πρώτης ομάδας συνδέονται με αντίστοιχες πρωτεΐνες των γειτονικών κυττάρων και σχηματίζουν φραγμό. Οι διαμεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες

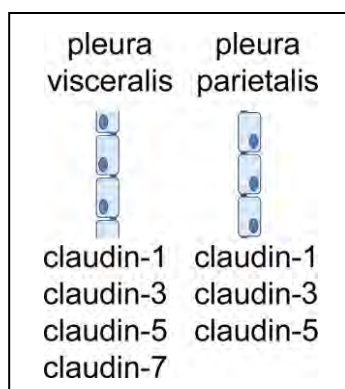
συνδέονται στην κυτταροπλασματική πλευρά με τις πρωτεΐνες των πλακών των στενών συνδέσεων και αποτελούνται από την οκλουδίνη, τις κλαουδίνες, τις JAM-A (Junctional Adhesion Molecule-A) και το ESAM (Endothelial Selective Adhesion Molecule). Η οκλουδίνη παίζει ρόλο στη διάρθρωση, διατήρηση και ρύθμιση της λειτουργίας των στενών συνδέσεων χάρις στις πολύπλοκες διασυνδέσεις και αλληλεπιδράσεις της με άλλα πρωτεϊνικά μόρια των στενών συνδέσεων. Οι κλαουδίνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς διατηρούν την ικανότητα δημιουργίας στενών συνδέσεων ακόμα και σε περιπτώσεις απουσίας της οκλουδίνης [31].

Οι πρωτεΐνες της δεύτερης ομάδας είναι συνδετικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και περιέχουν πολλαπλές περιοχές σύνδεσης πρωτεϊνών. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι ZO-1, ZO-2 και ZO-3 (Zonula Occludens), η πρωτεϊνική κινάση CASK (Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protein kinase), οι κινάσες MAGI-1, MAGI-2 και MAGI-3 (membrane-associated guanylate kinase), οι PAR3 και PAR6 (partitioning defective proteins) και MUPP-1 (Multiple PDZ domain protein, aka MUPP-1). Αποτελούν συνδετικούς κρίκους μεταξύ των ενσωματωμένων πρωτεϊνών και του κυτταροσκελετού της ακτίνης καθώς και συνδέσμους για την κινητοποίηση κυτταροπλασματικών μορίων που σχετίζονται με την κυτταρική σήμανση δηλαδή της δεύτερης τάξης πρωτεϊνών των πλακών [31].

Οι πρωτεΐνες της τρίτης ομάδας είναι κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες. Περιλαμβάνουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες των πλακών για το συντονισμό λειτουργιών όπως η ρύθμιση της παρακυτταρικής διαπερατότητας και της κυτταρικής

πολικότητας. Σε αυτές ανήκουν ο μεταγραφικός και ρυθμιστικός παράγοντας ZONAB, η σινγκουλίνη, η αφαντίνη κ.α. [31].

Όσον αφορά τον υπεζωκότα, έχει βρεθεί ότι σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα εκφράζονται η οκλουδίνη και οι κλαουδίνες [32]. Μελέτες έκφρασης των πρωτεϊνών των στενών συνδέσεων έδειξαν ότι σε ανθρώπινο σπλαχνικό υπεζωκότα ανιχνεύτηκαν οι κλαουδίνες 1, 3, 5 και 7 ενώ στον τοιχωματικό ανιχνεύτηκαν οι ίδιες πρωτεΐνες εκτός της κλαουδίνης 7 (**Εικόνα 6**). Σε παθολογικές καταστάσεις του υπεζωκότα όπως σε περίπτωση φλεγμονής, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται η κλαουδίνη 2 και οι πρωτεΐνες των στενών συνδέσεων αρχίζουν να χαλαρώνουν με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητα του μεσοθηλίου [33]. Επίσης, μία πολύ πρόσφατη τρανσκριπτομική μελέτη προσδιόρισε ορισμένα γονίδια των κλαουδινών που διαφοροεκφράζονται σε ασθενείς με μεσοθηλιώμα σε σχέση με υγιείς [34].



**Εικόνα 6.** Οι κλαουδίνες του σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα [33].

## Κεφάλαιο 6 Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μία επιστήμη όπου η μηχανική συνδυάζεται με τη βιολογία, τη χημεία και τη φυσική. Η νανοτεχνολογία ορίζεται ως τεχνολογία σχεδιασμού και σύνθεσης υλικών των οποίων οι διαστάσεις είναι της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου [35]. Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά εμφανίζουν νέες ιδιότητες που είναι συνάρτηση των διαστάσεών τους. Καθώς το μέγεθος ενός υλικού μειώνεται και φθάνει σε επίπεδο νανοκλίμακας, οι φυσικές, οι χημικές και οι βιολογικές του ιδιότητες αλλάζουν σε σχέση με το αρχικό υλικό [36]. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στη χρήση των νανοϋλικών μέσα σε βιολογικά συστήματα, με σκοπό να αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες ενέργειές τους. Στόχος θα πρέπει να είναι η δημιουργία βιοσυμβατών και ασφαλών προϊόντων νανοτεχνολογίας με αποτέλεσμα την ευρύτερη χρήση τους σε πολλούς τομείς της ιατρικής.

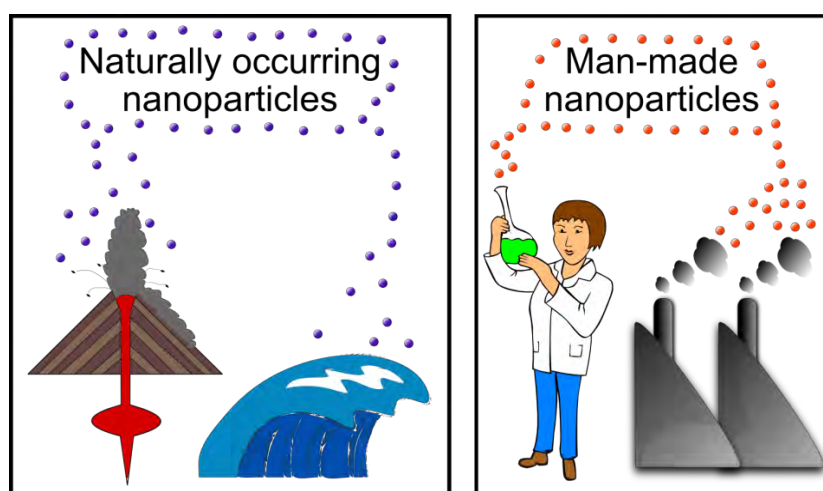
Με βάση το National Nanotechnology Initiative (NNI) [37], η νανοτεχνολογία σχετίζεται με τον έλεγχο των υλικών διαστάσεων 1-100 nm. Τα διάφορα νανοϋλικά έχουν τουλάχιστον μία διάσταση μικρότερη από 100 nm. Οι νανοσωλήνες είναι δομές που έχουν τις δύο από τις τρεις διαστάσεις μικρότερες από 100 nm ενώ τα νανοσωματίδια έχουν και τις τρεις διαστάσεις μικρότερες από 100 nm. Τα νανοσωματίδια και οι νανοϊνες είναι τα πιο καλά μελετημένα υλικά για τις πιθανές αρνητικές επιδράσεις τους στον άνθρωπο, καθώς στο μέλλον αυτά θα αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα νανο-υλικά σε τεχνολογίες όπως τα συστήματα στοχευμένης θεραπείας των πασχόντων ιστών και η βελτίωση βιοσυμβατότητας των εμφυτευμάτων [35]. Στον τομέα των ιατρικών εφαρμογών, η νανοτεχνολογία σημειώνει ταχεία εξέλιξη και θα μπορούσε να προσφέρει δυνατότητες για την



ανάπτυξη νέων μεθόδων έρευνας, διάγνωσης και θεραπείας των νόσων του αναπνευστικού συστήματος και κατ' επέκταση του υπεζωκότα.

## 6.1 Κατηγορίες, εφαρμογές και ιδιότητες των νανοσωματιδίων

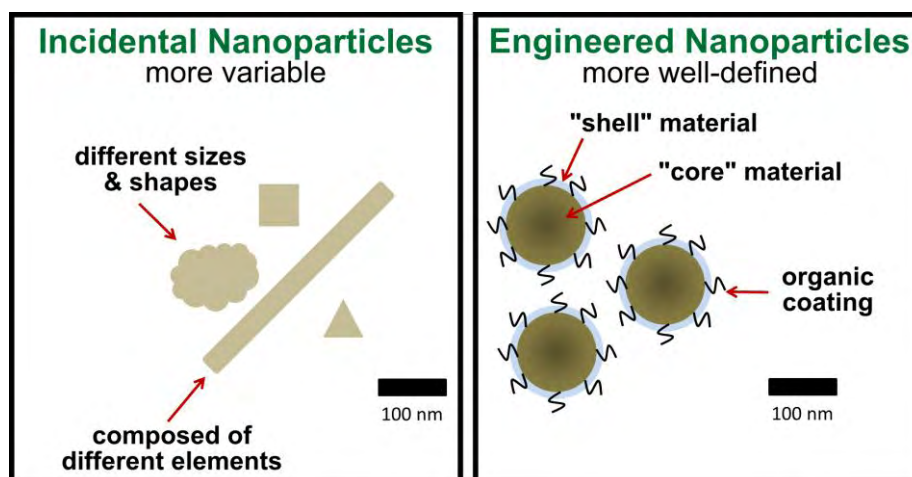
Διάφορες φυσικές και χημικές διεργασίες οδηγούν στη δημιουργία νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια προκύπτουν είτε από φυσικές διεργασίες είτε από ανθρώπινες δραστηριότητες (**Εικόνα 7**). Τα φυσικά παραγόμενα νανοσωματίδια (naturally occurring nanoparticles) μπορεί να βρεθούν στην ηφαιστειακή τέφρα, στη θάλασσα, στην ψιλή άμμο ή στη σκόνη [38].



**Εικόνα 7.** Φυσικά και τεχνητά παραγόμενα νανοσωματίδια [38].

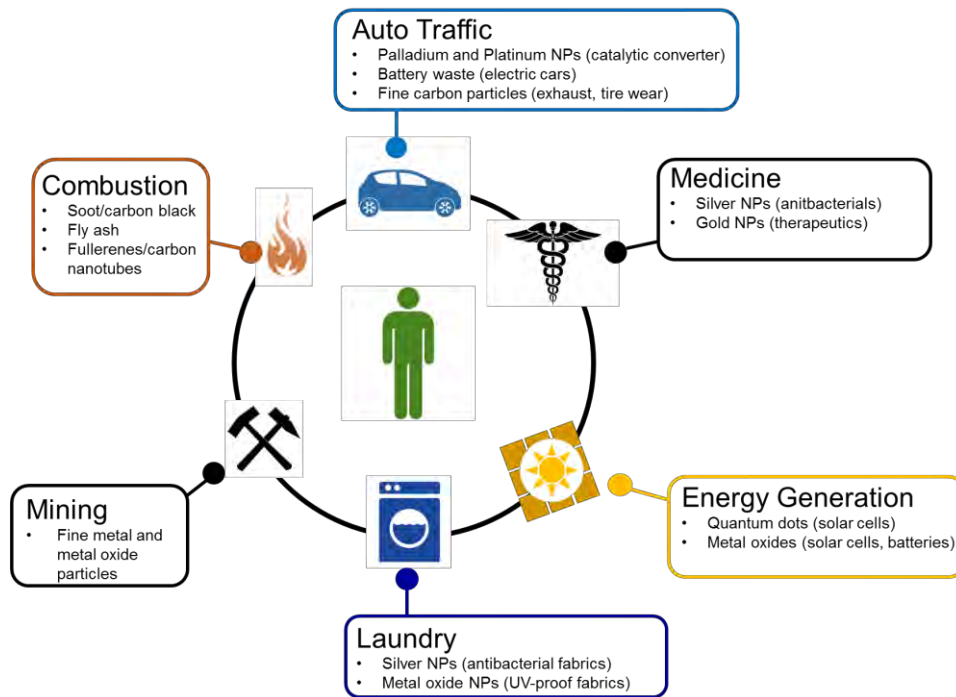
Τα τεχνητά παραγόμενα νανοσωματίδια (man-made nanoparticles) διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα “τυχαία” και τα “μηχανοποιημένα” (**Εικόνα 8**). Τα τυχαία (incidental) νανοσωματίδια είναι παραπροϊόντα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και αποτελούνται από διαφορετικά μεγέθη και σχήματα καθώς και από διαφορετικά στοιχεία. Μπορεί να προέρχονται από τα καυσαέρια, από μεγάλης κλίμακας εξόρυξη ακόμη και από την έναρξη μιας πυρκαγιάς. Σε αντίθεση με τα

προηγούμενα, τα μηχανοποιημένα (engineered) νανοσωματίδια παράγονται από τον άνθρωπο και έχουν συγκεκριμένα μεγέθη, σχήματα και σύνθεση. Επίσης μπορεί να περιέχουν τμήματα με διαφορετικές χημικές συνθέσεις (για παράδειγμα υπάρχουν νανοσωματίδια με πυρήνα φτιαγμένο από χρυσό, τα οποία περιβάλλονται από πυρίτιο και είναι επικαλυμμένα με ειδικά αντισώματα) [38].



**Εικόνα 8.** Κατηγορίες τεχνητών νανοσωματιδίων [38].

Πηγές εκπομπής νανοσωματιδίων είναι διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η καύση ορυκτών καυσίμων, η μεγάλης κλίμακας εξόρυξη και η κυκλοφορία των αυτοκινήτων. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς όπως στην ιατρική, στη βιομηχανία, στην παραγωγή ενέργειας, σε ηλεκτρονικές συσκευές και σε πολλά καταναλωτικά προϊόντα (**εικόνα 9**) [38].



Εικόνα 9. Πηγές έκθεσης νανοσωματιδίων [38].

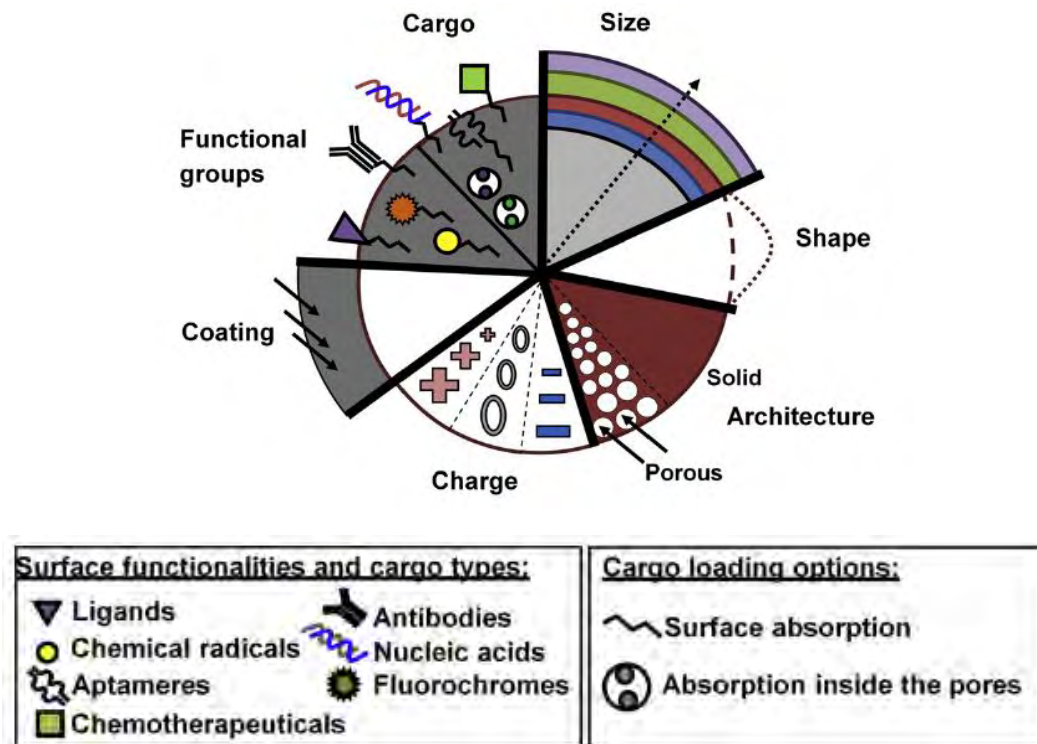
Τα προϊόντα που περιέχουν νανοσωματίδια είναι είδη ένδυσης, αντηλιακά, καλλυντικά, αθλητικά είδη, μπαταρίες, συσκευασίες τροφίμων και συμπληρώματα διατροφής [39]. Υπάρχουν για παράδειγμα σαμπουάν με νανοσωματίδια χαλκού, οδοντόκρεμες με νανοσωματίδια αργύρου, αντηλιακά με νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου ή οξειδίου του ψευδαργύρου, ρακέτες του τένις με νανοσωματίδια άνθρακα. Τα νανοσωματίδια πυριτικού άλατος περιέχονται σε μία πλαστική μεμβράνη που χρησιμοποιείται στις συσκευασίες τροφίμων επειδή εμποδίζουν την είσοδο αερίων (όπως το οξυγόνο) ή υγρασίας. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία για την επικάλυψη ξύλου, πλαστικού και υφασμάτων με σκοπό την προστασία τους από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία [40].

Η νανο-ιατρική οδηγείται σήμερα στην παρασκευή προϊόντων τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλεονεκτήματα. Στον τομέα της υγείας, μία σημαντική εφαρμογή των νανοσωματιδίων είναι η χρήση τους στη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών ή εμβολίων. Όταν οι διάφορες ουσίες εγκλωβιστούν σε νανοσωματίδια με κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειάς τους, ώστε να αποφεύγεται η πιθανή συσσωμάτωσή τους, έχουμε σαν αποτέλεσμα την παρασκευή ενός σταθερού και αποτελεσματικού νανοσυστήματος-φορέα της φαρμακευτικής ουσίας [41]. Μελέτες εξετάζουν τη χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων συνδεδεμένων σε νανοσωματίδια νανοαδάμαντα για τη θεραπεία όγκων του εγκεφάλου [42] ή της λευχαιμίας [43]. Τα νανοσωματίδια αυτά συνδεδεμένα με μόρια πρωτεϊνών μπορούν επίσης να βοηθήσουν την ανάπτυξη των οστών σε μοσχεύματα των αρθρώσεων [44]. Ορισμένα είδη νανοσωματιδίων δρουν ευεργετικά για τον οργανισμό. Για παράδειγμα, τα νανοσωματίδια του οξειδίου του δημητρίου απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος μετά από τραυματική κάκωση, δρώντας ως αντιοξειδωτικά [45] ενώ τα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων σε καρκινικούς όγκους [46].

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Woodrow Wilson [47] ο άργυρος είναι το πλέον εμπορευματοποιημένο νανοσωματίδιο. Οι ενώσεις του αργύρου έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών κυρίως λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Χρησιμοποιούνται σε πολλά αντιμικροβιακά, ηλεκτρονικά και βιοϊατρικά προϊόντα. Νανοσωματίδια αργύρου υπάρχουν σε υφάσματα (όπως τα ενδύματα που είναι ανθεκτικά στην οσμή), σε καλλυντικά και προϊόντα υγιεινής (οδοντόκρεμες, μεικ απ), συσκευές (πλυντήρια και ψυγεία), καθαριστικά (απορρυπαντικά και σαπούνια),

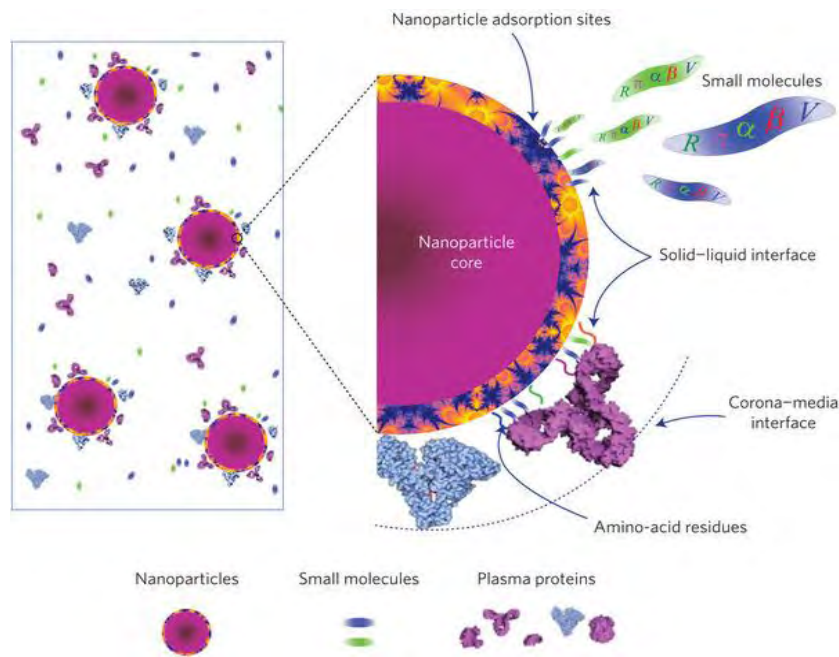
οικιακά σκεύη κουζίνας (δοχεία αποθήκευσης τροφίμων, σκεύη ψησίματος, βάσεις κοπής), παιχνίδια και οικοδομικά υλικά (χρώματα, κόλλες) [47]. Νανοσωματίδια αργύρου περιέχονται επίσης σε χειρουργικά εργαλεία και μάσκες, υλικά οδοντιατρικής (οδοντική ρητίνη), καθετήρες, επιδέσμους τραυμάτων, συσκευασίες τροφίμων, φίλτρα αέρα ακόμη και στην επεξεργασία του νερού [47-49].

Τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια αποτελούν δομές με ελεγχόμενες φυσικές και χημικές ιδιότητες. Τα μηχανοποιημένα νανοσωματίδια δύναται να έχουν ρυθμιζόμενα μεγέθη και σχήματα, να επενδύονται από συγκεκριμένα υλικά, να διαθέτουν συγκεκριμένο φορτίο επιφάνειας και κατάλληλη αρχιτεκτονική δομή ανάλογα με τον κατασκευαστή (**Εικόνα 10**). Αλλαγές στις παραπάνω ιδιότητες των νανοσωματιδίων καθορίζουν την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα. Σκοπός είναι τα νανοσωματίδια να έχουν ιδιότητες που τους επιτρέπουν να βελτιώνουν την πρόσληψή τους από τα κύτταρα στόχους και να ελαχιστοποιούν την μη-ειδική αλληλεπίδραση. Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια μπορούν να μεταφέρουν φορτίο στα κύτταρα στόχους. Το φορτίο αυτό μπορεί να αποτελείται από πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, αντισώματα και φάρμακα όπως χημειοθεραπευτικά κ.α. Το φορτίο μπορεί να εισέλθει στα νανοσωματίδια είτε μέσω προσρόφησης στην επιφάνειά τους είτε μέσω των καναλιών των πόρων (**Εικόνα 10**) σε όσα νανοϋλικά διαθέτουν πόρους [50].



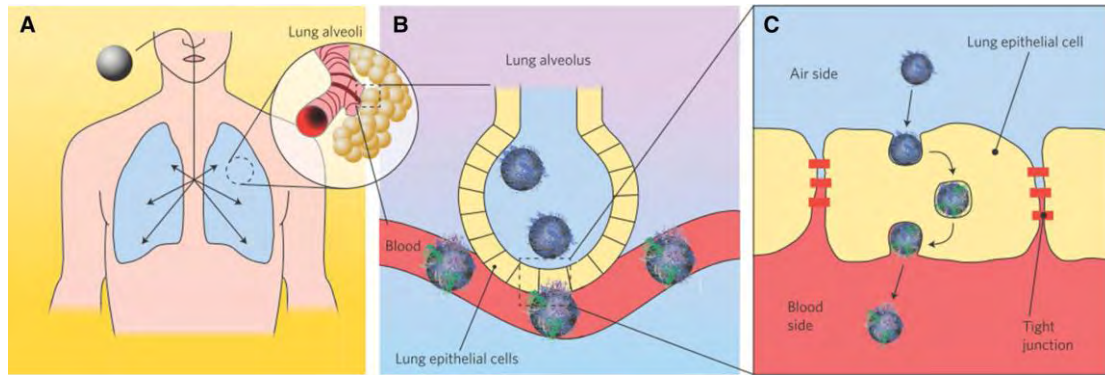
**Εικόνα 10.** Φυσικές και χημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων [50].

Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τα κύτταρα σε βιολογικά υγρά του σώματος. Τα νανοσωματίδια έχουν την ιδιότητα να προσροφούν μικρά μόρια και πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους, να σχηματίζουν δηλαδή μια «κορώνα πρωτεϊνών» (protein corona) γύρω τους, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** [51]. Αυτό το φαινόμενο διέπεται από τις μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χημικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και των κατάλοιπων αμινοξέων των πρωτεϊνών [52].



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση της προσρόφησης μικρών μορίων και πρωτεϊνών πάνω στις θέσεις προσρόφησης της επιφάνειας των νανοσωματιδίων [51].

Η δημιουργία της πρωτεϊνικής κορώνας γύρω από τα νανοσωματίδια είναι μία δυναμική διαδικασία που διαφέρει ανάλογα με την πορεία που ακολουθούν τα νανοσωματίδια μέσα στο σώμα. Τα νανοσωματίδια που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, αρχικά συναντούν τις κυψελίδες των πνευμόνων (**Εικόνα 12A**) και σχηματίζουν ένα είδος κορώνας με τις πρωτεΐνες των υγρών του πνεύμονα (μπλε στην **Εικόνα 12B**). Στη συνέχεια, τα νανοσωματίδια περνούν στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να σχηματίσουν εκεί μια νέα πρωτεϊνική κορώνα καθώς κάποια μόρια θα αντικατασταθούν από συστατικά του αίματος (μωβ στην **Εικόνα 12B**). Επίσης, όταν τα νανοσωματίδια εισέλθουν στα επιθηλιακά κύτταρα, ορισμένες πρωτεΐνες της επιφάνειάς τους θα αντικατασταθούν από ενδοκυτταρικά βιομόρια (πράσινο στην **Εικόνα 12C**) [53].



**Εικόνα 12.** Η δυναμική αλλαγή της πρωτεϊνικής κορώνας κατά τη διάρκεια της πορείας των νανοσωματιδίων μέσα από τον οργανισμό [54].

