

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΘΕΜΑ: Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΙΟΥΡΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΤΟΝ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

Διπλωματική Εργασία

Εκπόνηση: Θεοδοσίου Βασιλική

Λάρισα
Αύγουστος 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. 04/09/2003
Αριθ. Πρωτ. 2566



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 2855/1
Ημερ. Εισ.: 04-08-2009
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083648



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Εκπόνηση: Θεοδοσίου Βασιλική

ΘΕΜΑ: Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΙΟΥΡΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΤΟΝ
ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

Υπεύθυνος καθηγητής: Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ ,
Καθηγητής Φυσιολογίας

Τριμελής Επιτροπή:

Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας

Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Χατζηευθυμίου Αποστολία, Λέκτορας Φυσιολογίας

Λάρισα
Αύγουστος 2003

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα Ιανουάριος – Αύγουστος 2003, υπό την καθοδήγηση του Πρόεδρου του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά. Η εργασία ολοκληρώθηκε με την συμβολή δασκάλων και φίλων .

Τους αναφέρω εκφράζοντας τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου.

Ευχαριστώ,

- Τον Πρόεδρο του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητή Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά, επιστημονικό υπεύθυνο της εργασίας αυτής, για τις πολύτιμες συμβουλές του.
- Τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, για την επιστημονική βοήθεια, την καθοδήγηση και τις κριτικές παρατηρήσεις του.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας Σίμο Γεώργιο, για την συμβολή του στην διόρθωση της εργασίας.
- Την Λέκτορα Φυσιολογίας Χατζηευθυμίου Αποστολία για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές της.
- Την Λέκτορα Φυσιολογίας Χατζόγλου Χρυσή, για τις επιστημονικές της συμβουλές και την υποστήριξή της.
- Την Ιατρό και Υποψήφια Διδάκτορα Ματαφιά Γαλάτεια για την ανεκτίμητη βοήθειά της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της εργασίας.
- Τους κ. Ζυγοτέγο Αλέξανδρο και Τσαπράκα Δημήτριο για βοήθεια τους και την ηθική συμπαράσταση τους.
- Τον κ. Στακιά Νικόλαο για τις παρατηρήσεις του και την συμβολή του στην παρουσίαση της εργασίας.

- Την οικογένειά μου για την ενθάρρυνση, την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.
- Τους συγγενείς και φίλους για την πολύπλευρη συμπαράσταση και υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
2.1. Ανατομία του υπεζωκότα	3
2.2. Η ανταλλαγή υγρού στα πνευμονικά τριχοειδή και η δυναμική του μεσοκυττάριου υγρού των πνευμόνων	6
3. Η ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	9
4. ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ	12
4.1. Παθητική Μεταφορά	13
4.2. Ενεργητική Μεταφορά	14
4.3. Μελέτη της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών	16
5. ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	19
6. ΑΝΤΙΔΙΟΥΡΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ (ADH)	32
7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
7.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
7.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	41
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
11. ABSTRACT	67
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν να εξεταστεί η επίδραση των διαδικασιών ενεργητικής μεταφοράς και παθητική διάχυσης ιόντων στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ουσίες που επηρεάζουν τη μετακίνηση ιόντων και μεταβάλλουν την ηλεκτρική αντίσταση (R_{TE}) και κατ' επέκταση τη διαπερατότητα του υπεζωκότα προβάτου.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα από 12 ενήλικα πρόβατα (θηλυκά και αρσενικά). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs στους $4^{\circ}C$ εντός 30 λεπτών από τον θάνατο του ζώου. Στη συνέχεια ο υπεζωκότας τοποθετήθηκε σε μία αντλία τύπου Ussing, με διάλυμα Krebs και από τις δύο πλευρές, το οποίο οξυγονώνονταν συνεχώς και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 37° . Μελετήθηκε η ανάπτυξη διαφοράς δυναμικού και οι επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH), η οποία αναστέλλει τους διαύλους Na^{+} , την αντλία $Na^{+} - K^{+}$ και ελαττώνει την διευκολυνόμενη διάχυση Na^{+} . Επιπρόσθετα εξετάστηκαν οι επιδράσεις του N^{ω} -νίτρο-L-αργινίνη-μέθυλο-εστέρα (L-NAME), το οποίο είναι αναστολέας της σύνθεσης του οξειδίου του αζώτου προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή του οξειδίου του αζώτου στην R_{TE} του τοιχωματικού και του πνευμονικού υπεζωκότα. Εξαιτίας των ανατομικών διαφορών μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα οι μετρήσεις του πνευμονικού υπεζωκότα συγκρίθηκαν με αυτές του τοιχωματικού υπεζωκότα.

Σε όλες τις περιπτώσεις οι επίδραση της ορμόνης ήταν άμεση, εμφανής από το πρώτο λεπτό της έκθεση και διαρκούσε λίγα λεπτά. Στις περισσότερες των περιπτώσεων η αντίσταση επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα μέχρι την πάροδο των 60 λεπτών των πειραμάτων. Η μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης πιθανών να

οφείλεται σε αύξηση της παραγωγής του οξειδίου του αζώτου από την αντιδιουρητική ορμόνη.

Ο αναστολέας L-NAME δεν ανέστειλε την μείωση της διαπερατότητας πιθανών λόγω της ανεπαρκούς συγκέντρωσής που χρησιμοποιήθηκε.

Τα αποτελέσματα της μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο υπεζωκότας συμμετέχει ενεργά στη μετακίνηση υγρού και διαλυτών ουσιών. Φαίνεται ότι υπάρχει μετακίνηση Na^+ και K^+ και στον πνευμονικό και στον τοιχωματικό υπεζωκότα γιατί παρατηρήθηκε αύξηση της αντίστασης όταν προστέθηκε αντιδιουρητική ορμόνη και στις δύο πλευρές των υπεζωκότων.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

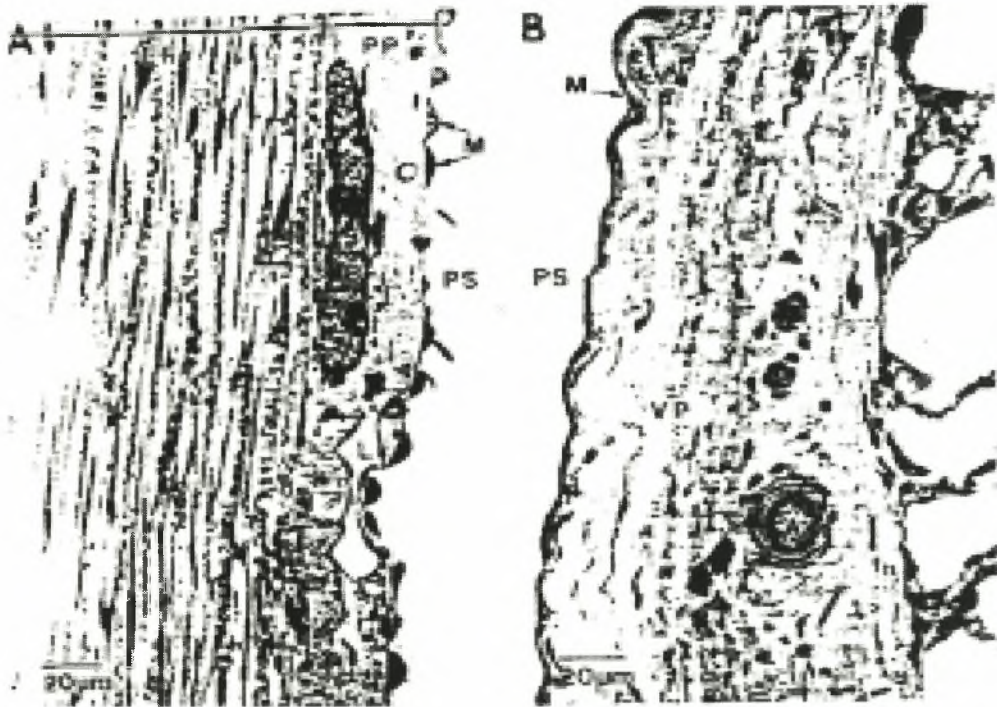
2.1 Ανατομία του υπεζωκότα

Ο υπεζωκότας είναι ένας ημιδιαφανής υμένας που καλύπτει τους πνεύμονες, το μεσαύλιο, το διάφραγμα και το εσωτερικό τοίχωμα του θωρακικού κλωβού. Αποτελείται από δύο πέταλα, το πνευμονικό (πνευμονικός υπεζωκότας), που καλύπτει όλο τον πνεύμονα και τις μεσολόβιες σχισμές και το τοιχωματικό (τοιχωματικός υπεζωκότας), που καλύπτει την έσω επιφάνεια του θωρακικού κλωβού το μεσαύλιο και το διάφραγμα. Τα δύο αυτά πέταλα ενώνονται στην περιοχή της πύλης του πνεύμονα (1).

Για την διεξαγωγή αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι πνεύμονες προβάτων επειδή έχει δειχθεί ότι η ανατομία τους είναι παρόμοια με αυτή του ανθρώπου. Η συνολική επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα ενός πνεύμονα συμπεριλαμβανομένων και των μεσολόβιων σχισμών είναι ίδια με του τοιχωματικού υπεζωκότα του ενός ημιθωρακίου δηλ. περίπου 1000 cm^2 . Οι δύο υπεζωκότες δεν εφάπτονται μεταξύ τους αλλά σχηματίζουν μία κοιλότητα, την υπεζωκοτική κοιλότητα η οποία περιέχει μία λεπτή στιβάδα υγρού, που επιτρέπει την ομαλή ολίσθηση της μίας επιφάνειας πάνω στην άλλη κατά την διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων. Η ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού στο πρόβατο είναι περίπου 3,5 ml και από τα δύο ημιθωράκια (2,3).

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας βρίσκεται μεταξύ της υπεζωκοτικής κοιλότητας και της ενδοθωρακικής περιτονίας, ενώ ο πνευμονικός υπεζωκότας βρίσκεται μεταξύ της υπεζωκοτικής κοιλότητας και των πνευμονικών κυψελίδων (Εικόνα 1.). Ο υπεζωκότας του προβάτου αποτελείται από δύο στιβάδες, την μεσοθηλιακή στιβάδα και την στιβάδα του συνδετικού ιστού. Η στιβάδα του συνδετικού ιστού είναι πλούσια

σε αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν στην επιφάνειά τους μικρολάχνες, μεταξύ των οποίων υπάρχει γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε υαλουρονικό οξύ. Κάτω από τα μεσοθηλιακά κύτταρα υπάρχουν εναλλασσόμενες στιβάδες κολλαγόνων και ελαστικών ινών (4).



Εικόνα 1. Τα δύο πέταλα του υπεζωκότα καλύπτονται από μία μονήρη στιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων (M). [A] Ο τοιχωματικός υπεζωκότας βρίσκεται μεταξύ της υπεζωκοτικής κοιλότητας (PS) και της ενδοθωρακικής περιτονίας (EF). Εντός του συνδετικού ιστού βρίσκονται αιμοφόρα αγγεία (B) και λεμφόκολλοι. [B] Ο πνευμονικός υπεζωκότας βρίσκεται μεταξύ της υπεζωκοτικής κοιλότητας (PS) και των κυψελίδων.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι, ανάλογα με την περιοχή στην οποία βρίσκονται, άλλοτε επίπεδα ή αποπεπλατυσμένα και κυβοειδή ή κυλινδρικά. Τα επίπεδα κύτταρα είναι τα περισσότερα και βρίσκονται πάνω από σταθερές δομές, όπως

οι πλευρές, ενώ τα κυβοειδή είναι λιγότερα και βρίσκονται πάνω από πιο χαλαρές δομικά περιοχές όπως οι πνεύμονες και το μεσοπνευμόνιο.

Ο αριθμός και το μέγεθος των μικρολαχνών που καλύπτουν την επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο. Οι μικρολάχνες αυξάνουν κατά πολύ την επιφάνεια του υπεζωκότα και συμβάλουν στην μείωση των τριβών μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα μέσω του γλυκοκάλυκα της επιφάνειας τους (5).

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με στενές συνδέσεις και δεσμοσώματα. Έχουν μεταβολικές λειτουργίες και συνθέτουν αρκετές πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται πάνω στην βασική μεμβράνη, η οποία επικαλύπτει τη στιβάδα του συνδετικού ιστού.

Η αιμάτωση του τοιχωματικού υπεζωκότα γίνεται από τις μεσοπλευρίες αρτηρίες και η απαγωγή του φλεβικού αίματος γίνεται από τις βρογχικές φλέβες. Η αιμάτωση του πνευμονικού υπεζωκότα γίνεται από τις βρογχικές αρτηρίες και η απαγωγή του αίματος από τις πνευμονικές φλέβες. Εξαιτίας αυτών των διαφορών υπάρχει διαφορετική πίεση διήθησης στα δύο πέταλα και κατά συνέπεια η ενδοαγγειακή πίεση στον πνευμονικό υπεζωκότα είναι μικρότερη από αυτή του τοιχωματικού επειδή οι βρογχικές αρτηρίες που αιματώνουν τον πνευμονικό εκβάλουν σε πνευμονικά αγγεία χαμηλής πίεσης και όχι στις φλέβες της συστηματικής κυκλοφορίας (6).

Η υπεζωκοτική κοιλότητα περιβάλλεται από δύο διαφορετικά συστήματα λεμφικής κυκλοφορίας. Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα είναι το αληθινό λεμφικό σύστημα του υπεζωκότα, και τα λεμφαγγεία του πνευμονικού υπεζωκότα που είναι το επιφανειακό τμήμα του λεμφικού συστήματος των πνευμόνων. Ο πνευμονικός

υπεζωκότας έχει ένα πυκνό σύστημα λεμφαγγείων το οποίο δεν έχει άμεση επικοινωνία με την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα λεμφαγγεία του πνευμονικού υπεζωκότα συνδέονται με τα λεμφαγγεία του διάμεσου πνευμονικού ιστού και του τοιχώματος των βρόγχων και η λέμφος ρέει προς τους πυλαίους λεμφαδένες διαμέσου των εν τω βάθει και των επιφανειακών λεμφαγγειακών πλεγμάτων. Τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα συνδέονται άμεσα με την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου ανοιγμάτων που καλούνται στόματα (7). Τα στόματα έχουν σχήμα κυκλικό ή ωοειδές, μέγεθος 2-6 μm και βρίσκονται κυρίως στη διαφραγματική και στη μεσοπνευμόνια περιοχή καθώς και κάτω από τις πλευρές. Μεγαλομοριακές ενώσεις και κύτταρα όπως ερυθροκύτταρα και μακροφάγα απομακρύνονται από την υπεζωκοτική κοιλότητα διαμέσου των στομάτων. Από τον τοιχωματικό υπεζωκότα η λέμφος ρέει προς τον δεξιό θωρακικό πόρο (8).

2.2. Η ανταλλαγή υγρού στα πνευμονικά τριχοειδή και η δυναμική του μεσοκυττάριου υγρού των πνευμόνων

Η δυναμική της ανταλλαγής υγρού μέσα από τα πνευμονικά τριχοειδή είναι ποιοτικά η ίδια όπως και για τους περιφερικούς ιστούς. Εν τούτοις, υπάρχουν σημαντικές ποσοτικές διαφορές:

1. Η ενδοτριχοειδική πίεση στα πνευμονικά τριχοειδή είναι πολύ μικρή, γύρω στα 7 mm Hg, σε σύγκριση με τη σημαντικά υψηλότερη λειτουργική ενδοτριχοειδική πίεση στους περιφερικούς ιστούς, γύρω στα 17 mm Hg.
2. Η πίεση του μεσοκυττάριου υγρού στους πνεύμονες είναι αρνητική ελάχιστα χαμηλότερη από την πίεση που επικρατεί στον περιφερειακό υποδόριο ιστό. (Αυτή μετρήθηκε με δύο τρόπους: με την εισαγωγή μικροκαθετήρα στο μεσοκυττάριο χώρο του πνεύμονα, που αποδίδει τιμή περίπου -5 mm Hg και με τη μέτρηση της πίεσης απορρόφησης υγρού από τις κυψελίδες, που αποδίδει τιμή -8 mm Hg).
3. Τα πνευμονικά τριχοειδή εμφανίζουν σχετικά αυξημένη διαπερατότητα για τα μόρια των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα η κολλοειδωσμητική πίεση στο μεσοκυττάριο υγρό των πνευμόνων να είναι γύρω στα 14 mm Hg, σε σύγκριση με τη μικρότερη από το μισό αυτής της τιμής στους περιφερειακούς ιστούς.
4. Τα τοιχώματα των κυψελίδων είναι εξαιρετικά λεπτά και το κυψελιδικό επιθήλιο που καλύπτει την επιφάνεια των κυψελίδων είναι τόσο ευαίσθητο, που ρήγνυται όταν εξασκείται οποιαδήποτε θετική πίεση μέσα στο μεσοκυττάριο χώρο, μεγαλύτερη από την ατμοσφαιρική πίεση (0 mm Hg). με αποτέλεσμα την εισροή υγρού από τον μεσοκυττάριο χώρο προς τις κυψελίδες.

Παρακάτω σημειώνεται η ισορροπία των δυνάμεων στο επίπεδο του τοιχώματος των τριχοειδών:

mm Hg

Δυνάμεις που τείνουν να μετακινήσουν υγρό από τα τριχοειδή προς το μεσοκυττάριο χώρο των πνευμόνων:

Η ενδοτριχοειδική πίεση7

Η κολλοειδωσμοτική πίεση του μεσοκυττάρου υγρού.....14

Η αρνητική πίεση του μεσοκυττάρου υγρού.....8

ΟΛΙΚΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΞΩ.....29

Δυνάμεις που τείνουν να προκαλέσουν απορρόφηση υγρού προς τα τριχοειδή:

Η κολλοειδωσμοτική πίεση του πλάσματος.....28

ΟΛΙΚΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΣΩ.....28

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι δυνάμεις με κατεύθυνση προς τα έξω είναι ελαφρά μεγαλύτερες από τις δυνάμεις με κατεύθυνση προς τα έσω. Η καθαρή πίεση διήθησης, στο επίπεδο του τριχοειδικού τοιχώματος, υπολογίζεται ως εξής:

mm Hg

Ολική δύναμη με κατεύθυνση προς τα έξω.....+29

Ολική δύναμη με κατεύθυνση προς τα έξω.....-28

ΚΑΘΑΡΗ ΠΙΕΣΗ ΔΙΗΘΗΣΗΣ +1

Η καθαρή αυτή πίεση διήθησης προκαλεί μια ελαφρά συνεχή ροή υγρού από τα πνευμονικά τριχοειδή προς το μεσοκυττάριο χώρο. Ένα μέρος απ' αυτό το υγρό εξατμίζεται προς τον κυψελιδικό αέρα και το υπόλοιπο επαναφέρεται προς την κυκλοφορία με το λεμφικό σύστημα.

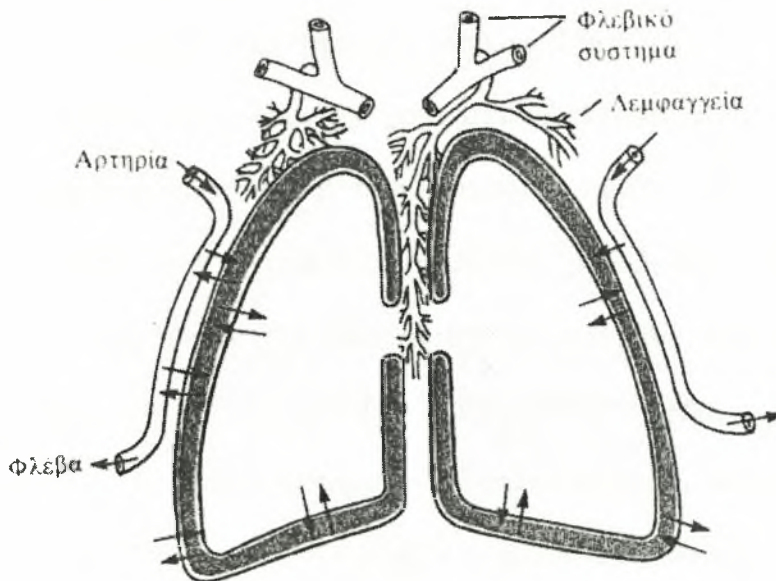
Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα για τη λειτουργία των πνευμόνων είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι κυψελίδες δεν γεμίζουν με υγρό. Η πρώτη σκέψη είναι ότι το κυψελιδικό επιθήλιο εμποδίζει τη διαρροή υγρού από το μεσοκυττάριο χώρο προς τις κυψελίδες. Εν τούτοις, αυτό δεν συμβαίνει, γιατί πάντα υπάρχουν, σε μικρό αριθμό, ανοίγματα μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του κυψελιδικού τοιχώματος, μέσα από τα οποία μπορούν να περάσουν ακόμα και μεγάλα μόρια λευκώματος, καθώς και μεγάλο ποσό υγρού και ηλεκτρολυτών.

Εν τούτοις υπενθυμίζεται ότι τα πνευμονικά τριχοειδή, καθώς και το λεμφικό σύστημα των πνευμόνων, φυσιολογικά διατηρούν μια αρνητική πίεση στο μεσοκυττάριο χώρο, και συνεπώς, οποτεδήποτε παρουσιάζεται υγρό μέσα στις κυψελίδες, αυτό απλά απορροφάται μηχανικά προς το μεσοκυττάριο χώρο των πνευμόνων μέσα από τα μικρά ανοίγματα που βρίσκονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του τοιχώματος των κυψελίδων. Έτσι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κυψελίδες διατηρούνται «στεγνές», εκτός από ένα πολύ μικρό ποσό υγρού που διηθείται μέσα από το επιθήλιο προς την κυψελιδική επιφάνεια και τη διατηρεί έφυγρη (9).

3. Η ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

Κατά την έκπτυξη και τη σύμπτυξη των πνευμόνων με τις φυσιολογικές αναπνευστικές κινήσεις, πραγματοποιείται διολίσθηση μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Για τη διευκόλυνσή της υπάρχει μια πολύ λεπτή στιβάδα υγρού μεταξύ του τοιχωματικού και του περισπλάγγνιου πετάλου του υπεζωκότα (10).

