

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Π.Α. Μολυβδάς

**Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΠΑΣΗ
ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ

ΜΑΡΙΑ Α. ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Επιβλέπων: Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς

Καθηγητής Φυσιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Γεώργιος Αντωνακόπουλος

Καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς**
Καθηγητής Φυσιολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 2. Γεώργιος Αντωνακόπουλος**
Καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 3. Δημήτριος Αρβανίτης**
Καθηγητής Ανατομίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 4. Νικόλαος Σταθάκης**
Καθηγητής Παθολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 5. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 6. Γεώργιος Κουκούλης**
Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- 7. Νικόλαος Σκεντέρης**
Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στους καθηγητές μου

Π.Α. Μολυβδά και Κ.Ι. Γουργουλιάνη

με αγάπη, σεβασμό, εκτίμηση

και ευγνωμοσύνη

Στο Γιώργο και στη Λυδία μου

Στους Γονείς μου

Πρόλογος

Από τα πρώτα μου βήματα στην ιατρική γοητευμένη από την κλινική πράξη, ήμουν σίγουρη ότι δεν θα μπορούσα ποτέ να μπω και να δουλέψω σε ένα εργαστήριο χωρίς να έχω επαφή με τον ασθενή. Η βασική έρευνα αποτελούσε για μένα, όπως και για τους περισσότερους συναδέλφους, τομέα δύσκολο, απόμακρο και απροσπέλαστο. Την ευκαιρία για να αναθεωρήσω τις παραπάνω απόψεις μου έδωσε ο Καθηγητής κ. Π.Α. Μολυβδάς όταν μου εμπιστεύθηκε την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής. Ήταν μεγάλη τιμή αλλά και χαρά για μένα να συνεργασθώ μαζί του. Η γνώση του και η καθοδήγησή του προσέφεραν πολύτιμη βοήθεια στο έργο μου. Τον ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή του στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Εκφράζω τις βαθιές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη βοήθεια που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια που τον γνωρίζω. Η γνωριμία μου με τον Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη αποτελεί σταθμό στην επαγγελματική μου σταδιοδρομία και θεωρώ τον εαυτό μου ευτυχί για τη συνεργασία μαζί του . Εκτός από την πολύτιμη και καθοριστική του υποστήριξη στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, η γνώση του, η δραστηριότητά του και οι συμβουλές του, βοήθησαν να ανοίξουν οι ορίζοντές μου και έπαιξαν σημαντικό ρόλο στους επαγγελματικούς στόχους που έθεσα. Τον ευγνωμονώ και τον τιμώ για πάντα.

Επίσης ευχαριστώ τη Λέκτορα της Φυσιολογίας κ. Λία Χατζηευθυμίου για τη βοήθεια που μου προσέφερε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω, τον τεχνικό του εργαστηρίου της Φυσιολογίας κ. Γιάννη Μακαντάση για τη συνεργασία του στο τεχνικό μέρος της μελέτης, την κ. Ζωή Σουλούκου για τη βοήθειά της στην αναισθησία των πειραματόζωων και το προσωπικό της βιβλιοθήκης

της Ιατρικής Σχολής για τη βοήθειά του στην αναζήτηση και προμήθεια της βιβλιογραφίας που χρειάστηκε για τη μελέτη.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ	Μαρία Α. Παπαγιάννη
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	Φωτίου Παπά 34 ΤΚ 41335 Λάρισα
ΤΗΛΕΦΩΝΟ	041-624704 0977-306251
E-MAIL	marpapagianni@hotmail.com
ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ	31 Ιανουαρίου 1969
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	Ελασσόνα Λάρισας
ΟΙΚΟΓΕΝ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	Έγγαμη, μητέρα ενός παιδιού 3,5 χρονών

ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

Οκτώβριος 2001	Τίτλος ειδικότητας Παιδιατρικής
Μάρτιος 1993	Πτυχίο Ιατρικής Α.Π.Θ. (Λίαν καλώς 7)
Ιούνιος 1986	Απολυτήριο 3 ^{ου} Γενικού Λυκείου Λάρισας

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά

Γαλλικά

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Αύγ 1999 – Αύγ 2001	Ειδικευόμενη παιδίατρος – Γ' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη
Νοέμβ 1997 – Αύγ 1999	Άμισθος Επιστημονικός Συνεργάτης – Παιδοενδοκρινολογική Μονάδα, Γ' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη
Ιούν 1996 – Οκτ 1997	Ειδικευόμενη παιδίατρος – Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης

- Φεβ 1996 – Μάιος 1996** **Ειδικευόμενη παιδίατρος** – Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη
- Σεπτ 1995 – Ιαν 1997** **Ειδικευόμενη παιδίατρος** – Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης
- Ιούν 1993 – Αύγ 1995** **Αγροτικός Ιατρός** – Περιφερειακό Ιατρείο Σταυρού Φαρσάλων
- Σεπτ 1994 – Αύγ 1995** Παρακολούθηση Τακτικών Εξωτερικών Παιδοενδοκρινολογικής Μονάδας Γ΄ Πανεπιστημιακής Παιδιατρικής Κλινικής ΑΠΘ, δύο φορές την εβδομάδα, με απόσπαση από το Περιφερειακό Ιατρείο
- 1995 – 2000** **Ιατρός** σε εκδρομές και κατασκηνώσεις παιδιών με σακχαρώδη διαβήτη που διοργανώνονται κάθε χρόνο από την Παιδοενδοκρινολογική Μονάδα της Γ΄ Πανεπιστημιακής Παιδιατρικής Κλινικής ΑΠΘ σε συνεργασία με τη ΧΑΝΘ
- Ιούν 1993 – Αύγ 1993** **Ιατρός** – Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών Νοσοκομείου Λάρισας (στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Νοέμβ 1997 – Μάιος 1999** Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Οκτ 1999 – Ιούν 2001** Συμμετοχή στο εκπαίδευση των φοιτητών ιατρικής στην Παιδιατρική στα πλαίσια του εκπαιδευτικού προγράμματος της Γ΄ Πανεπιστημιακής Παιδιατρικής Κλινικής ΑΠΘ

ΆΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Ιούλ 1992 – Αύγ 1992** **Elective Student** – Hammersmith Hospital, Royal Postgraduate Medical School (RPMS), University of London, UK
- Οκτ 1998 – Απρ 1999** **Έμμισθος Επιστημονικός Συνεργάτης** στο Πρόγραμμα Συμπληρωματικής Εκπαίδευσης του ΕΠΕΑΕΚ/ΥΠΕΠΘ, «Ασφάλεια και Υγιεινή Εργασίας στη Γεωργία»

1995 – 1999 Ενεργή συμμετοχή στις δραστηριότητες του «Σχολείου Άσθματος»

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ–ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΩΝ

Μάρτιος 2001 “Excel και Access”
Εργαστήριο πληροφορικής, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

Φεβρουάριος 2001 “Outlook – Εξοικείωση με το Internet”
Εργαστήριο πληροφορικής, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

Νοέμβριος 2000 «Αναζωογόνηση Νεογνού-Βρέφους-Παιδιού»
Παιδιατρική Εταιρεία Βορείου Ελλάδος

Μάρτιος–Απρίλιος 2000 “SPSS”
Εργαστήριο πληροφορικής, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

Νοέμβριος 1999 «Εφαρμογές γραφείου: Word-Power Point 2000»
Εργαστήριο πληροφορικής, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

Μάρτιος-Μάιος 1999 «Μαθήματα Πνευμονολογίας»
Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Απρίλιος 1997 «Συνέντευξη με έφηβο-Καρδιοαναπνευστική αναζωογόνηση εφήβου», Θεσσαλονίκη,
Ελληνική Εταιρεία Εφηβικής Ιατρικής

Νοέμβ 1996-Απρίλ 1997 «Αέρια αίματος–Οξεοβασική Ισορροπία»
Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και
Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Gourgouliannis KI, Brelas N, Hatziparasides G, Papayianni M, Molyvdas PA. “*The influence of altitude in bronchial asthma*”, Arch Med Res Sept-Oct 2001;32(5):429-31
2. Papayianni M, Gourgouliannis KI, Molyvdas PA. “*Insulin NO-Dependent Action on Airways Smooth Muscles*”, NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry, Jan 2001;5(1):72-76
3. Gourgouliannis KI, Papagianni M, Molyvdas PA. “*Maternal atopy and childhood bronchial asthma*”, J ALLERGY CLIN IMMUNOL, March 1998;101(3):432
4. Γ. Χατζηπαρασίδης, Ν. Μπρέλλας, Μ. Παπαγιάννη, Κ. Πασχουλάρη, Μ. Παπαθεοδώρου, Π. Κατοίκου, Ν. Μπρεγιάννης, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. «*Πορεία και πρόγνωση παιδικού βρογχικού άσθματος*» ΠΝΕΥΜΩΝ 1997, 10(2):103-107