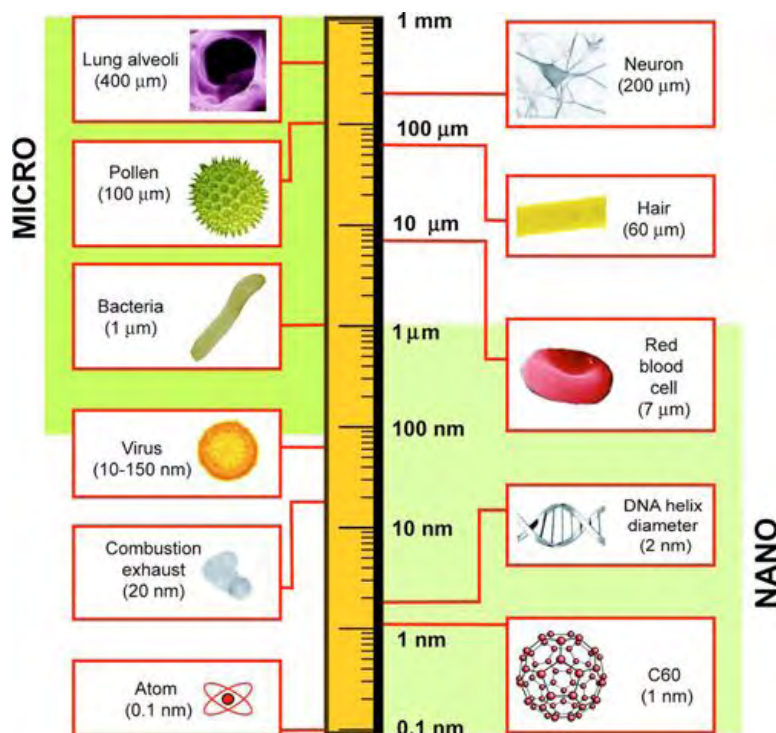
Ο σχηματισμός της πρωτεϊνικής κορώνας γύρω από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τα κύτταρα. Έχειδειχθεί ότι τα ίδια τα νανοσωματίδια καθώς και η σύνθεση του βιολογικού υγρού στο οποίο σχηματίζεται η κορώνα είναι ιδιαίτερης σημασίας για την απόκριση του οργανισμού στα νανοσωματίδια [55]. Σε μία πρόσφατη μελέτη εξετάστηκε η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων που απελευθερώνονται από τα καυσαέρια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και του βρογχοκυψελιδικού υγρού. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες του πλάσματος που δεσμεύτηκαν από τα νανοσωματίδια ήταν το ινωδογόνο ενώ στο βρογχοκυψελιδικό υγρό δεσμεύτηκαν η αλβουμίνη και οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A και D [56]. Ερευνητές μελέτησαν επίσης τη σύνθεση των πρωτεϊνών που επικαλύπτουν τα νανοσωματίδια ανθρακικού απατίτη σε δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών που προέρχονταν από ασθενείς με διάφορες κλινικές παθήσεις. Τα υπεζωκοτικά υγρά επωάστηκαν με τα νανοσωματίδια και οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με αυτά ήταν πρωτεΐνες του συμπληρώματος C3, η αλβουμίνη του ορού και η απολιποπρωτεΐνη-A1 [57].



## 6.2 Είσοδος νανοσωματιδίων στα κύτταρα

Τα νανοσωματίδια έχουν διαστάσεις πολύ μικρότερες από το ανθρώπινο κύτταρο και επομένως μπορούν να διεισδύσουν στα κύτταρα και να εισέλθουν σε κυτταρικά οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια και ο πυρήνας. Η ικανότητα των νανοσωματιδίων να εισέρχονται σε οργανίδια των κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών σε δομές του κυττάρου όπως είναι ο πυρήνας. Η παρουσία των νανοσωματιδίων σε κυτταρικά οργανίδια μπορεί όμως να έχει και επιβλαβείς επιδράσεις για τα κύτταρα. In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα για παράδειγμα, μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα και να προκαλέσουν γενετικές ανωμαλίες [58].

Νανοδομές μικρότερες των 50 nm μπορούν εύκολα να εισέλθουν στα περισσότερα κύτταρα, ενώ αυτές που είναι μικρότερες από 20 nm μπορούν να διαπεράσουν τα αιμοφόρα αγγεία, καθιστώντας έτσι τις νανοδομές ικανές να διαπεράσουν βιολογικούς φραγμούς. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων (μικρότερο από 100 nm) είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος των ιών, του DNA και των πρωτεϊνών. Στην **Εικόνα 13** μπορούμε να διακρίνουμε το μέγεθος διαφόρων βιολογικών συστατικών συγκριτικά με τα νανοσωματίδια που απελευθερώνονται από τα καυσαέρια (combustion exhaust 20 nm). Αυτά τα νανοσωματίδια για παράδειγμα είναι μικρότερα από τα ερυθροκύτταρα τα οποία έχουν μέγεθος περίπου 7  $\mu\text{m}$  και πολύ μικρότερα από τις κυψελίδες του πνεύμονα που έχουν μέγεθος περίπου 400  $\mu\text{m}$  [59]. Επομένως τα νανοσωματίδια αυτά μπορούν εύκολα να φτάσουν, μέσω της εισπνοής, στο αναπνευστικό σύστημα και να εισέλθουν στις κυψελίδες του πνεύμονα.



Εικόνα 13. Σύγκριση μεγέθους νανοσωματιδίων και βιολογικών συστατικών [59].

### 6.2.1 Μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης

Η είσοδος των νανοσωματιδίων στα κύτταρα μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς που εξαρτώνται από το μέγεθος, το φορτίο, τη σύνθεση των νανοσωματιδίων καθώς και από τον τύπο των κυττάρων [60]. Η ενδοκυττάρωση αποτελεί τον κύριο τρόπο πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα [61-62]. Ένα τέτοιο παράδειγμα ενδοκυττάρωσης έχει δείχθει σε αρουραίους, όπου μετά την εισπνοή σωματιδίων χρυσού, τα σωματίδια εντοπίστηκαν μέσα σε κυστίδια της μεμβράνης των κυψελιδικών μακροφάγων και των κυψελιδικών κυττάρων τύπου I [63].

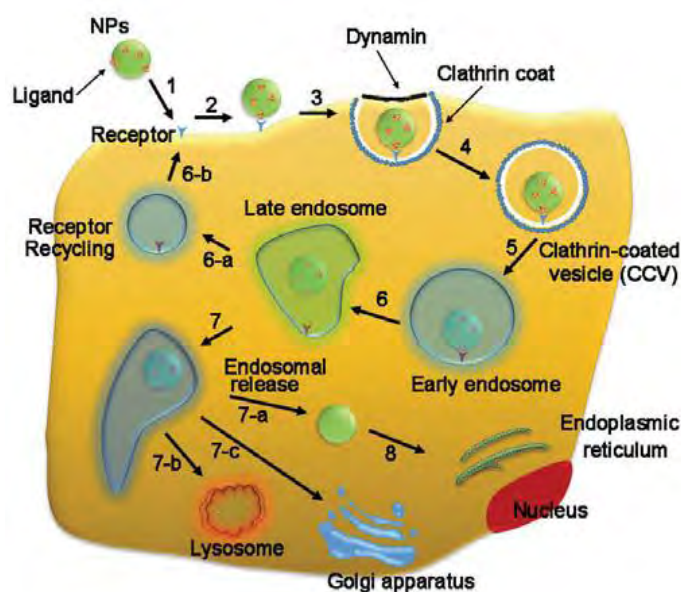
Οι μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: την φαγοκυττάρωση και την πινocyττάρωση. Η φαγοκυττάρωση είναι ο κύριος μηχανισμός πρόσληψης σωματιδίων που έχουν διάμετρο μεγαλύτερη από 500 nm.

Με τον μηχανισμό αυτόν τα φαγοκύτταρα εξαλείφουν ιούς, βακτήρια ακόμη και αποπτωτικά κύτταρα. Κατά την φαγοκυττάρωση των σωματιδίων, η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει εγκολπώσεις και κλείνει στο εσωτερικό της τα σωματίδια, σχηματίζοντας εσωτερικά κυστίδια, τα φαγοσώματα, που εξελίσσονται σε ενδοσώματα και στη συνέχεια ενσωματώνονται με τα λυσοσώματα [64].

Αντιθέτως, η πινοκυττάρωση είναι μηχανισμός ενδοκυττάρωσης των σωματιδίων που έχουν διάμετρο μικρότερη από 500 nm. Είναι ένας μηχανισμός κατά τον οποίο μικρά σωματίδια εισέρχονται στα κύτταρα μέσω κυστιδίων που σχηματίζει η κυτταρική μεμβράνη. Τα κυστίδια αυτά στη συνέχεια συντήκονται με τα λυσοσώματα όπου υδρολύονται ή αποικοδομούνται. Η πινοκυττάρωση απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας υπό την μορφή ATP και διακρίνεται σε δύο οδούς: την εξαρτώμενη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση και την ανεξάρτητη από την κλαθρίνη. Η δεύτερη υποδιαιρείται στην ενδοκυττάρωση που μεσολαβείται από μικροσπύλαια και στην μακροπινοκυττάρωση [65].

Ο μηχανισμός της ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης ή αλλιώς ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων είναι ο κύριος μηχανισμός πρόσληψης των νανοσωματιδίων. Κατά την διαδικασία αυτή, τα κύτταρα αναγνωρίζουν τα σωματίδια μέσω προσδετών που βρίσκονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και προσλαμβάνουν τα σωματίδια μέσω της δημιουργίας εγκολπώσεων στην μεμβράνη τους. Οι εγκολπώσεις αυτές διαθέτουν πρωτεϊνικά μόρια που λειτουργούν ως υποδοχείς για τους προσδέτες των σωματιδίων. Μετά τη σύνδεση του σωματιδίου στον υποδοχέα, μόρια κλαθρίνης περιβάλλουν την περιοχή, η δυναμίνη προκαλεί αποκοπή του κυστιδίου από τη μεμβράνη με αποτέλεσμα την μετατροπή του σε ενδοκυτταρικό κυστίδιο μεγέθους μικρότερου των 200 nm. Στη συνέχεια, τα μόρια κλαθρίνης αποικοδομούνται και τα

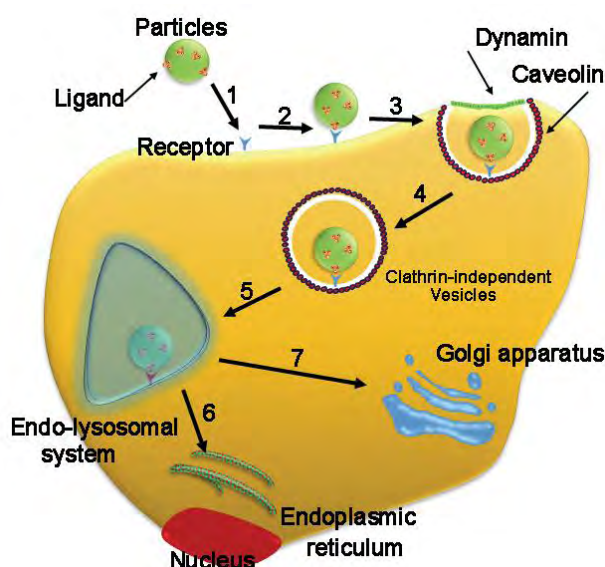
κυστίδια γίνονται πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία μετατρέπονται σε ώριμα ενδοσώματα (Εικόνα 14). Μόλις το σωματίδιο απελευθερωθεί στο εσωτερικό κυττάρου, οι υποδοχείς επιστρέφουν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης για να ξεκινήσει νέος κύκλος της διαδικασίας [66-67].



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης [67].

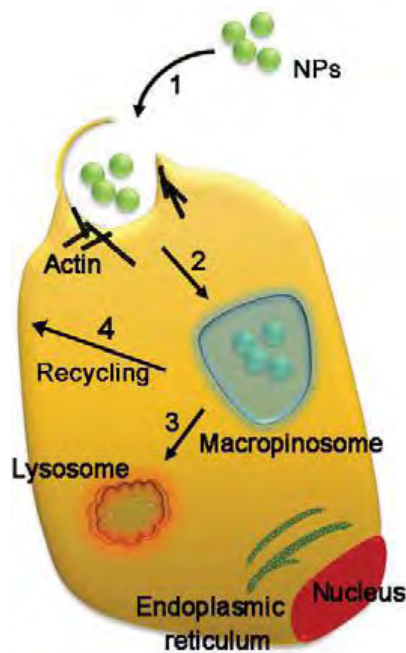
Η ενδοκυττάρωση μέσω μικροσπηλαίων (caveolae) είναι η δεύτερη κύρια οδός πρόσληψης των νανοσωματιδίων. Αυτός ο μηχανισμός ενδοκυττάρωσης χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κύτταρα των μυών και των πνευμόνων [68]. Τα μικροσπήλαια είναι κοιλότητες της κυτταρικής μεμβράνης με σχήμα που θυμίζει σπήλαιο. Η κύρια δομική πρωτεΐνη τους είναι η καβεολίνη και η διάμετρος τους είναι περίπου 50-80 nm. Στη μορφή αυτή της ενδοκυττάρωσης, τα νανοσωματίδια αναγνωρίζονται από τα κύτταρα μέσω προσδετών της επιφάνειάς τους και συνδέονται με υποδοχείς. Στη συνέχεια, παγιδεύονται μέσα στα μικροσπήλαια και η δυναμίνη απελευθερώνει το κυστίδιο από

τη μεμβράνη για να προχωρήσει μέσα στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 15**). Τα μικροσπήλαια συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα και τα νανοσωματίδια μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi [69].



**Εικόνα 15.** Στάδια της ενδοκυττάρωσης των νανοσωματιδίων μέσω μικροσπηλαίων [67].

Η μακροπινοκυττάρωση είναι μία μορφή ενδοκυττάρωσης που δεν μεσολαβείται από υποδοχείς. Αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία η κυτταρική μεμβράνη εγκολπώνει τα σωματίδια που βρίσκονται σε υγρό κοντά στην επιφάνειά της. Οι πτυχώσεις της μεμβράνης συγχωνεύονται με την επιφάνεια του κυττάρου και σχηματίζουν το ενδοκυτταρικό μακροπινόςωμα (**Εικόνα 16**). Οι ενδοκυτταρικές αυτές δομές συντήκονται με τα λυσοσώματα, οδηγώντας σε αποικοδόμηση των περιεχομένων τους. Ωστόσο, μερικά νανοσωματίδια μπορεί να διαφύγουν στο κυτταρόπλασμα καθώς τα μακροπινόςωματα είναι διαπερατά κυστίδια. Τα περιεχόμενα των κυστιδίων αυτών ανακυκλώνονται σε κενοτόπια στην επιφάνεια του κυττάρου [70-71].



**Εικόνα 16.** Αναπαράσταση της μακροπινοκυττάρωση των νανοσωματιδίων [67].

Για να διερευνήσουμε ποιος μηχανισμός ενδοκυττάρωσης είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αναστολείς της ενδοκυττάρωσης. Υπάρχουν φαρμακευτικοί αναστολείς που ο καθένας μπορεί να στοχεύει σε συγκεκριμένο μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης. Για παράδειγμα, η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης μπορεί να απενεργοποιηθεί χρησιμοποιώντας υπέρτονη θεραπεία (σακχαρόζη) ή χημικές ουσίες όπως η χλωροπρομαζίνη. Η τελευταία μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης και να αυξήσει τη ρευστότητά της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού εγκολπώσεων της μεμβράνης και της ανακύκλωσης της κλαθρίνης, οδηγώντας σε μείωση της πρόσληψης νανοσωματιδίων από τα κύτταρα [72].

Η ενδοκυττάρωση μέσω μικροσπηλαίων μπορεί να ανασταλεί με διάφορους αναστολείς δομικών ή σηματοδοτικών μορίων αυτής της οδού. Το υψηλό

περιεχόμενο σε χοληστερόλη των λιπιδίων και των μικροσπηλαίων επιτρέπει τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών όπως η νυστατίνη η οποία αλληλεπιδρά με την χοληστερόλη και τα συστατικά των λιπιδίων με στόχο την διαταραχή της δομής των μικροσπηλαίων [73]. Όσον αφορά τη μακροπινοκυττάρωση, υπάρχουν αναστολείς που μπλοκάρουν τον αποπολυμερισμό των νηματίων της ακτίνης και αποδιοργανώνουν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Αναστολέας της μακροπινοκυττάρωσης είναι για παράδειγμα η γουορτμανίνη, που διαταράσσει τα μονοπάτια σηματοδότησης φωσφοτυροσίνης [74].

## **Κεφάλαιο 7 Επιδράσεις νανοσωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα**

Η εκτεταμένη χρήση των τεχνητών νανοσωματιδίων σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών εγείρει ανησυχίες σχετικά με τις πιθανές τοξικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. Όσον αφορά το αναπνευστικό σύστημα, υπάρχουν ήδη ενδείξεις ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις του πνεύμονα και του υπεζωκότα [58]. Κλινικά δεδομένα συνδέουν την έκθεση σε νανοσωματίδια με τη δημιουργία φλεγμονής, ίνωσης και υπεζωκοτικής συλλογής [75-77]. Μελέτες σε ζώα και κυτταρικές σειρές επιβεβαιώνουν τα παραπάνω ευρήματα και δείχνουν ακόμη ότι τα νανοσωματίδια μπορεί να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα και καρκίνο του υπεζωκότα όπως ο αμίαντος [78-81]. Ειδικότερα, οι μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου στο αναπνευστικό σύστημα έχουν ιδιαίτερη σημασία, καθώς αυτά τα νανοσωματίδια περιέχονται σε πολλά καταναλωτικά προϊόντα και συσκευές με αποτέλεσμα πολλοί άνθρωποι να εκτίθενται καθημερινά σε αυτά [82].

### **7.1 Κλινικά δεδομένα για νανοσωματίδια**

Υπάρχουν κλινικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η εισπνοή τεχνητών νανοσωματιδίων μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα. Όσον αφορά τη βιομηχανία της νανοτεχνολογίας, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα παραγόμενα νανοσωματίδια μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των εργαζομένων που έρχονται σε επαφή με αυτά. Σε μία σειρά κλινικών περιστατικών που εισήχθησαν ταυτόχρονα σε νοσοκομείο στην Κίνα, εξετάστηκαν 7 γυναίκες που



δούλευαν στο ίδιο τμήμα ενός εργοστασίου εκτύπωσης. Οι γυναίκες αυτές εκτέθηκαν σε ναοσωματίδια για χρονικό διάστημα 5 έως 13 μηνών μέσα στο χώρο εργασίας τους. Η έκθεση σε ναοσωματίδια έγινε μέσω εισπνοής και δερματικής επαφής, και τα συμπτώματα που παρουσίασαν ήταν ακριβώς τα ίδια: δύσπνοια, υπεζωκοτική και περικαρδιακή συλλογή. Οι εξετάσεις έδειξαν φλεγμονή και ίνωση του πνεύμονα καθώς και κοκκιώματα ξένων σωμάτων στον υπεζωκότα. Επίσης, στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα, των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα και στο υπεζωκοτικό υγρό βρέθηκαν ναοσωματίδια επικαλυμμένα με πολυακρυλικό εστέρα, διαμέτρου 30 nm. Απόρροια των παραπάνω ήταν τα παθολογικά ευρήματα του πνεύμονα και του υπεζωκότα των ασθενών αυτών να συσχετιστούν με την παρουσία των ναοσωματιδίων στους ιστούς τους [75]. Η παρακολούθηση των γυναικών αυτών για δύο χρόνια έδειξε ότι οι δύο από αυτές πέθαναν από πνευμονική ανεπάρκεια και οι υπόλοιπες πέντε είχαν πολύ σοβαρά προβλήματα πνευμονικής δυσλειτουργίας [76]. Στις βιοψίες των ασθενών αυτών καθώς και στο υπεζωκοτικό υγρό εντοπίστηκαν επίσης ναοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου τα οποία φαίνεται να συνέβαλαν στη δημιουργία της υπεζωκοτικής συλλογής και στην εμφάνιση των άλλων κλινικών ευρημάτων αυτών των γυναικών [77]. Σε μεταγενέστερη μελέτη οι ίδιοι ερευνητές προσπάθησαν να αναπαραγάγουν το μοντέλο αυτό σε αρουραίους. Σε αυτό το πειραματικό μοντέλο έγινε έκθεση σε υψηλές δόσεις πολυακρυλικών ναοσωματιδίων και ναοσωματιδίων του πυριτίου. Οι αρουραίοι παρουσίασαν τους ίδιους φαινοτύπους με τις εργάτριες του εργοστασίου της προηγούμενης μελέτης, στοιχείο το οποίο συνηγορεί ότι τα ναοσωματίδια αυτά έχουν δυσμενείς επιδράσεις στους ορογόνους υμένες του θώρακα [83].

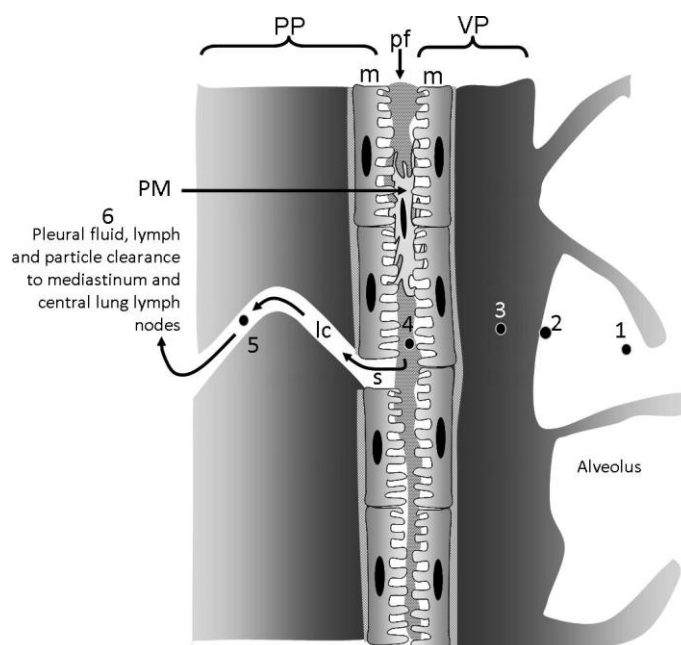
Τα παραπάνω κλινικά δεδομένα δεν είναι τα μόνα που συνηγορούν στην πιθανή πρόκληση κινδύνου στην υγεία εξαιτίας της έκθεσης σε νανοσωματίδια. Σε εργοστάσια παραγωγής νανοσωματιδίων στην Ταϊβάν, έγινε παρακολούθηση των εργατών που χειρίζονταν νανοσωματίδια καθώς και των εργατών που δεν είχαν εκτεθεί σε αυτά, για χρονικό διάστημα 6 μηνών. Πνευμονικοί και καρδιαγγειακοί δείκτες καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα βρέθηκαν να συσχετίζονται με την έκθεση σε νανοσωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, στους εργάτες που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια παρατηρήθηκε φλεγμονή στους αεραγωγούς λόγω μείωσης της πρωτεΐνης 16 των Club κυττάρων και διαταραχή της λειτουργίας των πνευμόνων λόγω αλλαγών σε δείκτες που σχετίζονται με την οξειδωτική ισορροπία σε σχέση με τους εργάτες που δεν ήρθαν σε επαφή με νανοσωματίδια. Επίσης, εντοπίστηκε βλάβη στο αγγειακό ενδοθήλιο λόγω της αύξησης στο μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης και μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, δισμουτάση του υπεροξειδίου και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης [84].

Σε άλλη κλινική μελέτη συσχετίστηκε η έκθεση σε νανοσωματίδια με το κλασματικό εκπνεόμενο μονοξειδίο του αζώτου (FENO). Βρέθηκε ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου οδήγησε σε σημαντική αύξηση του FENO, στοιχείο το οποίο δείχνει αυξημένη φλεγμονή των αεραγωγών [85].

Επίσης, σε εργάτες που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια μαύρου άνθρακα παρατηρήθηκε μείωση της λειτουργίας των πνευμόνων και έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό [86].

## 7.2 Αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων με δομές του πνεύμονα

Τα νανοσωματίδια μετά την είσοδό τους στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, μπορεί να περάσουν το βρογχικό επιθήλιο και να φτάσουν στις κυψελίδες του πνεύμονα. Από εκεί μπορούν είτε να εισέλθουν μέσα στα κυψελιδικά μακροφάγα είτε να προχωρήσουν στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Στην **Εικόνα 17** απεικονίζεται η πορεία ενός εισπνεόμενου σωματιδίου που φθάνει στην τελική μοίρα του αναπνευστικού συστήματος. Ένα αερομεταφερόμενο σωματίδιο (1) που φθάνει στις κυψελίδες (2) του πνεύμονα, μπορεί να περάσει στον διάμεσο ιστό (3), να εισέλθει στην υπεζωκοτική κοιλότητα (4) και να εξέλθει από αυτήν διαμέσου ενός στόματος (s) του τοιχωματικού υπεζωκότα. Στη συνέχεια το σωματίδιο περνά στα λεμφαγγεία (lc, 5) και μέσω της λεμφικής οδού μπορεί να φτάσει στους λεμφαδένες του μεσοπνευμονίου και του πνεύμονα [12].



**Εικόνα 17.** Η πορεία ενός εισπνεόμενου σωματιδίου στην κατώτερη μοίρα του αναπνευστικού συστήματος. (m: στιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων, PP: τοιχωματικός και VP: σπλαχνικός υπεζωκότας, pf: υπεζωκοτικό υγρό, PM: μακροφάγα του υπεζωκότα) [12].

Τα σωματίδια κατά την πορεία τους μέσα από το αναπνευστικό σύστημα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορες δομές του πνεύμονα. Αρχικά, τα εισπνεόμενα νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν με τα κυψελιδικά μακροφάγα. Ένα μεγάλο μέρος των νανοσωματιδίων δεν εντοπίζεται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα λόγω πρόσδεσης των νανοσωματιδίων σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων ή λόγω πρόσληψής τους από τα επιθηλιακά κύτταρα ή λόγω μετακίνησής τους πέραν του κυψελιδικού επιθηλίου στην κυκλοφορία του αίματος [87].

Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι μετά από εισπνοή νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου ( $\text{TiO}_2$ ) μόνο ένα μικρό μέρος των νανοσωματιδίων παραλαμβάνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα [88] ενώ τα νανοσωματίδια εντοπίζονται και στο διάμεσο ιστό του πνεύμονα [89]. Επίσης, είναι δυνατή η παρακυτταρική μεταφορά των νανοσωματιδίων στον πνεύμονα η οποία μπορεί να γίνει όταν η διαπερατότητα αυξηθεί, για παράδειγμα λόγω υπεροξειδίου του υδρογόνου ή ισταμίνης [90]. Τέλος η ενδοκυττάρωση αποτελεί τον κύριο τρόπο πρόσληψης των σωματιδίων όπως αναφέρεται σε πολλές μελέτες [61-62]. Σε αρουραίους μετά την εισπνοή σωματιδίων χρυσού, τα σωματίδια βρέθηκαν στα κυψελιδικά μακροφάγα και στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, μέσα σε κυστίδια της μεμβράνης τους [63].