Στην εικόνα 2 απεικονίζεται η δυναμική της ανταλλαγής υγρού σ' αυτό το χώρο. Το καθένα από τα δύο αυτά πέταλα είναι μια πολύ πορώδης μεσεγγυματική ορογόνος μεμβράνη, μέσα από την οποία μικρά ποσά μεσοκυττάριου υγρού διδρώνονται συνεχώς προς τη σχισμοειδή αυτή κοιλότητα. Μέσα σ' αυτό το υγρό περιέχονται πρωτεΐνες των ιστών, οι οποίες προσδίδουν σ' αυτό το υγρό βλεννοειδή εμφάνιση, χαρακτηριστικό που ευνοεί την εύκολη διολίσθηση των κινουμένων πνευμόνων.



Εικόνα 2. Η δυναμική της ανταλλαγής υγρού στον πλευριτικό χώρο. (Δηλαδή στο χώρο μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα).

Το ολικό ποσό του υγρού στην καθεμιά από τις υπεζωκοτικές αυτές κοιλότητες είναι πολύ μικρό, μόνο λίγα ml. Ο όγκος του υγρού ποικίλει μεταξύ των θηλαστικών και κυμαίνεται από 2,5 κυβικά εκατοστά ανά κιλό βάρους σώματος στα ποντίκια μέχρι 0,4 κυβικά εκατοστά ανά κιλό στα πρόβατα. Στα πρόβατα, ο υπεζωκότας των οποίων έχει παρόμοια ανατομία με του ανθρώπου η φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης του υπεζωκοτικού υγρού είναι 1-1,5 g/dl, ενώ το διάμεσο υγρό των πνευμόνων περιέχει 4,5 g/dl. Όμως, σε οποιαδήποτε περίπτωση το υγρό αυτό γίνεται περισσότερο από όσο απαιτείται για τον διαχωρισμό των δύο πετάλων του υπεζωκότα μεταξύ τους, η περίσσεια απάγεται με τα λεμφαγγεία, τα οποία επικοινωνούν κατευθείαν με: (1) το μεσοκυττάριο χώρο, (2) την άνω επιφάνεια του διαφράγματος, και (3) την έξω επιφάνεια του τοιχωματικού πετάλου του υπεζωκότα. Γι' αυτό το λόγο, ο υπεζωκοτικός χώρος -δηλαδή ο «χώρος» μεταξύ του σπλαχνικού και του τοιχωματικού πετάλου του υπεζωκότα -χαρακτηρίζεται ως δυνητικός χώρος, γιατί φυσιολογικά είναι τόσο στενός, ώστε προφανώς να μην αποτελεί πραγματικό φυσικό «χώρο».

Επειδή η τάση των πνευμόνων για ελαστική επάνοδο τους εξαναγκάζει να τείνουν προς συρρίκνωση, απαιτείται πάντοτε η παρουσία, έξω από τους πνεύμονες, μιας αρνητικής πίεσης για να διατηρούνται σε έκταση. Αυτή η δύναμη παρέχεται από την αρνητική πίεση που υπάρχει φυσιολογικά στον υπεζωκοτικό χώρο. Το βασικό αίτιο αυτής της αρνητικής πίεσης είναι η άντληση υγρού από αυτό το χώρο με τα λεμφαγγεία (που αποτελεί επίσης το βασικό αίτιο για την αρνητική πίεση που παρατηρείται στους περισσότερους ιστούς του σώματος). Επειδή η φυσιολογική τάση των πνευμόνων για σύμπτωση είναι περίπου -4 mm Hg (δηλαδή -5 cm H₂O ως -6 εκατοστόμετρα υδατικής στήλης), η πίεση του υπεζωκοτικού υγρού πρέπει να είναι τουλάχιστον το ίδιο αρνητική, δηλαδή -4 mm Hg, για τη διατήρηση των πνευμόνων σε θέση έκτασης. Από πραγματικές μετρήσεις προκύπτει ότι η τιμή της είναι συνήθως -7 mm Hg, δηλαδή λίγα

χιλιοστόμετρα υδραργυρικής στήλης περισσότερο αρνητική από την πίεση σύμπτωσης των πνευμόνων. Έτσι, η αρνητική πίεση του υπεζωκοτικού υγρού συγκρατεί τους πνεύμονες σε επαφή με το τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα, εκτός από το εξαιρετικά λεπτό στρώμα του βλεννοειδούς υγρού που λειτουργεί ως λιπαντικό.

Με τον όρο πλευριτικό διίδρωμα ή εξίδρωμα περιγράφεται η συλλογή μεγάλου ποσού ελεύθερου υγρού στο χώρο μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Είναι ανάλογο προς το υγρό του οιδήματος στους ιστούς, μπορεί μάλιστα να αποκαλείται και οίδημα της κοιλότητας του υπεζωκότα. Τα πιθανά αίτια του διιδρώματος είναι τα ίδια με τα αίτια του οιδήματος σε άλλους ιστούς, όπως: (1) η απόφραξη απαγωγής της λέμφου από τον υπεζωκοτικό χώρο, (2) η καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία προκαλεί την ανάπτυξη υπέρμετρα υψηλών πιέσεων στα τριχοειδή των πνευμόνων και της περιφέρειας, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη διήθηση υγρού προς την κοιλότητα μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα, (3) η μεγάλη ελάττωση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης του πλάσματος, με αποτέλεσμα και πάλι τη διήθηση μεγάλου ποσού υγρού, και (4) η λοίμωξη είτε οποιαδήποτε άλλη αιτία φλεγμονής των επιφανειών των πετάλων του υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα, με αποτέλεσμα την ταχεία άθροιση πρωτεϊνών του πλάσματος και υγρού μέσα σ' αυτή την κοιλότητα.

4. ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η κυτταρική ζωή εξαρτάται από την οργάνωση των μορίων μέσα στα κύτταρα. Οποιαδήποτε διαταραχή στη συγκέντρωση ή το είδος των ουσιών θα διαταράξει την κυτταρική λειτουργία και μπορεί να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο. Η πλασματική μεμβράνη δεν απομονώνει το εσωτερικό του κυττάρου από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, αλλά επιτρέπει την επικοινωνία και τη μεταφορά ουσιών ανάμεσα στο ενδοκυτταρικό και το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η πλασματική μεμβράνη παρουσιάζει εκλεκτική διαπερατότητα για διάφορες ουσίες και ιόντα. Έτσι, βασικά μόρια που είναι απαραίτητα για την κυτταρική λειτουργία, π.χ. γλυκόζη, αμινοξέα, λιπίδια, κτλ, εισέρχονται μέσα στο κύτταρο από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, τα προϊόντα του ενδιάμεσου μεταβολισμού παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι άχρηστες ουσίες απομακρύνονται από το κύτταρο. Διάφορα ιόντα μετακινούνται συνεχώς τόσο διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, αλλά και διαμέσου των μεμβρανών των υποκυτταρικών οργανιδίων (11).

Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί μεταφοράς μορίων και ιόντων διαμέσου των μεμβρανών. Η παθητική μεταφορά που στηρίζεται στη διαφορετική συγκέντρωση των ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο. Η διεργασία αυτή γίνεται χωρίς την κατανάλωση ενέργειας. Η ενεργητική μεταφορά που γίνεται ενάντια στη συγκέντρωση και απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Οι τιμές μεταφοράς των μορίων και των ιόντων μέσω των μεμβρανών εξαρτώνται από τις ιδιότητες των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Η μεταφορά διαμέσου της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας επηρεάζεται από τον υδρόφοβο, μη πολικό, χαρακτήρα των λιπιδίων. Μη πολικά μόρια διέρχονται με παθητική μεταφορά τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα πάρα πολύ εύκολα, σε αντίθεση με τα πολικά ή φορτισμένα

μόρια. Η μόνη εξαίρεση στον κανόνα αυτό είναι το ύδωρ το οποίο διαπερνά εύκολα τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα παρά τον πολικό του χαρακτήρα.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ιόντα έχουν φορτίο, τόσο η παθητική όσο και η ενεργητική μεταφορά τους μπορεί να δημιουργήσει σημαντικά ηλεκτρικά φαινόμενα και στις δύο πλευρές μιας μεμβράνης. Αυτά τα ηλεκτρικά φαινόμενα αποτελούν τη βάση για πολλά σημαντικά κυτταρικά φαινόμενα, περιλαμβανομένης της επικοινωνίας στα νευρικά και εγκεφαλικά κύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις το ηλεκτρικό δυναμικό που δημιουργείται κατά μήκος των μεμβρανών είναι πολύ μεγάλο. Στα ηλεκτρικά όργανα του ηλεκτροφόρου χελιού π.χ., το ρεύμα είναι τόσο υψηλό που μπορεί να ζαλίζει ή και να σκοτώσει μεγάλα ζώα, ακόμη και τον άνθρωπο.

4.1. Παθητική Μεταφορά

Η μεταφορά ουσιών επιτυγχάνεται κυρίως από ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Στην περίπτωση της απλής διάχυσης, μικρά μόρια και ιόντα π.χ. O_2 , CO_2 , αιθανόλη, ουρία, κτλ., διασχίζουν τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα χωρίς τη μεσολάβηση μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς. Η μεταφορά ουσιών μέσω των μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς παρουσιάζει εκλεκτικότητα, δηλ. συγκεκριμένες πρωτεΐνες μεταφέρουν συγκεκριμένα μόρια από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Η γλυκόζη μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα πολύ γρήγορα με μια διαδικασία που ονομάζεται υποβοηθούμενη διάχυση και γίνεται με τη βοήθεια μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς. Η μεταφορά των ιόντων και των μορίων γίνεται είτε με αλλαγή της διαμόρφωσης της μεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφοράς, είτε μέσα από διαύλους που σχηματίζουν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς. Ενώ συνήθως οι διάυλοι είναι ανοιχτοί, στην περίπτωση της διακοπτόμενης παθητικής

μεταφοράς οι διάυλοι είναι κλειστοί και ανοίγουν μόνο όταν συνδεθεί μαζί τους κάποιο εξωγενές μόριο ή όταν μεταβληθεί το δυναμικό πόλωσης της μεμβράνης. Κλασικό παράδειγμα διακοπτόμενης παθητικής μεταφοράς αποτελεί η ενεργοποίηση της νευρομυϊκής σύναψης.

4.2. Ενεργητική Μεταφορά

Το χαρακτηριστικό στοιχείο της ενεργητικής μεταφοράς είναι η μετακίνηση μίας ουσίας ενάντια στη συγκέντρωσή της. Η ενέργεια για τη μετακίνηση αυτή παρέχεται, άμεσα ή έμμεσα, από την υδρόλυση της ATP.

Στους άμεσα εξαρτώμενους μηχανισμούς, η υδρόλυση της ATP και η μεταφορά της ουσίας γίνονται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύστημα και η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση ωθεί τις ουσίες στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Όλες οι γνωστές αντλίες (όπως ονομάζονται τα πρωτεϊνικά συστήματα ενεργητικής μεταφοράς) που λειτουργούν με τον τρόπο αυτό μεταφέρουν θετικά φορτισμένα ιόντα δια μέσου της μεμβράνης. Οι αντλίες που χρησιμοποιούν άμεσα την ενέργεια από την υδρόλυση της ATP, διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους: τις αντλίες τύπου P, οι οποίες συνδέονται με μια φωσφορική ομάδα που αφαιρείται από την ATP κατά τη λειτουργία της αντλίας και τις αντλίες τύπου V, οι οποίες λειτουργούν χωρίς να συνδέονται με φωσφορική ομάδα κατά τη λειτουργία της αντλίας. Οι αντλίες τύπου P μεταφέρουν H^+ , Ca^{2+} , Na^+ και K^+ , ενάντια στη συγκέντρωσή τους. Η πιο γνωστή και καλύτερα μελετημένη μεμβρανική πρωτεΐνη ενεργητικής μεταφοράς είναι η αντλία καλίου-νατρίου η οποία συντελεί στην έξοδο τριών ιόντων Na^+ και στην είσοδο δύο ιόντων K^+ , ενώ η αντλία ιόντων Ca^{2+} βγάζει έξω από το κύτταρο δύο ιόντα Ca^{2+} . Οι αντλίες τύπου V μετακινούν H^+ ενάντια στη συγκέντρωσή τους και βρίσκονται στις μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων,

όπως τα λυοσώματα, τα ενδοσώματα, το trans-Golgi δίκτυο και τα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων. Οι αντλίες τύπου V μειώνουν το pH των οργανιδίων αυτών σε σχέση με το περιβάλλον κυτταρόπλασμα.

Στους έμμεσα εξαρτώμενους μηχανισμούς, οι αντλίες χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τη συγκέντρωση H^+ ή Na^+ που έχει δημιουργηθεί κατά τη λειτουργία των αντλιών που χρησιμοποιούν άμεσα την υδρόλυση της ATP. Η ουσία που μεταφέρεται με το μηχανισμό αυτό μπορεί να μετακινηθεί προς την ίδια ή την αντίθετη κατεύθυνση με αυτήν των H^+ ή Na^+ . Με το μηχανισμό αυτό μετακινούνται διάφορα ιόντα και όλα τα οργανικά μόρια που χρειάζονται τα κύτταρα.

Πληθώρα ουσιών έχει χρησιμοποιηθεί για την έρευνα διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η αμιλορίδη, η ουαμπαΐνη και τα τελευταία χρόνια το οξειδίο του αζώτου (NO) και οι ορμόνες. Πολλές ορμόνες έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον όπως η αλδοστερόνη, η αντιδιουρητική ορμόνη, τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, η ινσουλίνη, η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη.

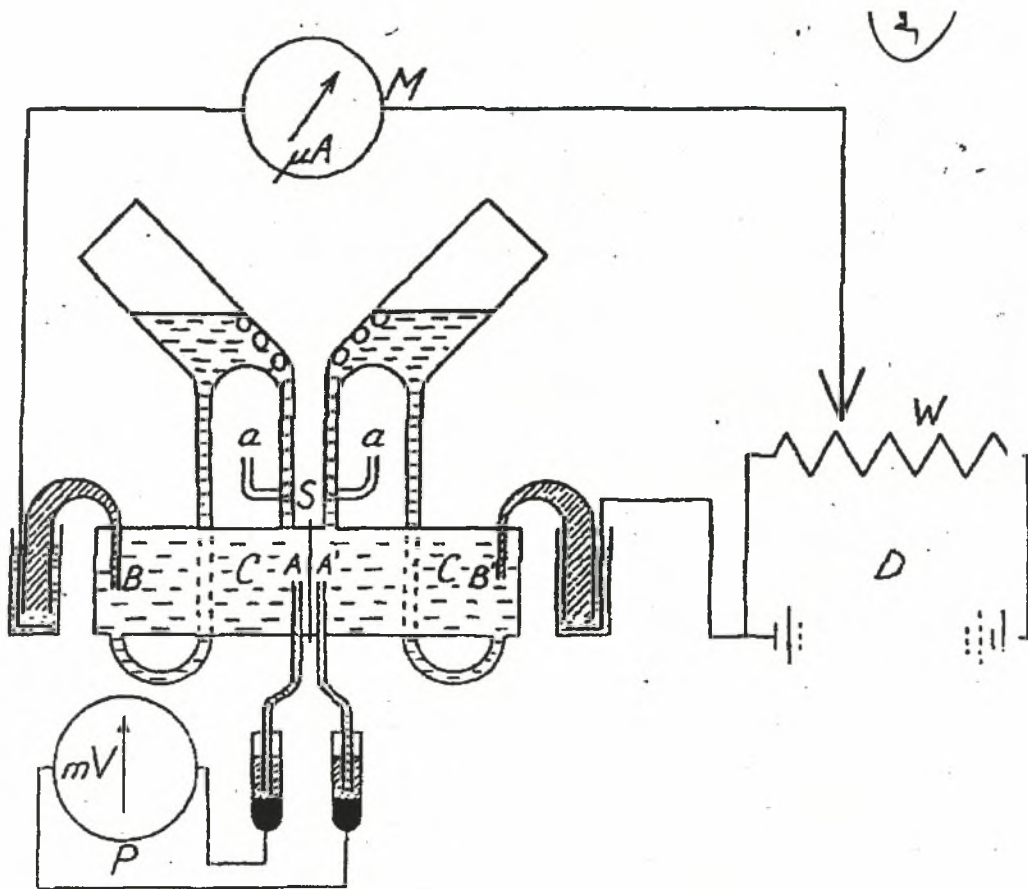
4.3. Μελέτη της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών

Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολικότητα στις μεταφορικές ιδιότητές τους. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταφορικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης που βλέπει προς την μία πλευρά της στιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από εκείνες της μεμβράνης που βλέπει προς την άλλη πλευρά.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου των νεφρών αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα της πολικότητας. Το συμπλήρωμα των πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ψηκτροειδή παρυφή που βλέπει προς τον αυλό του λεπτού εντέρου ή του ουροφόρου σωληναρίου διαφέρει από την σύσταση των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής μεμβράνης του κυττάρου. Οι στενές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν την μίξη των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής όψης των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της πλευράς του αυλού, διατηρώντας έτσι την πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν την διόδο ύδατος και μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι, υπάρχουν δύο ειδών οδοί μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: 1) διακυττάρια οδοί, μέσα από τα κύτταρα 2) παρακυττάρια οδοί, ανάμεσα από τα κύτταρα (12).

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που αναφέρθηκαν. Η διακίνηση από τις παρακυττάρια οδούς περιορίζεται από τις στενές συνδέσεις, οι οποίες συνήθως βρίσκονται στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων. Η μεταφορά αυτή στις παρακυττάρια οδούς θεωρούνταν παθητική, κυρίως σαν αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων, που δημιουργείται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται στενά (13).

Μία κλασσική μέθοδος μελέτης διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών είναι η μέθοδος Ussing System. Αναμφισβήτητη απόδειξη για την αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ και την ενεργητική μεταφορά προέρχεται από τις μελέτες του HANS USSING σε τμήμα δέρματος βατράχου (14). Η τεχνική αυτή εξασφάλισε ένα πειραματικό εργαλείο, το οποίο αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμο όχι μόνο για την μελέτη δέρματος βατράχου αλλά και για την έρευνα της φυσιολογικής συμπεριφοράς άλλων απομονωμένων επιθηλιακών ιστών. Η αρχή της τεχνικής φαίνεται στην εικόνα 3. Το δέρμα (S) είναι τοποθετημένο σαν επίπεδο στρώμα σε μία αντλία (C) και διαχωρίζει ένα διάλυμα Ringer. Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού μετρείται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (A, A') που τοποθετούνται όσο πιο κοντά γίνεται στην μεμβράνη χωρίς ουσιαστικά να την αγγίζουν. Το δυναμικό καταγράφεται από ένα μιλιβολτόμετρο (P), με την βοήθεια μιας μπαταρίας (D) και ενός διαιρέτη τάσης (potential divider) (W), ρεύμα που μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (B, B'), που τοποθετούνται όσο πιο μακριά γίνεται στον ιστό. Το ρεύμα μπορεί να προστεθεί αντίθετα προς το δυναμικό που αναπτύσσει ο ιστός και να αυξηθεί σταδιακά ώστε το δυναμικό να γίνει μηδέν.



Εικόνα 3. Διάγραμμα της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό ηλεκτρικών παραμέτρων σε δέρμα βατράχου από τον H. Ussing (Ussing HH et al, 1962)

C: αντλία

S: ιστός

a: είσοδοι για οξυγόνο

A and A': ηλεκτρόδια για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού

B and B': ηλεκτρόδια για την χορήγηση ρεύματος

D: μπαταρία

W: διαιρέτης τάσης

M: μικροαμπερόμετρο

P: μιλιβολτόμετρο

5. ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι ορμόνες είναι χημικά μηνυματοφόρα μόρια που συντονίζουν τη δραστηριότητα των κυττάρων των πολυκυτταρικών οργανισμών. Ο όρος ορμόνη (από την ελληνική λέξη ορμή) πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1904 από τους William Bayliss και Ernest Starling για να περιγραφεί η δράση της εκκριματίνης - ενός μορίου που εκκρίνεται από τον δωδεκαδάκτυλο και διεγείρει την έκκριση του παγκρεατικού υγρού. Από την εργασία των ερευνητών αυτών προέκυψαν καρποφόρες ιδέες: (1) οι ορμόνες είναι μόρια που παράγονται από ειδικούς ιστούς ή αδένες, (2) οι ορμόνες εκκρίνονται κατευθείαν στο αίμα το οποίο και τις μεταφέρει στα σημεία όπου επενεργούν και (3) οι ορμόνες τροποποιούν ειδικά τη δραστηριότητα των ιστών που αποκρίνονται σ' αυτές (όργανα-στόχοι ή κύτταρα-στόχοι) (15).

Οι ορμόνες είναι χημικώς διαφορετικές ουσίες. Μερικές ορμόνες, όπως η επινεφρίνη (αδρεναλίνη) και η θυροξίνη, είναι μικρά μόρια που προέρχονται από αμινοξέα. Άλλες, όπως η ωκυτοκίνη, η ινσουλίνη, η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη και πολλοί αυξητικοί παράγοντες είναι πολυπεπίδια ή πρωτεΐνες. Μια ομάδα που πρόσφατα ανακαλύφθηκε είναι τα εικοσανοειδή, τα οποία σχηματίζονται από το αραχιδονικό, ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, με είκοσι άτομα άνθρακα.

Πρόσφατα έχουν αποκαλυφθεί αρκετά κοινά μοτίβα ορμονικής δράσης. Οι περισσότερες ορμόνες δεσμεύονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και πυροδοτούν μια εκρηκτική αλυσιδωτή αντίδραση ενζυμικών αντιδράσεων. Ο καταρράκτης αντιδράσεων της αδενυλικής κυκλάσης, που οδηγεί σε αύξηση κυκλικού AMP και την ενεργοποίηση μιας πρωτεϊνικής κινάσης, είναι ένα κύριο μοτίβο μεταγωγής σήματος. Ο καταρράκτης αντιδράσεων του φωσφοϊνοσιτιδίου είναι μια άλλη πορεία ορμονικής δράσης που παρατηρείται συχνά. Κατ' αυτήν, στην υδρόλυση

ενός μεμβρανικού φωσφολιπιδίου παράγονται δυο ενδοκυτταρικά μηνυματοφόρα μόρια -η τριφωσφορική ινοσιτόλη, που προκαλεί τη διάνοιξη καναλιών ασβεστίου και η διακυλογλυκερόλη, που ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση. Η ινσουλίνη και πολλοί αυξητικοί παράγοντες δρουν διεγείροντας τη δραστικότητα της τυροσυλοκινάσης των υποδοχέων τους. Όμως και αρκετά προϊόντα ογκογονιδίων έχουν δράση κινάσης τυροσίνης. Οι στερεοειδείς και οι θυρεοειδικές ορμόνες δρουν πολύ διαφορετικά: εισέρχονται στα κύτταρα και δεσμεύονται με υποδοχείς που μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις του DNA. Αυτά τα σύμπλοκα ορμόνης-υποδοχέα είναι ενεργοποιητές μεταγραφής.