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Β. Δεμερτζίδου, Ι. Ξυνιάς, Ν. Σουρκόβα, Ο. Κοτζαερίδου, Μ. Παπαγιάννη, Θ. Θεοδωρίδης, Κ. Σπύρογλου: «*Ηπατίτιδα Β και C στην παιδική ηλικία*». 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Ιωάννινα, 2001.
2. Α. Μάρκου, Α. Κατσάβα, Μ. Παπαγιάννη, Α. Δράκου, Β. Ταμπάρας, Ε. Καρβούνη, Γ. Βανιώτη. «*Το “επείγον” όσχεο*» 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2001.
3. Α. Μάρκου, Μ. Παπαγιάννη, Α. Κατσάβα, Σ. Ζησοπούλου, Β. Ταμπάρας, Ε. Καρβούνη, Α. Κατσιλέρου. «*Χαρακτηριστικά του ασβεστοποιημένου επιθηλώματος του Malherbe (Pilomatricoma)*» 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2001.
4. Α. Μάρκου, Σ. Ζησοπούλου, Α. Δράκου, Α. Κατσάβα, Μ. Παπαγιάννη, Κ. Τασόπουλος. «*Κυστικό λεμφαγγείωμα (κυστικό ύγρωμα)*» 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2001
5. Α. Μάρκου, Α. Κατσάβα, Μ. Παπαγιάννη, Σ. Ζησοπούλου, Α. Δράκου. «*Το σύνδρομο Tourniquet*» 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη, 2001.
6. Π. Τσόπα, Δ. Κρεμέτη, Ν. Τσικλής, Φ. Δημόπουλος, Μ. Παπαγιάννη, Γ. Κρομμύδας, Μ. Γραβάνη, Γ. Μυλωνάς, Κ. Γουργουλιάννης, Θ. Γέμτος, Π. Μολυβδάς. «*Αναπνευστική λειτουργία εργαζομένων σε εκκοκκιστήρια*», **2^ο Βραβείο**, 5^ο Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Αλεξανδρούπολη, 1999.
7. Π. Τσούτσου, Α. Φωτιάδου, Μ. Παπαγιάννη, Κ. Ι. Γουργουλιάννης. «*Πορεία και παρακολούθηση παιδιών με βρογχικό άσθμα*», 9^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσ/νίκη, 1997.
8. Μ. Παπαδοπούλου, Ε. Κούμα, Ο. Τσιάτσιου, Χ. Χατζησεβαστού-Λουκίδου, Μ. Παπαγιάννη, Π. Σαββοπούλου-Αυγουστίδου, Α.Βυζαντιάδης, Μ. Οικονόμου-Αντωνιάδου. «*Θεραπεία με αυξητική ορμόνη (GH) και τελικό ανάστημα στο σύνδρομο Turner*», 35^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη 1997.
8. Μ. Παπαδοπούλου, Μ. Παπαγιάννη, Σ. Ντούμα-Θανόγλου, Π. Σαββοπούλου-Αυγουστίδου, Μ. Οικονόμου-Αντωνιάδου, Α. Βυζαντιάδης. «*Αύξηση και εφηβεία στον ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη*», 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Θεσ/νίκη, 1997.
9. Μ. Παπαγιάννη, Κ. Γαλανοπούλου, Ε. Μαυροματίδη, Μ. Παπαθεοδώρου, Κ.Πασχουλάρη, Δ. Ριζοπούλου, Κ. Γουργουλιάννης. «*Θεραπεία παιδικού βρογχικού άσθματος*», 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 1996.

10. Μ. Παπαγιάννη, Φ. Καρμίρη, Θ. Μερίδης, Κ. Γουργουλιάνης. «*Εκπαίδευση δασκάλων στο βρογχικό άσθμα*», 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 1996.
11. Μ. Παπαγιάννη, Μ. Μπασδαβάνος, Κ. Πασχουλάρη, Κ.. Γαλανοπούλου, Ε. Μαυροματίδη, Μ. Παπαθεοδώρου, Δ. Ριζοπούλου, Κ. Γουργουλιάνης. «*Συνθήκες περιβάλλοντος και διατροφής παιδιών με βρογχικό άσθμα*», 21^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 1995.
12. Η. Αλεξανδρίδης, Κ.. Γαλανοπούλου, Π. Δρούζια, Ε. Μαυροματίδη, Π. Μπουκουβάλα, Ι. Ξάνθη, Μ. Παπαθεοδώρου, Κ. Πασχουλάρη, Δ. Ριζοπούλου, Κ. Χρήστου, Μ. Παπαγιάννη, Μ. Μπασδαβάνος, Κ. Γουργουλιάνης. «*Συχνότητα του παιδικού άσθματος στην περιοχή των Φαρσάλων*», 1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Αθήνα, 1995.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ	20
Ιστορικά στοιχεία	20
Δομή και σύνθεση της ινσουλίνης	21
Υποδοχέας ινσουλίνης	23
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ	25
Σακχαρώδης διαβήτης	25
Τρόποι χορήγησης της ινσουλίνης	28
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ	32
Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων	32
Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό του λίπους	35
Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών	37
Η επίδραση της ινσουλίνης στην αύξηση	38
ΑΝΑΤΟΜΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ	40
Τραχεία	40
Βρογχικό δένδρο	43
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΠΑΣΗΣ-ΧΑΛΑΣΗΣ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ	45
Η σύζευξη της διέγερσης με τη συστολή στις λείες μυϊκές ίνες	45
Ο ρόλος των διαύλων και της αντλίας ασβεστίου	49
Ο ρόλος των ιόντων	51
Ο ρόλος του επιθηλίου	52

Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΕ ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	58
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	59
Χορήγηση ινσουλίνης	60
Χορήγηση ινσουλίνης μετά την αφαίρεση του επιθηλίου	60
Χορήγηση ινσουλίνης παρουσία L-NAME	61
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από KCl σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού	62
Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (Ach) σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού	65
Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (Ach) μετά από την αφαίρεση του επιθηλίου σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού	68
Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (Ach) σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού παρουσία L-NAME	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	80
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	81
SUMMARY	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανακάλυψη της ινσουλίνης, ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα στην ιστορία της ιατρικής, έφερε πραγματική επανάσταση στην αντιμετώπιση της μέχρι τότε θανατηφόρας νόσου, του ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδη διαβήτη.

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη, εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος και αποτελεί την κύρια ορμόνη-ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης ενώ παράλληλα παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπών και των πρωτεϊνών. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως η κυρίως υπεύθυνη ορμόνη για την πρόσληψη, τη χρήση και την αποθήκευση των θρεπτικών κυτταρικών συστατικών. Η αναβολική δράση της ινσουλίνης περιλαμβάνει την ενδοκυττάρια χρήση και αποθήκευση της γλυκόζης, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων ενώ αναστέλλει καταβολικές διεργασίες όπως τη διάσπαση του γλυκογόνου, του λίπους και των πρωτεϊνών¹.

Η ανεπάρκεια ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας χρόνιας νόσου, του σακχαρώδη διαβήτη, με κύριο χαρακτηριστικό την υπεργλυκαιμία τόσο στον ινσουλινοεξαρτώμενο (τύπου I) όσο και στον μη-ινσουλινοεξαρτώμενο (τύπου II) τύπο του. Η τριάδα των συμπτωμάτων που θέτει την υπόνοια της νόσου είναι πολυδιψία, πολουρία και ανεξήγητη απώλεια βάρους σώματος ενώ η κακή ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος έχει ως συνέπεια την εμφάνιση αρκετών επιπλοκών. Η ινσουλίνη ελαττώνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος αναστέλλοντας την παραγωγή της από το ήπαρ και διεγείροντας την πρόσληψη και το μεταβολισμό της από το μυϊκό και το λιπώδη ιστό.