### 7.3 Νανοσωματίδια και καρκινογένεση

Τα τεχνητά νανοσωματίδια, λόγω των χρήσιμων ιδιοτήτων τους, αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο μέρος της βιομηχανίας τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, η εισπνοή αυτών των νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα τεχνητά νανοσωματίδια όπως του  $\text{TiO}_2$ , του μαύρου άνθρακα και του πυριτίου έχουν καρκινογόνες ιδιότητες οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα και τη σύνθεση των νανοσωματιδίων [58]. Σε αρουραίους έχει βρεθεί ότι η εισπνοή νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο του πνεύμονα μετά από μακροχρόνια έκθεση και συσσώρευση επαρκούς δόσης. Ορισμένα είδη νανοσωματιδίων μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή οξειδωτικού στρες, την ανάπτυξη φλεγμονής και την εμφάνιση γενετοξικότητας, διεργασίες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου [58].

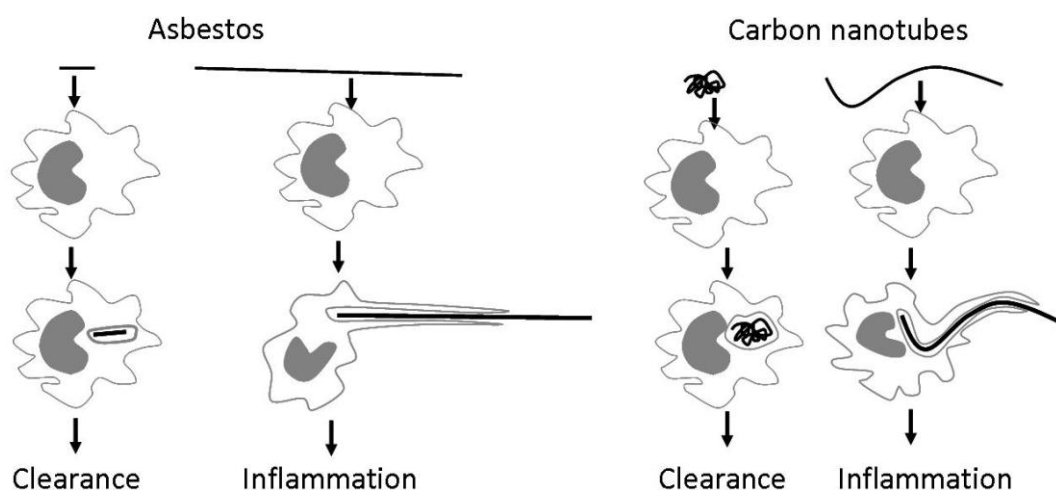
Τα τεχνητά νανοσωματίδια χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: α) τα νανοσωματίδια χαμηλής τοξικότητας και χαμηλής διαλυτότητας, β) τα νανοσωματίδια που έχουν μία δραστική επιφάνεια και γ) τα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων [58]. Τα νανοσωματίδια χαμηλής τοξικότητας και χαμηλής διαλυτότητας δεν είναι βιολογικά ενεργά και συνήθως δεν προκαλούν την εμφάνιση καρκίνου. Αντιθέτως τα νανοσωματίδια που έχουν μία δραστική επιφάνεια μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη φλεγμονής και σε δευτερογενή καρκινογένεση. Τα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων, έχουν συνήθως σχήμα ινών όπως ο αμίαντος και ενοχοποιούνται για την εμφάνιση καρκίνου στον πνεύμονα καθώς και στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα και του περιτοναίου [58].

Ο αμιάντος είναι ένα φυσικό ινώδες νανοσωματίδιο και η έκθεση σε ίνες αμιάντου έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία καρκίνου του πνεύμονα και του υπεζωκότα. Η εισπνοή ινών αμιάντου οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις του υπεζωκότα όπως ίνωση, υπεζωκοτικές πλάκες και μεσοθηλίωμα (καρκίνος των μεσοθηλιακών κυττάρων). Οι ίνες αμιάντου είναι αρκετά λεπτές και έχουν υψηλή αναλογία διαστάσεων (μήκος προς πλάτος). Επομένως μέσω της εισπνοής εισέρχονται στο αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια μπορούν να καταστούν παθογόνες για τον πνεύμονα [91]. Μερικά χαρακτηριστικά των ινών όπως είναι η διάμετρος, το μήκος και η βιοδιατήρηση, δηλαδή η διάρκεια παραμονής των ινών στους πνεύμονες, μπορούν να επηρεάσουν την παθογένειά τους. Για παράδειγμα, οι μακριές (μήκος μεγαλύτερο των 10 μm) και λεπτές ίνες που παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους πνεύμονες μπορούν να προκαλέσουν μία σειρά από διεργασίες οι οποίες οδηγούν σε καρκινογένεση [12].

#### **7.4 Επιδράσεις νανοσωματιδίων στον υπεζωκότα**

Ένα μέρος των εισπνεόμενων νανοσωματιδίων φθάνει στον υπεζωκότα. Στις περισσότερες μελέτες τα νανοσωματίδια που έχουν εξεταστεί για τις επιδράσεις τους στον υπεζωκότα, είναι οι νανοσωλήνες άνθρακα [92]. Είναι από τα πιο καλά μελετημένα νανοσωματίδια και χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, από ηλεκτρονικές συσκευές μέχρι την ιατρική. Μοιάζουν με τον αμιάντο στη δομή καθώς έχουν μορφή ίνας ή ράβδου με παρόμοιες αναλογίες μήκους/διαμέτρου και πιστεύεται ότι μπορεί να προκαλέσουν παρόμοιες επιδράσεις στον υπεζωκότα όπως ίνωση ή ακόμη και μεσοθηλίωμα [93-95].

Σε ποντικούς έχει δειχθεί ότι η εισπνοή μίας μόνο δόσης νανοσωλήνων άνθρακα φθάνει στον υπο-υπεζωκοτικό ιστό και προκαλεί φλεγμονή και ίνωση του υπεζωκότα [78]. Σε μία άλλη *in vivo* μελέτη έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση νανοσωλήνων άνθρακα διαφορετικών μεγεθών σε ποντικούς C57B1/6. Μετά από ανάλυση του περιτοναϊκού εκπλύματος και του διαφράγματος διαπιστώθηκε φλεγμονή και κοκκίωμα. Η ιστολογική εξέταση έδειξε την παρουσία απογοητευμένης φαγοκυττάρωσης στα μακροφάγα που ήρθαν σε επαφή με τις μακριές ίνες των νανοσωλήνων άνθρακα [93]. Η απογοητευμένη φαγοκυττάρωση είναι ένα φαινόμενο όπου τα μακροφάγα αποτυγχάνουν να εγκοπλώσουν πλήρως τις μακριές ίνες και έτσι αυτές διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών και άλλων ιστοτοξικών παραγόντων. Η απογοητευμένη φαγοκυττάρωση των μακρών ινών οδηγεί στη δημιουργία φλεγμονής, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18** για τις περιπτώσεις του αμιάντου και των νανοσωλήνων άνθρακα [12]. Οι νανοσωλήνες άνθρακα προκαλούν φλεγμονή μέσω αυτής της διαδικασίας, όταν έχουν μήκος μεγαλύτερο από 15 μm περίπου [93].

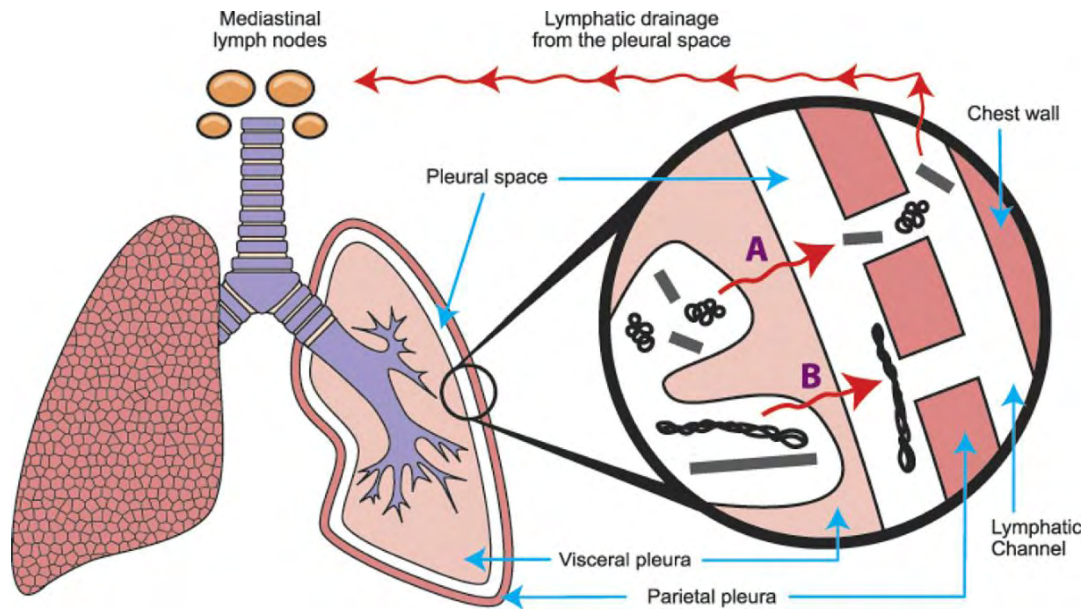


**Εικόνα 18.** Το φαινόμενο της απογοητευμένης φαγοκυττάρωσης για τις μακριές και βραχείες ίνες αμιάντου (αριστερά) και για διάφορα είδη νανοσωλήνων άνθρακα (δεξιά). Τα

μακροφάγα μπορούν να φαγοκυτταρώσουν πλήρως τις βραχείες ίνες αμιάντου ή τα μπερδεμένα και συμπαγή σωματίδια νανοσωλήνων άνθρακα. Αντίθετα, τα μακροφάγα δεν έχουν τη δυνατότητα να επεκταθούν ώστε να εγκολπώσουν τις μακριές ίνες αμιάντου ή τους μεγάλου μήκους νανοσωλήνες, με αποτέλεσμα την ατελή ή απογοητευμένη φαγοκυττάρωση η οποία οδηγεί στη δημιουργία φλεγμονής [12].

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα νανοσύρματα του οξειδίου του νικελίου, έχουν παθογένεια που εξαρτάται από το μήκος τους και είναι παρόμοια με αυτή του αμιάντου στα μεσοθηλιακά κύτταρα [93, 96]. Ενδο-υπεζωκοτική έγχυση των μακρών νανοϊνών οδηγεί σε επίμονη φλεγμονή και ίνωση του τοιχωματικού μεσοθηλίου, απ' όπου ανακύπτει το μεσοθηλίωμα καθώς και άλλες παθολογικές καταστάσεις του υπεζωκότα [12]. Αντίθετα, οι βραχείες νανοΐνες προκαλούν μέτρια φλεγμονή ή καθόλου, χωρίς παθολογικά ευρήματα στον τοιχωματικό υπεζωκότα (**Εικόνα 19**). Επομένως παρατηρείται μία διαφορετική αντίδραση στον υπεζωκότα από ίνες διαφορετικού μήκους, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι οι μακριές ίνες παραμένουν στα στόματα του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ οι βραχείες ίνες ακολουθούν τη λεμφική ροή και προχωρούν προς τους μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες [79].





**Εικόνα 19.** Η απομάκρυνση των σωματιδίων από την υπεζωκοτική κοιλότητα εξαρτάται από το μήκος τους. **A:** Οι βραχείες ίνες που φτάνουν στις κυψελίδες, μεταφέρονται στην υπεζωκοτική κοιλότητα, εξέρχονται διαμέσου των στομάτων και ακολουθούν τη λεμφική ροή προς τους μεσοπνευμόνιους λεμφαδένες. **B:** Οι μακριές ίνες επίσης φτάνουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα αλλά δεν μπορούν να διαφύγουν από τα στόματα και παραμένουν εκεί, όπου προκαλούν φλεγμονή και ενδεχομένως μακροχρόνια νόσο [79].

Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένες *in vitro* μελέτες που δείχνουν τις επιδράσεις διαφόρων ειδών νανοσωματιδίων στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Έκθεση φυσιολογικών και καρκινικών μεσοθηλιακών κυττάρων σε νανοσωλήνες άνθρακα είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή οξειδωτικού στρες, την πρόκληση βλαβών στο DNA και τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο [97]. Στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα (MeT-5A) που έχει χρησιμοποιηθεί και στα πειράματα αυτής της διατριβής, έχει βρεθεί ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα ήταν επίσης κυτταροτοξικοί και μάλιστα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ενώ δεν είχαν κάποια επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [98]. Τέλος, το θεραπευτικό υλικό από μακροφάγα που εκτέθηκαν σε νανοσωλήνες άνθρακα μπορεί να οδηγήσει

στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από την κυτταρική σειρά MeT-5A, φαινόμενο που είναι πολύ σχετικό με την δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής [99].

## 7.5 Νανοδοματίδια αργύρου

Τα νανοδοματίδια αργύρου χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο αριθμό καταναλωτικών προϊόντων και ιατρικών συσκευών, λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους [82]. Έτσι, αυξάνεται η πιθανότητα έκθεσης των καταναλωτών σε αυτά και δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται σε πολλά προϊόντα ψεκασμού όπως τα αποσμητικά ή άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα, οι μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις αυτών των νανοδοματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον [100-101]. Η έκθεση σε νανοδοματίδια αργύρου έχει συνδεθεί με τη δημιουργία παθολογικών καταστάσεων του πνεύμονα και του υπεζωκότα, όπως υποδεικνύουν έρευνες σε ζώα και κυτταρικές σειρές που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Οι περισσότερες *in vivo* μελέτες διερευνούν την τοξικότητα των νανοδοματιδίων αργύρου σε ποντικούς. Ενδοτραχειακή ενστάλαξη αυτών των νανοδοματιδίων (50  $\mu\text{g}$  και 250  $\mu\text{g}$ ) μπορεί να προκαλέσει μέτρια τοξικότητα μόνο στην μεγάλη συγκέντρωση, όπως φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα της γαλακτικής δεϋδρογονάσης, της συνολικής πρωτεΐνης, των ουδετεροφίλων και ορισμένων κυτταροκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα [102]. Ωστόσο, εισπνοή των νανοδοματιδίων αργύρου μπορεί να προκαλέσει ελάχιστη ή και καθόλου τοξικότητα σε ποντικούς. Ειδικότερα, η υποξεία έκθεση στα νανοδοματίδια (εισπνοή νανοδοματιδίων για 4 ώρες την ημέρα, για 10 ημέρες) δημιούργησε ελάχιστη

φλεγμονή στον πνεύμονα και ελάχιστη κυτταροτοξικότητα, αυξάνοντας τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα [103]. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν επίσης εισροή ουδετεροφίλων αλλά και αύξηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στους ποντικούς που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια αργύρου, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία φλεγμονής, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων αργύρου [104-105].

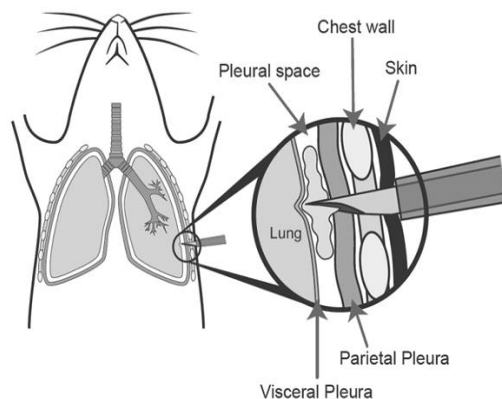
Αντίθετα, η χρόνια έκθεση στα νανοσωματίδια αργύρου, όπου η εισπνοή των νανοσωματιδίων έγινε για 6 ώρες την ημέρα, 5 φορές την εβδομάδα, για χρονικό διάστημα 28 ημερών, δεν επηρέασε σημαντικά την υγεία των ποντικών [106]. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη αυτών των νανοσωματιδίων δεν προκάλεσε επίσης φλεγμονή σε ποντικούς αλλά επηρέασε ορισμένες παραμέτρους της μηχανικής λειτουργίας των πνευμόνων όπως η ελαστικότητα του πνεύμονα [107]. Από την άλλη πλευρά, *ex vivo* μελέτη σε τεμάχια πνεύμονα αρουραίων έδειξε ότι τα νανοσωματίδια αργύρου (10, 20 και 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) προκάλεσαν ήπια κυτταροτοξικότητα αλλά καμία προφλεγμονώδη απάντηση [108].

*In vitro* μελέτες εξετάζουν επίσης την πιθανή κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου. Σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικών τα νανοσωματίδια αυτά οδήγησαν σε τοξικότητα και απόπτωση, καθώς μείωσαν τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης ενώ αύξησαν την έκκριση του μονοξειδίου του αζώτου, του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF- $\alpha$ ) και την γονιδιακή έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας [109]. Σε κυψελιδικά μακροφάγα παρατηρήθηκε επίσης τοξικότητα μετά από έκθεση σε

νανοσωματίδια αργύρου, η οποία εξαρτάται από το μέγεθός των νανοσωματιδίων και βασίζεται κυρίως στην παραγωγή οξειδωτικού στρες [110].

Ωστόσο, στην κυψελιδική κυτταρική σειρά A549 η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου προκάλεσε κυτταροτοξικότητα, η οποία εξαρτάται από τη δόση (συγκέντρωση) των νανοσωματιδίων καθώς και γενοτοξικότητα που υποδηλώνεται από βλάβες στο DNA μέσω του μηχανισμού παραγωγής οξειδωτικού στρες [80]. Τα νανοσωματίδια αργύρου φαίνεται να προκαλούν γενοτοξικότητα και σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, αφού αυξάνουν τα ρήγματα της έλικας του DNA και επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με την βλάβη και την επιδιόρθωση του DNA [111].

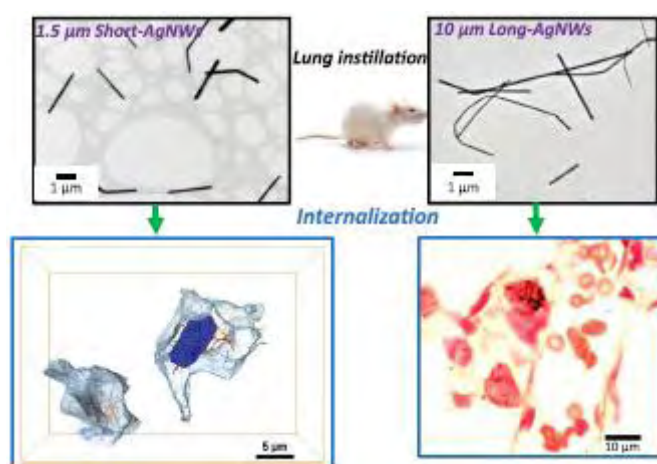
Όσον αφορά τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου στον υπεζωκότα, πολύ λίγα δεδομένα είναι γνωστά. Υπάρχει μόνο μία μελέτη στην οποία διερευνήθηκε ποιο είναι το μέγεθος των νανοσωματιδίων που μπορεί να προκαλέσει οξεία φλεγμονή στον υπεζωκότα. Σε αυτήν έγινε ενδο-υπεζωκοτική έγχυση νανοϊών αργύρου, 5 διαφορετικών κατηγοριών μήκους, σε ποντικούς C57Bl/6 (**Εικόνα 20**). Βρέθηκε ότι οι ίνες μήκους πάνω από 4  $\mu\text{m}$  ήταν παθογόνες για τον υπεζωκότα και οδήγησαν σε οξεία φλεγμονή και επακόλουθη ίνωση. Η οξεία φλεγμονώδη αντίδραση υποδηλώθηκε από την σημαντική αύξηση του συνολικού αριθμού κυττάρων καθώς και των συνολικών κοκκιοκυττάρων (κυρίως ουδετερόφιλων και ένα χαμηλό ποσοστό ηωσινόφιλων) στο υπεζωκοτικό έκπλυμα, 24 ώρες μετά την έγχυση. Επίσης, παρατηρήθηκε απογοητευμένη φαγοκυττάρωση των μακροφάγων του υπεζωκότα μόνο στις ίνες μήκους από 5  $\mu\text{m}$  και πάνω, ενώ 7 ημέρες μετά την έγχυση η φλεγμονή είχε υποχωρήσει σε μεγάλο βαθμό [81].



**Εικόνα 20.** Σχηματική απεικόνιση της ενδο-υπεζωκοτικής έγχυσης νανοσωματιδίων σε ποντικούς. Μία βελόνα διαπερνά το θωρακικό τοίχωμα για να γίνει έγχυση των νανοϊών αργύρου στην υπεζωκοτική κοιλότητα [81].

Τέλος, μία πολύ πρόσφατη μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις δύο διαφορετικών μεγεθών νανοσωλήνων αργύρου (1,5  $\mu\text{m}$  και 10  $\mu\text{m}$ ) στον πνεύμονα και στον υπεζωκότα αρουραίων. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, έγινε ενδοτραχειακή ενστάλαξη σε αρουραίους Sprague-Dawley και δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της απογοιτευμένης φαγοκυττάρωσης καθώς οι νανοσωλήνες φαγοκυτταρώθηκαν και αποικοδομήθηκαν από τα μακροφάγα. Και τα δύο μεγέθη νανοσωλήνων αργύρου οδήγησαν σε οξεία και παροδική φλεγμονή στους πνεύμονες η οποία είχε υποχωρήσει 21 ημέρες μετά την ενστάλαξη. Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα οι νανοσωλήνες αργύρου των 10  $\mu\text{m}$  προκάλεσαν καθυστερημένη φλεγμονή ουδετερόφιλων και μακροφάγων ενώ οι νανοσωλήνες του μικρότερου μεγέθους προκάλεσαν μόνο οξεία παροδική ουδετεροφιλία. Και τα δύο μεγέθη νανοσωλήνων οδήγησαν στην αύξηση των επιπέδων της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης D στο βρογχοκυψελιδικό υγρό την έβδομη ημέρα μετά την ενστάλαξη [112].

Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί ότι οι νανοσωλήνες αργύρου (μήκους 1,5  $\mu\text{m}$  και 10  $\mu\text{m}$ ) εισήλθαν στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μέσα στα οποία παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του μήκους τους σε διάστημα μίας ημέρας μετά την ενστάλαξη (**Εικόνα 21**). Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για την εμφάνιση της οξείας και παροδικής φλεγμονής των πνευμόνων, η οποία ήταν μεγαλύτερου βαθμού και διάρκειας για τους νανοσωλήνες αργύρου των 10  $\mu\text{m}$ . Η πιο έντονη επίδραση που παρατηρήθηκε από την έκθεση σε νανοσωλήνες μεγάλου μήκους σε σύγκριση με τους μικρού μήκους οφείλεται στον μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων που απαιτείται για τους νανοσωλήνες μεγαλύτερου μήκους καθώς και στην μεγαλύτερη παραμονή τους στον υπεζωκότα και τους υπο-υπεζωκοτικούς χώρους του πνεύμονα [112].



**Εικόνα 21.** Ενδοτραχειακή ενστάλαξη νανοσωλήνων αργύρου (1,5  $\mu\text{m}$  και 10  $\mu\text{m}$ ) σε αρουραίους και είσοδος και των δύο μεγεθών νανοσωλήνων στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα των αρουραίων [112].

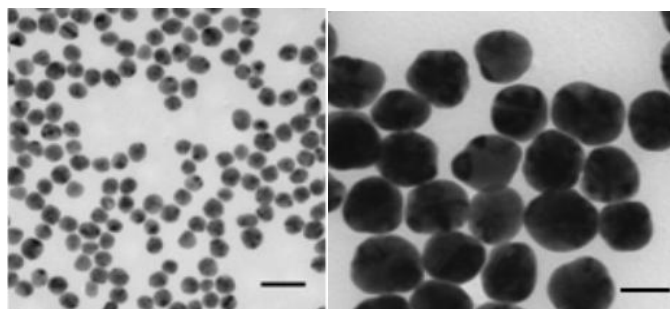
## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## Κεφάλαιο 1 Υλικό και Μέθοδοι

### 1.1 Νανοδομημένα αργύρου και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα νανοδομημένα αργύρου (AgNPs) 20 nm και 60 nm σε διάμετρο, με γνωστά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). Τα AgNPs είχαν σφαιρικό σχήμα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22** και είχαν σταθεροποιηθεί σε υδατικό διάλυμα κιτρικού νατρίου. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων AgNPs και ο αριθμός των νανοδομημάτων που περιείχαν, όπως παρελήφθησαν από τη Sigma, περιγράφονται στον **Πίνακα 2**.



**Εικόνα 22.** Ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης των υπό μελέτη AgNPs, διαμέτρου 20 nm στην αριστερή εικόνα (Aldrich Prod. No. 730793) και 60 nm στην δεξιά εικόνα (Aldrich Prod. No. 730815).

**Πίνακας 2.** Συσχετισμός μεταξύ της διαμέτρου των νανοδομημάτων, της συγκέντρωσης μάζας και της συγκέντρωσης του αριθμού των νανοδομημάτων.

Διάμετρος νανοδομημάτων (nm)	Συγκέντρωση μάζας (mg/mL)	Συγκέντρωση αριθμού (nanoparticles/mL)
20 nm	0.02 mg/mL	$4.5 \times 10^{11}$
60 nm	0.02 mg/mL	$1.7 \times 10^{10}$



Ακριβώς πριν από κάθε πείραμα τα AgNPs αναμειγνύονταν με στροβιλισμό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε τελικές συγκεντρώσεις 0,2 μg/ml ή 2 μg/ml. Τα AgNPs επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα Krebs-Ringer (KRB) για τα πειράματα που έγιναν σε υπεζωκότα προβάτου ενώ για τα πειράματα των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα RPMI 1640. Τα αντίστοιχα πειράματα αναφοράς έγιναν με υδατικά διαλύματα κιτρικού νατρίου συγκεντρώσεων 0,02 mM ή 0,2 mM.

Η σύνθεση του KRB (σε mM) ήταν: 117,5 NaCl, 1,15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24,99 NaHCO<sub>3</sub>, 5,65 KCl, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 2,52 CaCl<sub>2</sub>, και 5,55 γλυκόζη. Το RPMI περιείχε επιπρόσθετα 10% βόειο εμβρυικό ορό, 1% γλουταμίνη και 1% πενικιλίνη - στρεπτομυκίνη. Σε όλες τις πλαστικές επιφάνειες των κυτταροκαλλιεργειών έγινε προ-επικάλυψη με διάλυμα φιμπρονεκτίνης για 30 λεπτά (50 μg/ml φιμπρονεκτίνη από την Calbiochem, USA). Όλες οι άλλες χημικές ουσίες αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich.