Μια σημαντική ανακάλυψη του Earl Sutherland, στην δεκαετία του 1950, οδήγησε στην διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των ορμονών. Αρχικός στόχος της έρευνάς του ήταν ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη επέφεραν τη διάσπαση του γλυκογόνου στο ήπαρ. Ο Sutherland επέλεξε αυτό το σύστημα επειδή η επίδραση των ορμονών αυτών είναι ταχεία και μεγάλη. Ένα άλλο πλεονέκτημα ήταν το γεγονός ότι τα τεμάχια (στην κυριολεξία, φέτες) ηπατικού ιστού παρασκευάζονται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Επιπλέον, πολλά ήταν ήδη γνωστά σχετικά με τη βιοχημεία του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Μάλιστα ο Sutherland άρχισε τις μελέτες αυτές στο Εργαστήριο των Carl Cori και Gerty Cori.

Ο πρώτος στόχος ήταν η εντόπιση της ορμονο-ευαίσθητης αντίδρασης. Προσδιορισμός σημασμένων ενδιαμέσων που είχαν σχηματιστεί κατά την επώαση τεμαχίων ήπατος με ^{32}P έδειξαν ότι η αντίδραση παραγωγής γλυκόζης καταλύεται από μια φωσφορυλάση και όχι από φωσφογλυκομουτάση ή φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Η δραστικότητα αυτής της αντίδρασης αυξανόταν σημαντικά από την επινεφρίνη και τη γλυκαγόνη. Ο Sutherland ανακάλυψε ένα ένζυμο που κατέλυε την

απενεργοποίηση της ενεργού φωσφορυλάσης. Το ένζυμο αυτό αποδείχθηκε ότι ήταν μια φωσφατάση -παρατήρηση που υπέδειξε ότι η φωσφορυλάση ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης. Μάλιστα η ταχύτητα ενσωμάτωσης ως ^{32}P στη φωσφορυλάση αυξανόταν από τη γλυκαγόνη και την επινεφρίνη ευθέως ανάλογα με την επιτάχυνση της διάσπασης του γλυκογόνου. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η φωσφορυλάση ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποιείται μέσω αποφωσφορυλίωσης. Αυτό ήταν το πρώτο παράδειγμα ενζυμικής ρύθμισης μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των ορμονών στη δράση της φωσφορυλάσης σε ομογενοποίημα ηπατικού ιστού. Ανακαλύφθηκε ότι η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη ενεργοποιούσαν και εδώ την φωσφορυλάση. Αυτή η παρατήρηση ορμονικής δράσης σε ένα ομογενοποίημα ελεύθερο κυττάρων αποτελεί ένα σημαντικό σταθμό στη βιοχημεία. Ειδική ορμονική δράση δεν είχε προηγουμένως παρατηρηθεί σε συστήματα ελεύθερα κυττάρων. Πειράματα κυτταρικής κλασμάτωσης, στη συνέχεια, έδειξαν ότι τα διαλυτά στοιχεία από μόνα τους (τα οποία περιείχαν φωσφορυλάση) δεν αντιδρούσαν στην ορμόνη και ότι το σωματιδιακό κλάσμα (το οποίο περιείχε την κυτταρική μεμβράνη) ήταν επίσης απαραίτητο. Η υπόθεση που προτάθηκε στο σημείο αυτό ήταν ότι η δέσμευση της ορμόνης στη κυτταρική μεμβράνη οδηγεί στο σχηματισμό μιας ουσίας που διεγείρει τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης. Μάλιστα, ένας θερμο-ανθεκτικός ενεργοποιητικός παράγοντας παραγόταν όταν το σωματιδιακό κλάσμα επωαζόταν με την ορμόνη και τριφωσφορικά νουκλεοτίδια.

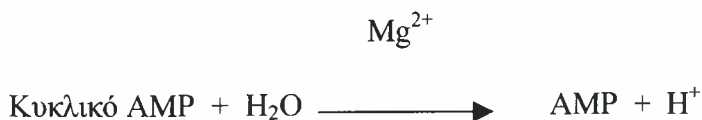
Η επόμενη πρόκληση ήταν η ταυτοποίηση αυτού του θερμοσταθερού ενδιάμεσου του οποίου η απαιτούμενη ποσότητα ήταν πολύ μικρή. Χημική ανάλυση έδειξε ότι αυτό ήταν ένα αδενικό ριβονουκλεοτίδιο, αλλά οι ιδιότητές του ήταν

ασυνήθεις. Ο Sutherland έγραψε στον Leon Heppel σχετικά με το μόριο αυτό, ελπίζοντας ότι θα μπορούσε να τον βοηθήσει στη διευκρίνιση της δομής του. Ταυτόχρονα έγραψε στον Heppel και ο David Lipkin περιγράφοντας ένα νέο νουκλεοτίδιο που παραγόταν κατά την επεξεργασία ATP με υδροξείδιο του βαρίου. Ο Heppel υπέθεσε ότι ο Lipkin και ο Sutherland μελετούσαν το ίδιο μόριο και τους έφερε σε επικοινωνία. Πράγματι, και οι δύο ερευνητές μελετούσαν το ίδιο μόριο το οποίο αποδείχθηκε ότι ήταν η 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη, που σήμερα αναφέρεται ως κυκλικό AMP ή cAMP. Ένα ακόμη όφελος από την τυχαία αυτή ανακάλυψη ήταν ότι έγινε δυνατή η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κυκλικού AMP και η χρήση του σε βιοχημικές μελέτες. Επιπλέον, η εργαστηριακή σύνθεση του cAMP από ATP και υδροξείδιο του βαρίου υπέδειξε στους ερευνητές και την πιθανή πορεία της βιοσύνθεσής του (15).

Το κυκλικό AMP σχηματίζεται από ATP με τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης που είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη.



Η αντίδραση αυτή είναι ελαφρώς ενδόεργη και έχει ΔG° 1,6 kcal/mol και βαίνει προς την κατεύθυνση της σύνθεσης κυκλικού AMP με την περαιτέρω υδρόλυση της πυροφωσφορικής ομάδας. Το κυκλικό AMP διασπάται από μια ειδική φωσφοδιεστεράση η οποία το υδρολύει σε AMP.



Η αντίδραση αυτή έχει ΔG° περίπου -12 kcal/mol, παρόλα αυτά απουσία φωσφοδιεστεράσης το cAMP είναι πολύ σταθερή ένωση. Εδώ παρατηρούμε ένα ωραίο

παράδειγμα κινητικής σταθερότητας παρουσία θερμοδυναμικής αστάθειας. Αυτή η ιδιότητα των φωσφορικών εστέρων τους έδωσε ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στην αρχή της εξέλιξης, και σ' αυτό οφείλεται η γενικευμένη παρουσία τους σε όλες σχεδόν τις βιοχημικές πορείες.

Οι μελέτες του Sutherland οδήγησαν στην ιδέα ότι το cAMP είναι ένα δεύτερο μήνυμα της δράσης ορισμένων ορμονών (15). Το πρώτο μήνυμα αποτελεί η ίδια η ορμόνη. Τα κύρια σημεία της έννοιας αυτής είναι:

1. Η κυτταρική μεμβράνη περιέχει υποδοχείς ορμονών.
2. Η ένωση μιας ορμόνης με τον ειδικό υποδοχέα της οδηγεί στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, η οποία είναι επίσης ένα μεμβρανικό ένζυμο.
3. Η αύξηση της ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης αυξάνει το επίπεδο του κυτταροπλασματικού κυκλικού AMP .
4. Κατά σειρά το κυκλικό AMP δρα στο κύτταρο και τροποποιεί την ταχύτητα μίας ή και περισσότερων διεργασιών .

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του μοντέλου του δεύτερου μηνύματος είναι ότι η ορμόνη δεν είναι απαραίτητο να εισέλθει στο κύτταρο. Η επίδρασή της είναι πάνω στη μεμβράνη. Οι επιδράσεις των ορμονών μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο μέσω του cAMP και όχι μέσω της ίδιας της ορμόνης. Το μοντέλο αυτό κάνει αρκετές προβλέψεις, των οποίων η ορθότητα μπορεί να εξετασθεί πειραματικά:

1. Η αδενυλική κυκλάση ενός κυττάρου-στόχου θα πρέπει να διεγείρεται από τις ορμόνες που επηρεάζουν το κύτταρο αυτό. Στα κύτταρα που δεν παρατηρείται χαρακτηριστική βιολογική απόκριση προς την ορμόνη δεν θα πρέπει να παρουσιάζεται αύξηση των επιπέδων της αδενυλικής κυκλάσης όταν αυτά προστίθεται η ορμόνη.

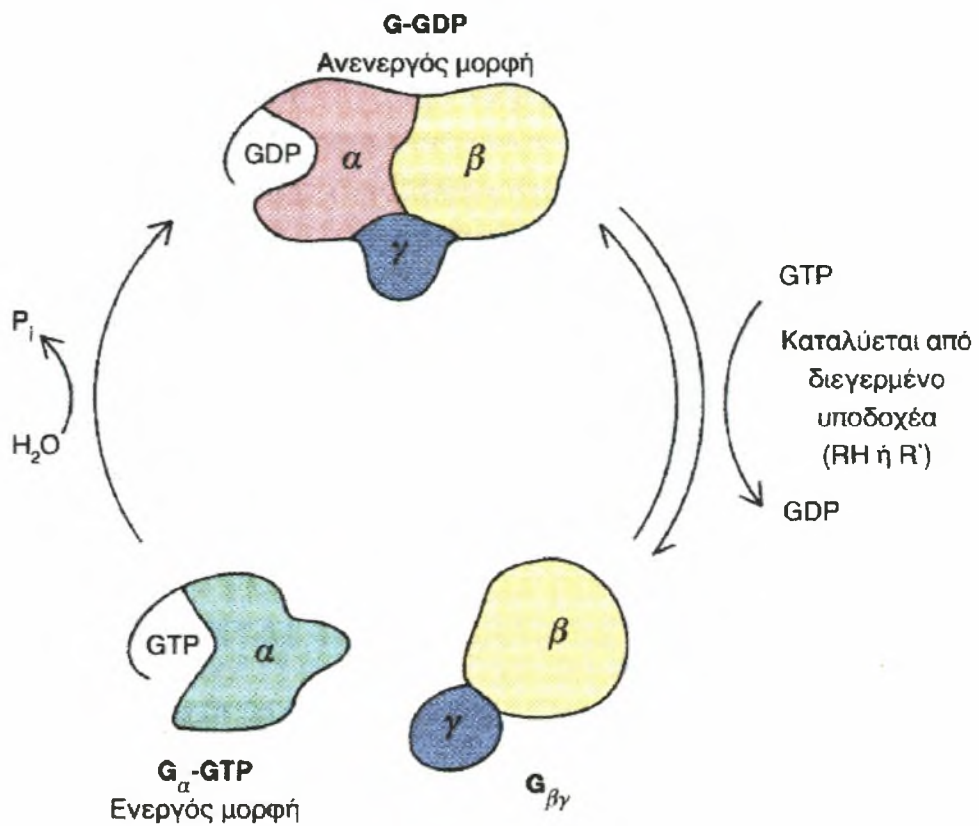
2. Σε ένα κύτταρο-στόχο η αλλαγή στη συγκέντρωση του κυκλικού AMP θα πρέπει να έπεται ή να παρατηρείται ταυτόχρονα με την απόκριση στην ορμονική διέγερση. Διακυμάνσεις στα επίπεδα των ορμονών θα πρέπει να συμβαδίζουν με διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του κυκλικού AMP.
3. Αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης, όπως η θεοφυλλίνη και η καφεΐνη, θα πρέπει να παρουσιάζουν συνεργειακή δράση με τις ορμόνες που ενεργούν μέσω του κυκλικού AMP.
4. Προσθήκη του κυκλικού AMP ή σχετικών ενώσεων θα πρέπει να μιμείται την βιολογική επίδραση των ορμονών. (Στην πράξη όμως το cAMP δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί, επειδή δεν διαπερνά εύκολα τα κύτταρα. Τα λιγότερο πολικά παράγωγα του AMP όμως, όπως το διβουτυρυλο-κυκλικό AMP, εισέρχονται στα κύτταρα και είναι ενεργά).

Πειράματα βασισμένα στα ανωτέρω κριτήρια έχουν δείξει ότι το κυκλικό AMP είναι ένα δεύτερο μήνυμα πολλών ορμονών και όχι μόνο της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης. Το κυκλικό AMP επηρεάζει μια μεγάλη κλίμακα κυτταρικών διεργασιών: επαυξάνει, για παράδειγμα, την διάσπαση των αποθηκευμένων πηγών ενέργειας, αυξάνει την έκκριση οξέος από το γαστρικό επιθήλιο, οδηγεί σε διασκόρπιση των κοκκίων μελανίνης και μειώνει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων.

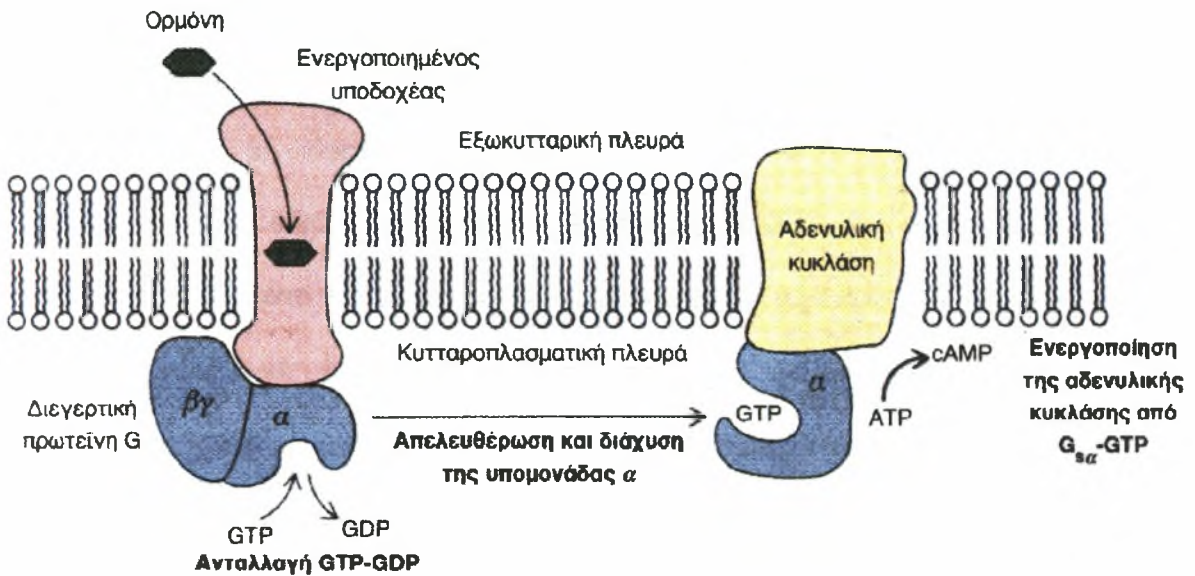
Με ποιο τρόπο η δέσμευση μιας ορμόνης, π.χ., της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης, με έναν υποδοχέα οδηγεί σε ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης; Μια ένδειξη-κλειδί υπήρξε η παρατήρηση του Martin Rodbell ότι, εκτός από την ορμόνη, απαραίτητη προϋπόθεση για ενεργοποίηση είναι η προσθήκη GTP. Εξίσου αποκαλυπτική ήταν η παρατήρηση ότι η ορμόνη ενεργοποιεί την υδρόλυση του GTP. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται

με γουανυλονουκλεοτίδιο αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο της πορείας της ενεργοποίησης. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε πρωτεΐνη G (όπου G το αρχικό της λέξεως Guanyl). Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα δεν διεγείρει άμεσα την αδενυλική κυκλάση. Αντίθετα, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας διεγείρει την πρωτεΐνη G, η οποία μεταφέρει το διεγερτικό μήνυμα στην αδενυλική κυκλάση. Αυτή η πορεία μεταγωγής του σήματος λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη.

Αλλά πώς ελέγχει η πρωτεΐνη G την αδενυλική κυκλάση και ποιος είναι ο ρόλος του GTP σε αυτήν την πορεία; Ο Alfred Gilman έδειξε ότι η πρωτεΐνη G είναι μια περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από μια υπομονάδα α (45 kd), μια β (35 kd) και μια γ (7 kd) (15). Η πρωτεΐνη αυτή μεταπίπτει μεταξύ μιας στερεοδιάταξης που δεσμεύει GDP και μιας που δεσμεύει GTP (Εικόνα 4). Η μορφή με GTP ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, ενώ αυτή με GDP όχι. Απουσία της ορμόνης, σχεδόν όλη η πρωτεΐνη G βρίσκεται στην ανενεργό μορφή GDP. Η δέσμευση της ορμόνης με τον υποδοχέα πυροδοτεί την ανταλλαγή GTP με GDP. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα (αλλά όχι ο υποδοχέας από μόνος του) δεσμεύεται με την πρωτεΐνη G, επάγει την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP και επιτρέπει τη δέσμευση GTP. Η υπομονάδα α που φέρει GTP (G_α - GTP) δίσταται από την υπομονάδα $\beta\gamma$. Η αδενυλική κυκλάση κατόπιν ενεργοποιείται από την G_α - GTP. Έτσι, η ροή πληροφοριών είναι από το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα στην πρωτεΐνη G και από εκεί στην αδενυλική κυκλάση (Εικόνα 5). Το κύριο συμπέρασμα είναι ότι το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα καταλύει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G. Για κάθε μόριο δεσμευμένης ορμόνης σχηματίζονται πολλά σύμπλοκα G_α -GTP και αυτό οδηγεί σε ενίσχυση της απόκρισης.



Εικόνα 4. Οι πρωτεΐνες G μεταπίπτουν από μία αδρανή μορφή GDP σε μία ενεργό GTP, και αντίστροφα. Η ανταλλαγή GTP σε δεσμευμένο GDP καταλύεται από το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα. Η υδρόλυση του δεσμευμένου GTP επαναφέρει την πρωτεΐνη G στην ανενεργό μορφή. Η ενέργεια για τον κύκλο αυτό πηγάζει από την φωσφορική ομάδα του GTP.



Εικόνα 5. Η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης με την δέσμευση της ορμόνης με τον ειδικό υποδοχέα της επάγεται από τη G_s – μία διεγερτική πρωτεΐνη G. Ένα απλό σύμπλοκο ορμόνης – υποδοχέα καταλύει τον σχηματισμό πολλών μορίων G_s. Η υδρόλυση του δεσμευμένου GTP από την υπομονάδα α της G_s τερματίζει την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης.

Αλλά πώς διακόπτεται η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης; Η πρωτεΐνη G έχει και μια ακόμη ιδιότητα που την καθιστά ικανή να δρα ως μηνυματοφόρο ενδιάμεσο μεταξύ των υποδοχέων της ορμόνης και της αδενυλικής κυκλάσης. Το GTP που βρίσκεται δεσμευμένο με την υπομονάδα α της πρωτεΐνης G υδρολύεται με αργό ρυθμό σε GDP. Με άλλα λόγια, η πρωτεΐνη G είναι μια GTPάση. Έτσι, η ρυθμιστική αυτή πρωτεΐνη φέρει έναν ενδογενή μηχανισμό απενεργοποίησης. Το ποσοστό της πρωτεΐνης G στη μορφή GTP και, συνεπώς, της αδενυλικής κυκλάσης σε ενεργό μορφή, εξαρτάται από τον ρυθμό ανταλλαγής GTP με GDP, σε σύγκριση με τον ρυθμό υδρόλυσης του δεσμευμένου GTP. Ο ρυθμός ανταλλαγής GTP-GDP, απουσία της ορμόνης, είναι πολύ χαμηλός επειδή η μη καταλύομενη αντίδραση έχει μεγάλη

ενέργεια ενεργοποίησης. Έτσι, σχεδόν όλη η πρωτεΐνη G βρίσκεται στη μορφή GDP και σχεδόν όλη η αδενυλική κυκλάση είναι ανενεργός. Η δέσμευση της ορμόνης με τον υποδοχέα οδηγεί σε ενίσχυση του σχηματισμού G_{α} - GTP η οποία και ενεργοποιεί με ταχύ ρυθμό την αδενυλική κυκλάση αφού δεσμευθεί με αυτήν. Η υδρόλυση δεσμευμένου GTP από την G_{α} κλείνει τον ορμονοπυροδοτούμενο κύκλο. Οι πρωτεΐνες G λαμβάνουν μέρος σε πολλές αντιδράσεις μεταγωγής του αρχικού ορμονικού σήματος. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη G που ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση ονομάζεται διεγερτική πρωτεΐνη G (Gs).