Η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης αποτελεί τη βάση της θεραπείας όλων των ασθενών με ινσουλινοεξαρτώμενο και πολλών ασθενών με μη-ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Όταν είναι αναγκαίο η ινσουλίνη μπορεί να χορηγηθεί

ενδοφλεβίως, όμως η μακροχρόνια θεραπεία βασίζεται στην υποδόρια χορήγησή της. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει μελέτες για τη χορήγησή της μέσω άλλων οδών με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των διαβητικών ασθενών οι οποίοι υφίστανται την ταλαιπωρία των καθημερινών ενέσεων. Το αναπνευστικό σύστημα είναι η περισσότερα υποσχόμενη εναλλακτική πρόταση¹. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες χορήγησης της ινσουλίνης σε εισπνεύσιμη μορφή τόσο σε ασθενείς με ινσουλινοεξαρτώμενο όσο και σε ασθενείς με μη-ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη με καλύτερα αποτελέσματα στη δεύτερη περίπτωση².

Εκτός όμως από τις γνωστές δράσεις της ινσουλίνης, τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πάρα πολλές μελέτες όσον αφορά τη δράση της ινσουλίνης στις λείες μυϊκές ίνες. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές έγιναν σε αγγεία και έδειξαν ότι η ινσουλίνη προκαλεί χάλαση στα λεία μυϊκά κύτταρα αυτών. Σχετικά με το μηχανισμό δράσης, φαίνεται να εξαρτάται αφενός από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και αφετέρου από τη δράση της αντλίας Na^+/K^+ . Παρά το γεγονός όμως ότι έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες σε αγγεία, δεν υπάρχουν ανάλογες μελέτες σε λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών³⁻⁴.

Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η δράση της ινσουλίνης στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών, ενόψει της πιθανής μελλοντικής της χορήγησης μέσω του αναπνευστικού συστήματος σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη.

Χρησιμοποιήθηκαν τμήματα τραχείας που ελήφθησαν από νεαρά κουνέλια μετά από τη χορήγηση αναισθητικού (πεντοθάλη). Για το σκοπό της μελέτης, σε κάθε τμήμα προκλήθηκε σύσπαση με τη χρήση ακετυλοχολίνης ή χλωριούχου καλίου. Στη διάρκεια του πειράματος, το τμήμα της τραχείας παρέμενε βυθισμένο σε ειδικό λουτρό και σε συνεχή διαβροχή με διάλυμα Krebs (KS) στο οποίο διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης: 95% O_2 και 5% CO_2 . Αρχικά μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης στη

σύσπαση που είχε προκληθεί από το γλωριούχο κάλιο. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση που είχε προκληθεί από την ακετυλοχολίνη, πριν και μετά την μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου. Τέλος, μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση που είχε προκληθεί από την ακετυλοχολίνη, παρουσία N^ω – nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), ενός αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Ιστορικά στοιχεία

Η απομόνωση της ινσουλίνης το 1922 από τους Banting και Best αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα στην ιστορία της ιατρικής. Για αρκετές δεκαετίες όμως πριν, πολλοί ερευνητές μέσα από τις μελέτες τους πρόσφεραν σημαντικές πληροφορίες. Η πρώτη παρατήρηση ήταν το 1869 από ένα Γερμανό φοιτητή τον Paul Langerhans, ο οποίος ανακάλυψε ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι κυττάρων, των αδενοκυψελών, τα οποία εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα και κάποια άλλα κύτταρα τα οποία είναι συγκεντρωμένα σε νησίδια και επιτελούν μια δεύτερη διαφορετική λειτουργία. Μια πρώτη ένδειξη της λειτουργίας των κυττάρων αυτών αναφέρθηκε από τους Oscar Minkowski και Joseph von Mering οι οποίοι έδειξαν ότι παγκρεατομηθέντα σκυλιά παρουσίαζαν ένα σύνδρομο που έμοιαζε με το σακχαρώδη διαβήτη στους ανθρώπους. Στη συνέχεια υπήρξαν πάρα πολλές προσπάθειες για την απομόνωση αυτής της ουσίας του παγκρέατος που ήταν υπεύθυνη για τη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος. Στις αρχές της δεκαετίας του 1900 ο Gurg Ludwig Zuelzer κατάφερε να σώσει ένα διαβητικό ασθενή που πέθαινε, με εκχυλίσματα παγκρέατος. Αν και ο ασθενής βελτιώθηκε προσωρινά, στη συνέχεια βυθίστηκε σε κόμα και πέθανε. Το 1911 ο E.L.Scott, ένας φοιτητής στο πανεπιστήμιο του Σικάγο έκανε άλλη μια προσπάθεια να απομονώσει την ουσία αυτή. Χρησιμοποιώντας αλκοολούχα εκχυλίσματα παγκρέατος ο Scott θεράπευσε αρκετά διαβητικά σκυλιά με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επίσης μεταξύ 1916 και 1920 ο Ρουμάνος φυσιολόγος Nicolas Paulesco έκανε μια σειρά πειραμάτων στα οποία βρήκε ότι ενέσεις εκχυλισμάτων παγκρέατος μείωσαν τη γλυκόζη και την οξόνη στα ούρα διαβητικών σκυλιών. Το 1921 ο Frederick G. Banting, ένας νεαρός Καναδός χειρουργός, με τη βοήθεια ενός τεταρτοετή φοιτητή ιατρικής του Charles H. Best, κατάφεραν να απομονώσουν τελικά την ουσία αυτή από

το πάγκρεας, η οποία δεν ήταν άλλη από την ινσουλίνη και να την χορηγήσουν αρχικά σε διαβητικά σκυλιά και λίγους μήνες αργότερα τον Ιανουάριο του 1922, στον πρώτο διαβητικό ασθενή με θεαματικά αποτελέσματα. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του J.J.R.Macleod, καθηγητή φυσιολογίας στο Τορόντο, και του χημικού J.B.Collip, κατάφεραν να παίρνουν πιο σταθερά και καθαρά παρασκευάσματα χρησιμοποιώντας ως πηγές χοίρους και βοοειδή. Το 1923 οι Banting και Macleod κέρδισαν το Νόμπελ ιατρικής το οποίο δήλωσαν ότι μοιράζονται με τους Best και Collip. Στα αμέσως επόμενα χρόνια επιτεύχθηκε η αύξηση τόσο του ποσού όσο και της καθαρότητας της ουσίας που απομονώνονταν. Έτσι η ινσουλίνη ήταν διαθέσιμη σε όλους τους διαβητικούς ασθενείς. Μέσα σ' ένα δύο χρόνια από την ανακάλυψη της ινσουλίνης σημειώθηκε μια πραγματική επανάσταση στη θεραπεία των ασθενών αυτών^{1,5-7}.

Δομή και σύνθεση της ινσουλίνης

Αν και η ινσουλίνη αναγνωρίστηκε ότι είναι μια πρωτεΐνη, πολύ γρήγορα μετά την ανακάλυψή της, η χημική δομή του μορίου της προσδιορίστηκε αρκετά χρόνια αργότερα από τον Sanger και συν. Η ινσουλίνη ήταν η πρώτη ορμόνη για την οποία αποσαφηνίστηκε ολόκληρη η ακολουθία των αμινοξέων (Βραβείο Νόμπελ χημείας στο Sir Frederick Sanger το 1959). Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην πλήρη σύνθεση της πρωτεΐνης το 1963 και στην αποσαφήνιση της τρισδιάστατης δομής της από τον Hodgkin και συν. το 1972.

Το μόριο της ινσουλίνης αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, την Α και την Β, που συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Επίσης υπάρχει ένας ακόμη δεσμός μεταξύ αμινοξέων στην Α αλυσίδα (Η Α αλυσίδα περιλαμβάνει 21 αμινοξέα ενώ η Β 30). Το μοριακό βάρος της ινσουλίνης είναι περίπου 5800 Dalton.

Όταν οι δύο αλυσοί αμινοξέων διαχωρίζονται η λειτουργική δραστηριότητα του μορίου της ινσουλίνης μηδενίζεται¹.

Η σύνθεση της ινσουλίνης επιτελείται μέσα στα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος. Το σημαντικότερο ερέθισμα για την έκκριση της ινσουλίνης είναι η γλυκόζη χωρίς αυτό να σημαίνει ότι είναι και το μοναδικό. Ουσίες που προάγουν την έκκριση της ινσουλίνης είναι εκτός από τη γλυκόζη, η λευκίνη, η αργινίνη και διάφορα άλλα αμινοξέα, η γλυκαγόνη, τα κετονικά σώματα οι σουλφονουλορίες, η γαστρίνη, η εκκριματίνη η παγκρεατοζυμίνη, η ισοπροτερενόλη και οι β-αδρενεργικοί αναστολείς όπως η φαιτολαμίνη. Ουσίες που αναστέλλουν την έκκριση ινσουλίνης είναι η νοραδρεναλίνη, η αδρεναλίνη (α-αδρενεργική δράση), σπάνια σάκχαρα όπως η μαννοεπτουλόζη, και η διαζοξίδη. Το γονίδιο της ινσουλίνης στον άνθρωπο βρίσκεται στην περιοχή p13 του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 11, δίπλα από τα γονίδια για τον IGF II και την υδροξυλάση της τυροσίνης⁸.