## 1.2 Συλλογή δειγμάτων υπεζωκότα προβάτου

Ακέραια τμήματα τοιχωματικού υπεζωκότα απομονώθηκαν από το θωρακικό τοίχωμα ενήλικων προβάτων (θηλυκών και αρσενικών). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στο σφαγείο αμέσως μετά τη θανάτωση των ζώων (**Εικόνα 23**). Τα τμήματα του τοιχωματικού υπεζωκότα εξετάστηκαν οπτικά για την ύπαρξη οπών και τοποθετήθηκαν αμέσως σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline - PBS) στους 4 °C. Το PBS περιείχε (σε mM) 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O και 0,5 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

Οι ιστοί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών και αμέσως μετά την άφιξη στο εργαστήριο, τοποθετήθηκαν σε οξυγονωμένο διττανθρακικό διάλυμα KRB με pH 7,4 και 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης να υποστεί όσο το δυνατόν λιγότερους χειρισμούς. Τα τμήματα του υπεζωκότα αφέθηκαν σε διάλυμα KRB για 30 λεπτά, προκειμένου να ισορροπήσουν και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διάφορες επεξεργασίες.



**Εικόνα 23.** Απομόνωση τοιχωματικού υπεζωκότα από το θωρακικό τοίχωμα αμέσως μετά την θανάτωση των προβάτων στο σφαγείο.

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

#### **1.3.1 Επώαση του υπεζωκότα προβάτου με AgNPs**

Τα τμήματα του τοιχωματικού υπεζωκότα επώαστηκαν με διαλύματα AgNPs (διαμέτρου 20 nm και 60 nm) σε KRB για 30 λεπτά, σε τελικές συγκεντρώσεις 0,2 μg/ml ή 2 μg/ml. Οι ιστοί που θα αποτελούσαν τα αντίστοιχα πειράματα αναφοράς επώαστηκαν με διαλύματα κιτρικού νατρίου σε KRB συγκεντρώσεων 0,02 mM ή 0,2 mM. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν πριν από κάθε πείραμα, θερμαίνονταν

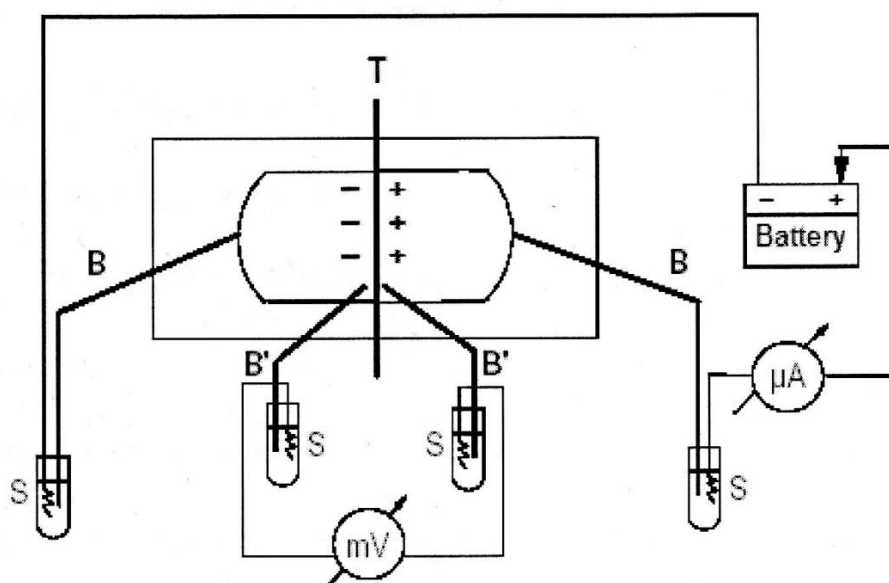
στους 37 °C, και διοχετεύονταν συνεχώς με αέριο περιεκτικότητας 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Μετά την επώαση των ιστών με τα διάφορα διαλύματα, έγινε πλύση αυτών με διάλυμα KRB και τοποθέτησή τους στους θαλάμους Ussing (K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) προκειμένου να γίνουν μετρήσεις διαμεσοθηλιακής αντίστασης ( $R_{TM}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) σε συνθήκες ανοιχτού κυκλώματος.

### 1.3.2 Μέθοδος Ussing System

Η μέθοδος Ussing System χρησιμοποιείται για τη μελέτη της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Αρχικά σχεδιάστηκε από τον Δανό Hans Ussing για τη μελέτη της μεταφοράς ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχων [113]. Σήμερα η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τόσο για τη μελέτη της διαπερατότητας των ιστών όσο και των κυτταρικών μονοστιβάδων. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου απεικονίζεται στην **Εικόνα 24**. Ο ιστός (T) είναι τοποθετημένος σε μία αντλία και διαβρέχεται και από τις πλευρές από διάλυμα KRB. Υπάρχει ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (B', B') που το καθένα απέχει 3 mm από την επιφάνεια του ιστού και καταγράφει τη διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού σε ένα βολτόμετρο (mV). Ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (B, B) που το καθένα βρίσκεται σε απόσταση 3 cm από την επιφάνεια του ιστού, με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) και ενός διαιρετή τάσης ( $\mu\text{A}$ ).

Με τη διάταξη Ussing μπορούν να υπολογιστούν η αντίσταση, το ρεύμα και η τάση ενός ιστού. Η αντίσταση δίνεται από τον τύπο:  $R = \rho \cdot l / A$ , όπου R: 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. Όταν διατηρούνται σταθερά τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του υλικού l και A, η ωμική

αντίσταση εξαρτάται από τη μοριακή του δομή και αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής [114].



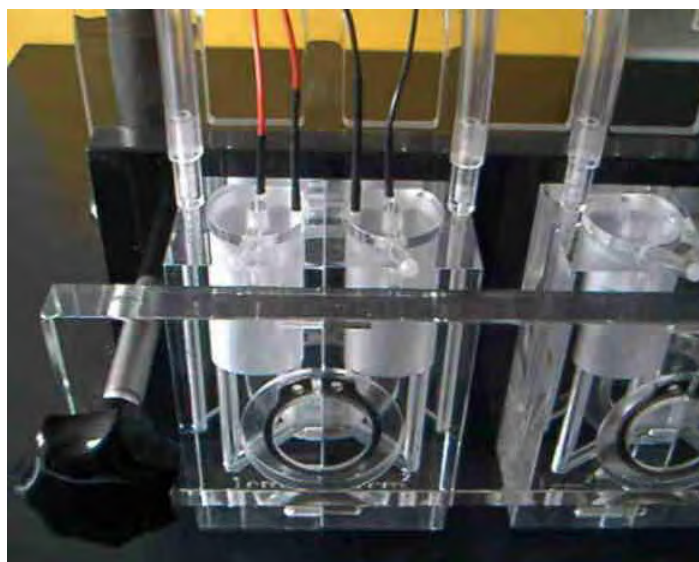
**Εικόνα 24.** Διάγραμμα της διάταξης Ussing. B: Γέφυρες άγαρ με τα ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (S) για τη χορήγηση ρεύματος. B': Γέφυρες άγαρ με τα ηλεκτρόδια αργύρου/χλωριούχου αργύρου (S) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. mV: βολτόμετρο,  $\mu\text{A}$ : αμπερόμετρο. Battery: μπαταρία, T: ιστός. Προσαρμοσμένο από [115].

Σύμφωνα με το νόμο του Ohm, η αντίσταση υπολογίζεται ως εξής:  $R = \Delta V / \Delta I$ .

Ο πιο απλός τρόπος για τη μέτρηση της αντίστασης στον ιστό, είναι η εφαρμογή συγκεκριμένης τάσης κατά μήκος της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος σε αυτήν. Το αμπερόμετρο καταγράφει το ρεύμα και η μέθοδος αυτή ονομάζεται Σύνδεση Τάσης/δυναμικού (Voltage Clamp). Ένας άλλος τρόπος μέτρησης της αντίστασης είναι μέσω της εφαρμογής ρεύματος συγκεκριμένης έντασης και ισχύος ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα από την πηγή ρεύματος. Με αυτόν τον τρόπο το βολτόμετρο καταγράφει την τάση στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή και σύμφωνα με το νόμο του Ohm υπολογίζεται η αντίσταση (μέτρηση σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος).

### 1.3.3 Μέτρηση ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος

Το κάθε τμήμα τοιχωματικού υπεζωκότα τοποθετήθηκε ως επίπεδο στρώμα μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (**Εικόνα 25**). Ο κάθε ημιθάλαμος περιείχε 4 ml KRB, εξασφαλίζοντας έτσι την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, ενώ συνεχώς διοχετευόταν με αέριο σύστασης 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Η επιφάνεια του ιστού που ήταν εκτεθειμένη στο υγρό ήταν 1 cm<sup>2</sup>. Η επιφάνεια του υπεζωκότα που πρόσκειται στη βασική μεμβράνη του ιστού ονομάζεται βασεοπλευρική επιφάνεια ενώ αυτή που αντικρίζει την υπεζωκοτική κοιλότητα ονομάζεται κορυφαία επιφάνεια.



**Εικόνα 25.** Θάλαμος τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Οι μετρήσεις της  $R_{TM}$  πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C, καθώς η ενεργητική μεταφορά ιόντων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η  $R_{TM}$  (εκφραζόμενη σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl σε συνθήκες ανοικτού κυκλώματος. Η μέτρηση της  $R_{TM}$  γινόταν κάθε ένα λεπτό μετά από τη χορήγηση συνεχούς ρεύματος έντασης 50  $\mu\text{A}$  και διάρκειας 200 msec και η καταγραφή γινόταν

μέσω λογισμικού σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Clamp Version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany).

Πριν την τοποθέτηση του ιστού στο θάλαμο τύπου Ussing, είχε υπολογισθεί από το σύστημα η αντίσταση του υγρού και η τάση στα ηλεκτρόδια. Αυτές οι τιμές αφαιρούνταν αυτόματα κατά τη μέτρηση της  $R_{TM}$  του ιστού. Μετά την τοποθέτηση του ιστού στο θάλαμο, ακολουθούσε μία περίοδος ηρεμίας από 10 έως 20 λεπτά προκειμένου να ισορροπήσει ο ιστός στη διάταξη Ussing και να γίνει σταθεροποίηση των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων. Μετά το τέλος των πειραμάτων έγινε υπολογισμός και του ισοδύναμου ρεύματος ( $I_{EQ}$ ) όπου σύμφωνα με το νόμο του Ohm ισούται με  $I_{EQ} = V_{TM} / R_{TM}$  όπου  $V_{TM}$ : η διαμεσοθηλιακή διαφορά δυναμικού που μετράται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl σε mV.

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

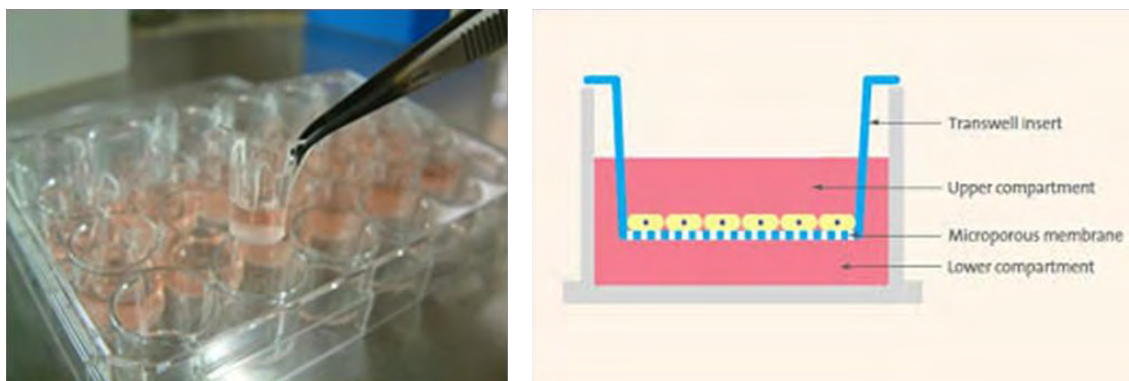
Πρωτογενείς καλλιέργειες από μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου δημιουργήθηκαν από δείγματα σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. Έγινε συλλογή τμημάτων ακέραιου σπλαχνικού υπεζωκότα στο σφαγείο αμέσως μετά το θάνατο του ζώου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες και κομμάτια περίπου 2 cm<sup>2</sup> πλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα RPMI, που περιείχε επιπρόσθετα 10% βόειο εμβρυικό ορό, 5% πενικιλίνη - στρεπτομυκίνη και 1% γλουταμίνη. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο στο εργαστήριο, πλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία πετρί.

Τα τρυβλία ήταν προ-επικαλυμμένα με διάλυμα φιμπρονεκτίνης και είχαν χαραχθεί με νυστέρι σε 5 περιοχές, όπου και τοποθετήθηκαν 5 δείγματα υπεζωκότα αντίστοιχα. Στα τρυβλία πετρί προστέθηκαν 3 ml θρεπτικού διαλύματος RPMI και

στη συνέχεια αυτά τοποθετήθηκαν σε έναν επωαστήρα με 5% CO<sub>2</sub> στους 37 °C. Αλλαγή στο θρεπτικό υλικό έγινε την επόμενη μέρα και στη συνέχεια κάθε 3 ημέρες. Τα ιστοτεμάχια υπεζωκότα απορρίφθηκαν μετά από 6 ημέρες και τα προσκολλημένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα RPMI όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα και συγκεκριμένα η καλοήθης κυτταρική σειρά MeT-5A που καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα RPMI με 10% βόειο εμβρυικό ορό, 1% πενικιλίνη - στρεπτομυκίνη και 1% γλουταμίνη.

### **1.5 Πειράματα επίδρασης των AgNPs στη διακυτταρική διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα**

Τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα και η κυτταρική σειρά MeT-5A τοποθετήθηκαν σε πολυανθρακικά φίλτρα Transwell (Corning, Sigma) την ημέρα 0. Τα φίλτρα αυτά έχουν πορώδη μεμβράνη (**Εικόνα 26**) πάνω στην οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης είναι 0,4 μm, η διάμετρος των φίλτρων είναι 6,5 mm και η επιφάνεια ανάπτυξης 0,33 cm<sup>2</sup>. Το θρεπτικό υλικό που προαναφέρθηκε προστέθηκε στο κορυφαίο διαμέρισμα (επάνω μέρος του φίλτρου - 100 μL) και στο βασεοπλευρικό διαμέρισμα (κάτω μέρος του φίλτρου - 600 μL) του Transwell. Στα 100 μL θρεπτικού υλικού του κορυφαίου διαμερίσματος τοποθετήθηκαν 5x10<sup>4</sup> κύτταρα. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στους 37 °C σε έναν επωαστήρα με 5% CO<sub>2</sub>.



**Εικόνα 26.** Φίλτρα Transwell στα οποία καλλιεργήθηκαν τα μεσοθηλιακά κύτταρα.

Η αντίσταση της μονοστιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων μετριούνταν καθημερινά μετά την τοποθέτησή τους στα φίλτρα Transwell χρησιμοποιώντας τη διάταξη EVOMX (World Precision Instruments, WPI) η οποία φαίνεται στην **Εικόνα 27**. Με τη διάταξη αυτή γίνεται συνεχής μέτρηση της αντίστασης με ένα ζεύγος διπλών ηλεκτροδίων, το STX2 (World Precision Instruments, WPI). Το ζεύγος αποτελείται από ένα εσωτερικό ηλεκτρόδιο Ag/AgCl που μετράει την διαφορά δυναμικού (Potential difference: Pd) και ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο Ag που περνάει ρεύμα. Η τιμή της αντίστασης που μετρήθηκε για το φίλτρο χωρίς κύτταρα αφαιρούνταν από την τιμή που μετρούνταν για το φίλτρο με κύτταρα. Η αντίσταση άρχισε να σταθεροποιείται την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την τοποθέτηση των κυττάρων στα φίλτρα καθώς σχηματίστηκαν συνεχείς μονοστιβάδες κυττάρων οι οποίες ελέγχονταν σε ανάστροφο μικροσκόπιο.





**Εικόνα 27.** Η διάταξη EVOMX με την οποία μετρούνταν η αντίσταση των μεσοθηλιακών κυττάρων απευθείας από την καλλιέργεια.

Στη συνέχεια, ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε διάφορες πειραματικές συνθήκες με σκοπό να μελετηθούν οι επιδράσεις των AgNPs στη διακυτταρική διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων. Οι μονοστιβάδες των κυττάρων εκτέθηκαν σε 0,2 mM διάλυμα κιτρικού νατρίου σε θρεπτικό RPMI ή σε 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  διάλυμα AgNPs 20nm σε RPMI ή σε 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  διάλυμα AgNPs 60nm (σε RPMI). Σε μία σειρά πειραμάτων εκτέθηκε σε νανοσωματίδια η κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων ενώ σε άλλη σειρά πειραμάτων εκτέθηκε σε νανοσωματίδια η βασική επιφάνειά τους. Τα AgNPs προστέθηκαν τη χρονική στιγμή 0 και με τη χρήση της διάταξης EVOMX έγινε μέτρηση της  $R_{\text{TM}}$  στα χρονικά διαστήματα 0, 1, 6 και 24 ώρες μετά την προσθήκη. Όλες οι τιμές της  $R_{\text{TM}}$  διορθώθηκαν σύμφωνα με την επιφάνεια του φίλτρου και εκφράστηκαν σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

## 1.6 Πειράματα κυτταροτοξικότητας

Έγινε μελέτη των επιπέδων κυτταροτοξικότητας σε δείγματα θεραπευτικού υλικού που συλλέχθηκαν από τα παραπάνω πειράματα στα φίλτρα Transwell. Μετά την συλλογή θεραπευτικού υλικού της κορυφαίας και της βασηοπλευρικής επιφάνειας των κυττάρων, έγινε εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου μετά από έκθεση της μονοστιβάδας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων και των MeT-5A κυττάρων σε AgNPs για χρονικά διαστήματα 0, 1, 6 και 24 ωρών. Ο κυτταρικός θάνατος μελετήθηκε μετρώντας την κυτταροπλασματική γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) που απελευθερώνεται στο θεραπευτικό υλικό, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (In Vitro Toxicology Assay Kit, LDH based, Sigma). Οι μονοστιβάδες των κυττάρων εκτέθηκαν σε 0,1% TritonX-100 (Sigma) για 15 λεπτά και αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες των πειραμάτων ενώ εκείνες που δεν εκτέθηκαν σε AgNPs αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες. Η απορρόφηση της LDH στα κορυφαία ή στα βασηοπλευρικά υγρά μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 490 nm. Η κυτταροτοξικότητα εκφράστηκε σαν % αύξηση σε σχέση με τις τιμές του πρώτου χρονικού διαστήματος (0 ώρα έκθεσης).

## 1.7 Πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης

Η εκτίμηση της κυτταρικής προσκόλλησης έγινε κατά τη διάρκεια της επώασης με AgNPs. Πριν το πείραμα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 24 ώρες, χρησιμοποιώντας θεραπευτικό RPMI με 0,5% ορό, προκειμένου να γίνει συγχρονισμός των κυττάρων. Τα συγχρονισμένα κύτταρα συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε RPMI με AgNPs των 20 nm ή των 60 nm σε συγκεντρώσεις 0,2 μg/ml και 2 μg/ml. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πυκνότητα  $2,5 \times 10^4$

κύτταρα/βοθρίο σε πλάκες με 48 βοθρία η καθεμία, που είχαν προ-επικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη. Τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα αφέθηκαν να προσκολληθούν στο υπόστρωμα της φιμπρονεκτίνης για 3 ώρες στους 37 °C στον επωαστήρα ενώ τα MeT-5A αφέθηκαν για 90 λεπτά.

Στη συνέχεια, έγινε πλύση των βοθρίων με PBS (37 °C) για να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν, μονιμοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων με 4% παραφορμαλδεΰδη και χρώση με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Η χρωστική αναρροφήθηκε και ακολούθησε πλύση των πλακών σε τρεχούμενο νερό βρύσης. Οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν όλη τη νύχτα και έγινε λήψη φωτογραφιών σε μεγέθυνση 100x προκειμένου να αξιολογηθούν πιθανές διαφορές στη μορφολογία των προσκολλημένων κυττάρων. Ακολούθησε επώαση με 10% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος για 20 λεπτά για την ανάκτηση της χρωστικής και στη συνέχεια μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 570 nm. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και είχε 6 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη. Στην κυτταρική σειρά MeT-5A έγιναν επίσης πειράματα προσκόλλησης με τη χρήση AgNPs και την προσθήκη αναστολέων της ενδοκυττάρωσης. Χρησιμοποιήθηκε η χλωροπρομαζίνη σε συγκέντρωση 28 μM, η οποία αναστέλει την ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης και η νυστατίνη σε συγκέντρωση 40 μg/ml, η οποία αναστέλει την ενδοκυττάρωση μέσω μικροσπηλαίων.

## **1.8 Πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού**

Η εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα για χρονικό διάστημα 3 ημερών. Έγινε στέρηση ορού στα κύτταρα για 24 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν

σε RPMI με AgNPs των 20 nm ή των 60 nm σε συγκεντρώσεις 0,2 µg/ml και 2 µg/ml. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες με 96 βοθρία η καθεμία, που είχαν προ-επικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη, σε πυκνότητα  $1 \times 10^4$  κύτταρα/βοθρίο. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξετάστηκε στις 3, 24, 48 και 72 ώρες μετά την τοποθέτηση στις πλάκες.

Σε κάθε χρονική στιγμή το θρεπτικό αφαιρούνταν, γινόταν πλύση των κυττάρων με PBS, μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΐδη και χρώση με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 15 λεπτά. Ακολούθησε αναρρόφηση της χρωστικής και πλύση των πλακών σε τρεχούμενο νερό βρύσης. Στη συνέχεια, οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν όλη τη νύχτα. Η ανάκτηση της χρωστικής έγινε με προσθήκη 10% οξικού οξέως και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε στα 570 nm. Ο αριθμός των πολλαπλασιασμένων κυττάρων αντανakλάται ποσοτικά από τις τιμές οπτικής πυκνότητας που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και είχε 8 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη.

## 1.9 Πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης

Η κυτταρική μετανάστευση μπορεί να μελετηθεί *in vitro* με τη δοκιμή επούλωσης της πληγής. Σε αυτήν τη δοκιμή δημιουργείται μια τεχνητή πληγή (ασυνέχεια) στην επιφάνεια της μονοστιβάδας των κυττάρων και στη συνέχεια επωάζονται τα κύτταρα με τον υπό μελέτη παράγοντα για ένα χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα μεταναστεύουν με σκοπό να κλείσουν την πληγή που έχει δημιουργηθεί και υπολογίζεται ο δείκτης μετανάστευσης των κυττάρων.

Για τα πειράματα μετανάστευσης τα MeT-5A κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πυκνότητα  $15 \times 10^4$  κύτταρα/βοθρίο σε πλάκες με 48 βοθρία η καθεμία, που είχαν προ-

επικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη. Πριν ξεκινήσει το πείραμα, στην εξωτερική επιφάνεια του κάτω μέρους των πλακών, είχαν σχεδιαστεί οριζόντιες ευθείες γραμμές που περνούν από το κέντρο κάθε βοθρίου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% FBS για 24 ώρες. Την δεύτερη ημέρα η πληρότητα των κυττάρων ανήλθε στο 100% και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού (RPMI με 0,5% FBS) για 24 ώρες. Την τρίτη ημέρα δημιουργήθηκε μία ασυνέχεια στη μονοστιβάδα των κυττάρων με τη χρήση του ρύγχους των 20  $\mu\text{L}$  μιας πιπέτας, έτσι ώστε στην επιφάνεια επαφής με το ρύγχος να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS (στους 37 °C) ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί και προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού με AgNPs των 20 nm ή των 60 nm σε συγκεντρώσεις 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Στη συνέχεια, έγινε λήψη φωτογραφιών σε μεγέθυνση 100x. Η λήψη των εικόνων έγινε ακριβώς πάνω από τη γραμμή που είχε σχεδιαστεί αρχικά, στο σημείο της ασυνέχειας. Ακολούθησε τοποθέτηση των κυττάρων στον επωαστικό θάλαμο για 8 ώρες, μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% παραφορμαλδεύδη και ξανά λήψη φωτογραφιών από τα μεταναστεύοντα κύτταρα στο ίδιο ακριβώς σημείο. Ο δείκτης μετανάστευσης (M.I.) των κυττάρων υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$M.I. = (A_0 - A_8) / A_0$ , όπου  $A_0$ : η περιοχή της πληγής τη στιγμή αμέσως μετά τη δημιουργία της και  $A_8$ : η περιοχή της πληγής 8 ώρες μετά. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και είχε 8 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη. Έγιναν επίσης πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης με τη χρήση AgNPs και την προσθήκη αναστολέων της ενδοκυττάρωσης. Χρησιμοποιήθηκε η χλωροπρομαζίνη σε συγκέντρωση 28  $\mu\text{M}$ , η οποία αναστέλει την ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης και η νυστατίνη σε

συγκέντρωση 40  $\mu\text{g/ml}$ , η οποία αναστέλει την ενδοκυττάρωση μέσω μικροσπηλαίων.