Η επινεφρίνη, η οποία αποκαλείται και αδρεναλίνη, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση δεσμευόμενη με τον β-αδρενεργικό υποδοχέα, μια ενδογενή μεμβρανική πρωτεΐνη (MB 64 kd) των κυττάρων-στόχων. Ο καθαρισμός του υποδοχέα αυτού επέτρεψε την κλωνοποίηση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου του. Το διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης αυτής έδειξε ότι περιέχει επτά διαμεμβρανικές έλικες, όπως και άλλοι υποδοχείς που δρουν μέσω των πρωτεϊνών G. Αυτό το επταλικοειδές μοτίβο βρίσκεται για παράδειγμα στη ροδοψίνη (φωτοδεκτική πρωτεΐνη των ραβδίων του αμφιβληστροειδούς, και στον μουσκαρινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (ο οποίος ελέγχει το κανάλι K^{+} των καρδιακών κυττάρων). Το αμινοτελικό άκρο των υποδοχέων αυτών, που περιέχει N-δεσμευμένους ολιγοσακχαρίτες, βρίσκεται στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης και το καρβοξυ-τελικό άκρο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά: Η θέση δέσμευσης της επινεφρίνης βρίσκεται σε μια κοιλότητα που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G από τον β-αδρενεργικό υποδοχέα δεν εξαρτάται μόνον από το εάν η ορμόνη είναι δεσμευμένη με τον υποδοχέα. Οι υποδοχείς

που εκτίθενται για ένα μακροχρόνιο διάστημα σε ένα σταθερό επίπεδο επινεφρίνης δεν καταλύουν αποδοτικά την ανταλλαγή GTP-GDP. Αυτή η αλλαγή της σχέσης ερεθισμού-απόκρισης (ένα γενικό χαρακτηριστικό των αισθητηρίων συστημάτων) ονομάζεται απευαισθητοποίησή ή προσαρμογή. Τα βιολογικά συστήματα μεταγωγής σημάτων αντιδρούν σε αλλαγές στη συγκέντρωση των ερεθισμάτων και όχι στην απόλυτη συγκέντρωσή τους. Η προσαρμογή είναι μια πλεονεκτική κατάσταση, επειδή καθιστά τους υποδοχείς ικανούς να λειτουργούν σε μια ευρεία κλίμακα συγκέντρωσης ερεθιστικών μορίων. Το καρβοξυτελικό άκρο του β-αδρενεργικού υποδοχέα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή. Η σερίνη της περιοχής αυτής φωσφορυλιώνεται από μια ειδική κινάση που ενεργεί στο σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα, αλλά όχι στον απλό υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση πολλαπλών θέσεων παρεμποδίζει το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα από την καταλυτική του δράση στην ανταλλαγή GTP-GDP και κατ' αυτό τον τρόπο αναστέλλει τη μετάδοση του σήματος. Η ευαισθησία επανακτάται με την απομάκρυνση του φωσφορικού μέσω μιας φωσφατάσης

Πώς επηρεάζει το κυκλικό AMP τόσες πολλές κυτταρικές διεργασίες; Υπάρχει κάποιος κοινός παρονομαστής για τις διαφορετικές τους επιδράσεις; Υπάρχει πράγματι κοινός παρονομαστής, και η απάντηση προήλθε και πάλι από μελέτες ελέγχου του μεταβολισμού του γλυκογόνου, που θεωρείται ως μεταβολικός «τόπος γέννησης» του cAMP. Οι Edwin Krebs και Donal Walsh ανακάλυψαν ότι το cAMP ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση. Στον σκελετικό μυ αυτή η κινάση φωσφορυλιώνει και την συνθετάση του γλυκογόνου (που την αδρανοποιεί) και την κινάση της φωσφορυλάσης (που την ενεργοποιεί). Με αυτόν τον τρόπο το cAMP ενεργοποιεί την διάσπαση του γλυκογόνου και σταματά τη σύνθεσή του. Ένας παρόμοιος μηχανισμός λειτουργεί και στο ήπαρ. Στην πραγματικότητα όλες οι γνωστές επιδράσεις του cAMP στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών. Οι

πρωτεϊνικές κινάσες αυτές, που ενεργοποιούνται από συγκεντρώσεις του cAMP της τάξης των 10^{-8} M, τροποποιούν την δραστικότητα πρωτεϊνικών στόχων φωσφορυλιώνοντας την σερίνη των αλληλουχιών Arg-Arg-Ser-X (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της κινάσης που ελέγχεται από το cAMP παρουσιάζει ενδιαφέρον. Το ένζυμο των μυϊκών κυττάρων αποτελείται από δυο είδη υπομονάδων: Μια ρυθμιστική (R) υπομονάδα (MB 49 kd) η οποία μπορεί να δεσμεύει το cAMP και μια καταλυτική (C) υπομονάδα (MB 38 kd). Απουσία του cAMP οι ρυθμιστικές και καταλυτικές υπομονάδες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο R_2C_2 το οποίο είναι ανενεργό. Η δέσμευση δύο cAMP με κάθε μία από τις ρυθμιστικές υπομονάδες οδηγεί στη διάσπαση του συμπλόκου R_2C_2 σε μία υπομονάδα R_2 και σε δύο υπομονάδες C. Αυτές οι ελεύθερες καταλυτικές υπομονάδες είναι ενεργές. Έτσι, η δέσμευση του cAMP με τη ρυθμιστική υπομονάδα αναιρεί την αναστολή που προκαλείται στην καταλυτική υπομονάδα. Το cAMP δρα ως αλλοστερικός τροποποιητής. Η παρουσία ξεχωριστών καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων στην πρωτεϊνική κινάση θυμίζει την ασπαραγινική τρανσκαρβαμύλαση.

Η συγκέντρωση πολλών ορμονών στο αίμα είναι της τάξης των 10^{-10} M. Η αλληλουχία αντιδράσεων που προκαλείται από την αδενυλική κυκλάση μεγεθύνει τα ασθενή αυτά ορμονικά ερεθίσματα. Η μεγέθυνση αυτή γίνεται σε τρία στάδια: (1) κάθε σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα καταλύει τον σχηματισμό πολλών $G_\alpha - GTP$, (2) πολλά μόρια cAMP σχηματίζονται από μια ενεργοποιημένη αδενυλική κυκλάση, και (3) κάθε πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από cAMP μπορεί να αλλάξει τη δραστικότητα πολλών μορίων κάθε πρωτεΐνης-στόχου της.

Τι οδήγησε στην επιλογή του cAMP κατά την πορεία της εξέλιξης ως μηνυματοφόρου μορίου; Τρεις παράγοντες εμφανίζονται ως σημαντικοί:

1. Το cAMP προέρχεται από ATP, ένα μόριο πανταχού παρόν, με μια απλή αντίδραση που προωθείται από την υδρόλυση πυροφωσφορικού.
2. Αν και προέρχεται από ένα απλό μόριο που βρίσκεται στο κέντρο των μεταβολικών μετασχηματισμών, το ίδιο το cAMP δεν αποτελεί μέρος μιας κύριας μεταβολικής οδού. Αντίθετα, εμπλέκεται μόνο στην ολοκλήρωση του μεταβολισμού και δεν αποτελεί πρόδρομη ουσία ούτε ενδιάμεσο στην παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωσή του μπορεί να ελέγχεται ανεξάρτητα. Επιπλέον, το cAMP είναι σταθερό, εκτός αν υδρολυθεί από μια ειδική φωσφοδιεστεράση.
3. Οι πολλαπλές λειτουργικές ομάδες του cAMP το καθιστούν ικανό να δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς με πρωτεϊνικούς υποδοχείς, όπως είναι η ρυθμιστική μονάδα της πρωτεϊνικής κινάσης των μυϊκών κυττάρων, και να προκαλεί αλλοστερικά φαινόμενα.

6. ΑΝΤΙΔΙΟΥΡΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ (ADH)

Τα κύτταρα του σώματος, για να λειτουργούν φυσιολογικά, πρέπει να περιλούονται από το εξωκυττάριο υγρό, με σχετικά σταθερή συγκέντρωση ηλεκτρολυτών και άλλων διαλυμένων ουσιών. Η ολική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών στο εξωκυττάριο υγρό και κατά συνέπεια και η οσμωγραμμομοριακότητα, καθορίζονται από το ποσό των διαλυμένων ουσιών, δια του όγκου του εξωκυττάριου υγρού. Έτσι, ως επί το πλείστον η συγκέντρωση νατρίου και η οσμωγραμμομοριακότητα, στο εξωκυττάριο υγρό ρυθμίζονται από το ποσό του εξωκυττάριου νερού (16).

Υπάρχει ένα ισχυρό ανατροφοδοτικό σύστημα για τον έλεγχο της οσμωτικότητας του πλάσματος και της συγκέντρωσης νατρίου, το οποίο λειτουργεί με μεταβολή της απέκκρισης διαλυμένων ουσιών. Ένας πρωτογενής εκτελεστικός παράγων αυτής της ανατροφοδότησης είναι η αντιδιουρητική ορμόνη (ADH), η οποία αποκαλείται επίσης και βαζοπρεσσίνη.

Η ADH είναι πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από εννέα αμινοξέα.

Η σειρά των αμινοξέων είναι η ακόλουθη:

Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Cly

Η ADH παράγεται από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης, που ονομάζεται και νευροϋπόφυση, ο οποίος αποτελείται κατά κύριο λόγο από κύτταρα που μοιάζουν με νευρογλοιακά κύτταρα, και τα οποία ονομάζονται υποφυσεοκύτταρα. Τα υποφυσεοκύτταρα δεν εκκρίνουν ορμόνες. Λειτουργούν μόνο ως ερειστική δομή για μεγάλο αριθμό τελικών νευρικών απολήξεων νευρικών ιών, που προέρχονται από τους υπεροπτικούς και παρακοιλιακούς πυρήνες του υποθαλάμου. Οι νευρικές αυτές δεσμίδες φέρονται προς τη νευροϋπόφυση μέσα στο μίσχο της υπόφυσης. Οι νευρικές αυτές απολήξεις μοιάζουν με βολβώδεις κόμβους, και περιέχουν πολλά εκκριτικά

κοκκία, βρίσκονται δε σε επαφή με την επιφάνεια των τριχοειδών προς τα οποία εκκρίνουν την αντιδιουρητική ορμόνη.

Οι φυσιολογικές λειτουργίες της αντιδιουρητικής ορμόνης σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ίδιες με τις λειτουργίες της στα νεφρικά κύτταρα. Εξαιρετικά ελάχιστα ποσά αντιδιουρητικής ορμόνης –ως και 2 νανογραμμάρια, ng – όταν ενίενται σε άτομο, μπορούν να έχουν αντιδιουρητική ενέργεια, δηλαδή ελάττωση της απέκκρισης νερού από τους νεφρούς. Απουσία ADH, τα αθροιστικά και αποχετευτικά σωληνάκια στους νεφρούς είναι σχεδόν αδιάβατα από το νερό, με αποτέλεσμα την μη απορρόφηση του νερού, και την απώλειά του σε μεγάλα ποσά προς τα ούρα.. Αντίθετα όταν υπάρχει η ADH, η διαπερατότητα των αθροιστικών και αποχετευτικών σωληναρίων των νεφρών για το νερό αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα την επαναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του νερού κατά την δίοδο του ενδοσωληνιακού υγρού από αυτά τα σωληνάκια, την εξοικονόμηση νερού για το σώμα με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ πυκνών ούρων. Χωρίς τη ADH, η προς τον αυλό των σωληναρίων μεμβράνη των σωληναριακών κυττάρων είναι σχεδόν αδιαπέραστη στο νερό. Όταν η ADH επιδρά στο κύτταρο, πρώτα συνδέεται με υποδοχείς στην μεμβράνη οι οποίοι προκαλούν την παραγωγή cAMP. Αυτή με την σειρά της προκαλεί φωσφορυλίωση στοιχείων που βρίσκονται μέσα στα ειδικά κυστίδια, με αποτέλεσμα τα ειδικά αυτά κυστίδια να συντήκονται με εξωκύττωση στην κυτταρική μεμβράνη προς την κορυφή του κυττάρου, και έτσι να παρέχουν πολλές περιοχές με αυξημένη διαπερατότητα στο νερό. Όλα αυτά επιτελούνται σε 5 έως 10 λεπτά. Απουσία ADH, ολόκληρη η διεργασία αναστρέφεται σε άλλα 5 έως 10 λεπτά. Έτσι με αυτή τη διεργασία παρέχονται πρόσκαιρα πολλοί νέοι πόροι που επιτρέπουν την ελεύθερη διάχυση νερού από τον αυλό του σωληναρίου προς τον διάμεσο χώρο της μυελώδης μοίρας του νεφρού. Με αυτόν τον τρόπο απορροφάται H₂O από τα

αθροιστικά και αποχετευτικά σωληνάκια με ώσμωση στον μηχανισμό των νεφρών για την συμπύκνωση των ούρων.

Το 1971 με μελέτη των Lipton and Edelman σε απομονωμένη ουροδόχο κύστη φρόνου αναφέρθηκε ότι τα πεπτίδια της νευροϋπόφυσης προκαλούν μία παροδική αύξηση στην μεταφορά ιόντων Na δια μέσου των επιθηλίων (17). Επίκαιρες απόψεις σχετικά με τους μηχανισμούς που περιλαμβάνονται σε αυτές τις ρυθμιστικές διαδικασίες, ως επί το πλείστον, έχουν βασιστεί σε ένα πρότυπο που τα περιορισμένου χρόνου βήματα τοποθετούνται στις κορυφαίες και βασεοπλευρικές πλασματικές μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων στη σειρά.. Γενικά οι μηχανισμοί της διαπερατότητας της μεμβράνης από τα ιόντα νατρίου καθορίστηκαν ως εξής: 1) Η ορμόνη μπορεί να διευκολύνει την είσοδο των ιόντων στο επιθηλιακό κύτταρο με την ενίσχυση της αγωγιμότητας στην ακραία πλευρά των κυττάρων. Η επακόλουθη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Na^+ θα ενεργοποιούσε την αντλία Na^+ στην βασεοπλευρική επιφάνεια με αποτέλεσμα μία σταθερή αύξηση στην μεταφορά δια μέσου του επιθηλίου στα κορυφαία και στα βασεοπλευρικά όρια των κυττάρων. 2) Η ορμόνη μπορεί να αυξήσει την δραστηριότητα της αντλίας Na^+ στα βασεοπλευρικά όρια του κυττάρου. Κατά συνέπεια η ενδοκυττάρια ενεργότητα του Na^+ θα έπεφτε, ώστε να αυξηθεί η είσοδος ιόντων με παθητική μεταφορά δια μέσω των κορυφαίων πλευρών ώστε να επιτευχθεί μια νέα σταθερή κατάσταση. 3) Η ορμόνη μπορεί ταυτόχρονα να αυξήσει την αγωγιμότητα των κορυφαίων πλευρών και να μιμηθεί την δράση της αντλίας Na^+ αναλογικά. Σε αυτή την νέα σταθερή κατάσταση η αύξηση της διαμεμβρανικής μεταφοράς μπορεί να προκαλέσει μικρή ή καμία αλλαγή στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση Na^+ .

Η βασική μεμβράνη πολλών επιθηλίων που παρουσιάζουν υψηλή ηλεκτρική αντίσταση έχει εξειδικευμένους διαύλους Na^+ οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την υψηλή χημική συγγένεια με την διουρητική αμιλορίδη. Αυτοί οι διάυλοι συμμετέχουν στην είσοδο των ιόντων νατρίου στο επιθηλιακό κύτταρο κατά την πρώτη φάση της ενεργητικής μεταφοράς των ιόντων (18).

Οι διάυλοι αυτοί ρυθμίζονται από την αντιδιουρητική ορμόνη η οποία συνδέεται στον μεμβρανικό υποδοχέα και ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP (19). Η δράση αυτή έχει μελετηθεί εκτενώς σε δέρμα βατράχου και σε ουροδόχο κύστη φρύνου (20). Η εφαρμογή της ADH στην πλευρά του ορογόνου υμένα ενός τοποθετημένου δέρματος βατράχου ή μιας ουροδόχου κύστης προκαλεί από διπλή έως και τετραπλή αύξηση I_{sc} (αντίστασης), η οποία αναπτύσσεται μέσα σε 10-15 λεπτά. Η αλλαγή αυτή συνοδεύεται από μία μείωση της ηλεκτρικής αντίστασης και από μία αύξηση του Na^+ δηλαδή χαρακτηρίζεται από μία αύξηση του ενδοκυττάρου Na.

Από τους Li et al. το 1982 (21) αναλύθηκαν τα αποτελέσματα της ADH στις διακυμάνσεις των αποπολωμένων από K^+ κυστών που προκλήθηκαν από αμιλορίδη. Αναφέρθηκε ότι η αντίδραση που αφορούσε την αύξηση του Na^+ από την ορμόνη θα μπορούσε να αποτελείται πλήρως από μία αύξηση της πυκνότητας των πλευρών που περιέχουν υποδοχείς Na^+ , χωρίς καμία αλλαγή στο απλού διαύλου ρεύμα. Αυτό επιβεβαιώθηκε το 1983 όταν χρησιμοποιήθηκε βαζοπρεσίνη σε μη εκπολωμένο από ιόντα καλίου δέρμα βατράχου (22). Το γεγονός ότι η ADH, όπως και η αλδοστερόνη αυξάνει την πυκνότητα των ανοιχτών διαύλων χωρίς να επηρεάζονται οι ιδιότητές τους, αυξάνει την πιθανότητα οι δύο ορμόνες να ανήκουν στην ίδια ομάδα ορμονών που δρουν στους ίδιους αδρανείς υποδοχείς διαύλων. Αυτό αποδεικνύεται από δύο γεγονότα. Πρώτον τα αποτελέσματα των δύο ορμονών ήταν προσθετικά ή και

συνεργικά δηλαδή η απόκριση των επιθηλιακών κυττάρων στην αλδοστερόνη δεν αποκλείει την δυνατότητά τους να αποκριθούν και στην ADH (23). Η διεγερτική επίδραση της αλδοστερόνης στην απόκριση της βαζοπρεσίνης θα μπορούσε να προκύψει από μία παρεμπόδιση της διακοπής του cAMP που προκλήθηκε από στεροειδή (24) ή λόγω της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών. Δεύτερον, η επεξεργασία της επιφάνειας της ουροδόχου κύστης του φρύνου αναστέλλει την αντίδραση στην αλδοστερόνη, όχι όμως και στην βαζοπρεσίνη.

Με την έρευνα αυτή εξεξηγήθηκε ο σημαντικός ρόλος των δύο «κλασσικών» δευτεροβάθμιων αγγελιοφόρων cAMP και Ca^{2+} . Οι ακριβείς όμως μηχανισμοί δεν ήταν κατανοητοί. Οι μετρήσεις όμως που έγιναν επέτρεψαν την κατάρτιση ενός δοκιμαστικού προτύπου που μπορούσε να συνοψιστεί στα εξής:

1) Τα ιόντα ασβεστίου μπορούν άμεσα να παρεμποδίσουν τους διαύλους νατρίου δεσμεύοντας την πρωτεΐνη των διαύλων στην μία πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (25). Κατά συνέπεια οι δίοδοι μπορούν να υπάρξουν με τρεις μορφές σε ισορροπία: αγωγιμοί, μη αγωγιμοί και μπλοκαρισμένοι από ιόντα ασβεστίου.

2) Άλλες διαδικασίες που προκαλούνται από μία αύξηση του cAMP από τρανσμεθυλίωση μπορούν να ανατροφοδοτήσουν αυτή την ισορροπία με την ενεργοποίηση των υποδοχέων των διαύλων.

3) Μία μείωση των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο, προκαλεί με αργούς ρυθμούς μία άλλη διαδικασία η οποία ενεργοποιεί διαύλους με το να προκαλεί αργά μία σταθερή τροποποίηση ενός τμήματος των μεμβρανών (26). Αυτή η διαδικασία είναι διαφορετική από αυτή που αναφέρθηκε πιο πάνω.

4) Τα ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν το επίπεδο του cAMP μέσω της υποκίνησης της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών και μέσω της άμεσης ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης που είναι εξαρτώμενη από τα ιόντα ασβεστίου (27). Μία αύξηση

των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο μπορεί να αυξήσει το επίπεδο του βασικού cAMP και να μειώσει το επίπεδο του cAMP που παράχθηκε από την ADH.

Το 1991 από τους J. Calamita et al. μελετήθηκε πιο συγκεκριμένα η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης ως απάντηση στην δράση της αντιδιουρητικής ορμόνης, σε ουροδόχο κύστη αμφίβιου (28). Η ουροδόχος κύστη των αμφιβίων είναι μία από τις μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν πολύ στην μελέτη της απόκρισης στην αντιδιουρητική ορμόνη. Στον ιστό αυτό, η ADH δεσμεύεται στον υποδοχέα και υποκινεί την παραγωγή ενός ενδοκυττάριου μεσολαβητή, το 3',5'αδενοσίνο-κυκλικό μονοφωσφαρικό (cAMP), όπως είχε ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Αυτός ο δεύτερος αγγελιοφόρος αρχίζει στη συνέχεια τα επόμενα βήματα που οδηγούν τελικά σε συγκεκριμένες αλλαγές στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης.

Μορφολογικές μελέτες που έγιναν με μέθοδο της ψυκτικού μικροτόμου έχουν αποκαλύψει ότι η διέγερση της ADH αυξάνει την εμφάνιση των οργανωμένων σειρών των διαμεμβρανικών συνόλων μορίων (IMP) στην κυτταρική μεμβράνη κοκκωδών κυττάρων (29). Στα αδρανή κύτταρα αυτά τα σύνολα βρίσκονται κανονικά μέσα στην περιοριστική μεμβράνη των κυτταροπλασματικών σωληνοειδών κυστών ονομάζονται συσσωματώματα (**aggrefores**), τα οποία ενσωματώνονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ως αντίδραση στο ορμονικό ερέθισμα. Ο αριθμός των κυτταρικών συνόλων IMP και η επιφάνειά τους σχετίζονται με την ανεπαρκή αύξηση της διαπερατότητας του ύδατος από την ADH και τους σχετικούς μεσολαβητές. Κατά συνέπεια θεωρούνται ότι περιέχουν συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς διαύλους διαπερατούς συγκεκριμένα στο νερό.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα από 12 πρόβατα και των δύο φύλλων. Η συλλογή του ιστού έγινε στο σφαγείο. Ο ιστός τοποθετήθηκε άμεσα σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs στους 4° C και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο μέσα σε 30 λεπτά.

Η σύνθεση του διαλύματος Krebs όπου διατηρήθηκαν τα τμήματα του ιστού ήταν σε mM: 117,5 NaCl, 1,15 NaH₂PO₄, 24,99 NaHCO₃, 5,65 KCl, 1,18 MgSO₄, 2,52 CaCl₂ και 5,55 γλυκόζη. Το pH του διαλύματος ήταν 7,4. Το διάλυμα, όπως γινόταν πριν από κάθε πείραμα θερμάνθηκε στους 37° C επειδή η ενεργητική μεταφορά επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Στο διάλυμα διοχετευόταν συνεχώς αέριο σύνθεσης: 95% O₂ και 5% CO₂.

Εφόσον ο ιστός διατηρείτο σε διάλυμα Krebs στους 4°C, ήταν εφικτό από ένα ζώο να γίνουν πολλά πειράματα.