Η ινσουλίνη συντίθεται με το συνήθη κυτταρικό μηχανισμό για τη σύνθεση των πρωτεϊνών που αρχίζει με τη μετάφραση του RNA για την ινσουλίνη στα ριβοσώματα, που βρίσκονται προσκολλημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το προϊόν της αρχικής αυτής μετάφρασης, η προπροϊνσουλίνη, η οποία αποτελείται από μια αλυσίδα που περιέχει τις δύο αλυσίδες (A και B) της ινσουλίνης, ένα πεπτίδιο το C-πεπτίδιο που τις συνδέει και μια αλληλουχία αμινοξέων συνδεδεμένη στο αμινικό άκρο της. Η προπροϊνσουλίνη έχει μοριακό βάρος περίπου 11500 Dalton αλλά στη συνέχεια τέμνεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να σχηματίσει την προϊνσουλίνη που αποτελείται από δύο αλυσίδες, A και B, συνδεδεμένες με το C-πεπτίδιο. Η προϊνσουλίνη μεταφέρεται στη συσκευή Golgi όπου αποχωρίζεται το C-πεπτίδιο και προκύπτει η ινσουλίνη.

Στην κυκλοφορία απελευθερώνονται ίσα ποσά C-πεπτιδίου και ινσουλίνης. Το C-πεπτίδιο αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη έκκρισης ινσουλίνης⁹⁻¹⁰. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ινσουλίνης που απελευθερώνεται στο πλάσμα είναι περίπου 6 λεπτά και αποσύρεται από την κυκλοφορία μέσα σε 10-15 λεπτά. Εκτός από το ποσό της ινσουλίνης που συνδέεται στα κύτταρα-στόχους, η υπόλοιπη υφίσταται κυρίως διάσπαση από το ένζυμο ινσουλινάση στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς¹⁰.

Υποδοχέας ινσουλίνης

Η έναρξη της δράσης της ινσουλίνης στα κύτταρα πραγματοποιείται με τη σύνδεσή της σε έναν υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης. Ο υποδοχέας αυτός της ινσουλίνης υπάρχει όχι μόνο στα κλασσικά κύτταρα-στόχους δράσης της ινσουλίνης (ηπατικά, μυϊκά, λιπώδη) αλλά και σε άλλα όπως τα ερυθροκύτταρα, τα νευρικά και τα γεννητικά κύτταρα. Ο αριθμός των υποδοχέων αυτών ποικίλει από 40/κύτταρο στα ερυθροκύτταρα έως περισσότεροι από 200000/κύτταρο στα ηπατοκύτταρα και στα λιποκύτταρα¹.

Το γονίδιο για τον υποδοχέα της ινσουλίνης βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19. Ο υποδοχέας για την ινσουλίνη είναι μια μεγάλη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο α-υποομάδες με μοριακό βάρος 135-kDa η κάθε μία και δύο β-υποομάδες με μοριακό βάρος 95-kDa η καθεμία. Οι υποομάδες αυτές είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν ένα β-α-α-β ετεροτετραμερές. Οι α-υποομάδες βρίσκονται εντελώς έξω από την κυτταρική μεμβράνη και αποτελούν τα σημεία σύνδεσης με την ινσουλίνη ενώ οι β-υποομάδες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με το ένα άκρο τους να προεξέχει

μέσα στο κυτόπλασμα και αποκτούν δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης¹¹⁻¹⁵.

Η σύνδεση της ινσουλίνης στις α-υποομάδες του υποδοχέα της οδηγεί σε μια γρήγορη αυτοφωσφορυλίωση αρκετών κατάλοιπων τυροσίνης στις β-υπομονάδες. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα είναι αυτοκαταλυώμενη και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα προς άλλα υποστρώματα. Επίσης μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα, λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C και η οποία ελαττώνει τη δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα παρουσιάζοντας ένα μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης. Η δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης φαίνεται να απαιτείται για τη μεταβίβαση του μηνύματος. Η ενεργοποίηση της κινάσης δίνει το έναυσμα για το ξεκίνημα ενός καταρράκτη γεγονότων με πρώτο την φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης-1 (Insulin Receptor Substrate-1, IRS-1). Ο IRS-1 χρησιμεύει ως πρωτεΐνη-δεξαμενή για άλλες πρωτεΐνες που έχουν πεδία που ονομάζονται Src homology 2 (SH2). Μια απ'αυτές τις πρωτεΐνες είναι η φωσφοϊνοσιτίδη 3 κινάση (PI3-κινάση) η οποία ενεργοποιείται από αρκετές ορμόνες που διεγείρουν τη μιτογένεση και αποτελεί ένα μεσολαβητή αυτής. Επίσης άλλα ένζυμα που ενεργοποιεί η ινσουλίνη είναι πρωτεϊνικές κινάσες με μιτογόνο δραστηριότητα (Mitogen-activated protein kinases, MAP kinases)¹¹⁻¹⁵.

Τελικά η ινσουλίνη μετά τη σύνδεσή της στον υποδοχέα της προκαλεί την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση κάποιων ενζύμων ρυθμίζοντας απ'τη μια τον ενδοκυττάριο μεταβολικό μηχανισμό και λαμβάνοντας χώρα απ'την άλλη σε άλλες δραστηριότητες όπως η μιτογένεση.

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Σ/Δ) είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία και διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με απόλυτη ή σχετική ανεπάρκεια στην έκκριση ινσουλίνης ή/και στη δράση της¹⁶.

Η πλειονότητα των διαβητικών ασθενών μπορεί να ταξινομηθεί στις δύο μεγάλες κατηγορίες, τον ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (ΙΕΣΔ) ή τύπου Ι σακχαρώδη διαβήτη και τον μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (ΜΙΕΣΔ) ή τύπου ΙΙ σακχαρώδη διαβήτη.

Η επίπτωση του κάθε τύπου Σ/Δ ποικίλει ανά τον κόσμο¹⁷⁻¹⁸. Στις ΗΠΑ περίπου το 10% των διαβητικών ασθενών έχουν ΙΕΣΔ και η επίπτωσή του είναι περίπου 18 περιπτώσεις/100000 κατοίκους/έτος. Στην Ευρώπη μεγαλύτερη επίπτωση παρουσιάζουν οι βόρειες χώρες με πρώτη τη Φινλανδία¹⁹ (35 περιπτώσεις/100000 κατοίκους/έτος) ενώ τη μικρότερη οι νότιες χώρες όπως η Γαλλία και η Ιταλία (8 περιπτώσεις/100000 κατοίκους/έτος)²⁰. Στην Ελλάδα η επίπτωση είναι 10 περιπτώσεις/100000 παιδιών/έτος²¹. Εξαίρεση στον κανόνα αποτελεί η Σαρδηνία όπου η επίπτωση είναι 30 περιπτώσεις/100000 κατοίκους /έτος¹⁹. Παρ'όλα αυτά η σχετικά χαμηλή επίπτωση του Σ/Δ στη νότια Ευρώπη είναι αρκετά υψηλότερη από εκείνη στην Ιαπωνία (1,2-2 περιπτώσεις/100000 κατοίκους/έτος)²²⁻²³. Η πλειονότητα των διαβητικών ασθενών έχουν ΜΙΕΣΔ. Στις ΗΠΑ περίπου το 90% των διαβητικών ασθενών ανήκει στην κατηγορία αυτή. Η επίπτωση του ΜΙΕΣΔ αυξάνει με την ηλικία με μέση τιμή περίπου 440 περιπτώσεις/100000 κατοίκους /έτος την έκτη δεκαετία της ζωής στις ΗΠΑ. Σε αντίθεση με τον ΙΕΣΔ η επίπτωση του ΜΙΕΣΔ είναι μεγαλύτερη

στη νότια Ευρώπη (περίπου 800 περιπτώσεις/100000 κατοίκους /έτος) από αυτή στη βόρεια Ευρώπη (100-250 περιπτώσεις/100000 κατοίκους /έτος).