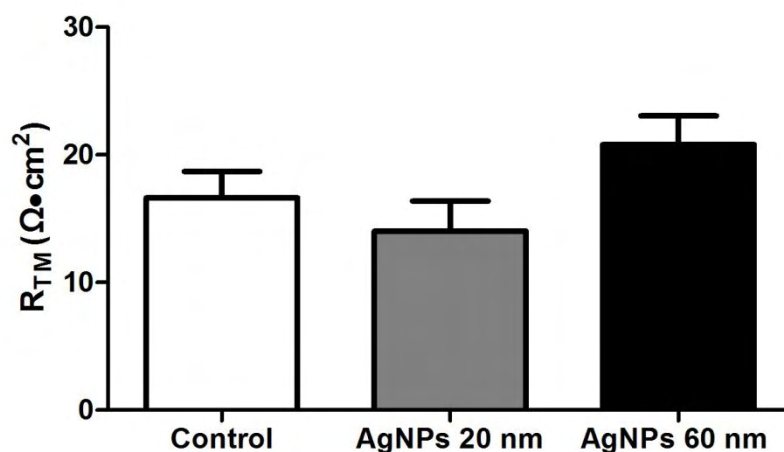
### 1.10 Στατιστική Ανάλυση

Οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 5η έκδοση για Windows. Όλα τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι οι μέσοι του αριθμού των πειραμάτων που αναφέρονται σε κάθε περίπτωση. Οι συγκρίσεις μεταξύ τριών ομάδων έγιναν με One-way ANOVA και Tukey post-test πολλαπλών συγκρίσεων για τα παραμετρικά δεδομένα (πειράματα σε Ussing System, κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση) ενώ για τα μη παραμετρικά δεδομένα έγιναν με τεστ Kruskal-Wallis και Dunn's post-test πολλαπλών συγκρίσεων (πειράματα σε Ussing System). Για τη σύγκριση δύο μεταβλητών σε περισσότερες από τρεις ομάδες χρησιμοποιήθηκε Two-way ANOVA με Bonferroni post-test (πειράματα σε φίλτρα Transwell, κυτταροτοξικότητα, κυτταρικός πολλαπλασιασμός). Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε εκείνη όπου η τιμή του  $p$  ήταν μικρότερη του 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Κεφάλαιο 2 Αποτελέσματα

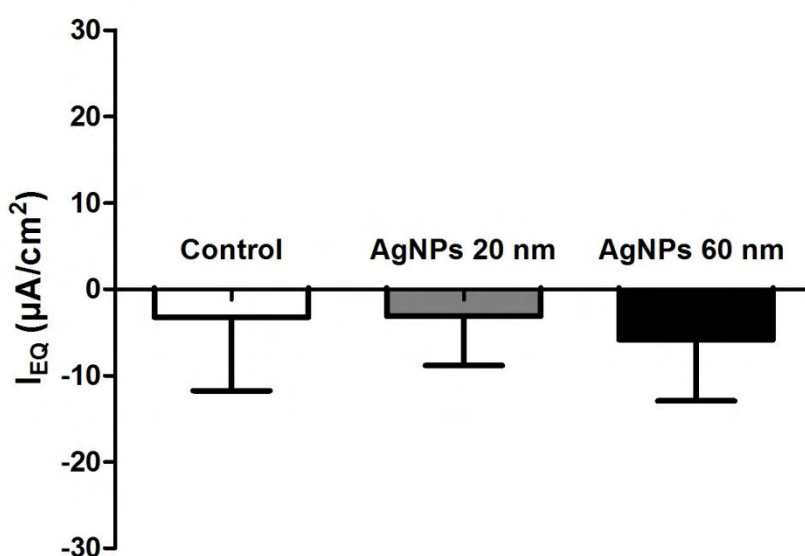
### 2.1 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ και στο $I_{EQ}$ τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου

Στα πειράματα όπου έγινε προ-επώαση του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου με διαλύματα AgNPs συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για 30 λεπτά, η  $R_{TM}$  των δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα που αποτέλεσαν τα πειράματα αναφοράς (Control) ήταν  $16.60 \pm 2.09 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Τα AgNPs και των δύο μεγεθών δεν οδήγησαν σε σημαντική μεταβολή της  $R_{TM}$  σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p > 0.05$ ). Η  $R_{TM}$  των δειγμάτων του υπεζωκότα μετά την επώαση με AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ήταν  $14 \pm 2.35 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ενώ μετά την επώαση με AgNPs των 60 nm ίδιας συγκέντρωσης ήταν  $20.80 \pm 2.25 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1**.



**Σχήμα 1.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου που έχουν προ-επωαστεί για 30 λεπτά με διάλυμα KRB-κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0.02 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=5$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=7$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=5$ ). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην  $R_{TM}$ .

Η προ-επώαση των δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου με AgNPs συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g/mL}$  δεν είχε επίσης σημαντική επίδραση στο  $I_{EQ}$  όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2**. Μετά την επώαση των δειγμάτων με AgNPs των 20 και 60 nm για 30 λεπτά, οι τιμές του  $I_{EQ}$  διαμορφώθηκαν στα  $-3.13 \pm 5.70 \mu\text{A/cm}^2$  και  $-5.83 \pm 7.11 \mu\text{A/cm}^2$  αντίστοιχα. Για τα πειράματα αναφοράς το  $I_{EQ}$  ήταν  $-3.27 \pm 8.49 \mu\text{A/cm}^2$  και επομένως δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών διαφορετικών συνθηκών.

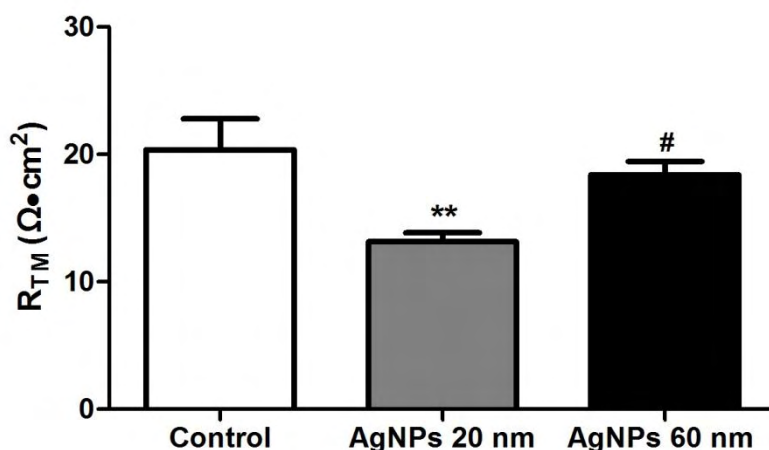


**Σχήμα 2.** Ισοδύναμο ρεύμα ( $I_{EQ}$ ;  $\mu\text{A/cm}^2$ ) δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου που έχουν προ-επωαστεί για 30 λεπτά με διάλυμα KRB-κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0.02 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=5$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=7$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=5$ ). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο  $I_{EQ}$ .

Στα πειράματα όπου έγινε προ-επώαση του υπεζωκότα με AgNPs συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g/mL}$  για 30 λεπτά, η  $R_{TM}$  των δειγμάτων του υπεζωκότα που αποτέλεσαν τα πειράματα αναφοράς ήταν  $20.36 \pm 2.44 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Η προ-επώαση του υπεζωκότα με AgNPs των 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g/mL}$  οδήγησε σε σημαντική μείωση της  $R_{TM}$  ( $13.13 \pm 0.72 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.01$ ) σε σύγκριση με τα πειράματα

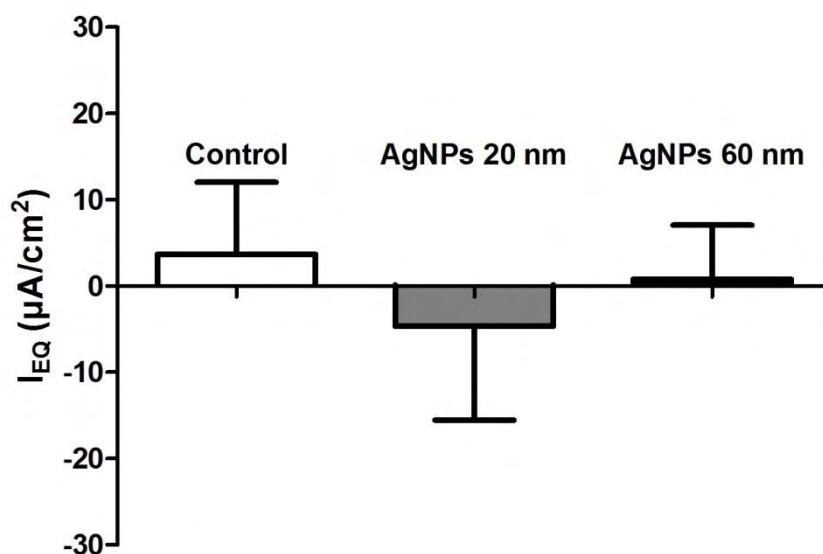


αναφοράς. Αντίθετα, η προ-επώαση του υπεζωκότα με AgNPs των 60 nm δεν επηρέασε σημαντικά την  $R_{TM}$  ( $18.40 \pm 1.04 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς. Η  $R_{TM}$  του υπεζωκότα που επώαστηκε με AgNPs των 60 nm ήταν σημαντικά υψηλότερη από την  $R_{TM}$  του υπεζωκότα που επώαστηκε με AgNPs των 20 nm ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3**.



**Σχήμα 3.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου που έχουν προ-επωαστεί για 30 λεπτά με διάλυμα KRB-κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=14$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=16$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=15$ ). \*\* $p < 0.01$  συγκριτικά με Control και # $p < 0.05$  συγκριτικά με AgNPs των 20 nm.

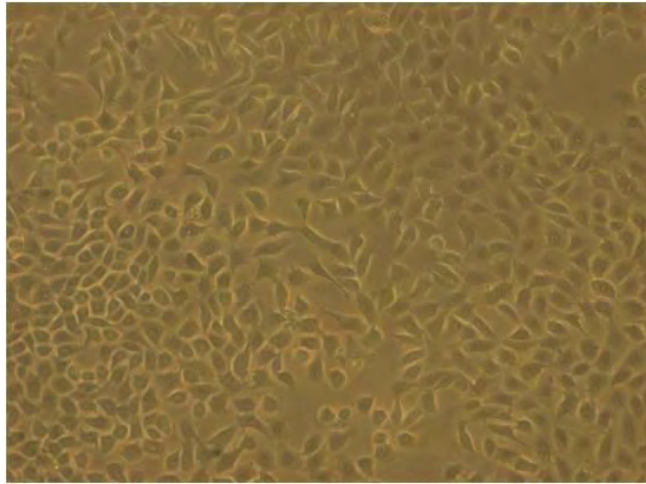
Όσον αφορά το  $I_{EQ}$ , η προ-επώαση των δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα με AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στις τιμές του σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4**.



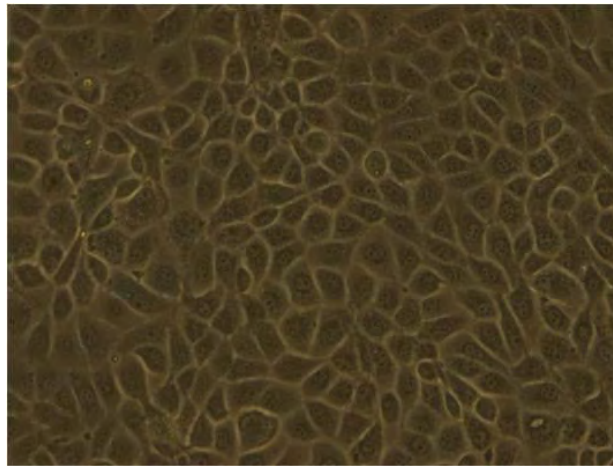
**Σχήμα 4.** Ισοδύναμο ρεύμα ( $I_{EQ}$ ;  $\mu A/cm^2$ ) δειγμάτων τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου που έχουν προ-επωαστεί για 30 λεπτά με διάλυμα KRB-κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu g/mL$  (στήλη με γκρι χρώμα; n=15) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu g/mL$  (στήλη με μαύρο χρώμα; n=14). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στο  $I_{EQ}$ .

## 2.2 Τύποι των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα που χρησιμοποιήθηκαν

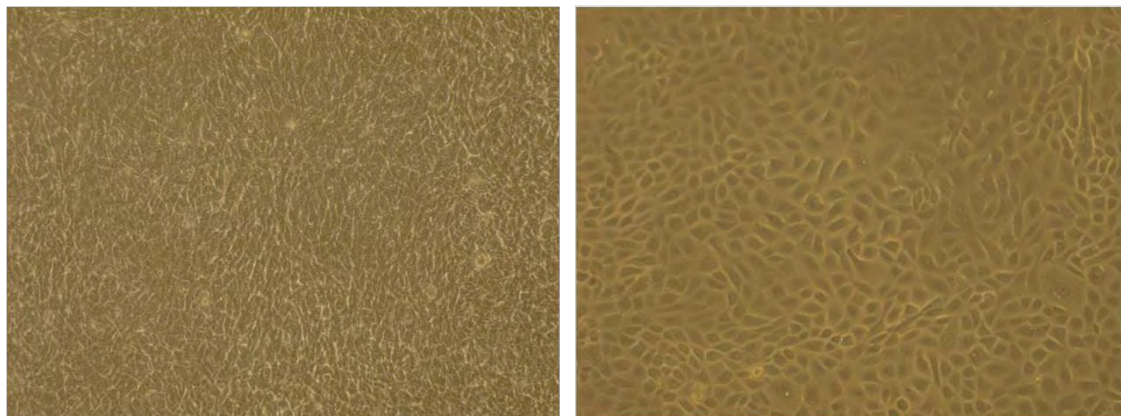
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα τα οποία σχηματίζουν μονοστιβάδες πάνω στο φίλτρο ανάπτυξης. Έγινε απομόνωση πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου από δείγματα σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. Η μορφολογία των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων φαίνεται στις **Εικόνες 28** και **29**. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα και συγκεκριμένα η κυτταρική σειρά MeT-5A που είναι αθανатоποιημένα κύτταρα από φυσιολογικό μεσοθήλιο. Στην **Εικόνα 30** φαίνονται συγκριτικά οι δύο διαφορετικοί τύποι κυττάρων που έχουν καλύψει πλήρως το φίλτρο ανάπτυξης.



**Εικόνα 28.** Πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Μεγέθυνση 10X).



**Εικόνα 29.** Πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Μεγέθυνση 20X).



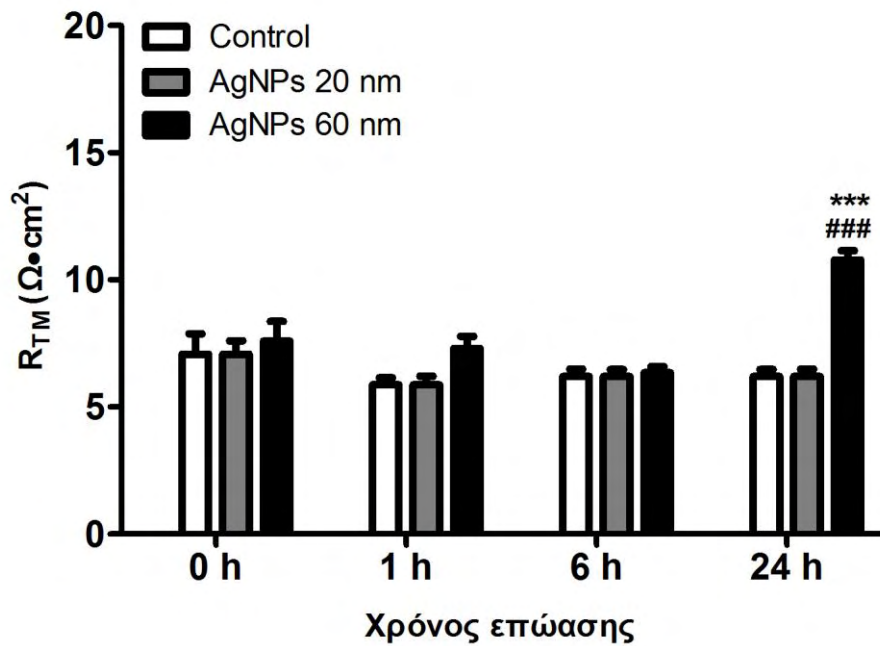
**Εικόνα 30.** Η κυτταρική σειρά MeT-5A (αριστερά) και τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου (δεξιά) σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Μεγέθυνση 10X).

## **2.3 Επιδράσεις των AgNPs στη διακυτταρική διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα**

Η αντίσταση της μονοστιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων μετριούνταν με τη διάταξη EVOMX καθημερινά, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων στα φίλτρα Transwell. Διαπιστώθηκε ότι η αντίσταση άρχισε να σταθεροποιείται την 3η ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων στα φίλτρα Transwell όπου σχηματίστηκαν συνεχείς μονοστιβάδες των κυττάρων οι οποίες ελέγχονταν και οπτικά σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

### **2.3.1 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου**

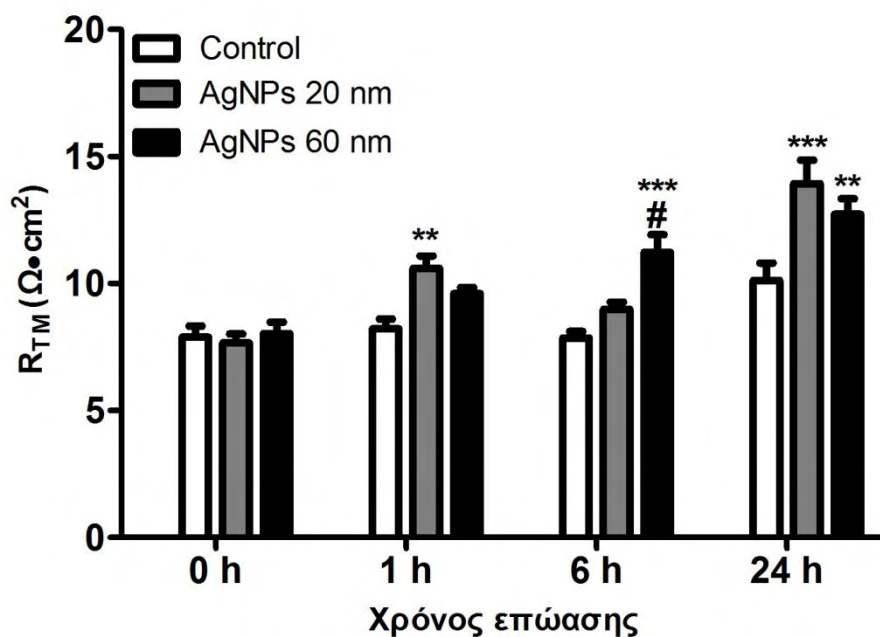
Την 3η ημέρα καλλιέργειας ακολούθησε έκθεση των μεσοθηλιακών κυττάρων με AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g/mL}$ . Η  $R_{TM}$  των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν με AgNPs από την κορυφαία επιφάνειά τους, σημείωσε σημαντικές αλλαγές μόνο στις 24 ώρες επώασης. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτό το χρονικό σημείο η έκθεση της κορυφαίας επιφάνειας των πρωτογενών κυττάρων με AgNPs μεγέθους 60 nm οδήγησε σε σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  ( $10.78 \pm 0.37 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $n=9$ ) σε σύγκριση με την  $R_{TM}$  των πειραμάτων αναφοράς και των κυττάρων που εκτέθηκαν σε AgNPs μεγέθους 20 nm ( $6.20 \pm 0.28$  και  $8.89 \pm 0.29 \Omega \cdot \text{cm}^2$  αντίστοιχα;  $n=9$  και  $p < 0.001$  και στις δύο περιπτώσεις). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο **Σχήμα 5**.



**Σχήμα 5.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν από την κορυφαία επιφάνεια με κιτρικό νάτριο συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=9$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=9$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=9$ ) για 0, 1, 6 και 24 ώρες. \*\*\* $p < 0.001$  συγκριτικά με Control και ### $p < 0.001$  συγκριτικά με AgNPs των 20 nm.

Η  $R_{TM}$  των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν με AgNPs από τη βασεοπλευρική επιφάνειά τους παρουσίασε σημαντικές αλλαγές σε όλα τα χρονικά διαστήματα επώασης (**Σχήμα 6**). Πιο συγκεκριμένα, τα AgNPs των 20 nm οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  στη 1 και 24 ώρες επώασης ( $10.60 \pm 0.48 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.01$  και  $13.93 \pm 0.92 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.001$  αντίστοιχα;  $n=9$ ) σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $8.21 \pm 0.39 \Omega \cdot \text{cm}^2$  και  $10.12 \pm 0.69 \Omega \cdot \text{cm}^2$  αντίστοιχα;  $n=9$ ) ενώ τα AgNPs των 60 nm αύξησαν σημαντικά την  $R_{TM}$  στις 6 και 24 ώρες επώασης ( $11.22 \pm 0.70 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.001$  και  $12.72 \pm 0.62 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.01$  αντίστοιχα;  $n=9$ ) σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $7.85 \pm 0.26$

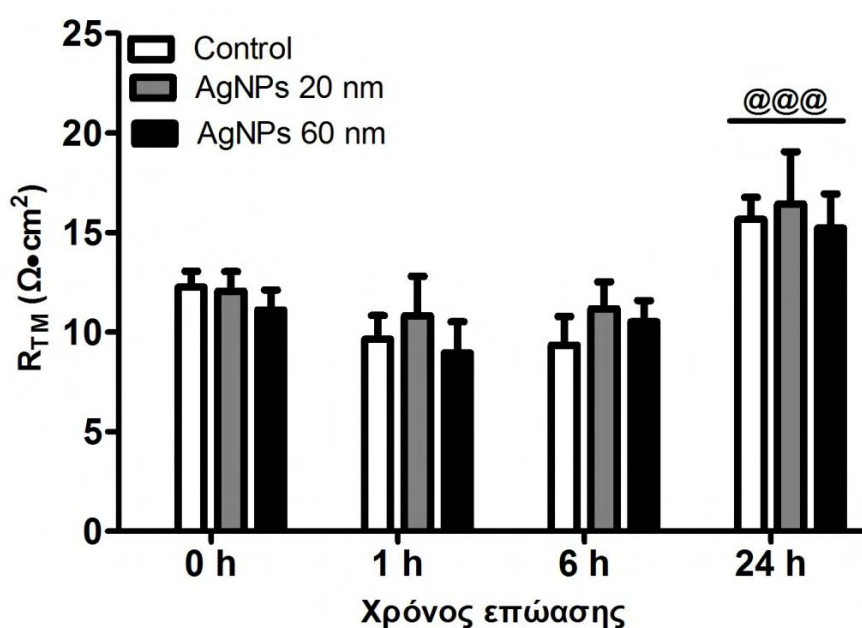
$\Omega \cdot \text{cm}^2$  και  $10.12 \pm 0.69 \Omega \cdot \text{cm}^2$  αντίστοιχα;  $n=9$ ). Επιπροσθέτως, η έκθεση της βασεοπλευρικής επιφάνειας των κυττάρων σε AgNPs 60 nm για 6 ώρες οδήγησε σε αύξηση της  $R_{\text{TM}}$  ( $11.22 \pm 0.70 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $p < 0.05$ ;  $n=9$ ) σε σύγκριση με την έκθεση σε AgNPs 20 nm για το ίδιο χρονικό διάστημα ( $8.98 \pm 0.28 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $n=9$ ).



**Σχήμα 6.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{\text{TM}}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν από τη βασεοπλευρική επιφάνεια με κιτρικό νάτριο συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=9$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=9$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=9$ ) για 0, 1, 6 και 24 ώρες. \*\* $p < 0.01$  και \*\*\* $p < 0.001$  συγκριτικά με Control. # $p < 0.05$  συγκριτικά με AgNPs των 20 nm.

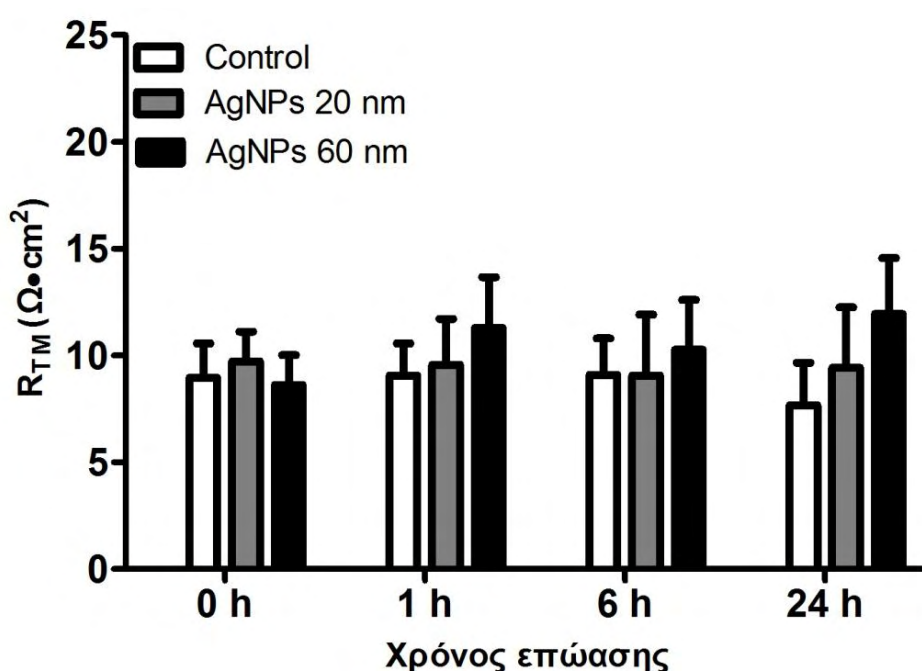
### 2.3.2 Επιδράσεις των AgNPs στην $R_{TM}$ της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A

Η ανθρώπινη μεσοθηλιακή κυτταρική σειρά MeT-5A εκτέθηκε σε AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η έκθεση της κορυφαίας επιφάνειας των MeT-5A κυττάρων σε AgNPs προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στην  $R_{TM}$  μόνο στις 24 ώρες επώασης (Σχήμα 7). Σε αυτό το χρονικό σημείο η επώαση των κυττάρων με τα δύο μεγέθη των AgNPs είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της  $R_{TM}$  συγκριτικά με τα προηγούμενα χρονικά διαστήματα επώασης ( $p < 0.001$ ). Ωστόσο, δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στην  $R_{TM}$  από τα διαφορετικά μεγέθη των AgNPs σε κάθε χρονικό σημείο.



**Σχήμα 7.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{TM}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A που επώαστηκε από την κορυφαία επιφάνεια με κιτρικό νάτριο συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=9$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=9$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=9$ ) για 0, 1, 6 και 24 ώρες. \*\*\* $p < 0.001$  σύγκριση 24 ωρών επώασης με τα χρονικά διαστήματα 0, 1 και 6 ωρών.

Στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά MeT-5A που εκτέθηκε σε AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  από την βασηοπλευρική επιφάνεια, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές στη διακυτταρική διαπερατότητα των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην  $R_{\text{TM}}$  (Σχήμα 8) καθώς ούτε ο χρόνος επώασης των κυττάρων με AgNPs αλλά ούτε και τα διαφορετικά μεγέθη AgNPs που χρησιμοποιήθηκαν, επηρέασαν την  $R_{\text{TM}}$ .



**Σχήμα 8.** Διαμεσοθηλιακή αντίσταση ( $R_{\text{TM}}$ ;  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A που επώαστηκε από τη βασηοπλευρική επιφάνεια με κιτρικό νάτριο συγκέντρωσης 0.2 mM (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=9$ ), AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=9$ ) και AgNPs διαμέτρου 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=9$ ) για 0, 1, 6 και 24 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην  $R_{\text{TM}}$ .