Τμήματα του πνευμονικού υπεζωκότα αποκολλήθηκαν από τον υποκείμενο ιστό και ειδικότερα από τους άνω, μέσους και κάτω λοβούς του αριστερού και δεξιού πνεύμονα με πολλή προσοχή. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποκολλήθηκε από τις πλευρές. Εδόθη ιδιαίτερη σημασία στην ακεραιότητα των μεμβρανών και γενικότερα στο να αγγιχτεί ο ιστός το λιγότερο δυνατόν.

Ο υπεζωκότας τοποθετήθηκε σε ένα θάλαμο Ussing μεταξύ δύο δεξαμενών με διάλυμα Krebs που οξυγονωνόταν συνεχώς με 95% O₂ και 5% CO₂ και μεταξύ δύο κυλίνδρων από σιλικόνη (SYLGAR D Silicone – elastomer kit). Η μέθοδος αυτή ελαχιστοποιεί τη βλάβη που προκαλείται στον ιστό από την πίεση στην αντλία. Κάθε δεξαμενή είχε σχήμα κωνικό με ολικό όγκο περίπου 20 ml. Η επιφάνεια του

εκτεθειμένου ιστού ήταν $1,43 \text{ cm}^2$. Όλες οι μετρήσεις της διαφοράς δυναμικού έγιναν στους 37° C λόγω της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργητική μεταφορά των ιόντων.

Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του πνευμονικού και τοιχωματικού υπεζωκότα μετρήθηκε με ηλεκτρόδια Ag/AgCl (3M KCl , 3% άγαρ), τα οποία κατασκευάσαμε μόνοι μας και τοποθετήθηκαν εκατέρωθεν της μεμβράνης και η καταγραφή ενισχύετο από ενισχυτή τύπου PVC-3 αντίστασης εισόδου 10Ω , της World Precision Instruments. Για να προσδιορισθεί η ανταπόκριση του δυναμικού σε εξωγενή χορήγηση ρεύματος, συνεχές ρεύμα χορηγήθηκε από μία συσκευή voltage – clamp (model DVC 100, World Precision Instruments) διαμέσου ηλεκτροδίων τοποθετημένων σε απόσταση 30 χιλιοστών από τις δύο πλευρές της μεμβράνης.

Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του πνευμονικού και του τοιχωματικού υπεζωκότα, μετρήθηκε στο $1^\circ, 5^\circ, 10^\circ, 15^\circ, 30^\circ, 45^\circ, 60^\circ$ λεπτό χωρίς χορήγηση ρεύματος. Στη συνέχεια χορηγήθηκε ρεύμα με μεταβλητή ένταση (0-400 μA , και -400-0 μA) και μετρήθηκε η μεταβολή του δυναμικού τόσο στον πνευμονικό όσο και στον τοιχωματικό υπεζωκότα στους ίδιους χρόνους.

Η αντίσταση του ιστού (R_{TE}) υπολογίστηκε βάση του νόμου του Ohm ($R=V/I$, R = αντίσταση, V =δυναμικό I =ρεύμα), από τις αποκλίσεις του δυναμικού σε απάντηση στο χορηγούμενο ρεύμα. Στην συνέχεια εφαρμόσαμε $R_{TE} \cdot \text{cm}^2$. Οι αλλαγές της διαπερατότητας καθορίστηκαν σύμφωνα με τις αλλαγές της αντίστασης.

Η πλευρά του υπεζωκότα που φυσιολογικά αντικρίζει την υπεζωκοτική κοιλότητα ονομάζεται έσω, ενώ η πλευρά που βρίσκεται προς τον διάμεσο ιστό έξω.

Στη συνέχεια προστέθηκε στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα καθώς επίσης και στην πλευρά προς τον ενδιάμεσο ιστό του τοιχωματικού και πνευμονικού υπεζωκότα αντιδιουρητική ορμόνη

(ADH) σε συγκεντρώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν στους καθορισμένους χρόνους. Η ορμόνη ήταν προϊόν της εταιρείας SIGMA [Arginin⁸] + Vasopressine με M.B. 1084,2. Η ίδια πειραματική διαδικασία έγινε σε σειρά δώδεκα πειραμάτων με προσθήκη ADH και του αναστολέα L- NAME με συγκέντρωση 10^{-4} , 10^{-3} M.

Ο αναστολέας L-NAME ήταν προϊόν της SIGMA NW-NITRO-L-ARGININE METHYL ESTER με M.B. 269,7.

Η στατιστική ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα SPSS for WINDOWS. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσοι όροι \pm σταθερή απόκλιση (SD) και η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με paired t-test. Θεωρήσαμε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς όταν το p ήταν μικρότερο από 0,05.

7.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια και γεμίστηκαν οι αντλίες με Krebs χωρίς να τοποθετηθεί ιστός και προσέχοντας να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα κοντά στα ηλεκτρόδια.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων γίνεται εξοικείωση της συσκευής με Dummy membrane (DVC-2).

Τοποθετήθηκε ο ιστός και αφέθηκε να ηρεμήσει έχοντας Krebs και από τις δύο πλευρές για τουλάχιστον 30 min και με συνεχή παροχή 95% O₂ και CO₂.

Έγιναν οι μετρήσεις, δηλαδή χορηγήθηκε ρεύμα (0,100,200,300,400 μ A) και καταγράφηκε το δυναμικό σε Krebs χωρίς ιστό (μία φορά), σε Krebs με ιστό (control) και Krebs με αντιδιουρητική ορμόνη και ιστό. Οι μετρήσεις έγιναν στους χρόνους που είχαν επιλεχθεί (1', 5', 10', 15', 30', 45' και 60') τόσο στην σπλαχνική, όσο και στην τοιχωματική επιφάνεια.

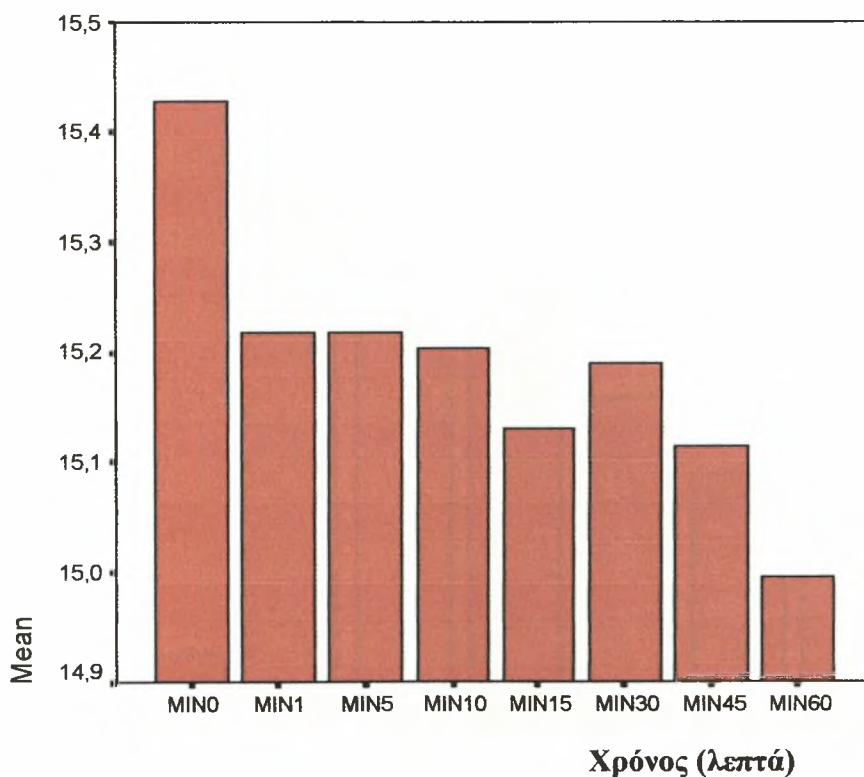
Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 6 φορές.

Στο τέλος κάθε πειράματος ο ιστός αφέθηκε να στεγνώσει για 24 ώρες και μετά ζυγίσθηκε.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Αντίσταση του Control στον πνευμονικό υπεζωκότα

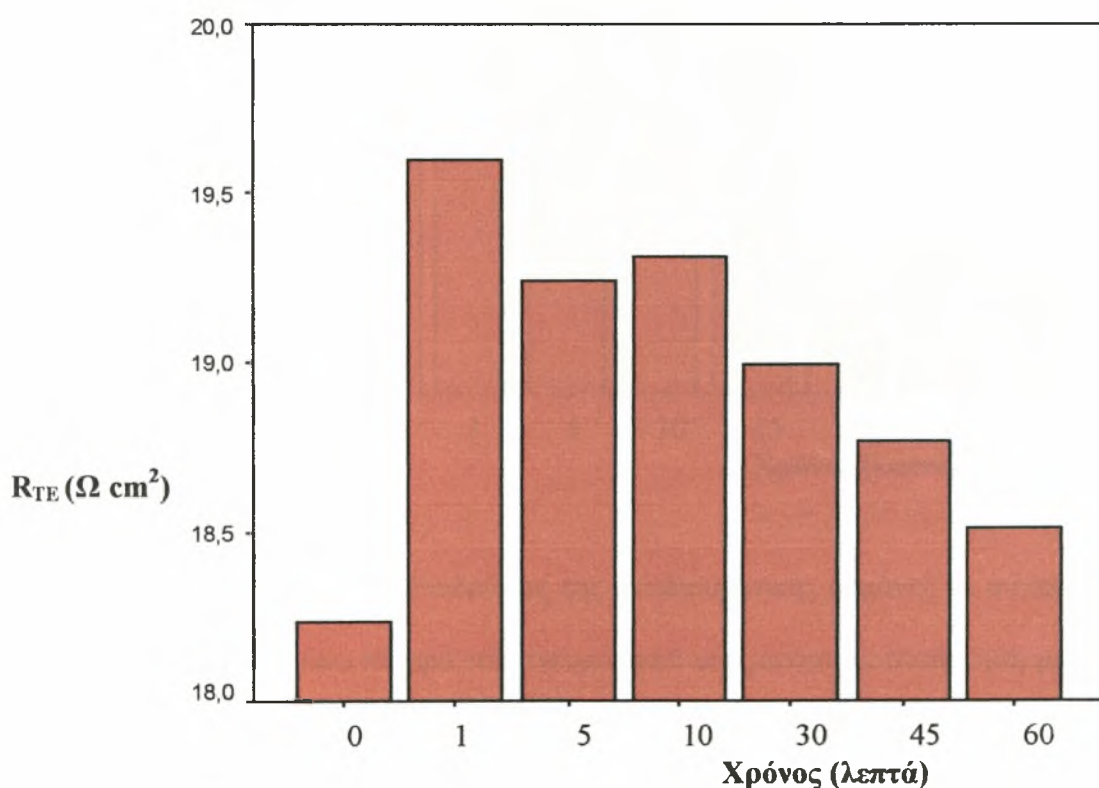
Οι μετρήσεις των πειραμάτων του ιστού με διάλυμα Krebs χωρίς να προσθέσουμε αντιδιουρητική ορμόνη (Control) στον πνευμονικό υπεζωκότα παρουσίασαν χαρακτηριστική μείωση στις χρονικές περιόδους των πειραμάτων (Διάγραμμα 1). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αντίστασης (R_{TE}), άρα αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης.



Διάγραμμα 1. Η διαπερατότητα του Control του πνευμονικού υπεζωκότα σε $n = 4$.

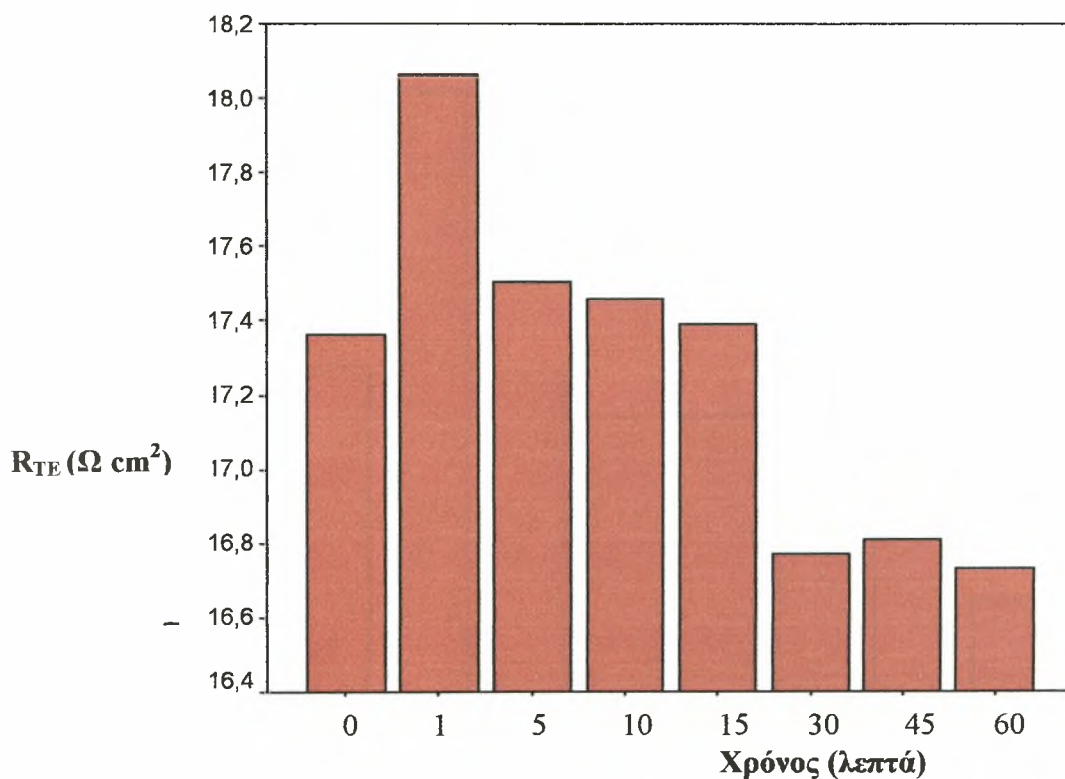
B. Επιδράσεις της ADH στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα

Οι επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης στην υπεζωκοτική κοιλότητα του πνευμονικού υπεζωκότα φαίνονται στο διάγραμμα 2. Στην έσω πλευρά της μεμβράνης με την προσθήκη της ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της αντίστασης (R_{TE}), άρα μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης. Η αύξηση αυτή ήταν μεγάλη κατά το πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη της ουσίας και στα επόμενα λεπτά μέχρι τα εξήντα που έγιναν οι μετρήσεις παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της αντίστασης σχεδόν έως τα αρχικά επίπεδα.



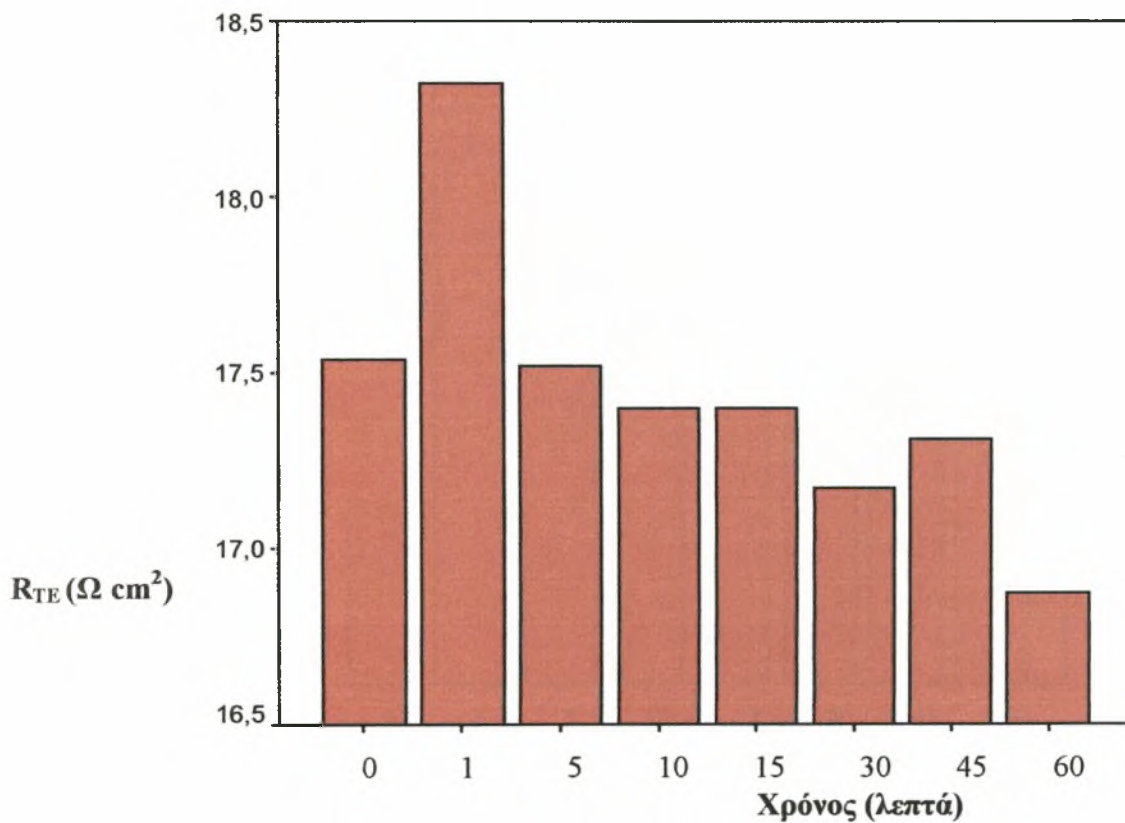
Διάγραμμα 2. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ ($n = 4$) στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν στην υπεζωκοτική κοιλότητα του πνευμονικού υπεζωκότα προστέθηκε ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ παρατηρήθηκε κατά το πρώτο λεπτό επίσης αύξηση της αντίστασης άρα μείωση της διαπερατότητας και η μείωση της αντίστασης πραγματοποιήθηκε σύντομα, ούτως ώστε μετά τα εξήντα λεπτά να μην υπάρχει αντίσταση στην μεμβράνη (Διάγραμμα 3).



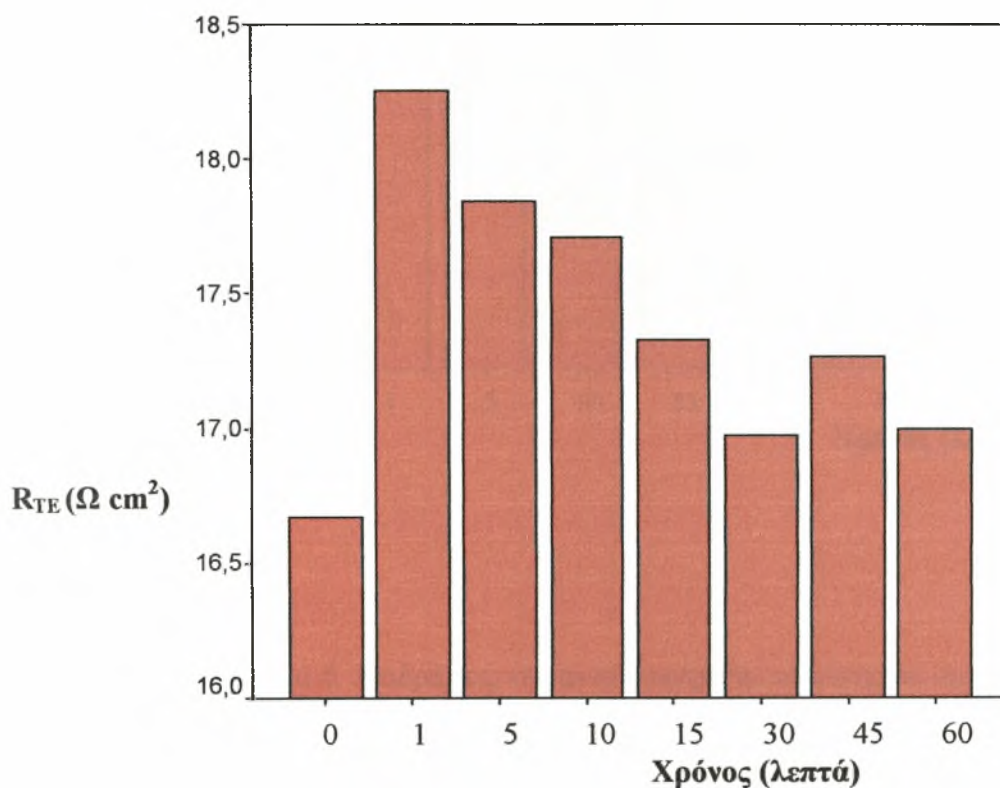
Διάγραμμα 3. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ ($n = 3$) στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Με την προσθήκη της ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στην υπεζωκοτική κοιλότητα του πνευμονικού υπεζωκότα η αντίσταση αυξήθηκε σημαντικά κατά το πρώτο λεπτό αλλά αμέσως από το 5^ο λεπτό, υπήρξε μεγάλη μείωση της αντίστασης (Διάγραμμα 4).