Η επίπτωση του Σ/Δ αυξάνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε για την επόμενη δεκαετία να μιλάμε για «επιδημία» Σ/Δ. Η συχνότητα της νόσου αναμένεται να διπλασιαστεί πριν το 2010. Ενώ το 1997, ο αριθμός των ατόμων με Σ/Δ υπολογίζονταν σε 124 εκατομμύρια (περίπου 3,5 εκατομμύρια με ΙΕΣΔ), μέχρι το 2010 υπολογίζεται ότι ο αριθμός αυτός θα ξεπεράσει τα 220 εκατομμύρια παγκοσμίως (περίπου 5 εκατομμύρια με ΙΕΣΔ)²⁴⁻²⁵.

Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετισθεί με το Σ/Δ. Θετικό οικογενειακό ιστορικό και αυξημένο βάρος σώματος πάνω από 20% του ιδανικού, προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΜΙΕΣΔ. Όσον αφορά τον ΙΕΣΔ, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι πρόκειται για αυτοάνοσο νόσημα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των νησιδίων του παγκρέατος, τα β-κύτταρα των οποίων καταστρέφονται με αυτοάνοση διεργασία μεσολαβούμενη από τα Τ κύτταρα. Τα έναντι των νησιδίων του παγκρέατος αντισώματα (islet cell antibodies, ICA) αναγνωρίζουν αντιγόνα του κυτταροπλάσματος ή της κυτταρικής μεμβράνης τα κυριότερα των οποίων είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέως (glutamic acid decarboxylase, GAD), η ινσουλίνη, ένα αντιγόνο MB 37kDa, η καρβοξυπεπτιδάση Η, κ.ά. Τα ICA ανιχνεύονται σε ποσοστό 65-90% των νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών ασθενών και στο 0,9-9% στους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών με ΙΕΣΔ. Τα anti-GAD αντισώματα ανιχνεύονται στο 70-80% των νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών ασθενών με ΙΕΣΔ. Αυτοαντισώματα έναντι της ινσουλίνης (insulin autoantibodies, IAA) ανιχνεύονται στο 53% των νεοδιαγνωσθέντων διαβητικών ασθενών με ΙΕΣΔ. Πολλές μελέτες έχουν γίνει με σκοπό τη χρήση της ανίχνευσης των αντισωμάτων αυτών για την πρόγνωση του ΙΕΣΔ. Οι πρώτες μελέτες σε γενικό πληθυσμό έχουν

δείξει ότι παρόλο που η ιδιαίτερη προγνωστική αξία των IAA (21%), των ICA (25%) και των anti-GAD αντισωμάτων (28%) είναι σχετικά χαμηλή, ο συνδυασμός των τριών αυξάνει πολύ περισσότερο την προγνωστική αξία του ελέγχου (71%). Επίσης σε συγγενείς πρώτου βαθμού η ανίχνευση μόνο IAA συσχετίζεται με μικρό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ενώ η παρουσία υψηλού τίτλου ICA και anti-GAD αντισωμάτων σε συνδυασμό με IAA συσχετίζεται με πολύ υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Έχει βρεθεί επίσης συσχέτιση μεταξύ του IESΔ και αντιγόνων HLA ιδιαίτερα στις γονιδιακές θέσεις B και DR. Περίπου το 95% των ασθενών με IESΔ έχουν θετικό HLA-DR3 και DR4 ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το γενικό πληθυσμό είναι 40%²⁶⁻³⁰.

Η διάγνωση του Σ/Δ βασίζεται στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων (πολυουρία, πολυδιψία, ανεξήγητη απώλεια βάρους σώματος) και στη διαπίστωση της υπεργλυκαιμίας. Ο IESΔ χαρακτηρίζεται από απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης, απόλυτη έναρξη, τάση για κέτωση και ανάγκη για εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης εφ'όρου ζωής. Ο τύπου I Σ/Δ εμφανίζεται κυρίως σε ηλικίες μικρότερες των 30 χρόνων αλλά μπορεί να εμφανισθεί και σε οποιαδήποτε ηλικία. Είναι ο συχνότερος τύπος στα παιδιά και στους νεαρούς ενήλικες. Ο MIESΔ εμφανίζεται κυρίως σε ενήλικες μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής αλλά και σε οποιαδήποτε ηλικία. Συχνά δεν εμφανίζονται συμπτώματα για πολλά χρόνια και μπορεί να διαγνωσθεί στα πλαίσια τυχαίου ελέγχου της γλυκόζης του αίματος και των ούρων ή από την εμφάνιση κάποιας από τις επιπλοκές του. Συνήθως χρειάζεται να γίνει δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. Συχνά σχετίζεται με παχυσαρκία και υπερβολική αντίσταση των υποδοχέων στην ινσουλίνη. Κετοξέωση μπορεί να συμβεί στους ασθενείς αυτούς στα πλαίσια κάποιας σοβαρής λοίμωξης¹⁸.

Η αντιμετώπιση του Σ/Δ έχει ως στόχο την πρόληψη των επιπλοκών της νόσου. Στις οξείες επιπλοκές συγκαταλέγονται η υπογλυκαιμία, η διαβητική κετοξέωση και οι

λοιμώξεις, ιδιαίτερα από μυκοβακτηρίδια, αναερόβια μικρόβια και μύκητες. Η κακή ρύθμιση του Σ/Δ οδηγεί πολύ γρήγορα στην εμφάνιση των χρόνιων επιπλοκών του. Η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στα αγγεία με αποτέλεσμα την εμφάνιση αμφιβληστροειδοπάθειας που οδηγεί σε τύφλωση, νεφροπάθειας που οδηγεί σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και αθηροσκλήρωσης. Στις χρόνιες επιπλοκές συγκαταλέγονται και η διαβητική νευροπάθεια καθώς και η ανάπτυξη ελκών στα πόδια που οδηγούν σε ακρωτηριασμό. Η ινσουλίνη έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση του Σ/Δ, στην πρόληψη των επιπλοκών και στην αύξηση του μέσου όρου ζωής των ασθενών αυτών¹⁸.

Τρόποι χορήγησης της ινσουλίνης

Πολύ γρήγορα μετά την ανακάλυψη της ινσουλίνης από τους Banting και Best και τη χορήγησή της με υποδόριες ενέσεις στους ασθενείς με Σ/Δ τύπου I, οι ερευνητές άρχισαν να ψάχνουν για διαφορετικούς τρόπους χορήγησής της. Αν και η παραγωγή καθαρότερης ινσουλίνης είχε σημαντικά αποτελέσματα στην πρόληψη των επιπλοκών από την υποδόρια χορήγησή της με ενέσεις όπως λιποατροφία, λιποδυστροφία και τοπική αλλεργική αντίδραση στα σημεία των ενέσεων, η ανάγκη για βελτίωση της ζωής των διαβητικών ασθενών με αποφυγή των καθημερινών ενέσεων προτρέπει στην εύρεση νέων μεθόδων χορήγησης της ινσουλίνης³¹. Μέχρι τώρα έχει μελετηθεί η απορρόφηση και η αποτελεσματικότητα της ινσουλίνης μετά από τη χορήγησή της μέσω διαφόρων οδών.

Η από του στόματος χορήγηση δεν είχε καλά αποτελέσματα λόγω της διάσπασής της από πεπτικά ένζυμα πριν την απορρόφησή της από τον εντερικό βλεννογόνο. Η προσπάθεια χορήγησής της με τη μορφή κάψουλας δεν έλυσε το πρόβλημα ενώ από

την άλλη πλευρά η καθυστέρηση στην έναρξη της δράσης της αποκλείουν προς το παρόν αυτή την οδό χορήγησης³²⁻³⁵.

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι ικανή ποσότητα ινσουλίνης μπορεί να απορροφηθεί από τον βλεννογόνο του ορθού και να ελαττώσει τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος. Απαραίτητη όμως είναι η χρησιμοποίηση κάποιων παραγόντων που βοηθούν στην απορρόφηση της ινσουλίνης. Η αναζήτηση τέτοιων ασφαλών παραγόντων καθώς και η σκέψη ότι θα χρειαζόταν αρκετές φορές καθημερινά να χορηγηθεί ινσουλίνη από το ορθό στους διαβητικούς ασθενείς, μείωσε τον ενθουσιασμό των ερευνητών^{32-33,35}.

Παρά το ότι βρέθηκε ότι η ινσουλίνη απορροφάται από το βλεννογόνο του κόλπου και το ενδομήτριο, οι έρευνες δεν συνεχίσθηκαν προς αυτήν την κατεύθυνση^{32,35-36}.