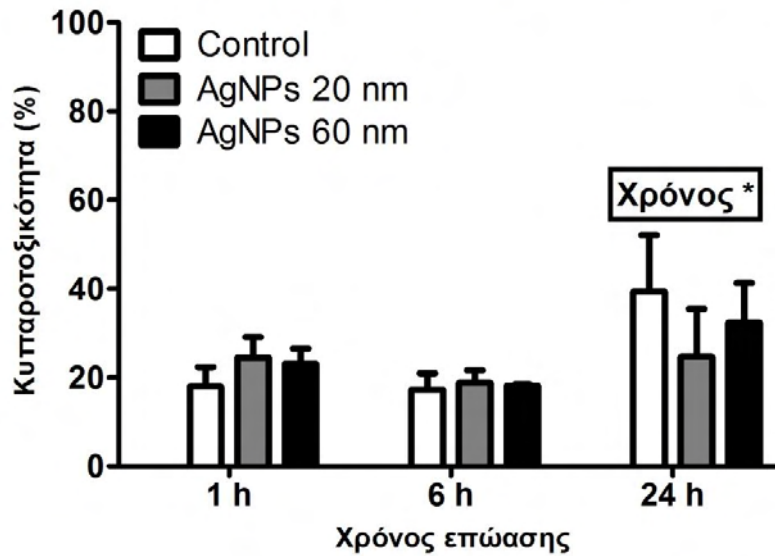
## **2.4 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα**

Στην παρούσα μελέτη έγινε εκτίμηση των επιπέδων κυτταροτοξικότητας σε δείγματα θρεπτικού υλικού που συλλέχθηκαν από τα παραπάνω πειράματα στα φίλτρα Transwell. Η κυτταροτοξικότητα μετρήθηκε στα υγρά της κορυφαίας ή της βασηοπλευρικής επιφάνειας και στους δύο τύπους μεσοθηλιακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, μετά από έκθεση της μονοστιβάδας των κυττάρων σε AgNPs 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στις αντίστοιχες επιφάνειες για χρονικά διαστήματα 1, 6 και 24 ωρών.

### **2.4.1 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου**

Στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου που εκτέθηκαν σε AgNPs από την κορυφαία επιφάνειά τους παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας μόνο στα υγρά της κορυφαίας επιφάνειας των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος επώασης φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την κυτταροτοξικότητα και στις 24 ώρες επώασης σημειώνεται αύξηση των επιπέδων κυτταροτοξικότητας σε σύγκριση με τα προηγούμενα χρονικά διαστήματα επώασης (\* $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 9**.

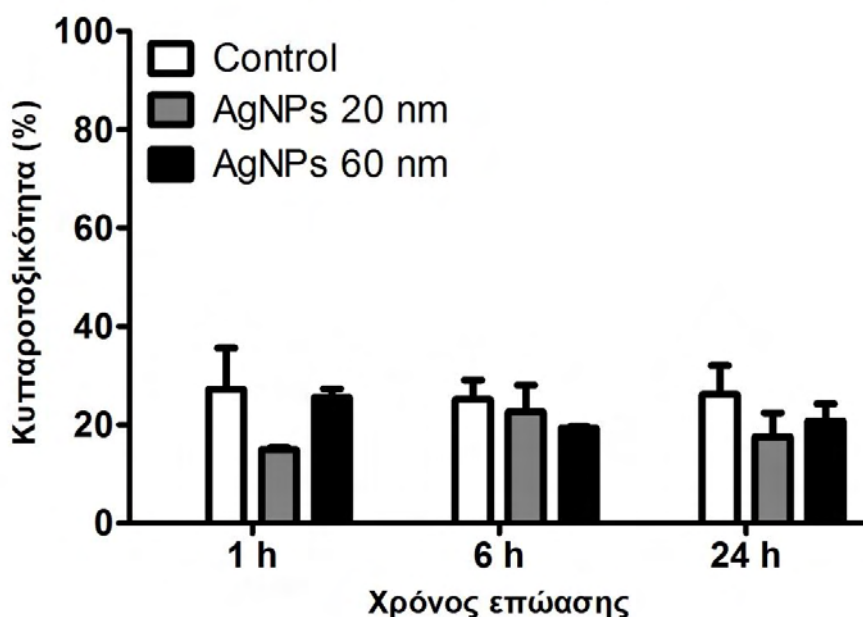
## Υγρό κορυφαίας επιφάνειας



**Σχήμα 9.** Κυτταροτοξικότητα (%) στο υγρό της κορυφαίας επιφάνειας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν από την κορυφαία επιφάνεια με 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=6), 2 μg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=6) και 2 μg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=6) για 1, 6 και 24 ώρες (\* $p < 0.05$ ).

Στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου που εκτέθηκαν σε AgNPs από τη βασεοπλευρική επιφάνειά τους, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας (**Σχήμα 10**). Τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης αλλά και τα δύο διαφορετικά μεγέθη των AgNPs που μελετήθηκαν, δεν επηρέασαν το ποσοστό κυτταροτοξικότητας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς στην πορεία του χρόνου. Και στις δύο περιπτώσεις η κυτταροτοξικότητα κυμάνθηκε στα επίπεδα του 20% περίπου.

## Υγρό βασεοπλευρικής επιφάνειας

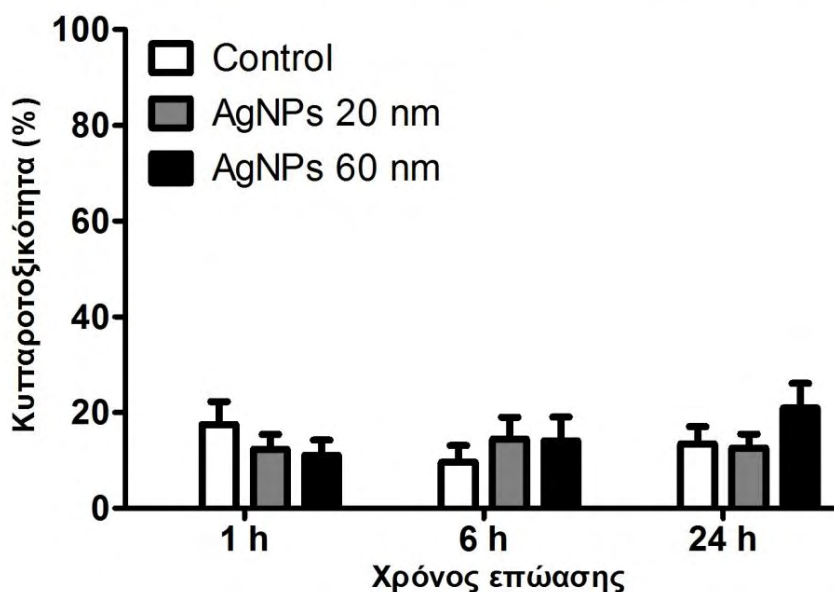


**Σχήμα 10.** Κυτταροτοξικότητα (%) στο υγρό της βασεοπλευρικής επιφάνειας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου που επώαστηκαν από τη βασεοπλευρική επιφάνεια με 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=6), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=6) και 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=6) για 1, 6 και 24 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας.

### 2.4.2 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταροτοξικότητα της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A

Η έκθεση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A σε AgNPs από την κορυφαία επιφάνεια είχε σαν αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (περίπου 20%) στο υγρό της κορυφαίας επιφάνειας (**Σχήμα 11**). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας δεν επηρεάστηκαν από την έκθεση στα δύο μεγέθη των AgNPs ούτε από τον χρόνο επώασης σε αυτά.

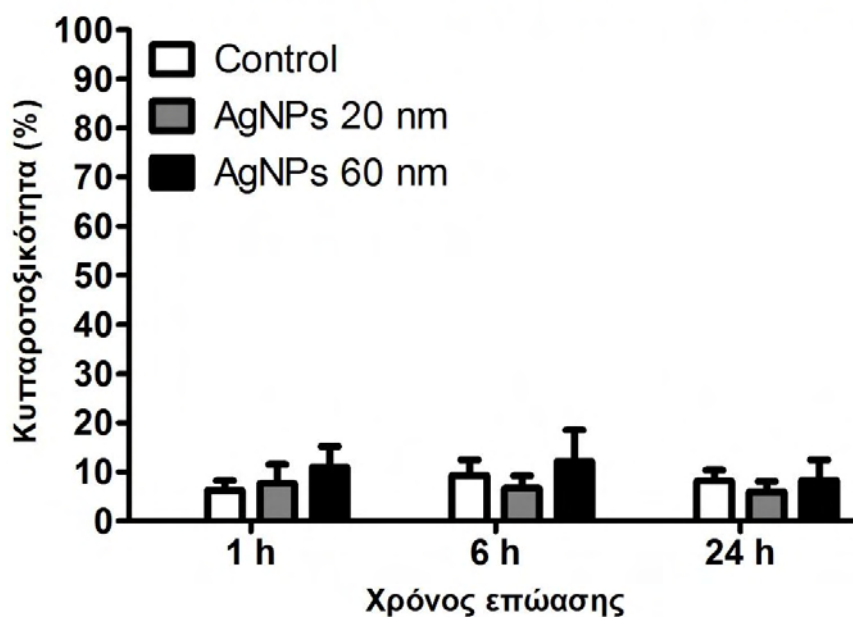
## Υγρό κορυφαίας επιφάνειας



**Σχήμα 11.** Κυτταροτοξικότητα (%) στο υγρό της κορυφαίας επιφάνειας της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A που επώαστηκε από την κορυφαία επιφάνεια με 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=8), 2 µg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=8) και 2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=8) για 1, 6 και 24 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας στην πορεία του χρόνου.

Στα πειράματα όπου η κυτταρική σειρά MeT-5A εκτέθηκε σε AgNPs από τη βασεοπλευρική επιφάνεια των κυττάρων, παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (περίπου 15%) στο υγρό της βασεοπλευρικής επιφάνειας (**Σχήμα 12**). Τα AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm δεν οδήγησαν σε αύξηση της τοξικότητας κατά την πορεία του χρόνου έκθεσης.

## Υγρό βασεοπλευρικής επιφάνειας

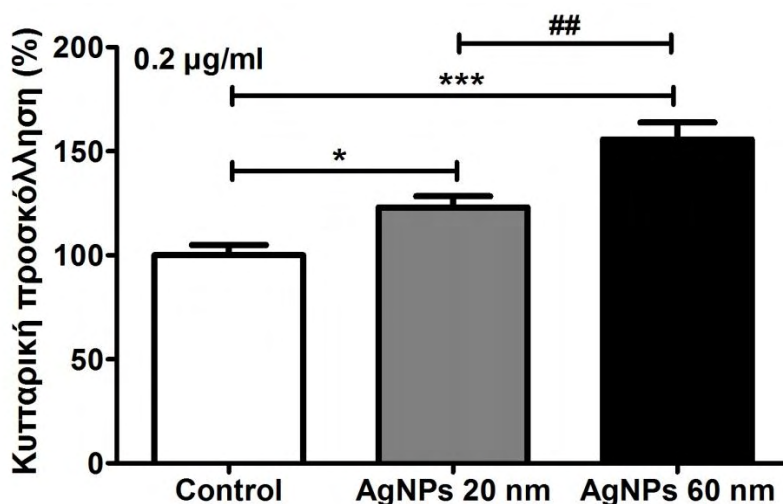


**Σχήμα 12.** Κυτταροτοξικότητα (%) στο υγρό της βασεοπλευρικής επιφάνειας της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A που επώαστηκε από τη βασεοπλευρική επιφάνεια με 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=6), 2 μg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=6) και 2 μg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=6) για 1, 6 και 24 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας.

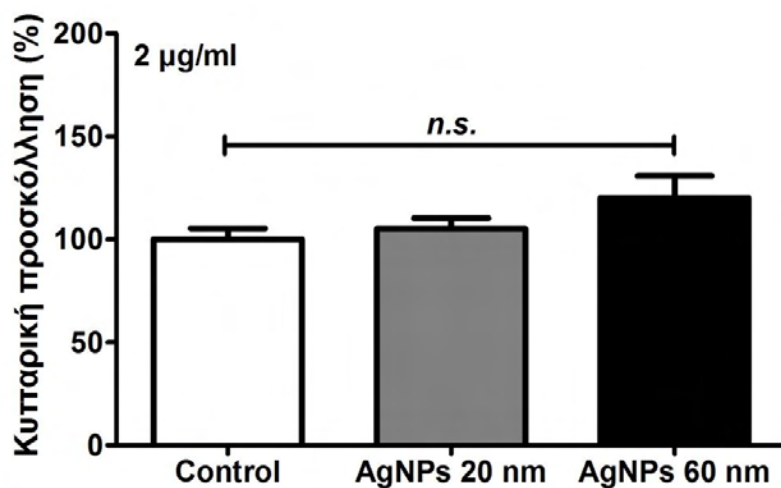
### 2.5 Επιδράσεις των AgNPs στην προσκόλληση και στη μορφολογία των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου

Η έκθεση των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου σε AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 0.2 μg/mL αύξησε την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p < 0.05$  και  $p < 0.001$  αντίστοιχα). Αυτή η επίδραση ήταν πιο έντονη στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε AgNPs των 60 nm συγκριτικά με τα AgNPs των 20 nm ( $p < 0.01$ ) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 13**. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, όταν τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα εκτέθηκαν σε AgNPs (20

και 60 nm) συγκέντρωσης 2 µg/mL δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην κυτταρική προσκόλληση (Σχήμα 14).

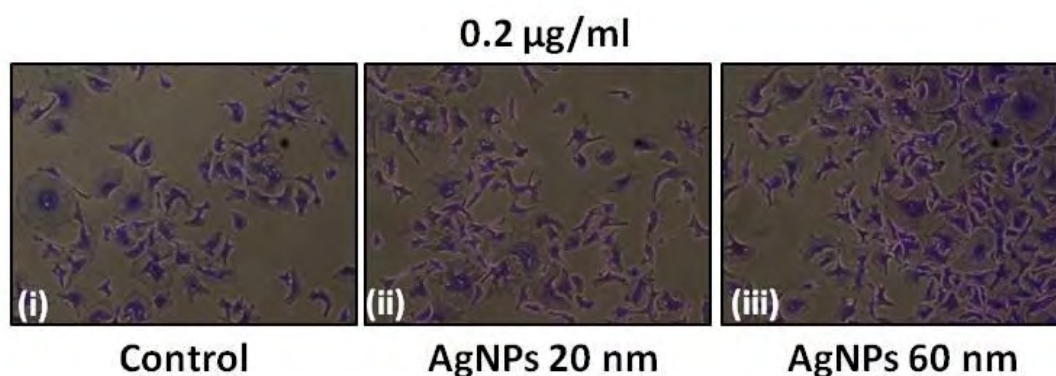


**Σχήμα 13.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου εκφρασμένη ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.02 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 0.2 µg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 0.2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 3 ώρες. \* $p < 0.05$  και \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς, ## $p < 0.01$  σε σύγκριση με AgNPs των 20 nm.

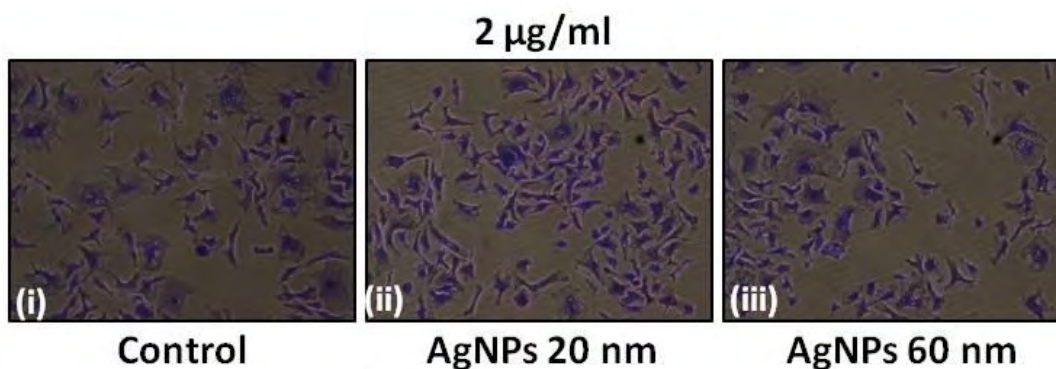


**Σχήμα 14.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου εκφρασμένη ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 2 µg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 3 ώρες. n.s. στατιστικά μη σημαντικές μεταβολές στην κυτταρική προσκόλληση.

Όσον αφορά τη μορφολογία των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ των κυττάρων των πειραμάτων αναφοράς και των κυττάρων που εκτέθηκαν σε AgNPs. Η έκθεση των κυττάρων στα δύο μεγέθη των AgNPs για 3 ώρες δεν επηρέασε τη μορφολογία των κυττάρων ούτε στη συγκέντρωση των 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Εικόνα 31) ούτε στη συγκέντρωση των 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Εικόνα 32).



**Εικόνα 31.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μορφολογίας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου μετά την προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης για 3 ώρες. (i) Control: 0.02 mM κιτρικό νάτριο, (ii) AgNPs 20 nm: 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm, (iii) AgNPs 60 nm: 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων.



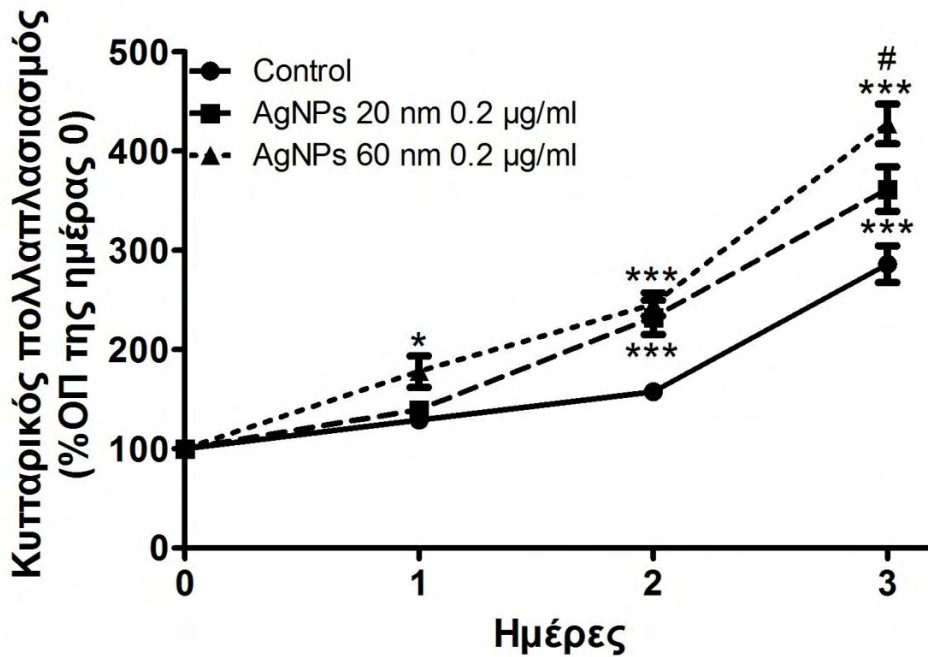
**Εικόνα 32.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μορφολογίας των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου μετά την προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης για 3 ώρες. (i) Control: 0.2 mM κιτρικό νάτριο, (ii) AgNPs 20 nm: 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm, (iii) AgNPs 60 nm: 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων.

Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες, όπου έγινε χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα προβάτου είχαν ατρακτοειδές σχήμα ενώ μερικά από αυτά είχαν διαφορετική μορφολογία με έναν κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και μία καλά σχηματισμένη κυτταρική μεμβράνη, τα οποία κάλυπταν μεγαλύτερη περιοχή. Ο φαινότυπος αυτός των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων ήταν ανάλογος σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

## **2.6 Επιδράσεις των AgNPs στον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου**

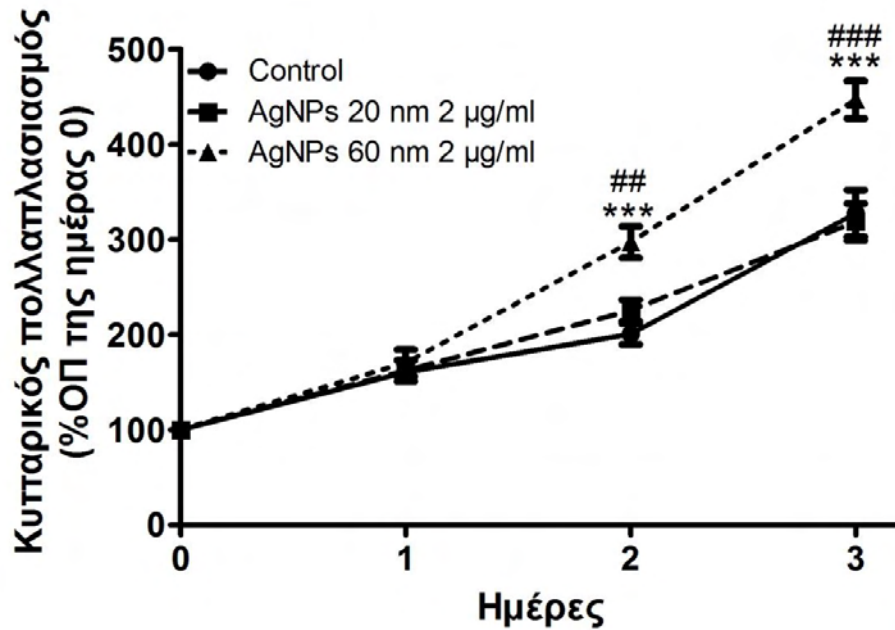
Τα AgNPs είχαν σημαντικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου. Πιο συγκεκριμένα, τα AgNPs διαμέτρου 20 nm στη συγκέντρωση των 0.2  $\mu\text{g/ml}$  αύξησαν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τις ημέρες 2 και 3, σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p < 0.001$  και τις δύο ημέρες), ενώ τα AgNPs των 60 nm αύξησαν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από την 1η ημέρα ( $p < 0.05$ ) έως τις ημέρες 2 και 3 ( $p < 0.001$  και τις δύο ημέρες) συγκριτικά με τα πειράματα αναφοράς. Επίσης, η έκθεση των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων σε AgNPs των 60 nm οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με την έκθεση των κυττάρων σε AgNPs των 20 nm ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο **Σχήμα 15**.





**Σχήμα 15.** Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου εκφρασμένος ως ποσοστό % οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) της ημέρας 0. Έγινε εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων για 3 ημέρες και χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες, όπου μετρήθηκε η ΟΠ της εκλυόμενης χρωστικής. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.02 mM κιτρικό νάτριο (Control; ευθεία γραμμή και κουκκίδες; n=15), 0.2 μg/mL AgNPs των 20 nm (διακεκομμένη γραμμή και τετράγωνα; n=15) και 0.2 μg/mL AgNPs των 60 nm (διακεκομμένη γραμμή και τρίγωνα; n=15), \* $p < 0.05$  και \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς, # $p < 0.05$  σε σύγκριση με AgNPs των 20 nm.

Όσον αφορά τα AgNPs συγκέντρωσης 2 μg/ml, μόνο τα AgNPs διαμέτρου 60 nm αύξησαν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων. Στο **Σχήμα 16** φαίνεται ότι υπήρξε σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που εκτέθηκαν σε AgNPs των 60 nm τις ημέρες 2 και 3, σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p < 0.001$  και τις δύο ημέρες) καθώς και σε σύγκριση με τα AgNPs 20 nm ( $p < 0.01$  την ημέρα 2 και  $p < 0.001$  την ημέρα 3).

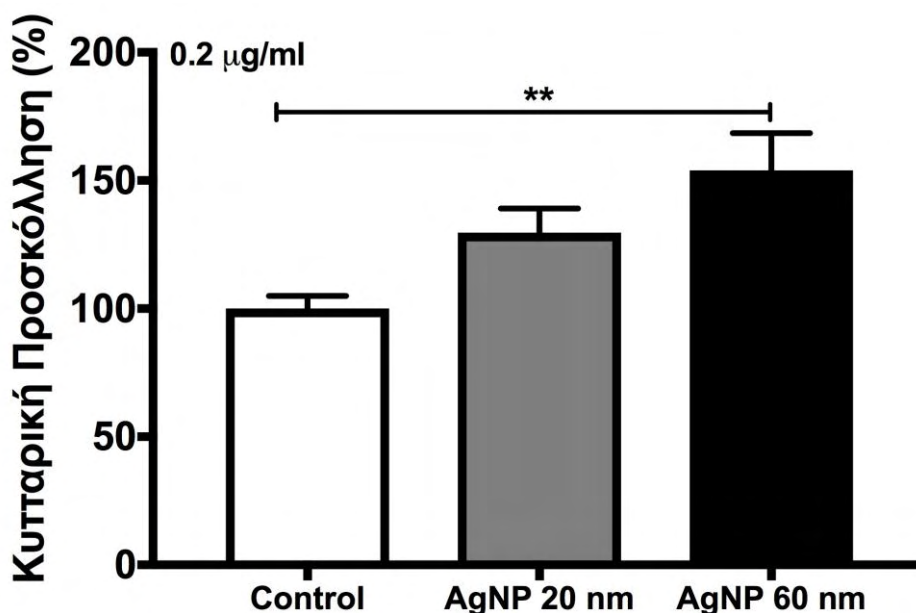


**Σχήμα 16.** Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου εκφρασμένος ως ποσοστό % οπτικής πυκνότητας (ΟΠ) της ημέρας 0. Έγινε εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων για 3 ημέρες και χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες, όπου μετρήθηκε η ΟΠ της εκλυόμενης χρωστικής. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2 mM κιτρικό νάτριο (Control; ευθεία γραμμή και κουκκίδες; n=15), 2 μg/mL AgNPs των 20 nm (διακεκομμένη γραμμή και τετράγωνα; n=15) και 2 μg/mL AgNPs των 60 nm (διακεκομμένη γραμμή και τρίγωνα; n=15), \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς, # $p < 0.01$  και ### $p < 0.001$  σε σύγκριση με AgNPs των 20 nm.