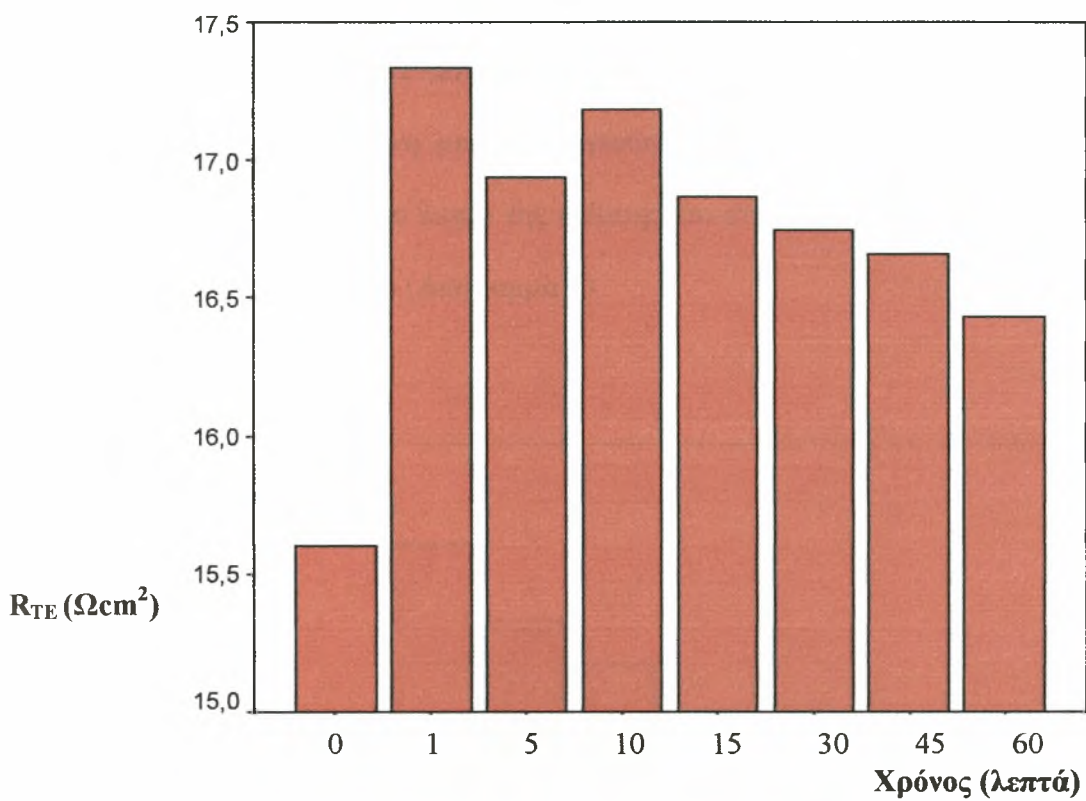


Διάγραμμα 4. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ ($n = 5$) στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Προσθήκη της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5}M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-3}M (Διάγραμμα 5) και σε συγκέντρωση 10^{-4}M (Διάγραμμα 6) προκάλεσε σημαντική αύξηση της αντίστασης στο πρώτο λεπτό και αργή και σταδιακή μείωση κατά τα επόμενα λεπτά.



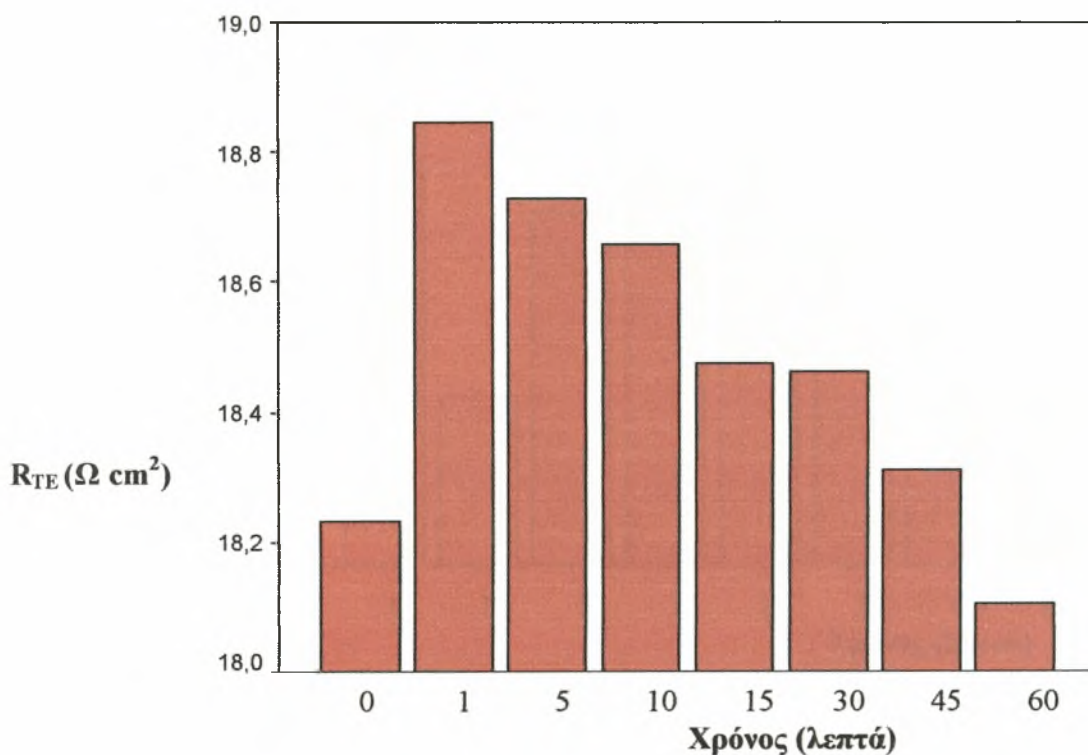
Διάγραμμα 5. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5}M ($n = 4$) σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-3}M στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).



Διάγραμμα 6. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ ($n = 4$) στην έσω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

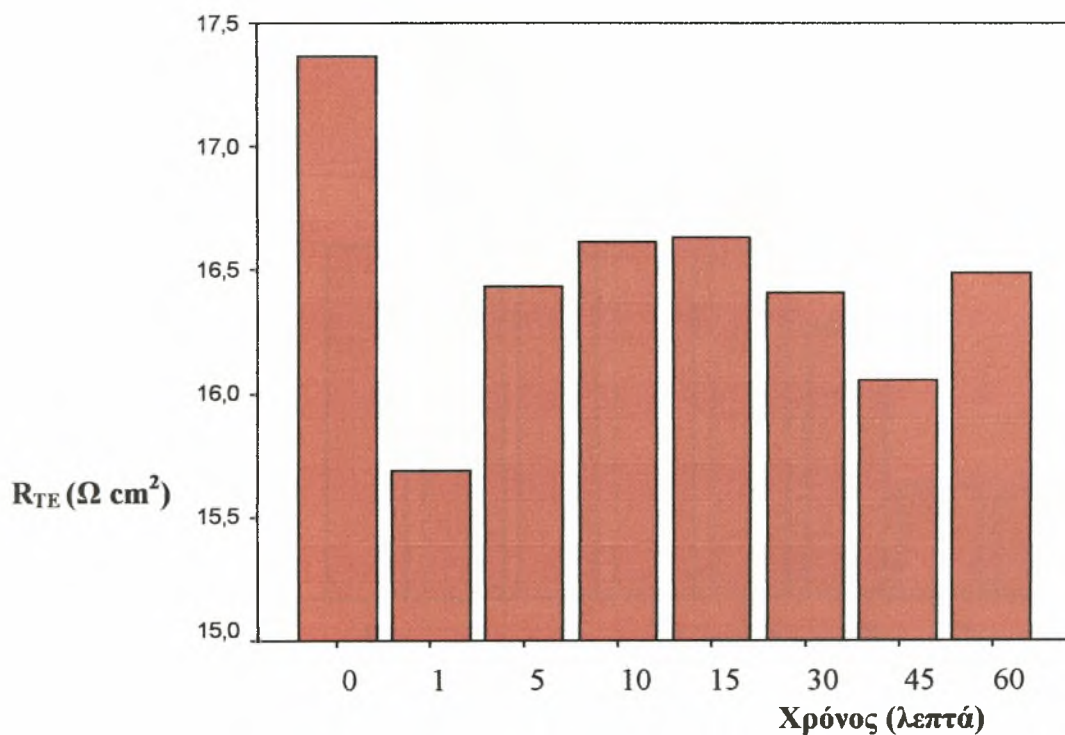
Γ. Επιδράσεις της ADH στην έξω πλευρά του πνευμονικού υπεζωκότα

Έκθεση του πνευμονικού υπεζωκότα προς την πλευρά προς τον διάμεσο ιστό σε αντιδιουρητική ορμόνη με συγκέντρωση $10^{-5}M$ προκάλεσε σημαντική αύξηση της αντίστασης στο πρώτο λεπτό της έκθεσης και σταδιακή μείωση μέχρι τα χαμηλότερα επίπεδα στο 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 7).



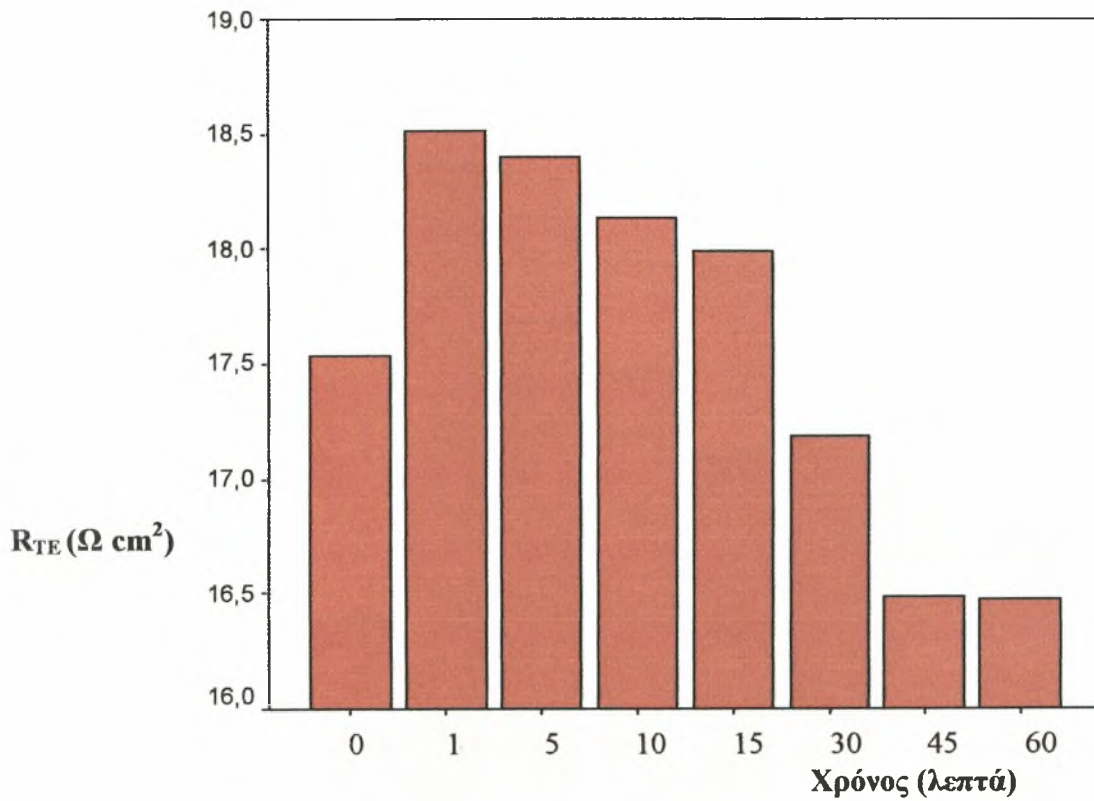
Διάγραμμα 7. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ στην πλευρά προς το διάμεσο ιστό του πνευμονικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν προστέθηκε στο πνευμονικό υπεζωκότα προς την πλευρά προς τον διάμεσο ιστό αντιδιουρητική ορμόνη με συγκέντρωση $10^{-6}M$ παρατηρήθηκε αύξηση της διαπερατότητας από το 5ο λεπτό, που διήρκησε μέχρι και το 25^ο λεπτό. Στην συνέχεια παρατηρήθηκε και δεύτερη αύξηση της αντίστασης κατά το 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 8).



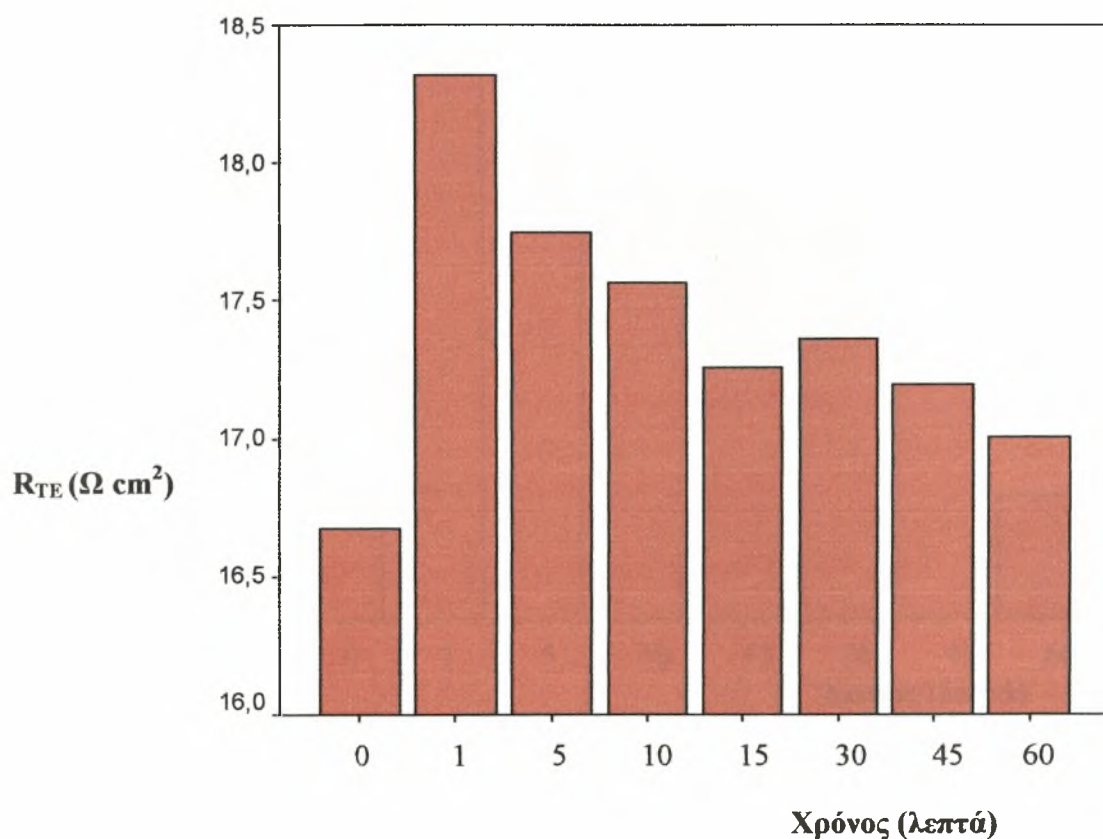
Διάγραμμα 8. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στην πλευρά προς το διάμεσο ιστό του πνευμονικού υπεζωκότα ($n = 3$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Αύξηση της αντίστασης της μεμβράνης παρατηρήθηκε επίσης όταν στο ίδιο ιστό προστέθηκε ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-7}M$. Η αύξηση αυτή διήρκησε από το πρώτο ως και το 15^ο λεπτό περίπου (Διάγραμμα 9).



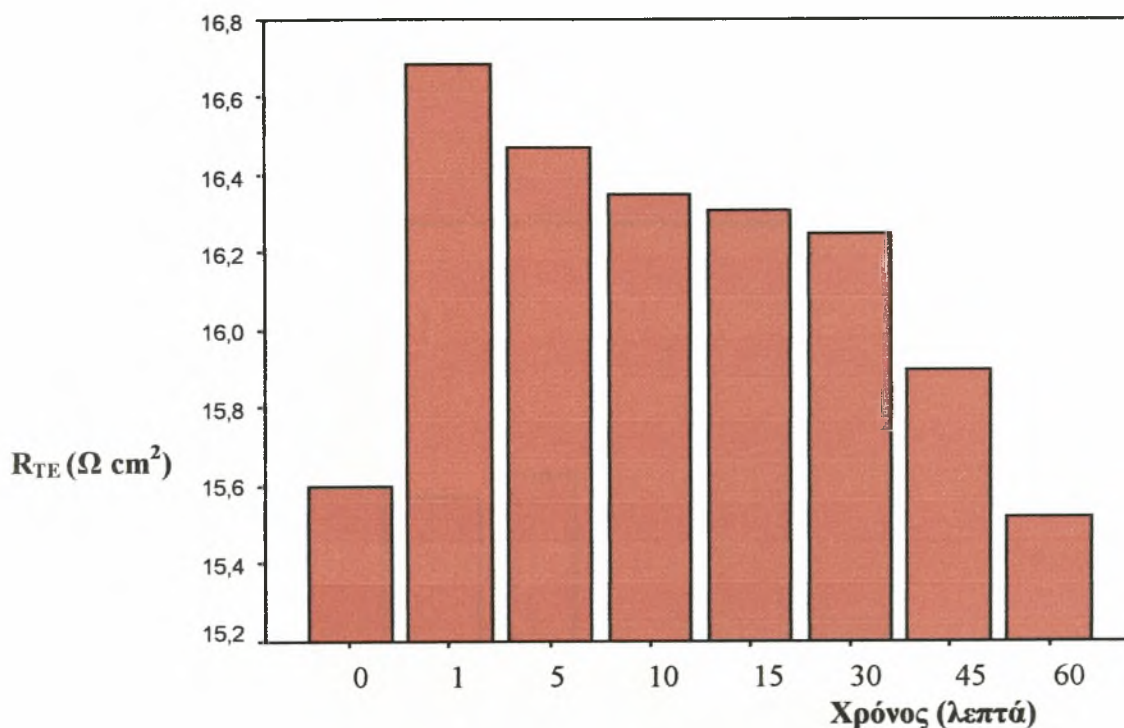
Διάγραμμα 9. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στην πλευρά προς το διάμεσο ιστό του πνευμονικού υπεζωκότα ($n = 5$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν εκτέθηκε ο πνευμονικός υπεζωκότας από την πλευρά προς το διάμεσο ιστό σε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση 10^{-5}M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-3}M (Διάγραμμα 10), παρατηρήθηκε αύξηση της αντίστασης και σταδιακή μείωσή της η οποία μέχρι το 60^ο λεπτό δεν είχε ακόμη μηδενιστεί.



Διάγραμμα 10. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5}M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-3}M στην πλευρά προς το διάμεσο ιστό ($n = 4$) του πνευμονικού υπεζωκότα σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

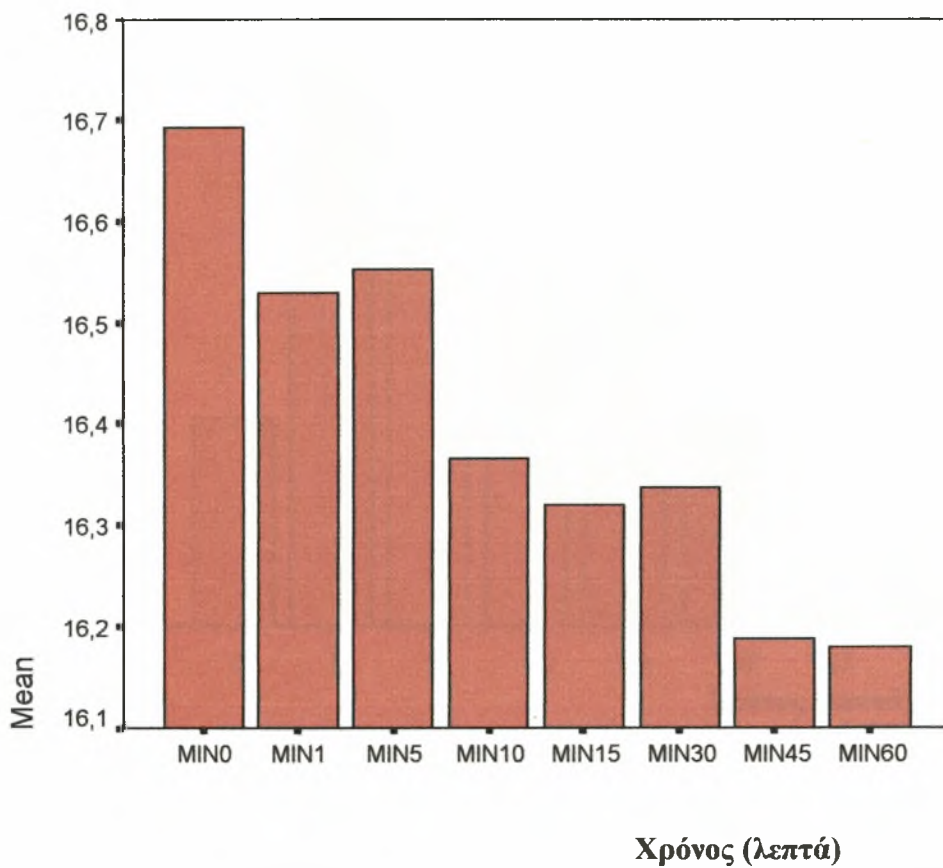
Η ίδια αντίσταση παρατηρήθηκε όταν στον παραπάνω ιστό προστέθηκε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση 10^{-5}M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-4}M (Διάγραμμα 11). Η μείωση που ακολούθησε αμέσως από το 5^ο λεπτό ήταν σταδιακή και στο 60^ο λεπτό είχε μηδενιστεί.



Διάγραμμα 11. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5}M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-4}M στην πλευρά προς το διάμεσο ιστό του πνευμονικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Γ. Αντίσταση του Control στον Τοιχωματικό υπεζωκότα

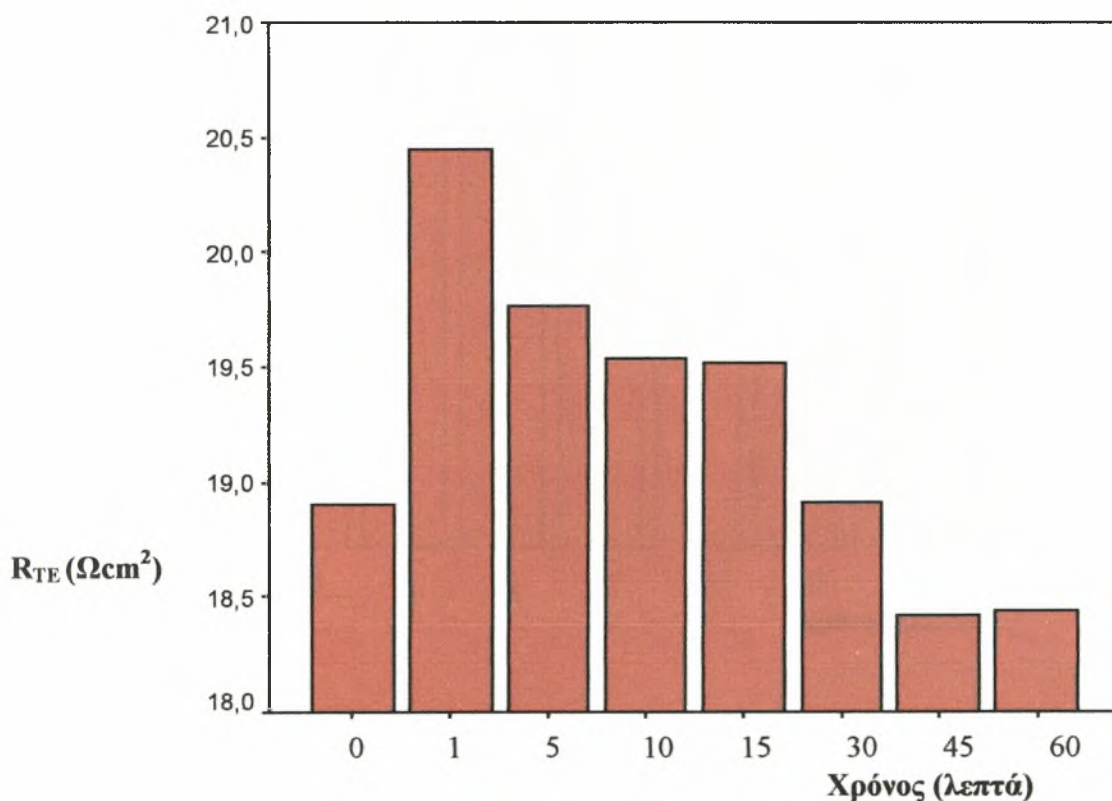
Οι μετρήσεις των πειραμάτων του ιστού με διάλυμα Krebs χωρίς να προσθέσουμε αντιδιουρητική ορμόνη (Control) στον τοιχωματικό υπεζωκότα παρουσίασαν χαρακτηριστική μείωση στις χρονικές περιόδους του πειράματος (Διάγραμμα 12). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αντίστασης (R_{TE}), άρα αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης.