Η διαδερματική χορήγηση ινσουλίνης με τη χρήση χαμηλών επιπέδων ηλεκτρικού ρεύματος είχε καλά αποτελέσματα όσον αφορά την απορρόφηση της ορμόνης^{32,35,37}. Ενθουσιασμό όμως προκάλεσε η ανακάλυψη και μελέτη των αντλιών ινσουλίνης με τις οποίες μπορεί να γίνεται συνεχής έγχυση της ορμόνης υποδόρια, ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοφλέβια. Παρά τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν με τη χρήση των αντλιών αυτών, όπως επεισόδια κέτωσης ή υπογλυκαιμίας λόγω βλάβης της αντλίας, απόφραξη του καθετήρα έγχυσης, λοιμώξεις και αύξηση βάρους σώματος, φαίνεται ότι η μέθοδος έγινε αποδεκτή από τους ασθενείς και βελτίωσε την ποιότητα ζωής τους. Δεν συνίσταται όμως για την αντιμετώπιση του Σ/Δ στα παιδιά^{35,38-40}.

Η σκέψη της χορήγησης της ινσουλίνης διά του αναπνευστικού συστήματος αποτέλεσε πρόκληση για πολλούς ερευνητές και ήταν από τις πρώτες οδούς που μελετήθηκαν. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν την ενδορινική χορήγηση ινσουλίνης με τη μορφή ψεκασμών. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Επιτυγχάνονται

πολύ γρήγορα επίπεδα ινσουλίνης στον ορό μετά την ενδορινική χορήγησή της σε σχέση με την υποδόρια. Στην απορρόφηση της ινσουλίνης από τον ρινικό βλεννογόνο κατά κύριο λόγο, οφείλεται η δράση της μετά από τη χορήγησή της με τη μορφή οφθαλμικών σταγόνων σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα, με τη μεταφορά του διαλύματος μέσω των δακρυϊκών πόρων στη ρινική κοιλότητα. Τις τελευταίες δεκαετίες άρχισαν να γίνονται κλινικές μελέτες τόσο σε ασθενείς με ΜΙΕΣΔ όσο και με ΙΕΣΔ. Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί όμως η ανάγκη χρήσης κάποιου παράγοντα που να βοηθά την απορρόφηση της ινσουλίνης από τον ρινικό βλεννογόνο και η πρόκληση τοπικού ερεθισμού^{23,32,35,43-44}.

Η χορήγηση της ινσουλίνης σε εισπνεόμενη μορφή υπερπηδά το πρόβλημα αυτό διότι δεν χρειάζεται κάποιος πρόσθετος παράγοντας για την απορρόφηση της από το επιθήλιο των αεραγωγών. Έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη χορήγηση εισπνεόμενης μορφής ινσουλίνης ενώ την τελευταία δεκαετία άρχισαν να γίνονται και μακράς διάρκειας κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ΜΙΕΣΔ ή ΙΕΣΔ. Τα αποτελέσματα είναι αναπαραγώγιμα και δείχνουν ότι με τη χορήγηση εισπνεόμενης ινσουλίνης επιτυγχάνονται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με την υποδόρια χορήγηση, επίπεδα της ορμόνης στον ορό και μπορούν να ελαττώσουν σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης του ορού. Επομένως οι ασθενείς μπορούν να παίρνουν τη δόση τους λίγο πριν το γεύμα. Υπάρχει όμως μεγαλύτερος κίνδυνος υπογλυκαιμίας. Η βιοδιαθεσιμότητα της εισπνεόμενης ινσουλίνης είναι πολύ πιο χαμηλή από εκείνη που χορηγείται με υποδόρια ένεση και για το λόγο αυτό χρειάζονται αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες ινσουλίνης στην πρώτη περίπτωση, γεγονός που θα αυξήσει το κόστος της θεραπείας. Επίσης η ανάγκη μεταφοράς από τον ασθενή μιας συσκευής εισπνοών δημιουργεί σίγουρα κάποιο πρόβλημα στην άνεσή του. Απ'την άλλη πλευρά όμως, αποφεύγει τις καθημερινές ενέσεις και τις ανεπιθύμητες ενέργειες αυτών όπως αναφέρονται

παραπάνω. Χρειάζεται όμως, να γίνουν ακόμη πολλές κλινικές μελέτες μακράς διάρκειας και σε μεγάλο αριθμό ασθενών, για να διαπιστωθεί αν μπορεί να επιτευχθεί εξίσου καλή ρύθμιση της νόσου και πρόληψη των επιπλοκών της σε σχέση με την υποδόρια χορήγηση. Επίσης είναι ανάγκη να μελετηθούν και τα πιθανά αποτελέσματα που θα είχε η μακροχρόνια έκθεση των αεραγωγών και των πνευμόνων στην ινσουλίνη (ανοσογονικότητα, τοξικότητα, αναπνευστική λειτουργία)^{2,32,35,45-49}.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετά εμπόδια για τη χορήγηση της ινσουλίνης δια του αναπνευστικού συστήματος στη θεραπεία του Σ/Δ, υπάρχει αισιοδοξία ότι τα προβλήματα αυτά θα λυθούν με την πρόοδο της τεχνολογίας, και η αντιμετώπιση του Σ/Δ δεν θα απαιτεί καθημερινές ενέσεις ινσουλίνης για τη ρύθμισή του και την πρόληψη των επιπλοκών του.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Η ινσουλίνη προκαλεί ένα σημαντικό αριθμό βιολογικών αντιδράσεων. Είναι η κύρια υπεύθυνη ορμόνη για τη ρύθμιση της πρόσληψης, της χρησιμοποίησης και της αποθήκευσης των θρεπτικών συστατικών των κυττάρων. Οι αναβολικές δράσεις της ινσουλίνης περιλαμβάνουν την ενδοκυττάρια χρησιμοποίηση και αποθήκευση της γλυκόζης, των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων ενώ αναστέλλει καταβολικές διεργασίες όπως η διάσπαση του γλυκογόνου, του λίπους και των πρωτεϊνών. Επιτυγχάνει αυτές τις διεργασίες διεγείροντας τη μεταφορά των υποστρωμάτων και των ιόντων μέσα στα κύτταρα, προωθώντας την μετάθεση των πρωτεϊνών μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων, ενεργοποιώντας και ανενεργοποιώντας ειδικά ένζυμα και τροποποιώντας τα ποσά των πρωτεϊνών αλλάζοντας το ρυθμό μεταγραφής των ειδικών γονιδίων.

Κάποια αποτελέσματα της δράσης της ινσουλίνης επιτυγχάνονται εντός δευτερολέπτων ή λεπτών, όπως η ενεργοποίηση των συστημάτων μεταφοράς της γλυκόζης και των ιόντων, η μετατροπή των ενζύμων (π.χ. φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση) και μερικά αποτελέσματα της δράσης της ινσουλίνης στη μεταγραφή των γονιδίων. Άλλες όμως διεργασίες, όπως εκείνες που αφορούν τη σύνθεση πρωτεϊνών και την μεταγραφή γονιδίων, μπορεί να χρειαστούν μερικές ώρες για να επιτευχθούν, ενώ εκείνες που αφορούν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων μερικές μέρες¹.

Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων

Η γλυκόζη είναι μια από τις κυριότερες πηγές ενέργειας των κυττάρων με ιδιαίτερη μάλιστα σημασία για τον εγκέφαλο. Ο μονοσακχαρίτης αυτός

προσλαμβάνεται από τους υδατάνθρακες της τροφής. Αμέσως μετά από γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η γλυκόζη που απορροφάται προς το αίμα, προκαλεί την έκκριση ινσουλίνης η οποία με τη σειρά της προκαλεί την πρόσληψη, εναποθήκευση και χρησιμοποίηση της γλυκόζης απ' όλους σχεδόν τους ιστούς του σώματος. Οι κυριότεροι ιστοί στόχοι για τη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης από την ινσουλίνη, είναι το ήπαρ, οι μύες και ο λιπώδης ιστός¹⁰.