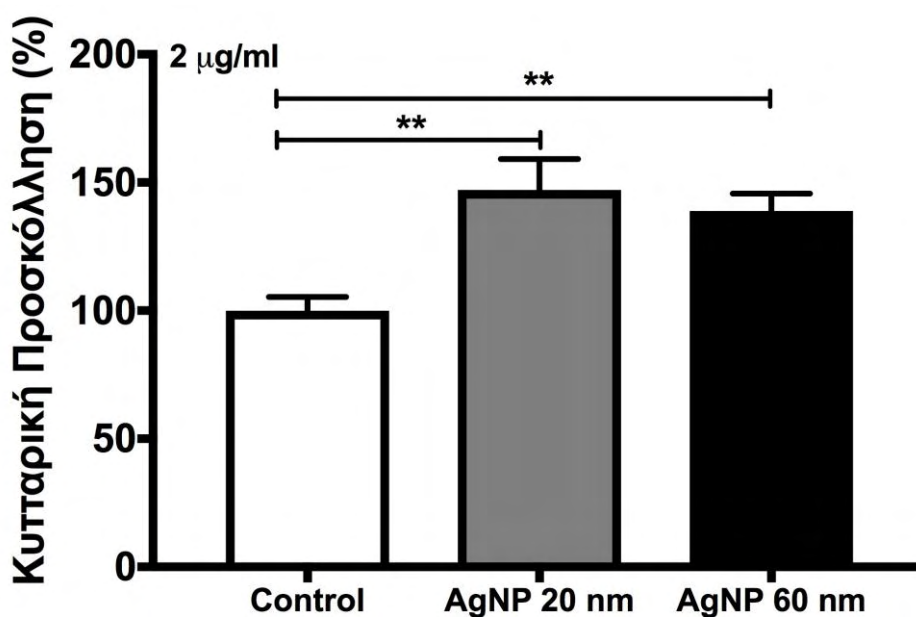
## 2.7 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A

Η έκθεση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής σειράς MeT-5A σε AgNPs διαμέτρου 20 nm συγκέντρωσης 0.2 μg/mL έτεινε να αυξήσει την κυτταρική προσκόλληση στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης, ενώ η έκθεση των κυττάρων σε AgNPs διαμέτρου 60 nm αύξησε σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης, σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p < 0.01$ ) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 17**. Επιπρόσθετα, η έκθεση των κυττάρων MeT-5A σε AgNPs

διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της προσκόλλησης, σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ( $p < 0.01$  και στις δύο περιπτώσεις) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 18**.



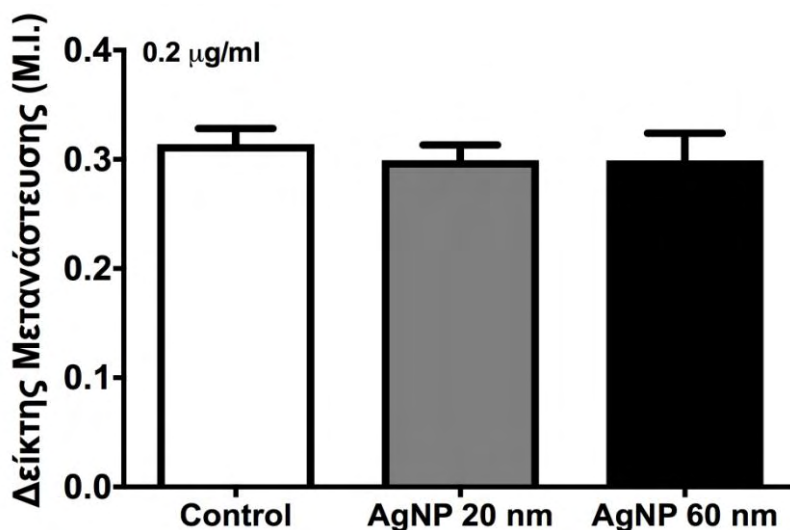
**Σχήμα 17.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.02 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα;  $n=14$ ), 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα;  $n=14$ ) και 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα;  $n=14$ ) για 90 λεπτά.  $**p < 0.01$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.



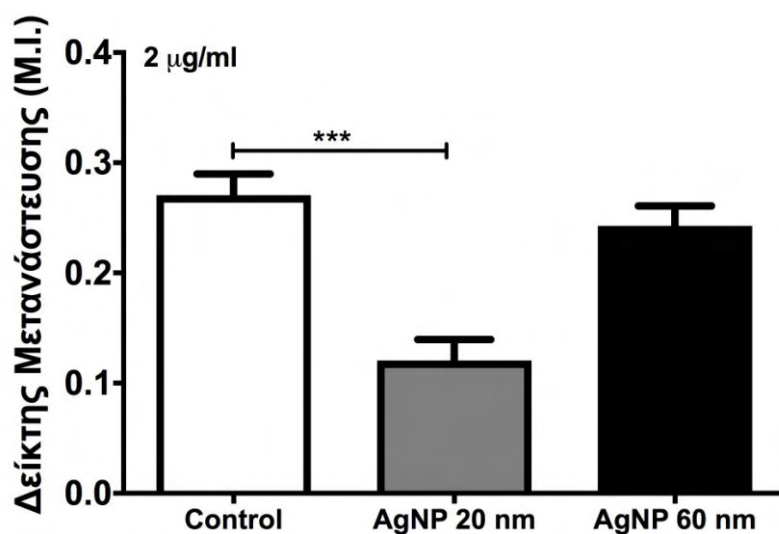
**Σχήμα 18.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=14), 2 µg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=14) και 2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=14) για 90 λεπτά.  $**p < 0.01$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.

## 2.8 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A

Πειράματα που εξέτασαν την κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής σειράς MeT-5A υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 0.2 µg/mL έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η κινητικότητα των κυττάρων (Σχήμα 19). Αντίθετα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση AgNPs είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντικά μειωμένη κυτταρική μετανάστευση των MeT-5A μόνο στην περίπτωση της έκθεσης σε νανοσωματίδια διαμέτρου 20 nm (Σχήμα 20).



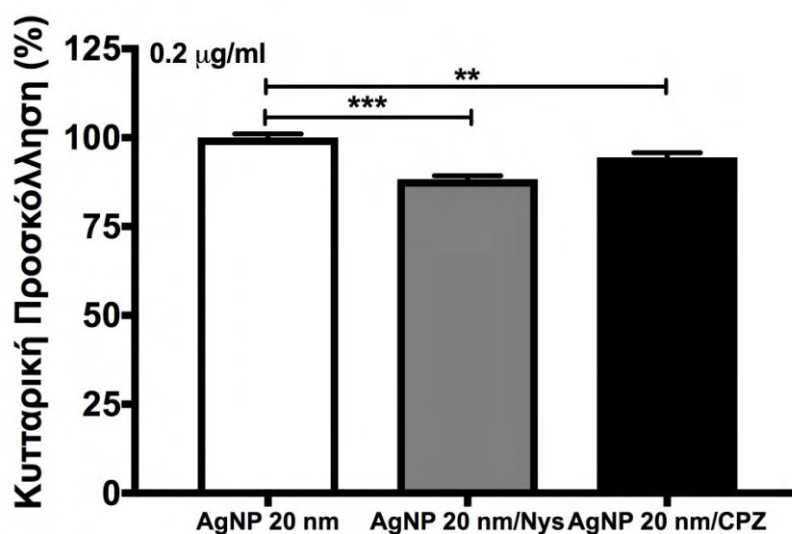
**Σχήμα 19.** Μέση τιμή του Δείκτη Μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A-. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.02 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=8), 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=8) και 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=8) για 8 ώρες. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



**Σχήμα 20.** Μέση τιμή του Δείκτη Μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A-. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2 mM κιτρικό νάτριο (στήλη με άσπρο χρώμα; n=8), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με γκρι χρώμα; n=8) και 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 60 nm (στήλη με μαύρο χρώμα; n=8) για 8 ώρες. \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.

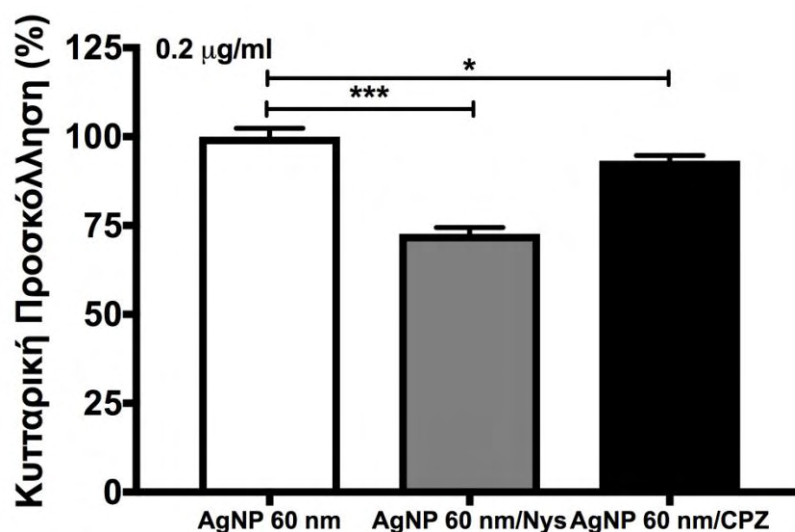
## 2.9 Επιδράσεις των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A με χρήση αναστολέων της ενδοκυττάρωσης

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν νυστατίνη και χλωροπρομαζίνη που αναστέλουν την ενδοκυττάρωση μέσω μικροσπλαιών και την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση αντίστοιχα. Στην περίπτωση της έκθεσης των MeT-5A σε AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , και οι δύο αναστολείς μείωσαν σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση (Σχήματα 21 και 22). Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και στα πειράματα έκθεσης των MeT-5A σε AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g/mL}$  (Σχήματα 23 και 24).

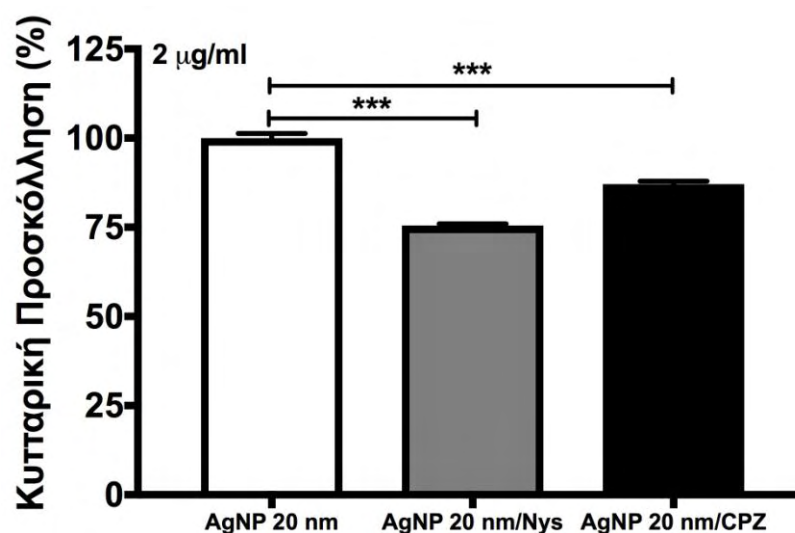


Σχήμα 21. Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 0.2  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs των 20 nm με προσθήκη νυστατίνης (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 0.2  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs των 20 nm με προσθήκη χλωροπρομαζίνης (στήλη με

μαύρο χρώμα; n=12) για 90 λεπτά.  $**p<0.01$  και  $***p<0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.

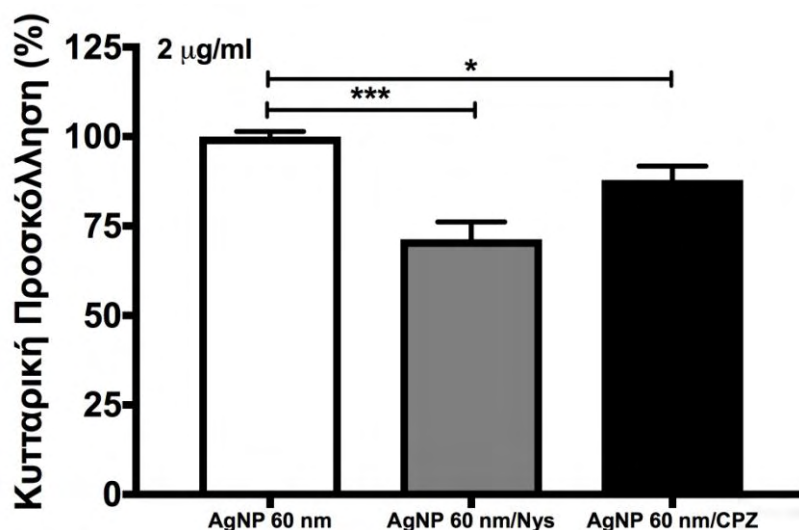


**Σχήμα 22.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 0.2 µg/mL AgNPs των 60 nm με προσθήκη νυστατίνης (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 0.2 µg/mL AgNPs των 60 nm με προσθήκη χλωροπρομαζίνης (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 90 λεπτά.  $*p<0.05$  και  $***p<0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.



**Σχήμα 23.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 2 µg/mL AgNPs των 20 nm (στήλη με

άσπρο χρώμα; n=12), 2 µg/mL AgNPs των 20 nm με προσθήκη νυστατίνης (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 2 µg/mL AgNPs των 20 nm με προσθήκη χλωροπρομαζίνης (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 90 λεπτά. \*\* $p < 0.01$  και \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.



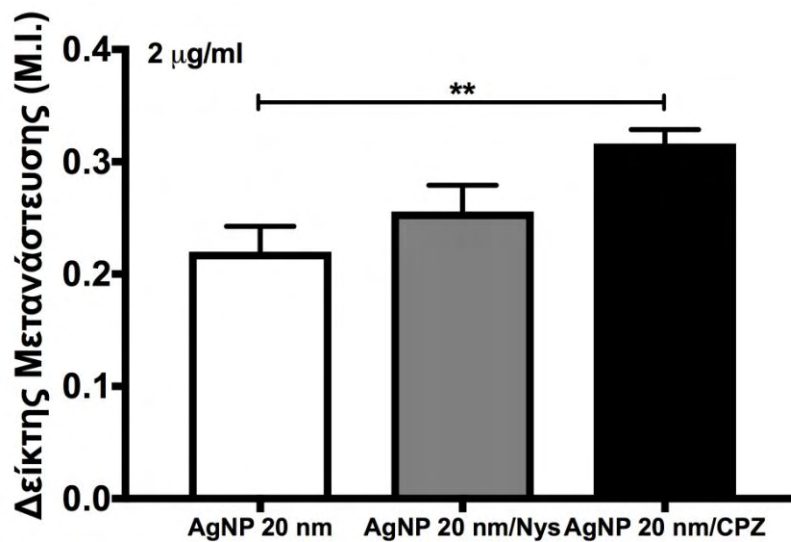
**Σχήμα 24.** Μέση τιμή κυτταρικής προσκόλλησης ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A ως ποσοστό % των πειραμάτων αναφοράς. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 2 µg/mL AgNPs των 60 nm (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 2 µg/mL AgNPs των 60 nm με προσθήκη νυστατίνης (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 2 µg/mL AgNPs των 60 nm με προσθήκη χλωροπρομαζίνης (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 90 λεπτά. \* $p < 0.05$  και \*\*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.

## 2.10 Επιδράσεις των AgNPs 20 nm συγκέντρωσης 2 µg/ml στην κυτταρική μετανάστευση της ανθρώπινης μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς MeT-5A με χρήση αναστολέων της ενδοκυττάρωσης

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης των AgNPs διαμέτρου 20 nm σε συγκέντρωση 2 µg/ml στην κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν νυστατίνη και



χλωροπρομαζίνη. Στο **Σχήμα 25** φαίνεται ότι η αναστολή της εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης υπό τη δράση της χλωροπρομαζίνης οδήγησε στην σημαντικά αυξημένη κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A σε υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης.



**Σχήμα 25.** Μέση τιμή του Δείκτη Μετανάστευσης  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής σε μεσοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MeT-5A. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm (στήλη με άσπρο χρώμα; n=12), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm με προσθήκη νυστατίνης (στήλη με γκρι χρώμα; n=12) και 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNPs των 20 nm με προσθήκη χλωροπρομαζίνης (στήλη με μαύρο χρώμα; n=12) για 8 ώρες.  $**p < 0.01$  σε σύγκριση με πειράματα αναφοράς.

### Κεφάλαιο 3 Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι επιδράσεις των AgNPs δύο διαφορετικών μεγεθών στη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Οι ηλεκτροφυσιολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η  $R_{TM}$  και το  $I_{EQ}$ . Η  $R_{TM}$  έχει καθιερωθεί ως δείκτης αντιστρόφως ανάλογος της διαπερατότητας της μεσοθηλιακής μεμβράνης [23]. Επομένως, όταν μειώνεται η  $R_{TM}$  αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και το αντίστροφο. Στα ex vivo πειράματα, η προ-επώαση του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου με AgNPs μεγέθους 20 nm και συγκέντρωσης 2  $\mu\text{g/ml}$  οδήγησε σε σημαντική μείωση της  $R_{TM}$  σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς και με τα AgNPs των 60 nm. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο υπεζωκότας γίνεται περισσότερο διαπερατός μόνο μετά την επώαση με AgNPs του μικρότερου μεγέθους για 30 λεπτά. Η μελέτη των επιδράσεων της βραχυπρόθεσμης έκθεσης στα νανοσωματίδια είναι πολύ σημαντική, καθώς έχειδειχθεί ότι τα εισπνεόμενα νανοσωματίδια μεγέθους περίπου 20 nm εισέρχονται γρήγορα (μέσα σε μία ώρα) στη συστηματική κυκλοφορία [59]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες που να διερευνούν τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων στη διαπερατότητα των μεσοθηλιακών μεμβρανών, για να μπορέσει να γίνει σύγκριση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής και γι αυτό απαιτείται περισσότερη έρευνα σε αυτό το πεδίο.

Τα νανοσωματίδια έχουν συχετιστεί με τη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής τόσο σε εργάτες εργοστασίων που εκτέθηκαν σε αυτά [75-77] όσο και σε πειραματικές μελέτες που έγιναν σε αρουραίους [83]. Η υπεζωκοτική συλλογή που έχει αναπτυχθεί λόγω της έκθεσης σε νανοσωματίδια, μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες που μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του υπεζωκότα. Μεταξύ αυτών

μπορεί να είναι αναστολείς ιοντικών διαύλων, φλεγμονώδεις παράγοντες ή στεροειδή, που μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού [22]. Τα αποτελέσματα των *ex vivo* πειραμάτων, όπου αυξάνεται η διαπερατότητα του υπεζωκότα μετά από έκθεση σε AgNPs 20 nm, θα μπορούσαν να εξηγήσουν εν μέρει την ανάπτυξη υπεζωκοτικών συλλογών στα άτομα που εκτίθενται σε νανοσωματίδια [75-77]. Απαιτείται όμως περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο τα νανοσωματίδια επηρεάζουν τη διαπερατότητα του υπεζωκότα για να εξηγηθεί επαρκώς η εμφάνιση των υπεζωκοτικών συλλογών στα άτομα αυτά.

Στα πειράματα όπου μονοστιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα εκτέθηκαν σε AgNPs παρατηρήθηκε μείωση της διαπερατότητας. Πιο συγκεκριμένα, στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα προβάτου σημειώθηκε μια προοδευτική αύξηση της  $R_{TM}$  όσο μεγαλώνει ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τα AgNPs, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι τα AgNPs μπορεί να επηρεάζουν τις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Η μεσοθηλιακή μονοστιβάδα των κυττάρων γινόταν σταδιακά λιγότερο διαπερατή και αυτό το φαινόμενο ήταν πιο έντονο όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με AgNPs από τη βασεοπλευρική επιφάνειά τους. Αυτό το εύρημα σχετίζεται με την οδό έκθεσης στα νανοσωματίδια. Όταν τα AgNPs μεταναστεύουν από τους αεραγωγούς προς τον υπεζωκοτικό χώρο, τα κύτταρα εκτίθενται στα AgNPs από την κορυφαία επιφάνειά τους. Σε αντίθεση με την προηγούμενη περίπτωση έμμεση προσβολή του υπεζωκότα έχουμε μετά την έκθεση των κυττάρων με AgNPs από την βασεοπλευρική επιφάνειά τους κατά την παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού με διήθηση από τα τριχοειδή αγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα. Από την άλλη πλευρά, τα πειράματα στην ανθρώπινη μεσοθηλιακή κυτταρική σειρά έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά είναι πιο ανθεκτικά στις μεταβολές της

διαπερατότητας σε σύγκριση με τα μεσοθηλιακά κύτταρα του προβάτου αλλά και πάλι μετά την προσθήκη AgNPs στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, μειώνεται η διαπερατότητα καθώς αυξάνεται η  $R_{TM}$ .

Όσον αφορά τις *in vitro* μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των AgNPs στη διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών, υπάρχουν λίγες μελέτες με διαφορετικά αποτελέσματα. Σε μία πρόσφατη μελέτη AgNPs μεγέθους 8 nm οδήγησαν σε μείωση της διεπιθηλιακής αντίστασης σε ένα μοντέλο μεικτής καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων αιματοεγκεφαλικού φραγμού και αστροκυττάρων [116]. Αντίθετα, σε ένα άλλο μοντέλο μεικτής καλλιέργειας ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα μαζί με μακροφάγα, η έκθεση σε AgNPs διαφορετικών μεγεθών (10, 20, 50 και 100 nm) για 24 ώρες δεν σημείωσε σημαντικές μεταβολές στην διεπιθηλιακή αντίσταση, εκτός από μερικές ελάσσονος σημασίας στην πολύ υψηλή συγκέντρωση των AgNPs [117]. Σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου έγινε επώαση με AgNPs συγκέντρωσης 20  $\mu\text{g/ml}$  (τουλάχιστον 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση από την παρούσα διατριβή) και μεγεθών 10, 20, 75 και 100 nm για 24 ώρες [118]. Διαπιστώθηκε επίσης μείωση της διεπιθηλιακής αντίστασης η οποία ήταν πολύ πιο έντονη μετά από έκθεση με τα AgNPs του μικρότερου μεγέθους.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις επιδράσεις τους και μάλιστα έχειδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια μικρότερου μεγέθους έχουν συνήθως πιο έντονες επιδράσεις [118]. Αυτό παρατηρήθηκε και στα *ex vivo* πειράματα όπου μόνο τα AgNPs των 20 nm ήταν ικανά να επηρεάσουν την διαπερατότητα του υπεζωκότα

προβάτου ενώ τα AgNPs των 60 nm δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στη διαπερατότητα του υπεζωκότα.

Επομένως παρατηρήθηκαν τα αντίθετα αποτελέσματα στα *ex vivo* και τα *in vivo* πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να οφείλονται στους παρακάτω λόγους: α) τα πειράματα στους ιστούς του υπεζωκότα προβάτου αφορούν βραχυπρόθεσμη έκθεση σε AgNPs (30 λεπτά) ενώ η έκθεση των μεσοθηλιακών μονοστιβάδων των κυττάρων του υπεζωκότα ήταν μακροπρόθεσμη (1-24 ώρες) και β) ο ιστός είναι μια πολύ πιο σύνθετη δομή από τις κυτταρικές μονοστιβάδες και αυτό θα μπορούσε εν μέρει να ευθύνεται για την παρατηρούμενη αντίφαση.

Όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα των AgNPs στο υγρό της κορυφαίας και της βασεοπλευρικής επιφάνειας των πειραμάτων σε μονοστιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων στα Transwell, παρατηρείται αύξηση της LDH στα διαφορετικά χρονικά σημεία επώασης σε σχέση με τη χρονική στιγμή 0. Υπάρχει επομένως κυτταροτοξικότητα η οποία διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και δεν επηρεάζει τη συνοχή της μονοστιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων όπως φαίνεται από τις τιμές της  $R_{TM}$ . Στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν επίπεδα κυτταροτοξικότητας της τάξης του 20% και στα MeT-5A παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα της τάξης του 10-15%. Τα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα συνεπώς είναι πιο ευπαθή και εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα μεγαλύτερης έκτασης, ειδικότερα στις 24 ώρες επώασης, η οποία όμως ακολουθείται από ταυτόχρονη αύξηση της  $R_{TM}$  στα αντίστοιχα πειράματα. Μελέτες με AgNPs σε κυψελιδικά κύτταρα και συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά A549 έχουν δείξει

επίσης αύξηση της κυτταροτοξικότητας μέσω της μέτρησης της εκλυόμενης LDH [119, 120].

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των AgNPs σε δύο κυτταρικές λειτουργίες των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα προβάτου, στην κυτταρική προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό. Και τα δύο μεγέθη των AgNPs οδήγησαν σε αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης μόνο στη χαμηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, στα πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων μετά από την έκθεση σε AgNPs. Στη χαμηλή συγκέντρωση και τα δύο μεγέθη των AgNPs αύξησαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ στην υψηλή συγκέντρωση μόνο τα AgNPs των 60 nm είχαν αυτό το αποτέλεσμα. Επομένως, σημειώθηκαν σημαντικές επιδράσεις και από τα δύο μεγέθη των AgNPs, όταν αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ οι παραπάνω επιδράσεις ελαττώθηκαν, όταν τα AgNPs χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά MeT-5A οι επιδράσεις που σημειώνονται στην κυτταρική προσκόλληση είναι πιο έντονες μετά την έκθεση των κυττάρων σε AgNPs υψηλής συγκέντρωσης, όπου και τα δύο μεγέθη νανοσωματιδίων αυξάνουν σημαντικά την προσκόλληση στο υπόστρωμα φιβρονεκτίνης. Το φαινόμενο αυτό ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στα πρωτογενή μεσοθηλιακά κύτταρα από την ίδια συγκέντρωση AgNPs, όπου η προσκόλληση δεν παρουσίασε μεταβολές. Παρατηρούνται επομένως παρόμοιες επιδράσεις στην προσκόλληση και των δύο τύπων κυττάρων μόνο στη χαμηλή συγκέντρωση AgNPs, καθώς και στα MeT-5A

σημειώνεται τάση αύξησης της προσκόλλησης μετά την έκθεση σε AgNPs 20 nm αλλά και σημαντική αύξησή της μετά την έκθεση σε AgNPs 60 nm.

Δεν υπάρχουν παρόμοιες μελέτες σε μεσοθηλιακά κύτταρα που να εξετάζουν τις επιδράσεις των AgNPs στις δύο αυτές κυτταρικές λειτουργίες, με τις οποίες θα μπορούσαμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα, τα AgNPs έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας [121]. Υπάρχει, ωστόσο, μια θεμελιώδης διαφορά μεταξύ των δύο μελετών, καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα αφέθηκαν να προσκολληθούν σε φιλμ χιτοζάνης AgNPs με μεταβλητό πάχος ενώ στην παρούσα διατριβή αφέθηκαν να προσκολληθούν σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης. Αυτό έχει σαν συνέπεια διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με το υπόστρωμα προσκόλλησης και ως εκ τούτου, η σύγκριση μεταξύ των δύο μελετών θα ήταν δύσκολο να ερμηνευθεί.