Διάγραμμα 12. Η διαπερατότητα του Control του τοιχωματικού υπεζωκότα σε $n = 4$.

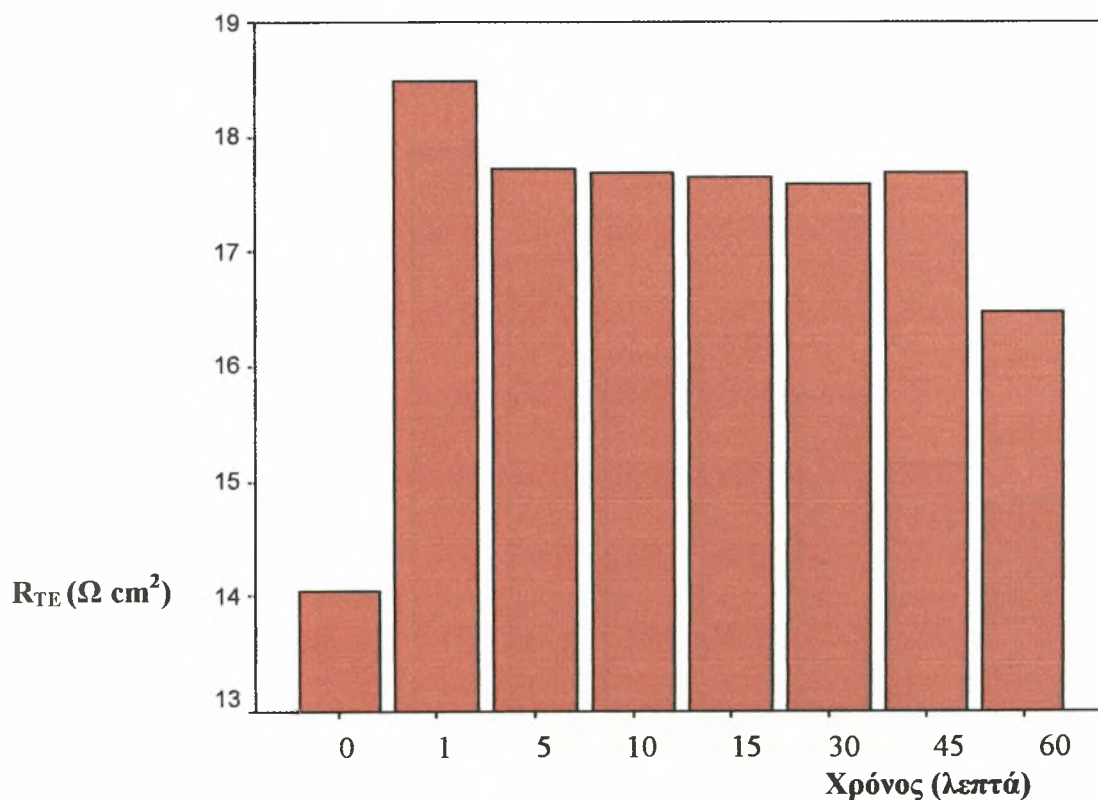
Δ. Επιδράσεις της ADH στην έσω πλευρά του τοιχωματικού υπεζωκότα

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 13, προσθήκη ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5} Μ στον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα προκάλεσε αύξηση της αντίστασης της μεμβράνης. Από το 5^ο λεπτό έως και το 30^ο είχαμε σταδιακή μείωση της αντίστασης, η οποία από το 45^ο λεπτό έφτασε σε μηδενικά επίπεδα.



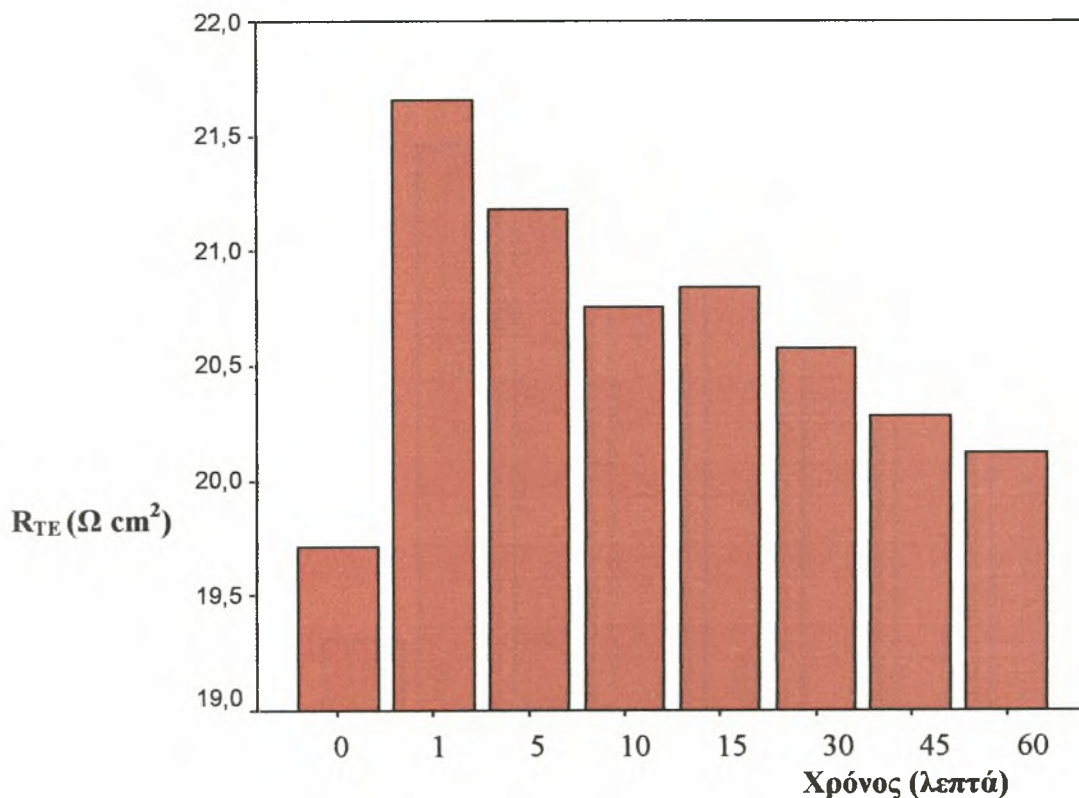
Διάγραμμα 13. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5} Μ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα (n = 4) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν στον ίδιο ιστό προστέθηκε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση 10^{-6} M παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της διαπερατότητας από το πρώτο λεπτό και παρέμεινε υψηλή με ελάχιστη μείωση σχεδόν έως και το 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 13).



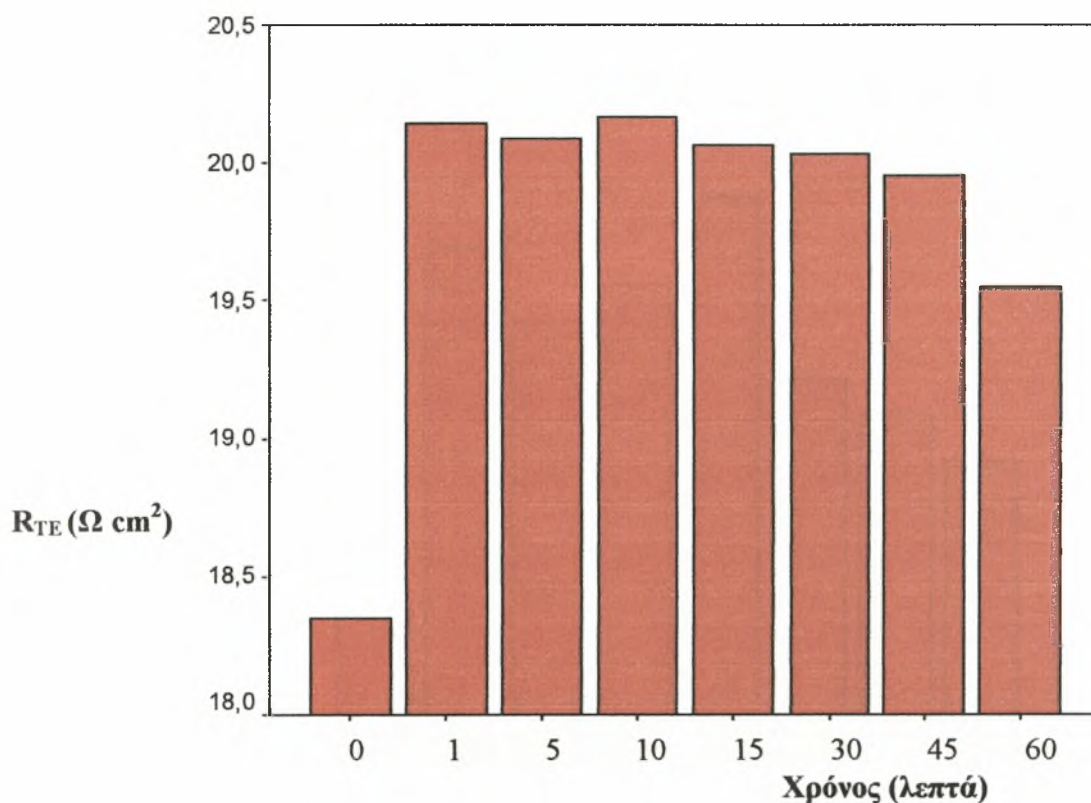
Διάγραμμα 14. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-6} M στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Μετά από ένα λεπτό από την προσθήκη αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στον ίδιο ιστό είχαμε αύξηση της αντίστασης του ιστού, ενώ η μείωση που ακολούθησε αμέσως από το 5^ο λεπτό είχε σταθερά πτωτική τάση (Διάγραμμα 15)



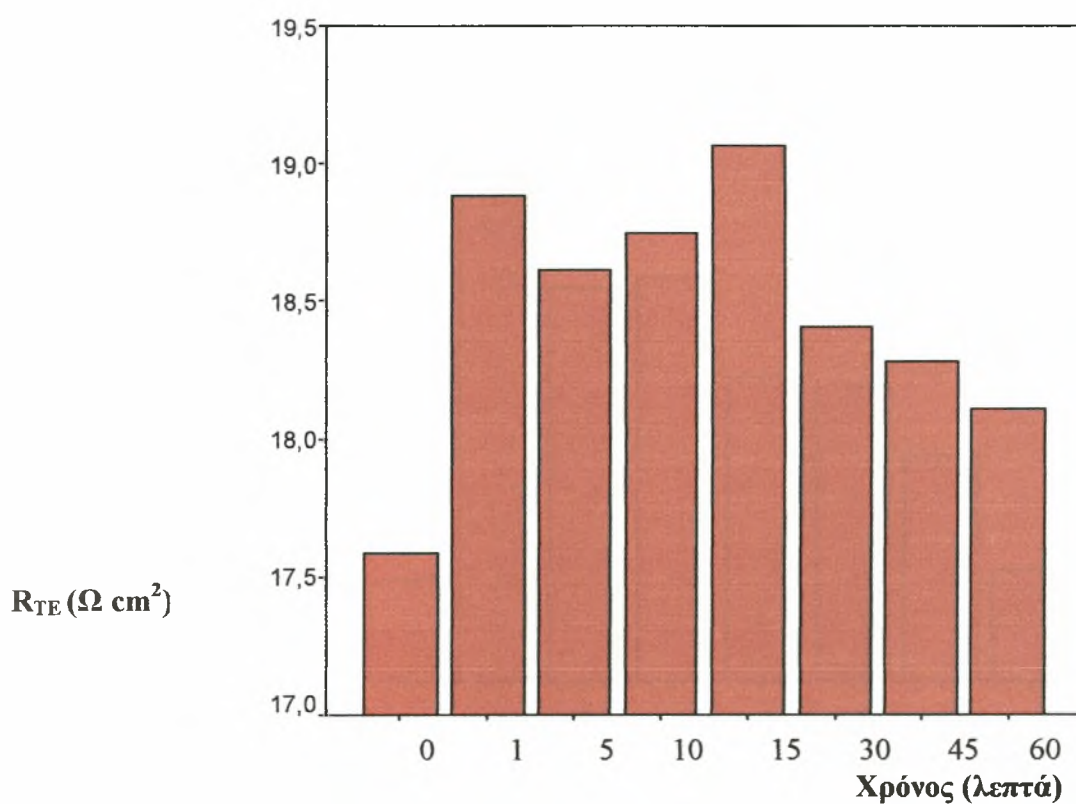
Διάγραμμα 15. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Στον τοιχωματικό υπεζωκότα εφαρμόστηκε επίσης αντιδιουρητική ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-3}M$ (Διάγραμμα 16). Αμέσως από το 1^ο λεπτό η μεμβράνη παρουσίασε σημαντική αντίσταση η οποία μειώθηκε ελάχιστα κατά την διάρκεια των 60 λεπτών του πειράματος.



Διάγραμμα 16. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-3}M$ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

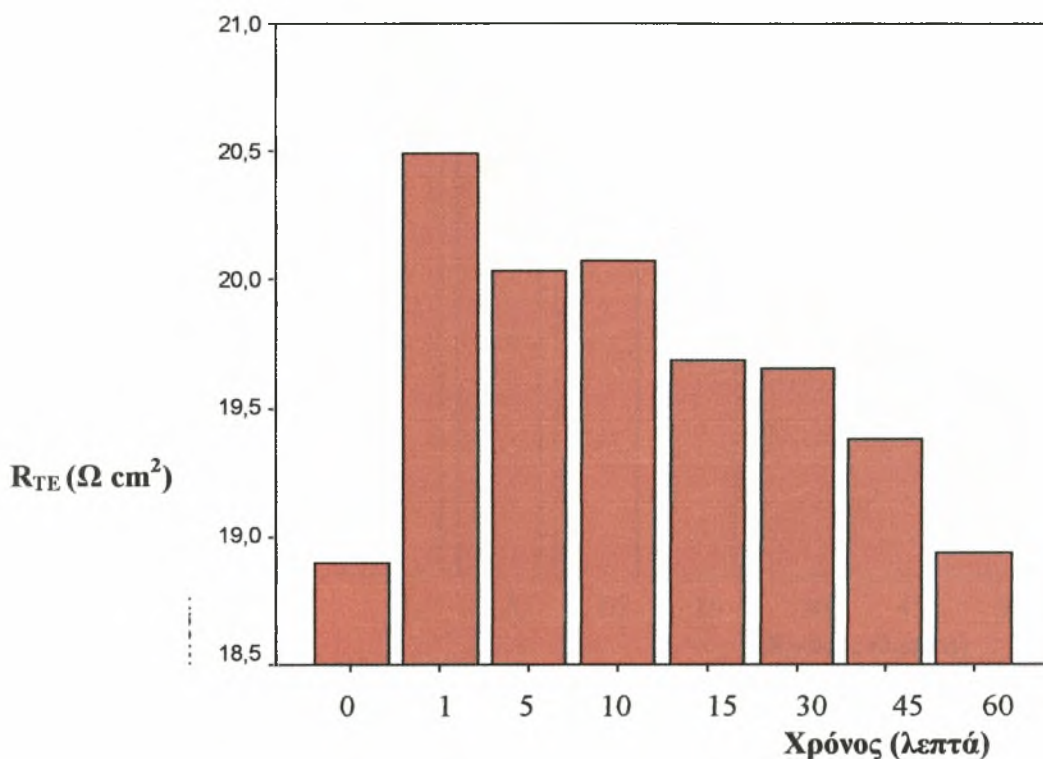
Το διάγραμμα 17 μας δείχνει ότι όταν ο ίδιος ιστός εκτέθηκε σε αντιδιουρητική ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-4}M$, υπήρξε σημαντική αύξηση της αντίστασης κατά το 1^ο λεπτό. Την αύξηση αυτή ακολούθησε μία μείωση στο 5^ο λεπτό και στην συνέχεια μία δεύτερη σημαντική αύξηση στο 15^ο λεπτό. Η μείωση που ακολούθησε ήταν αργή και σταδιακή.



Διάγραμμα 17. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5} M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-4}M$ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

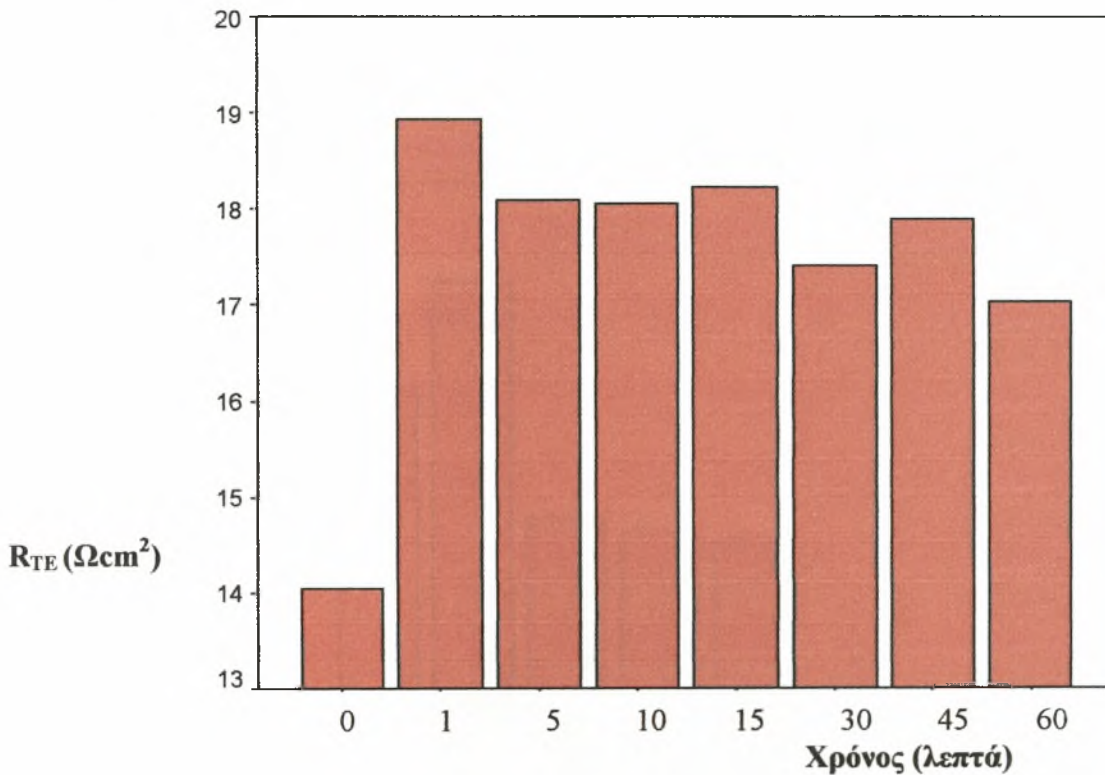
Ε. Επιδράσεις της ADH στην έξω πλευρά του τοιχωματικού υπεζωκότα

Στο τοιχωματικό πέταλο εφαρμόστηκε επίσης αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-5}M$, στην έξω πλευρά δηλ. στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό. Τα αποτελέσματα έδειξαν και πάλι σημαντική αύξηση της αντίστασης στο πρώτο λεπτό και σταδιακή μείωση έως το μηδενικό επίπεδο μέχρι και το 60^ο λεπτό (Διάγραμμα 18).



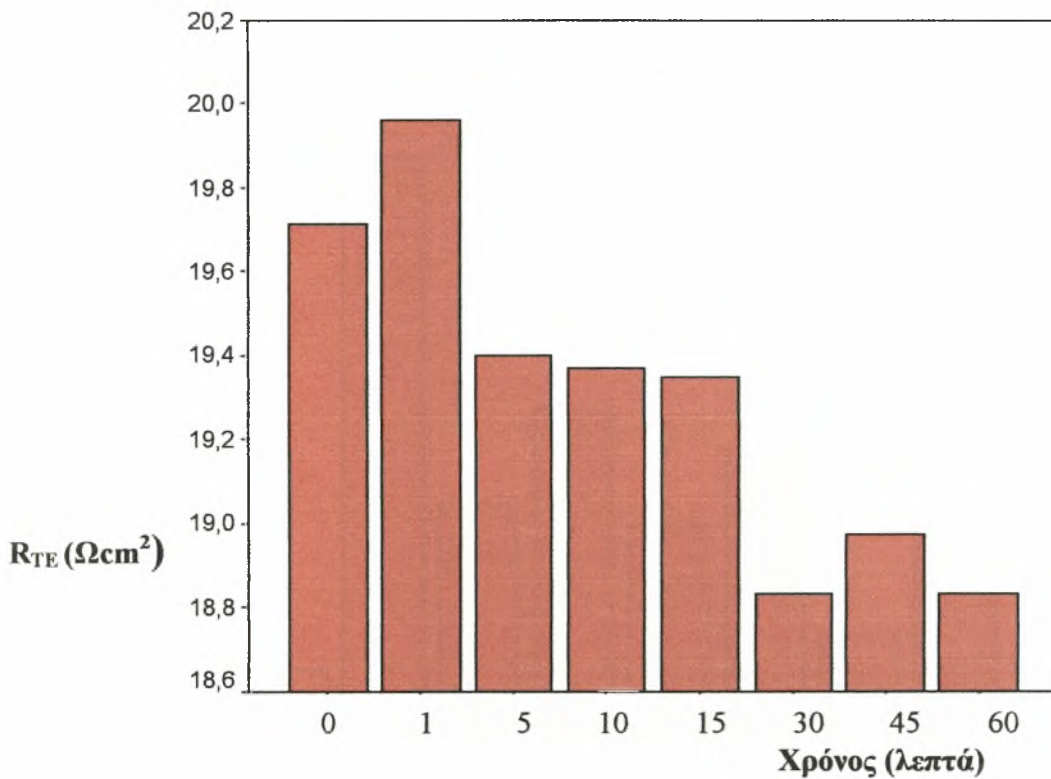
Διάγραμμα 18. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν ο ίδιος ιστός εκτέθηκε σε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ υπήρξε και πάλι αύξηση της αντίστασης κατά το πρώτο λεπτό. Η μείωση της αντίστασης που παρατηρήθηκε από το 5^ο λεπτό έως και το 60^ο λεπτό ήταν πολύ μικρή (Διάγραμμα 19).