Η μεμβράνη των κυττάρων των περισσότερων ιστών διαθέτει φορείς για την είσοδο της γλυκόζης με διευκολυνόμενη διάχυση. Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί επτά τέτοιοι φορείς. Όσον αφορά τη δράση της ινσουλίνης, ο πιο σημαντικός από αυτούς είναι ο φορέας γλυκόζης-4 (GLUT-4) που βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων του μυϊκού και του λιπώδη ιστού. Ο φορέας αυτός βρίσκεται στον ενδοκυττάριο χώρο σε περίοδο ηρεμίας. Με την επίδραση της ινσουλίνης επιτυγχάνεται μεταφορά των μορίων του φορέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου συνδέονται με μόρια γλυκόζης. Η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα του μυϊκού ιστού μπορεί να επιτευχθεί και χωρίς τη δράση της ινσουλίνης αλλά μόνο σε περιόδους μέτριας έως και έντονης μυϊκής δραστηριότητας^{1,13}.

Σε περίπτωση που οι μύες δεν χρησιμοποιούν τη γλυκόζη που μεταφέρεται στο εσωτερικό των κυττάρων τους, τότε το μεγαλύτερο μέρος αυτής μετατρέπεται και εναποτίθεται με τη μορφή του γλυκογόνου μέσα στις μυϊκές ίνες μέχρι το όριο της συγκέντρωσης 2%. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η δράση της ινσουλίνης, η οποία προάγει τη γλυκογονογένεση διατηρώντας τη συνθάση του γλυκογόνου στην ενεργή της μορφή.

Σε αντίθεση με το μυϊκό και το λιπώδη ιστό, στο ηπατικό κύτταρο βρίσκεται ο φορέας γλυκόζης-2 (GLUT-2), η δράση του οποίου δεν εξαρτάται από την ινσουλίνη^{1,13}.

Η ινσουλίνη σχεδόν αμέσως μετά από ένα γεύμα, προάγει την αποθήκευση του μεγαλύτερου μέρους της γλυκόζης που απορροφάται από το έντερο, μέσα στο ήπαρ με τη μορφή γλυκογόνου. Η δράση της επιτυγχάνεται με την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου γλυκοκινάση που είναι το ένζυμο που προκαλεί την αρχική φωσφορυλίωση της γλυκόζης μετά τη διάχυσή της μέσα στο ηπατοκύτταρο. Επίσης η ινσουλίνη αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων που προάγουν τη σύνθεση του γλυκογόνου, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η φωσφοφρουκτοκινάση που προκαλεί το δεύτερο στάδιο της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης και η συνθάση του γλυκογόνου η οποία είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό των μονοσακχαριδικών μονάδων για το σχηματισμό των μορίων του γλυκογόνου το οποίο μπορεί να αποτελεί το 5-6% της ολικής μάζας του ήπατος^{10,50}.

Στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα των γευμάτων, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αρχίζει να ελαττώνεται, το γλυκογόνο του ήπατος αρχίζει να διασπάται προς γλυκόζη η οποία αποδίδεται προς το αίμα για τη διατήρηση της συγκέντρωσής της σε ικανοποιητικά επίπεδα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η έλλειψη ινσουλίνης αναστρέφει όλες τις επιδράσεις που αναφέρονται παραπάνω για την εναποθήκευση γλυκογόνου ενώ παράλληλα ενεργοποιεί την ενεργοποίηση του ενζύμου φωσφορυλάση, το οποίο διασπά το γλυκογόνο σε φωσφορική γλυκόζη. Το ένζυμο φωσφατάση της γλυκόζης, που είχε ανασταλεί από την ινσουλίνη, ενεργοποιείται τώρα με την έλλειψή της και προκαλεί την απομάκρυνση της φωσφορικής ρίζας από τη γλυκόζη. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπεται στην ελεύθερη γλυκόζη να διαχέεται στο αίμα⁵⁰.

Όταν όμως η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να αποθηκευτεί με τη μορφή του γλυκογόνου, η

ινσουλίνη προάγει τη μετατροπή όλης αυτής της περίσσειας της γλυκόζης σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά αυτά οξέα στη συνέχεια συσσωρεύονται με τη μορφή των τριγλυκεριδίων μέσα σε λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας(VLDL), και μεταφέρονται στο λιπώδη ιστό όπου αποθηκεύονται με τη μορφή του λίπους¹⁰.

Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό του λίπους

Η ινσουλίνη εξασκεί διάφορες επιδράσεις που οδηγούν σε αποθήκευση λίπους στο λιπώδη ιστό. Αυξάνει τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από τους περισσότερους ιστούς του σώματος, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρησιμοποίησης του λίπους. Επίσης προάγει τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Η σύνθεση αυτή επιτελείται σχεδόν στο σύνολό της μέσα στα ηπατικά κύτταρα και στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα μεταφέρονται με τις λιποπρωτεΐνες προς τα λιποκύτταρα για εναποθήκευση. Μικρή ποσότητα λιπαρών οξέων σχηματίζεται μέσα στα λιποκύτταρα¹⁰.

Όταν η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται μέσα στα ηπατοκύτταρα είναι μεγάλη και δεν μπορεί πλέον να εναποθηκευτεί με τη μορφή του γλυκογόνου, η περίσσεια αυτή της γλυκόζης διασπάται σε πυροσταφυλικό οξύ με τη γλυκολυτική οδό και στη συνέχεια το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακετύλο-CoA, δηλαδή στο υπόστρωμα από το οποίο συντίθενται τα λιπαρά οξέα. Όταν για την παροχή ενέργειας χρησιμοποιούνται υπέρμετρα ποσά γλυκόζης, παράγεται περίσσεια κιτρικών και ισοκιτρικών ιόντων, τα οποία ασκούν άμεση επίδραση στην ενεργοποίηση της καρβοξυλάσης του ακετύλο-CoA, του ενζύμου που απαιτείται για την καρβοξυλίωση του ακετύλο-CoA για το σχηματισμό μανολυλ-CoA, που αποτελεί την πρώτη βαθμίδα για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα που συντίθενται μέσα στο ήπαρ χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό τριγλυκεριδίων, που αποτελούν και τη συνήθη μορφή αποθήκευσης του λίπους. Αυτό το λίπος αποδίδεται από τα

ηπατοκύτταρα προς το αίμα μέσα σε λιποπρωτεΐνες. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη λιποπρωτεϊνική λιπάση που βρίσκεται στο τοίχωμα των τριχοειδών του λιπώδους ιστού, η οποία διασπά και πάλι τα τριγλυκερίδια σε λιπαρά οξέα, διεργασία που είναι απαραίτητη για την πρόσληψή τους από τα λιποκύτταρα, όπου και πάλι μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια και αποθηκεύονται με αυτή τη μορφή. Επίσης η ινσουλίνη αναστέλλει την ενέργεια της ορμονοευαίσθητης λιπάσης, ενός ενζύμου που προκαλεί την υδρολυτική διάσπαση των τριγλυκεριδίων που βρίσκονται ήδη αποθηκευμένα μέσα στα λιποκύτταρα. Επομένως αναστέλλεται η απόδοση των λιπαρών οξέων προς το αίμα⁵⁰.

Μια άλλη δράση της ινσουλίνης είναι η επίδρασή της στον φορέα γλυκόζης-4 (GLUT-4) που βρίσκεται στη μεμβράνη των λιποκυττάρων με αποτέλεσμα τη μεταφορά της γλυκόζης μέσα σε αυτά. Μέρος αυτής της γλυκόζης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μικρού ποσού λιπαρών οξέων καθώς και μεγάλων ποσών α-γλυκεροφωσφορικού οξέως. Η ουσία αυτή παρέχει τη γλυκερόλη, η οποία συνδέεται με τα λιπαρά οξέα για το σχηματισμό των τριγλυκεριδίων, τα οποία αποτελούν τη μορφή με την οποία το λίπος εναποτίθεται μέσα στα λιποκύτταρα.

Επομένως όταν η ινσουλίνη δεν είναι διαθέσιμη, αποκλείεται πλήρως ακόμα και η αποθήκευση του μεγάλου ποσού των λιπαρών οξέων που μεταφέρονται με τις λιποπρωτεΐνες από το ήπαρ και αυξάνεται η χρησιμοποίηση του λίπους για το μεταβολισμό. Με την έλλειψη της ινσουλίνης ενεργοποιείται το ένζυμο ορμονοευαίσθητη λιπάση με αποτέλεσμα την υδρολυτική διάσπαση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων και την απελευθέρωση μεγάλου ποσού ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης προς το αίμα. Η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στο πλάσμα αυξάνεται μέσα σε λίγα λεπτά και αποτελούν το υπόστρωμα για την παροχή ενέργειας. Η περίσσεια των λιπαρών οξέων στο πλάσμα προάγει τη μετατροπή από το

ήπαρ ορισμένου ποσού των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Οι ουσίες αυτές μαζί με τα τριγλυκερίδια αποδίδονται στο αίμα μέσα στις λιποπρωτεΐνες. Η υψηλή συγκέντρωση των λιπιδίων στο αίμα και ιδιαίτερα της χοληστερόλης οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε άτομα με μη ρυθμισμένο σακχαρώδη διαβήτη.