Μία μελέτη που ήταν παρόμοια με τη δική μας, όσον αφορά το υπόστρωμα προσκόλλησης, εξέτασε την προσκόλληση των πνευμονικών κυττάρων μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου. Τα νανοσωματίδια αυτά μείωσαν την προσκόλληση των κυττάρων των αεραγωγών μόνο στην πολύ υψηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκαν (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ενώ στην χαμηλότερη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  τα νανοσωματίδια αυτά δεν επηρέασαν την κυτταρική προσκόλληση [122]. Στη δική μας μελέτη ωστόσο χρησιμοποιήθηκαν 5 και 50 φορές χαμηλότερες συγκεντρώσεις και παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης. Άλλες σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τη δική μας μελέτη είναι ότι στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες φυσιολογικών μεσοθηλιακών

κυττάρων και όχι μια κακοήθης κυτταρική σειρά. Ένας πιθανός μηχανισμός της αυξημένης κυτταρικής προσκόλλησης που παρατηρήθηκε μετά από την έκθεση σε AgNPs θα μπορούσε να είναι η διαταραχή του δικτύου των μικροσωληνίσκων από τα νανοσωματίδια η οποία οδηγεί σε ισχυρότερη προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα όπως έχει αποδειχθεί σε κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου από άλλους τύπους νανοσωματιδίων [123].

Όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα AgNPs των 45 nm έχουν διπλές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των στεφανιαίων ενδοθηλιακών κυττάρων [124]. Πιο συγκεκριμένα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των AgNPs που κυμαίνονται από 1,0 έως 10  $\mu\text{g/ml}$  ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις των 50 έως 100  $\mu\text{g/ml}$  αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε επίσης μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Συγκεκριμένα τα AgNPs και των δύο μεγεθών αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα προβάτου μόνο στη χαμηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) ενώ αυτό το αποτέλεσμα προκλήθηκε μόνο με τα AgNPs των 60 nm στην υψηλότερη συγκέντρωση (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Η παραπάνω μελέτη του Rosas-Hernandez είναι η πιο σχετική μελέτη για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας καθώς χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων αρουραίου και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ex vivo σε απομονωμένους αορτικούς δακτυλίους αρουραίου.

Από την άλλη πλευρά, μελέτες βασισμένες σε διάφορες κυτταρικές σειρές (καλοήθεις ή κακοήθεις) αναφέρουν κυρίως αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις των



AgNPs που είναι πιο εμφανείς σε νανοσωματίδια μικρού μεγέθους [125, 126]. Αυτές οι διαφορές που παρατηρούνται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από την έκθεση σε AgNPs, συνεπάγονται ότι η επίδραση των νανοσωματιδίων εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους και τη συγκέντρωσή τους, αλλά και από τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό πάνω στον οποίο ασκούν τις επιδράσεις τους.

Στη συνέχεια εξετάστηκε μια ακόμη κυτταρική λειτουργία στα MeT-5A, η κυτταρική μετανάστευση έπειτα από δημιουργία ασυνέχειας (τραύματος) σε μονοστιβάδα κυττάρων. Η έκθεση των κυττάρων σε AgNPs επηρέασε τη μεταναστευτική ικανότητά τους μόνο στην υψηλή συγκέντρωση των 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και υπό την επίδραση νανοσωματιδίων μεγέθους 20 nm. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε σημαντική μείωση της μετανάστευσης στην κυτταρική σειρά MeT-5A, φαινόμενο το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστών από την έκθεση σε AgNPs 10 nm, συγκέντρωσης 1 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [127]. Ένας πιθανός μηχανισμός της μειωμένης μετανάστευσης των ινοβλαστών αυτής της μελέτης, έχει δειχθεί ότι είναι η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού με τον αυξημένο σχηματισμό ενδοκυτταρικών ινιδίων πίεσης και κυτταρικών προσεκβολών με αποτέλεσμα την αυξημένη κυτταρική προσκόλληση, η οποία έχει παρατηρηθεί και στα δικά μας πειράματα.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης των AgNPs διαμέτρου 20 nm σε συγκέντρωση 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  στην κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A, χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς για δύο τύπους ενδοκυττάρωσης. Με την προσθήκη νυστατίνης έγινε αναστολή της ενδοκυττάρωσης μέσω μικροσπυλαίων ενώ με την προσθήκη χλωροπρομαζίνης έγινε αναστολή της εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης. Με τη χρήση των αναστολέων της ενδοκυττάρωσης, η μειωμένη

μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 nm αποκαταστάθηκε με την προσθήκη χλωροπρομαζίνης. Επομένως φαίνεται ότι η ενδοκυττάρωση των νανοσωματιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 nm και εξαρτάται από τον μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης. Είναι πιθανό να μειώνεται η μετανάστευση των κυττάρων λόγω ενδοκυττάρων φαινομένων που έπονται της ενδοκυττάρωσης των νανοσωματιδίων μέσω κλαθρίνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Παρόμοια με την παρούσα μελέτη αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε μελέτες σε κύτταρα του στοματικού βλεννογόννου που έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου και του πυριτίου μείωσαν επίσης την κυτταρική μετανάστευση αλλά η προσθήκη ενός αναστολέα της εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης (μονοδαζυλοκαδαβερίνη), οδήγησε στην αποκατάσταση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων [123].

Όσον αφορά την επίδραση της ενδοκυττάρωσης των AgNPs στην κυτταρική προσκόλληση, και οι δύο αναστολείς προκάλεσαν σημαντικές αλλαγές. Στην κυτταρική σειρά MeT-5A υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm οι αναστολείς της ενδοκυττάρωσης μείωσαν σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση. Παρατηρείται συνεπώς ενδοκυττάρωση των AgNPs και μέσω κλαθρίνης και μέσω μικροσπληαίων καθώς στα προηγούμενα πειράματα με τα AgNPs σημειώθηκε αύξηση της κυτταρικής προσκόλλησης ενώ με την προσθήκη της χλωροπρομαζίνης και της νυστατίνης παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης των AgNPs έχουν αναφερθεί σε μελέτες που εξετάζουν άλλους τύπους κυττάρων [128] αλλά δεν υπάρχουν παρόμοιες μελέτες σε μεσοθηλιακά κύτταρα. Επομένως αυτή είναι η πρώτη μελέτη που εξετάζει τους

μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης των AgNPs σε μεσοθηλιακά κύτταρα και από τα αποτελέσματα αυτής συμπεραίνεται ότι στην κυτταρική προσκόλληση υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 και 60 nm διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και οι δύο μηχανισμοί της ενδοκυττάρωσης που εξετάστηκαν. Είναι συνεπώς πιθανό να αυξάνεται η κυτταρική προσκόλληση λόγω ενδοκυττάρων φαινομένων που έπονται της ενδοκυττάρωσης των νανοσωματιδίων μέσω κλαθρίνης αλλά και μέσω μικροσπηλαίων.

## Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Τα AgNPs ανάλογα με το μέγεθός τους αυξάνουν τη διαπερατότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου και μειώνουν τη διαπερατότητα των μεσοθηλιακών κυτταρικών μονοστιβάδων του υπεζωκότα.
2. Τα AgNPs εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας τα οποία παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.
3. Τα AgNPs και των δύο μεγεθών (20 και 60 nm) στη συγκέντρωση των 0,2 μg/ml αυξάνουν την προσκόλληση των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα.
4. Στη συγκέντρωση των 0,2 μg/ml και τα δύο μεγέθη AgNPs αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα ενώ στη συγκέντρωση των 2 μg/ml μόνο τα AgNPs 60 nm αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό.
5. Στη συγκέντρωση των 0,2 μg/ml μόνο τα AgNPs των 60 nm αυξάνουν την προσκόλληση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα ενώ στη συγκέντρωση των 2 μg/ml και τα δύο μεγέθη AgNPs αυξάνουν την προσκόλληση.
6. Μόνο τα AgNPs των 20 nm στη συγκέντρωση των 2 μg/ml μειώνουν την μετανάστευση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα.
7. Και οι δύο αναστολείς της ενδοκυττάρωσης μείωσαν την προσκόλληση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση AgNPs 20 και 60 nm.

8. Η χλωροπρομαζίνη αύξησε την μετανάστευση των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα υπό την επίδραση AgNPs διαμέτρου 20 nm.

Συμπερασματικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει μεταβολές στη διαπερατότητα της μεμβράνης του υπεζωκότα μετά από σύντομη έκθεση σε AgNPs οι οποίες θα μπορούσαν ενδεχομένως να εξηγήσουν τις υπεζωκοτικές συλλογές που εμφανίστηκαν σε ορισμένα άτομα που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε *in vivo* ότι τα AgNPs μπορούν να αλλάζουν τη διαπερατότητα μιας μεσοθηλιακής μονοστιβάδας με τρόπο που εξαρτάται από τον χρόνο επώασης και το μέγεθος των AgNPs. Απαιτείται όμως περαιτέρω διερεύνηση αυτών των αποτελεσμάτων, προκειμένου να διασαφηνιστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί με τους οποίους μεταβάλλεται η διαπερατότητα.

Επίσης, στην παρούσα διατριβή εξετάζονται για πρώτη φορά οι επιδράσεις των AgNPs στις κυτταρικές λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Τα AgNPs προκαλούν αλλαγές στην προσκόλληση, στη μετανάστευση και στον πολλαπλασιασμό των μεσοθηλιακών κυττάρων, οι οποίες εξαρτώνται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων και τη συγκέντρωσή τους ενώ οι μηχανισμοί της ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης και μέσω μικροσπληαίων αποτελούν τους κύριους τρόπους πρόσληψης των AgNPs από τα κύτταρα όσον αφορά την προσκόλληση και μόνο η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης όσον αφορά την κυτταρική μετανάστευση. Υπάρχει ωστόσο ανάγκη για περαιτέρω μελέτες στοχεύοντας στην ανακάλυψη των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στις παραπάνω μεταβολές των κυτταρικών λειτουργιών.

## **Βιβλιογραφία**

- [1] **Light R.W.** "Anatomy of the pleura; Pleural diseases". ed. Light R.W. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 4th edition. 2001:1-8.
- [2] **Finley D.J. and Rusch V.W.** "Anatomy of the pleura". Thorac Surg Clin 2011;21(2):157-163.
- [3] **Agostoni E. and Zocchi L.** "Pleural liquid and its exchanges". Respir Physiol Neurobiol 2007;159:311-323.
- [4] **Charalampidis C. et al.** "Pleura space anatomy". J Thorac Dis 2015;7(Suppl 1):S27-32.
- [5] **Michailova K.N. and Usunoff K.G.** "Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology". Adv Anat Embryol Cell Biol 2006;183: i-vii, 1-144.
- [6] **Lai-Fook S.J.** "Pleural mechanics and fluid exchange". Physiol Rev 2004;84(2):385-410.
- [7] **Negrini D. and Moriondo A.** "Pleural function and lymphatics". Acta Physiol (Oxf) 2013;207(2):244-259.
- [8] **Herrick S.E. and Mutsaers S.E.** "Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering". Int J Biochem Cell Biol 2004;36(4):621-642.
- [9] **Mutsaers S.E.** "The mesothelial cell". Int J Biochem Cell Biol 2004;36(1):9-16.

- [10] **Mutsaers S.E.** "Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair". *Respirology* 2002;7(3):171-191.
- [11] **Zocchi L.** "Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover". *Eur Respir J* 2002;20(6):1545-1558.
- [12] **Donaldson K. et al.** "Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma". *Part Fibre Toxicol* 2010;7:5.
- [13] **Bodega F. and Agostoni E.** "Contribution of lymphatic drainage through stomata to albumin removal from pleural space". *Respir Physiol Neurobiol* 2004;142(2-3):251-263.
- [14] **Lamallice L. et al.** "Endothelial cell migration during angiogenesis". *Circ Res* 2007;100(6):782-794.
- [15] **Γουργουλιάνης Κ. και συνεργάτες.** "Συμβολή του Εργαστηρίου στην Εκτίμηση του Πνευμονολογικού Ασθενούς". Εκδόσεις της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας. Αθήνα 2009.
- [16] **Hatzoglou C.H. et al.** "Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura". *J Appl Physiol* 2001;90(4):1565-1569.
- [17] **Liakopoulos V. et al.** "Aquaporin-1 and sodium transport in the peritoneal membrane--need for more research?" *Kidney Int* 2006;70(9):1663-1664.
- [18] **Nie H.G. et al.** "Expression and Regulation of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels by Nucleotides in Pleural Mesothelial Cells". *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40(5):543-554.

- [19] **Sironi C. et al.** "Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter is also expressed in mesothelium of species with thick visceral pleura". *Respir Physiol Neurobiol* 2008;161(3):261-266.
- [20] **Kouritas V.K. et al.** "Human parietal pleura present electrophysiology variations according to location in pleural cavity". *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008;7(4):544-547.
- [21] **Light R.W. et al.** "Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exudates". *Ann Intern Med* 1972;77:507-513.
- [22] **Zarogiannis S.G. and Kalomenidis I.** "Can pharmacologic agents speed the rate of resorption of pleural fluid?" *Curr Opin Pulm Med* 2015;21(4):372-375.
- [23] **Zarogiannis S. et al.** "Adrenergic influence on the permeability of sheep diaphragmatic parietal pleura". *Respiration* 2007;74(1):118-120.
- [24] **Zarogiannis S. et al.** "Dexamethasone decreases the transmesothelial electrical resistance of the parietal and visceral pleura". *J Physiol Sci* 2009;59(4):335-339.
- [25] **Zarogiannis S. et al.** "Dexamethasone acutely accelerates pleural fluid absorption in mice hydrothoraces". *J Physiol Sci* 2010;60(4):299-302.
- [26] **Kouritas V.K. et al.** "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter the human mesothelial pleural permeability via ion cellular transportation by inhibiting prostaglandin synthesis". *Respiration* 2012;84(1):62-68.
- [27] **Kotsiou O.S. et al.** "Prehospital NSAIDs use prolong hospitalization in patients with pleuro-pulmonary infection". *Respir Med* 2017;123:28-33.



- [28] **Hall J.E.** "Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology". Saunders, Elsevier. 13th Edition. 2015.
- [29] **Anderson J.M. and Van Itallie C.M.** "Physiology and function of the tight junction". Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1(2):a002584.
- [30] **González-Mariscal L. et al.** "Tight junction proteins". Progress in Biophysics & Molecular Biology 2003;81:1-44.
- [31] **Van Itallie C.M. and Anderson J.M.** "Architecture of tight junctions and principles of molecular composition". Semin Cell Dev Biol 2014;36:157-165.
- [32] **Markov A.G. et al.** "Tight junction proteins contribute to barrier properties in human pleura". Resp Physiol Neurobiol 2011;175:331–335.
- [33] **Markov A.G. and Amasheh S.** "Tight junction physiology of pleural mesothelium". Front Physiol 2014;5:221.
- [34] **Rouka E. et al.** "Transcriptomic Analysis of the Claudin Interactome in Malignant Pleural Mesothelioma: Evaluation of the Effect of Disease Phenotype, Asbestos Exposure, and CDKN2A Deletion Status". Front Physiol 2017;8:156.
- [35] **Lehn J.M.** "Toward self-organization and complex matter". Science 2002;295:2400-2403.
- [36] **Schmidt G. et al.** "Small dimensions and material properties. Europäische Akademie Graue Reihe. In a definition of nanotechnology". Bad Neuenahr 2003:134.
- [37] <http://www.nano.gov/>

- [38] [www.sustainable-nano.com](http://www.sustainable-nano.com)
- [39] **Maynard A.D. and Aitken R.J.** "Safe handling of nanotechnology ten years on". *Nat Nanotechnol* 2016;11(12):998-1000.
- [40] **Ju-Nam Y. and Lead J.R.** "Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications". *Sci Total Environ* 2008;400:396-414.
- [41] **Κωνσταντίνος Ν. Δεμέτζος.** "Φαρμακευτική νανοτεχνολογία. Βασικές αρχές και πρακτικές εφαρμογές". Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 2014.
- [42] **Xi G. et al.** "Convection-enhanced delivery of nanodiamond drug delivery platforms for intracranial tumor treatment". *Nanomedicine* 2014;10:381-391.
- [43] **Man H.B. et al.** "Synthesis of nanodiamond-daunorubicin conjugates to overcome multidrug chemoresistance in leukemia". *Nanomedicine* 2014;10:359-369.
- [44] **Moore L. et al.** "Multi-protein delivery by nanodiamonds promotes bone formation". *J Dent Res* 2013;92:976-981.
- [45] **Lee S.S. et al.** "Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating". *ACS Nano* 2013;7:9693-9703.
- [46] **Obaid G. et al.** "Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles". *Photochem Photobiol Sci* 2015;14(4):737-747.
- [47] [www.nanotechproject.org](http://www.nanotechproject.org)

- [48] **Herrera M. et al.** "In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements". *Micronios* 2001;104:141–148.
- [49] **Bosetti M. et al.** "Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity". *Biomaterials* 2002;23:887–892.
- [50] **Barkalina N. et al.** "Nanotechnology in reproductive medicine: emerging applications of nanomaterials". *Nanomedicine* 2014;10(5):921-938.
- [51] **Xia X.R. et al.** "An index for characterization of nanomaterials in biological systems". *Nat Nanotechnol* 2010;5(9):671-675.
- [52] **Nel A.E. et al.** "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface". *Nature Mater* 2009;8:543–557.
- [53] **Ge C. et al.** "Towards understanding of nanoparticle-protein corona". *Arch Toxicol* 2015;89(4):519-539.
- [54] **Monopoli M.P. et al.** "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials". *Nat Nano* 2012;7(12):779–786.
- [55] **Durán N. et al.** "Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review". *J Nanobiotechnology* 2015;13:55.
- [56] **Shaw C.A. et al.** "Protein corona formation in bronchoalveolar fluid enhances diesel exhaust nanoparticle uptake and pro-inflammatory responses in macrophages". *Nanotoxicology* 2016;10(7):981-991.
- [57] **Martel J. et al.** "Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Anal Biochem* 2011;418(1):111-125.

- [58] **Donaldson K. and Poland C.A.** "Inhaled nanoparticles and lung cancer - what we can learn from conventional particle toxicology". *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13547.
- [59] **Buzea C. et al.** "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity". *Biointerphases* 2007;2:MR17-71.
- [60] **Ziello J.E. et al.** "Cellular endocytosis and gene delivery". *Mol Med* 2000;16:222-229.
- [61] **Shukla R. et al.** "Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview". *Langmuir* 2005;21:10644-10654.
- [62] **Singh S. et al.** "Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles". *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222:141–151.
- [63] **Takenaka S. et al.** "Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung". *Inhal Toxicol* 2006;18:733–740.
- [64] **May R. and Machesky L.** "Phagocytosis and the actin cytoskeleton". *J Cell Sci* 2001;114:1061-1077.
- [65] **Iversen T.G. et al.** "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies". *Nano Today* 2011;6:176-185.
- [66] **Sahay G. et al.** "Endocytosis of nanomedicines". *J Control Release* 2010;145:182-195.

- [67] **Kafshgari M.H. et al.** "Insights into cellular uptake of nanoparticles". *Curr Drug Deliv* 2015;12(1):63-77.
- [68] **Hillaireau, H., and Couvreur P.** "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery". *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2873-2896.
- [69] **Pelkmans L. and Helenius A.** "Endocytosis via caveolae". *Traffic* 2002;3:311-320.
- [70] **Jones A.T.** "Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides". *J Cell Mol Med* 2007;11:670-684.
- [71] **Kerr M. and Teasdale R.** "Defining macropinocytosis". *Traffic* 2009;10:364-371.
- [72] **Gratton S.E. et al.** "The effect of particle design on cellular internalization pathways". *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:11613-11618.
- [73] **Goluszko P. and Nowicki B.** "Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells". *Infect Immun* 2005;73:7791-7796.
- [74] **Kong D. and Yamori T.** "Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: Promising drug candidates for cancer therapy". *Cancer Sci* 2008;99(9):1734-1740.
- [75] **Song Y. et al.** "Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma". *Eur Respir J* 2009;34:559-567.
- [76] **Song Y. and Tang S.** "Nanoexposure, unusual diseases, and new health and safety concerns". *Scientific World Journal* 2011;11:1821-1828.

- [77] **Song Y. et al.** "Nanomaterials in humans: identification, characteristics, and potential damage". *Toxicol Pathol* 2011;39(5):841-849.
- [78] **Ryman-Rasmussen J.P. et al.** "Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice". *Nat Nanotechnol* 2009;4:747-751.
- [79] **Murphy F.A. et al.** "Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura". *Am J Pathol* 2011;178:2587–2600.
- [80] **Foldbjerg R. et al.** "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549". *Arch Toxicol* 2011;85(7):743-750.
- [81] **Schinwald A. et al.** "The Threshold Length for Fiber-Induced Acute Pleural Inflammation: Shedding Light on the Early Events in Asbestos-Induced Mesothelioma". *Toxicol Sci* 2012;128:461-470.
- [82] **Martínez-Gutiérrez, F. et al.** "Antimicrobial activity, cytotoxicity and inflammatory response of novel plastics embedded with silver nanoparticles". *Future Microbiol* 2013 8:403–411.
- [83] **Zhu X. et al.** "Polyacrylate/nanosilica causes pleural and pericardial effusion, and pulmonary fibrosis and granuloma in rats similar to those observed in exposed workers". *Int J Nanomedicine* 2016;11:1593-1605.
- [84] **Liao H.Y. et al.** "Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials". *Nanotoxicology* 2014;8 Suppl 1:100-110.

- [85] **Wu W.T. et al.** "Effect of nanoparticles exposure on fractional exhaled nitric oxide (FENO) in workers exposed to nanomaterials". *Int J Mol Sci* 2014;15(1):878-894.
- [86] **Zhang R. et al.** "Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers". *Part Fibre Toxicol* 2014;11:73.
- [87] **Mühlfeld C. et al.** "Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L817-829.
- [88] **Geiser M. et al.** "The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles". *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:371-376.
- [89] **Geiser M. et al.** "Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs, and in cultured cells". *Environ Health Perspect* 2005;113:1555–1560.
- [90] **Meiring J.J. et al.** "The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung". *Part Fibre Toxicol* 2005;2:3.
- [91] **Donaldson K. et al.** "The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles". *Part Fibre Toxicol* 2009;6:13.
- [92] **Dikensoy O. and Bayram H.** "The current data on nanoparticles and pleura". *Tuberk Toraks* 2010;58:455-458.

- [93] **Poland C.A. et al.** "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study". *Nat Nanotechnol* 2008;3:423–428.
- [94] **Jaurand M.C. et al.** "Mesothelioma: Do asbestos and carbon nanotubes pose the same health risk?" *Part Fibre Toxicol* 2009;6:16.
- [95] **Bonner J.C.** "Nanoparticles as a Potential Cause of Pleural and Interstitial Lung Disease". *Proc Am Thorac Soc* 2010;7:138–141.
- [96] **Poland C.A. et al.** "Length-dependent pathogenic effects of nickel nanowires in the lungs and the peritoneal cavity". *Nanotoxicology* 2012;6:899-911.
- [97] **Pacurari M. et al.** "Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- $\kappa$ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells". *Environ Health Perspect* 2008;116(9):1211–1217.
- [98] **Tabet L. et al.** "Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells". *J Toxicol Environ Health A* 2009 72(2):60–73.
- [99] **Murphy F.A. et al.** "The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells". *Part Fibre Toxicol* 2012 9:8.
- [100] **Nowack B. et al.** "Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment". *Environ Toxicol Chem* 2012;31(1):50-59.
- [101] **Chernousova S. and Epple M.** "Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal". *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52(6):1636-1653.



- [102] **Haberl N. et al.** "Cytotoxic and proinflammatory effects of PVP-coated silver nanoparticles after intratracheal instillation in rats". *Beilstein J Nanotechnol* 2013;4:933-940.
- [103] **Stebounova L.V. et al.** "Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model". *Part Fibre Toxicol* 2011;8(1):5.
- [104] **Silva R.M. et al.** "Short versus long silver nanowires: a comparison of in vivo pulmonary effects post instillation". *Part Fibre Toxicol* 2014;11:52.
- [105] **Braakhuis H.M. et al.** "Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles". *Part Fibre Toxicol* 2014;11:49.
- [106] **Ji J.H. et al.** "Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats". *Inhal Toxicol* 2007;19(10):857-871.
- [107] **Botelho D.J. et al.** "Low-dose AgNPs reduce lung mechanical function and innate immune defense in the absence of cellular toxicity". *Nanotoxicology* 2016;10(1):118-127.
- [108] **Hirn S. et al.** "Proinflammatory and cytotoxic response to nanoparticles in precision-cut lung slices". *Beilstein J Nanotechnol* 2014;5:2440-2449.
- [109] **Park E.J. et al.** "Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism". *Toxicol In Vitro* 2010;24(3):872-878.

- [110] **Carlson C. et al.** "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species". *J Phys Chem B* 2008;112(43):13608-13619.
- [111] **Asare N. et al.** "Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice". *Nanotoxicology* 2016;10(3):312-321.
- [112] **Chung K.F. et al.** "Inactivation, Clearance, and Functional Effects of Lung-Instilled Short and Long Silver Nanowires in Rats". *ACS Nano* 2017;11(3):2652-2664.
- [113] **Ussing H.H. and 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.
- [114] **Li H. et al.** "Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber". *J Cyst Fibros* 2004;3 Suppl 2:123-126.
- [115] **Stefanidis I. et al.** "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.
- [116] **Chen I.C. et al.** "Influence of silver and titanium dioxide nanoparticles on in vitro blood-brain barrier permeability". *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;47:108-118.
- [117] **Braakhuis H.M. et al.** "Simple in vitro models can predict pulmonary toxicity of silver nanoparticles". *Nanotoxicology* 2016;10:770-779.

- [118] **Williams K.M. et al.** "Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium". *J Nanobiotechnology* 2016:14:62.
- [119] **Han J.W. et al.** "Oxidative stress mediated cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line". *Nanoscale Res Lett* 2014:9(1):459.
- [120] **Lee Y.S. et al.** "Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC $\zeta$ -dependent signaling in A549 lung cells". *Arch Toxicol* 2011:85(12):1529-1540.
- [121] **Wang X.H. et al.** "Cytotoxicity of AgNPs/CS composite films: AgNPs immobilized in chitosan matrix contributes a higher inhibition rate to cell proliferation". *Bioengineered* 2016:7:283-290.
- [122] **Zarogiannis S.G. et al.** "Nano-TiO<sub>2</sub> particles impair adhesion of airway epithelial cells to fibronectin". *Respir Physiol Neurobiol* 2013:185:454-460.
- [123] **Tay C.Y. et al.** "Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration". *Nano Lett* 2014:14:83-88.
- [124] **Rosas-Hernández H. et al.** "Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings". *Toxicol Lett* 2009:191:305-313.
- [125] **McCracken C. et al.** "Oxidative stress-mediated inhibition of intestinal epithelial cell proliferation by silver nanoparticles". *Toxicol In Vitro* 2015:29:1793-1808.

[126] **Park M.V. et al.** "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles". *Biomaterials* 2011;32:9810-9817.

[127] **Vieira L.F.A. et al.** "Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro". *Nanoscale Res Lett* 2017;12(1):200.

[128] **Gliga A.R. et al.** "Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release". *Part Fibre Toxicol* 2014;11:11.