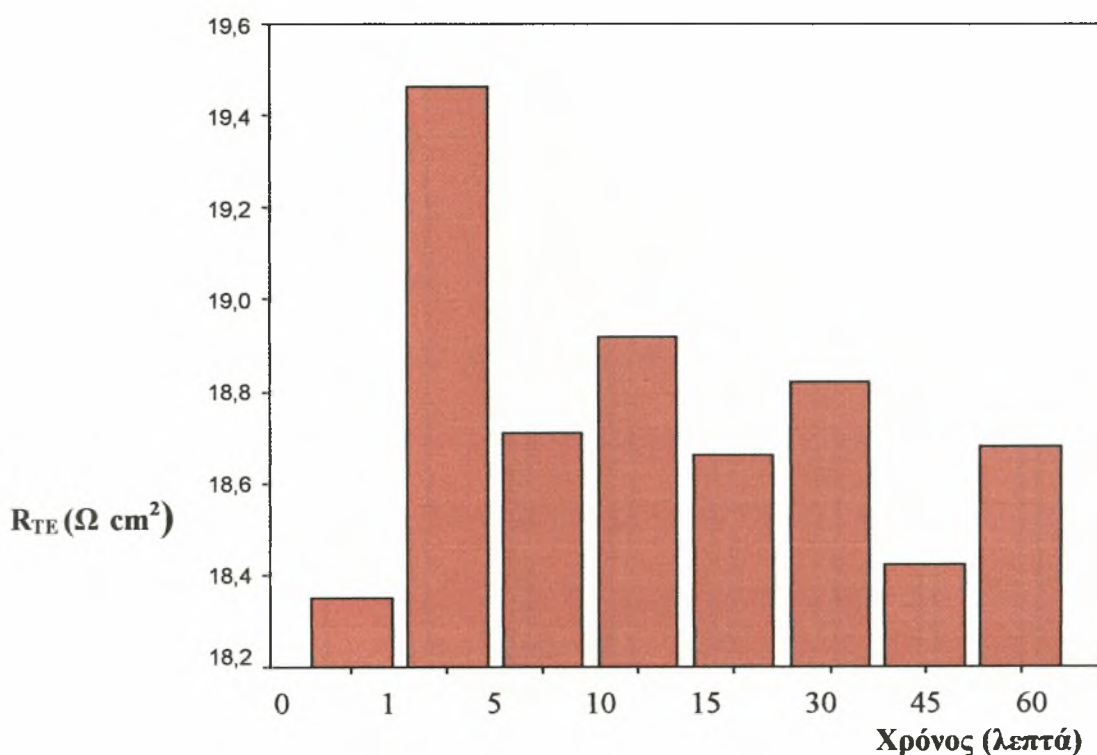
Διάγραμμα 19. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-6}M$ στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Στον τοιχωματικό υπεζωκότα και στην έξω πλευρά του εφαρμόστηκε επίσης αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-7}M$, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το διάγραμμα 20 είναι μη αναμενόμενα. Δείχνουν μία αυξημένη αντίσταση της μεμβράνης πριν ακόμη εκτεθεί ο ιστός σε αντιδιουρητική ορμόνη. Η αντίσταση αυτή παρουσιάζει σταθερή και σταδιακή μείωση από το πρώτο λεπτό της έκθεσης του ιστού στην ορμόνη.



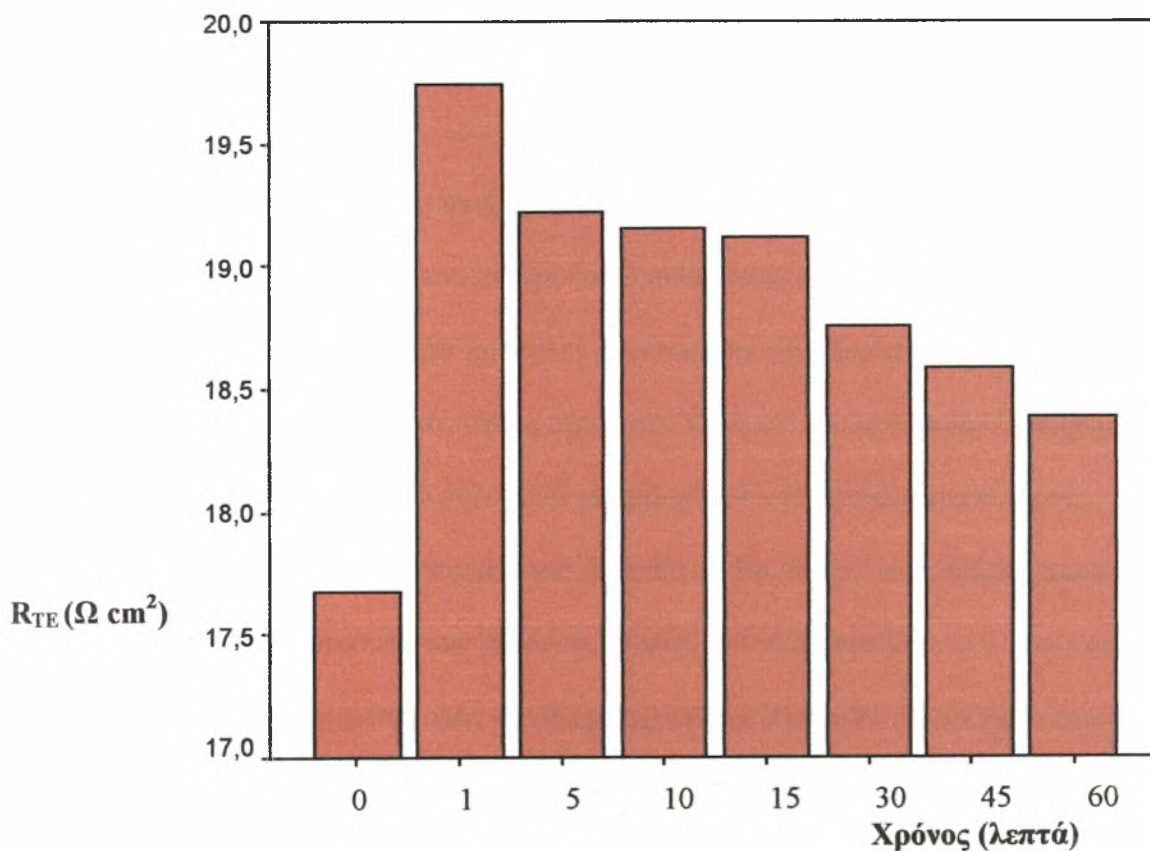
Διάγραμμα 20. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Το διάγραμμα 21 επίσης το οποίο απεικονίζει τα αποτελέσματα της έκθεσης του ιστού σε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-3}M$. Η αντίσταση αυξήθηκε σημαντικά κατά το πρώτο λεπτό, στην συνέχεια μειώθηκε σημαντικά και στο 10° λεπτό αυξήθηκε λιγότερο αυτή τη φορά ακολούθησε και πάλι μικρή μείωση στο 15° λεπτό και μικρή αύξηση κατά το εικοστό λεπτό. Μικρή μείωση και μικρή αύξηση παρατηρήθηκαν και στο 45° και 60° λεπτό αντίστοιχα.



Διάγραμμα 21. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση $10^{-3}M$ στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

Όταν στον ίδιο ιστό προστέθηκε αντιδιουρητική ορμόνη σε συγκέντρωση 10^{-5} σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-3} M (Διάγραμμα 22) είχαμε και πάλι στατιστικά σημαντική αύξηση της αντίστασης της μεμβράνης και κατά συνέπεια μείωση της διαπερατότητας στο 1^ο λεπτό από την προσθήκη. Η αντίσταση άρχισε να μειώνεται αργά αλλά σταθερά από το 5^ο λεπτό.



Διάγραμμα 22. Επιδράσεις της αντιδιουρητικής ορμόνης σε συγκέντρωση 10^{-5} M σε συνδυασμό με αναστολέα L-NAME σε συγκέντρωση 10^{-4} M στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα ($n = 4$) σε συνάρτηση με το χρόνο (60 λεπτά).

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπεζωκοτική κοιλότητα είναι ένας πραγματικός χώρος μεταξύ των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος. Περιέχει μία μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού και διευκολύνει τις κινήσεις των πνευμόνων μέσα στη θωρακική κοιλότητα. Παρόλο που αυτή είναι η κύρια λειτουργία της υπεζωκοτικής κοιλότητας, εξάλειψη της κοιλότητας είτε χειρουργικά είτε χημικά δεν εμποδίζει σημαντικά την ικανότητα των ατόμων να αναπνέουν. Από την άλλη πλευρά νοσήματα των πετάλων του υπεζωκότα ή συλλογή υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αναπνοή.

Έχει προταθεί ότι η υπεζωκοτική κοιλότητα προσφέρει επίσης μία ασφαλή οδό απομάκρυνσης του υγρού του πνευμονικού οιδήματος, αν και μεγάλη ποσότητα υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα προκαλεί συμπτώματα, έχει λιγότερη αρνητική επίδραση στην αναπνοή από ότι ο ίδιος όγκος υγρού στο πνευμονικό παρέγχυμα. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας έχει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση του υπεζωκοτικού υγρού.

Σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρεία η διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού στηρίζεται στις διαφορές των πιέσεων μεταξύ των δύο πετάλων του υπεζωκότα. Η ύπαρξη ενεργητικής μεταφοράς και διάχυσης ουσιών έχει γίνει αντικείμενο έρευνας με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Υπάρχουν ακόμη αναπάντητα ερωτήματα και σημαντικές διαφωνίες για τη φυσιολογική σημασία του υπεζωκοτικού υγρού και για τη φύση των δυνάμεων που κατευθύνουν τη διακίνηση προς τα μέσα και έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα.

Επίκαιρες απόψεις σχετικά με τους μηχανισμούς που περιλαμβάνονται σε αυτές τις ρυθμιστικές διαδικασίες, ως επί το πλείστον, έχουν βασιστεί σε ένα πρότυπο που τα περιορισμένου χρόνου βήματα τοποθετούνται στις κορυφαίες και βασηοπλευρικές μεμβράνες πλάσματος των επιθηλιακών κυττάρων στη σειρά.. Γενικά οι μηχανισμοί

Η αύξηση της αντίστασης της μεμβράνης όταν αντιδιουρητική ορμόνη προστέθηκε στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και των δύο υπεζωκότων πιθανών να υποδηλώνει την ύπαρξη δύο ειδών κυττάρων στο μεσοθήλιο του υπεζωκότα σύμφωνα με την πρόταση πολλών μελετητών. Το πρώτο είδος κυττάρων περιλαμβάνει αυτά στα οποία υπάρχουν διάλυτοι Na^+ ή ανταλλαγή $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ στην πλευρά προς τον διάμεσο ιστό. Είναι τα κύτταρα τα οποία μεταφέρουν Na^+ (και έτσι υγρό) έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Στο δεύτερο είδος των κυττάρων υπάρχει αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ στην πλευρά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και σχετίζονται με την ανακύκλωση του K^+ και ίσως άλλες λειτουργίες. Οι μηχανισμοί αυτοί σχετίζονται με την διατήρηση του όγκου και της σύστασης όχι μόνο του υπεζωκοτικού υγρού αλλά και των μεσοθηλιακών κυττάρων.

Το οξειδίο του αζώτου (NO) έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τους διαύλους Na^+ , την αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ και την διευκολυνόμενη διάχυση Na^+ στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, όπως επίσης και σε καλλιέργειες κυττάρων πνεύμονα. (30). Το οξειδίο του αζώτου μπορεί να ρυθμίσει τη διαπερατότητα επιθηλιακών και ενδοθηλιακών ιστών, αλλά ο ρόλος του ως μεσολαβητής δεν είναι ξεκάθαρος.

Η ενδογενής παραγωγή του NO μπορεί να ανασταλεί από διάφορα ανάλογα της L-αργινίνης που μπλοκάρουν τη δράση της συνθάσης του οξειδίου (NOS). Δύο από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αναστολείς είναι η N^G -μόνο-μέθυλο-L-αργινίνη (L-NMMA) και ο N^0 -νίτρο-L-αργινίνη-μέθυλο-εστέρας (L-NAME). Εκτός από τα ανάλογα της L-αργινίνης χρησιμοποιούνται και άλλες ουσίες όπως αναστολείς του Ca^{2+} και της καλμοδουλίνης, ουσίες που περιέχουν άζωτο και αναστολείς της BH_4 σύνθεσης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας L-NAME ο οποίος δεν απέτρεψε την αύξηση της αντίστασης. Μία πιθανή εξήγηση για την αδυναμία της αναστολής θα μπορούσε να είναι ότι η συγκέντρωση του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν επαρκής ώστε να αναστείλει όλη την συνθάση του οξειδίου του αζώτου.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο υπεζωκότας συμμετέχει ενεργά στη μετακίνηση υγρού και διαλυτών ουσιών. Φαίνεται ότι υπάρχει μετακίνηση Na^+ και K^+ και στον πνευμονικό και στον τοιχωματικό υπεζωκότα γιατί παρατηρήθηκε αύξηση όταν προστέθηκε αντιδιουρητική ορμόνη και στις δύο πλευρές των υπεζωκότων.

Σε όλες τις περιπτώσεις οι επίδραση της ορμόνης ήταν άμεση, εμφανής από το πρώτο λεπτό της έκθεση και διαρκούσε λίγα λεπτά. Στις περισσότερες των περιπτώσεων η αντίσταση επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα μέχρι την πάροδο των 60 λεπτών των πειραμάτων.

Η μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης πιθανών να οφείλεται σε αύξηση της παραγωγής του οξειδίου του αζώτου από την αντιδιουρητική ορμόνη.

Ο αναστολέας L-NAME δεν ανέστειλε την αύξηση της διαπερατότητας πιθανών λόγω της ανεπαρκούς συγκέντρωσής που χρησιμοποιήθηκε.

Το μοντέλο διακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού περιλαμβάνει την ύπαρξη αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ και από τις δύο πλευρές του υπεζωκότα, όπως και τη μετακίνηση Na^+ και την ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ από τα πέταλα του υπεζωκότα.

11. ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the interaction process of the active transfer and passive diffusion of ions in the transport of pleura fluids across the pleura membrane. For this purpose specific substances were used that influence ion movement as well as alter the electrical resistance (R_{TE}) and as a result affect the permeability of the pleura membrane of the sheep.

Specifically for this study, intact sections of visceral and parietal pleura from twelve (12) adult sheep were used. The samples were transferred to the laboratory in a Krebs-Ringer solution maintained at 4 °C and within 30 minutes from the death of the animal. The pleura samples were then mounted as a planar sheet in a Ussing type chamber that was fed with Krebs solution from both sides, continuously oxygenated, and maintained at a temperature of 37 °C.

The potential change difference and the effect of the Antidiuretic Hormone (ADH) were studied, which inhibit the Na^+ channels, the $Na^+ - K^+$ pump, and reduce the diffusion of Na^+ . Furthermore, a reaction of N^{ω} -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) process was observed, which is a Nitric Oxide (NO) inhibitor, to study the possibility of the Nitrous Oxide complication in the visceral and parietal pleura R_{TE} . Due to the anatomical differences between the two pleura membranes separate measurements were taken from both membranes and a comparison was done.

In all instances the hormone reaction was instantaneous, evident as soon as it was exposed to the Antidiuretic Hormone lasting for a given time. In most cases the resistance returned to the initial values during the 60-minute duration of the experiment. The reduced permeability of the membrane may be due to the increased Nitrous Oxide production by the Antidiuretic Hormone.

The L-NAME inhibitor did not prevent the reduction in the permeability of the membrane probably due to the inadequate concentrations used.

In conclusion, the results of the study show that the pleural tissue is an active participant in the transfer of the solute substances. It seem that there is a Na^+ and K^+ transfer through the visceral and parietal pleura indicative of the increase in the electrical resistance when the Antidiuretic Hormone was introduced to both sides of the pleura tissue.

12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χατζόγλου Χ.: Επιδράσεις αμιλορίδης, ουαμπαΐνης, νιτροπρωσσικού νατρίου, 17β οιστραδιόλης και προγεστερόνης στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Τμήμα Ιατρικής. 6-12, 2001.
2. Courtney Broaddus V, and Light RW. Disorders of the pleura: General principles and diagnostic approach. 100: 621-623, 1990.
3. Wang NS. Anatomy and physiology of the pleura space. Clinics in chest medicine. 6: 3-16, 1985.
4. Journal MC, Fleury-Feith J, Bernaudin J.F., and Bignon J. Pleural mesothelial cells. The Lung. 65: 961-969, 1997.
5. Mariassy AT, and Wheeldon EB. The pleura: A combined light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic study in the sheep. Exp. Lung Res. 4: 293-313, 1982.
6. Πατάκας ΔΑ.Ε. Οι παθήσεις του υπεζωκότα. Επίτομη Πνευμονολογία. 19: 275-286, 1994.
7. Jicheng LI. Ultrastructural study on the pleural stomata in human. Funct. Dev. Morphol. 3: 277-280, 1993.
8. Shinohara H. Distribution of lymphatic stomata on the pleural surface of the thoracic cavity and surface topography of the pleural mesothelium in the golden hamster. Anat. Rec. 249: 16-23, 1997.
9. Guyton A.C.and Hall J.E. Medical Physiology 1.38: 546-547, 1996.
10. Guyton A.C.and Hall J.E. Medical Physiology 1.38: 548-549, 1996.
11. Θωμόπουλος Ν. Γ. Ο υποκυτταρικός κόσμος. 2.11: 55-57, 1995.

12. Balabann RS, Mandel LJ, and Benos DJ. On the cross-reactivity of amiloride and 2,4,6 triaminopyrimidine (TAP) for the cellular entry and tight junctional caution permeation pathways in epithelia. *J. Membrane Biol.* 49: 363-390, 1979.
13. Harris BJ, Chatton JV, Tran PH, Bungay PM, and Spring KR. pH, morphology, and diffusion in lateral intercellular spaces of epithelial cell monolayers. *Am. J. Physiol.* 266: C73-C80, 1994.
14. Ussing HH, and Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in short-circuit isolated frog skin. *Acta Phy. Scandinav.* 23: 110-127, 1951.
15. Stryer L. *Biochemistry.* 2.38: 1075-1082, 1997.
16. Guyton A.C. and Hall J.E. *Medical Physiology* 2.75: 1084-1087, 1996.
17. Lipton P. and Edelman I. Effects of aldosterone and vasopressin on electrolytes of toad bladder epithelial cells. *American Journal of Physiology.* 221.3:533-541, 1971.
18. Garty H. and Benos D. Characteristics and regulatory mechanisms of the Amilogide-Blockable Na⁺ channel. *American Physiological Society.* 68.2: 309-373, 1988.
19. Orloff J. and Handler J.S. The similarity of effects of vasopressin, adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) and theophylline on the toad bladder. *J Clin. Invest* 41: 702-709, 1962.
20. Schafer J.A. and Troutman S.L. Effect of ADH on rubidium transport in isolated perfused rat cortical collecting tubules. *Am J. Physiol.* 250: F1063-1072, 1986.
21. Li J. H.-Y, Palmer L.G. Edelman I.S. and Lindemann. The role of sodium density in the natriferic response to the road urinary bladder to an antidiuretic hormone. *J. Membr. Biol.* 64; 77-89, 1982.
22. Helman S.I., Cox T.C. and Driessche W.Van. Hormonal control of apical membrane Na⁺ transport in epithelia, *J. Gen. Physiol.* 82: 201-220, 1983.

23. Fanestil D.D., G.A. Porter, and I.S. Edelman. Aldosterone stimulation of sodium transport. *Biochim. Biophys. Acta* 135: 74-88, 1969.
24. Stoff J.S., J.S. Handler, A.S. Preston, and J. Orloff. The effect of aldosterone on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in toad urinary bladder. *Life Sci.* 13: 542-552, 1973.
25. Chase H. S. JR. and Q. AL-Awqati. Calcium reduces the sodium permeability of luminal membrane vesicles from toad bladder. Studies using a fast reaction apparatus. *J. Gen. Physiol.* 81:643-666, 1983.
26. Bridges R. J., H. Garty, D.J. Benos, and W. Rummel. Sodium uptake into colonic enterocyte membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 254 (Cell Physiol. 23): C484-C490, 1988.
27. Shimada H., Mishina T., and Marumo F. The effect of PGE on vasopressin and guanine nucleotide-mediated adenylate cyclase activity in toad bladder membrane. *Tohoku J. Exp. Med.* 145: 427-435, 1985.
28. Calamita G., Guevel Y. LE. and Bourguet J. ADH-induced water permeability and particle aggregates : alteration by a synthetic estrogen. *American Physiology Society.* 91: F144-F152, 1991.
29. Bourguet J., Chevalier J., Parisi M., and Ripoche P. Water permeability of amphibian urinary bladder. In: *Water transport in Biological Membranes*, edited by G. Benga. Boca Raton, FL: CRC: 169-196, 1989.
30. Guo V., Duvall MD., Crow JP, and Matalon S. Nitric oxide inhibits Na⁺ absorption across cultured alveolar type II manolayers. *AM. I. Physiol.*, 274: L369-L377, 1998.