Σε απουσία ινσουλίνης και την παρουσία μεγάλου ποσού λιπαρών οξέων μέσα στα ηπατικά κύτταρα αυξάνεται η μεταφορά των λιπαρών οξέων μέσα στα μιτοχόνδρια όπου η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων προχωρεί με γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα την απόδοση εξαιρετικά μεγάλου ποσού ακέτυλο-CoA. Μεγάλο μέρος αυτού του ποσού συμπυκνώνεται για να σχηματίσει ακετοξικό οξύ, το οποίο αποδίδεται στο αίμα και μεταφέρεται στα διάφορα κύτταρα στην περιφέρεια όπου μετατρέπεται και πάλι σε ακέτυλο-CoA και χρησιμοποιείται για την απόδοση ενέργειας. Όμως η έλλειψη ινσουλίνης καταστέλλει τη χρησιμοποίηση του ακετοξικού οξέως από τους περιφερικούς ιστούς ενώ από το ήπαρ αποδίδεται τόσο πολύ ακετοξικό οξύ, ώστε να μην μπορεί να μεταβολίζεται από τους ιστούς. Ένα μέρος από το ακετοξικό οξύ μετατρέπεται σε β-υδροξυβουτυρικό οξύ και σε ακετόνη. Οι ουσίες αυτές μαζί με το ακετοξικό οξύ ονομάζονται κετονοσώματα και η παρουσία τους σε μεγάλα ποσά στα υγρά του σώματος ονομάζεται κέτωση. Σε σακχαρώδη διαβήτη που δεν ρυθμίζεται το ακετοξικό και το β-υδροξυβουτυρικό οξύ μπορούν να προκαλέσουν βαρεία οξέωση και κόμα^{10,13,50}.

Η επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών

Η ινσουλίνη προάγει την παραγωγή και καταστέλλει τη διάσπαση πρωτεϊνών. Αρχικά προκαλεί την ενεργητική μεταφορά πολλών αμινοξέων προς το εσωτερικό των κυττάρων. Ασκεί άμεση επίδραση στα ριβοσώματα και αυξάνει τη μετάφραση του

αγγελιοφόρου RNA, συμβάλλοντας έτσι στην παραγωγή νέων πρωτεϊνών. Επίσης αυξάνει το ρυθμό της μεταγραφής επιλεγμένων τμημάτων DNA στον πυρήνα του κυττάρου και μ'αυτό τον τρόπο αυξάνει την παραγωγή RNA, με αποτέλεσμα την ακόμη μεγαλύτερη σύνθεση πρωτεϊνών (ιδίως ενζύμων που χρειάζονται για την αποθήκευση των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών).

Η ινσουλίνη επίσης αναστέλλει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού της απόδοσης αμινοξέων από τα κύτταρα και ιδιαίτερα από τα μυϊκά. Επίσης προκαλεί την ελάττωση της δραστηριότητας των ενζύμων που προάγουν τη νεογλυκογένεση με αποτέλεσμα την καταστολή της. Επειδή όμως κατά τη νεογλυκογένεση το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται περισσότερο για τη σύνθεση της γλυκόζης είναι τα αμινοξέα του πλάσματος, με την καταστολή της επιτυγχάνεται εξοικονόμηση των αμινοξέων.

Σε έλλειψη ινσουλίνης αναστέλλεται όλη η διεργασία της αποθήκευσης και της σύνθεσης των πρωτεϊνών ενώ ο καταβολισμός τους επιτείνεται και μεγάλα ποσά αμινοξέων παραμένουν μέσα στο πλάσμα. Ένα μεγάλο μέρος αυτών χρησιμοποιείται είτε για την άμεση παροχή ενέργειας, είτε ως υπόστρωμα για τη νεογλυκογένεση. Αποτέλεσμα του καταβολισμού των πρωτεϊνών είναι η αυξημένη απέκκριση ουρίας με τα ούρα. Η απώλεια πρωτεϊνών αποτελεί μια από τις σοβαρότερες συνέπειες του σακχαρώδη διαβήτη και μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά μεγάλη αδυναμία, καθώς και σε αποδιοργάνωση πολλών λειτουργιών των διαφόρων οργάνων^{10,50}.

Η επίδραση της ινσουλίνης στην αύξηση

Η ινσουλίνη ανήκει μαζί με τους ινσουλινόμορφους αυξητικούς παράγοντες (IGF-I και IGF-II), στην οικογένεια των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων (IGFs). Αρκετές μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά την μιτογόνο δράση των IGFs. Η

ινσουλίνη όπως αναφέρεται παραπάνω είναι απαραίτητη για την σύνθεση των πρωτεϊνών. Η παρουσία της επίσης απαιτείται για την αύξηση του σώματος όπως και της αυξητικής ορμόνης. Η καθεμιά απ' αυτές προάγει την είσοδο προς τα κύτταρα μιας διαφορετικής ομάδας από αμινοξέα. Για την αύξηση όμως απαιτείται η παρουσία και των δύο ομάδων^{10,13}.

ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Τραχεία

Η τραχεία είναι ένας ινοχόνδρινος σωλήνας που αποτελεί τη συνέχεια του λάρυγγα και φθάνει μέχρι το ύψος του τέταρτου θωρακικού σπονδύλου, όπου διαιρείται σε δύο κλάδους, τον αριστερό και το δεξιό στελεχιαίο βρόγχο.

Εξωτερικά η τραχεία περιβάλλεται από μια στιβάδα αραιού συνδετικού ιστού, που αποτελεί τον ινώδη χιτώνα της. Το τοίχωμά της αποτελείται από ινοχόνδρινο σκελετό, από βλεννογόνο και από μυϊκό χιτώνα.

Ο σκελετός της τραχείας συγκροτείται από τα χόνδρινα ημικρίκια (ο αριθμός των οποίων ποικίλει ανάλογα με το είδος) που συνδέονται μεταξύ τους με τους μεσοκρίκιους συνδέσμους και καλύπτονται από το περιχόνδριο. Οι σύνδεσμοι αυτοί αποτελούνται από ινώδη συνδετικό ιστό με άφθονες ελαστικές ίνες. Τα ημικρίκια της τραχείας αποτελούν πέταλα από υαλοειδή χόνδρο, που κάμπτονται και σχηματίζουν δακτυλίους, τα ελεύθερα άκρα των οποίων αφορίζουν την οπίσθια επιφάνεια του τοιχώματος της τραχείας που είναι υμενώδης. Το οπίσθιο αυτό τμήμα της τραχείας είναι ένας ινοελαστικός υμένας, που αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό με ελαστικές ίνες και συνδέει τα άκρα των χόνδρινων ημικρίκιων⁵¹.

Ο μυϊκός χιτώνας της τραχείας βρίσκεται μόνο στην οπίσθια επιφάνειά της. Αποτελείται από δεσμίδες λείων μυϊκών ινών, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ του συνδετικού ιστού του ινοελαστικού υμένα. Στο σαρκόπλασμα των λείων μυϊκών ινών και ιδιαίτερα κοντά στους δύο πόλους του πυρήνα βρίσκονται μιτοχόνδρια, λίγα σωληνοειδή στοιχεία κοκκώδους ενδοπλασματικού δικτύου, πολλές ομάδες ελεύθερων ριβοσωματίων μία μικρή συσκευή Golgi και λίγα λιποσταγονίδια ή κοκκία γλυκογόνου. Τη συστατική ουσία των λείων μυϊκών ινών αποτελούν τα μυϊκά νημάτια ακτίνης και μυοσίνης, τα οποία στην πλειοψηφία τους έχουν επιμήκη φορά στις μυϊκές

ίνες που είναι σε χάλαση και τυχαία στις ίνες που είναι σε σύσπαση. Επίσης έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη ενός τρίτου τύπου νηματίων, των ενδιάμεσων νηματίων που πιστεύεται ότι αποτελούν ένα μάλλον συνεχές σύστημα (πλέγμα).

Η κυτταρική μεμβράνη εμφανίζει μεγάλο αριθμό μικροπινοκυτταρικών κυστιδίων και η εξωτερική επιφάνειά της καλύπτεται από το εξωτερικό ή βασικό πέταλο που διαχωρίζει τις ίνες μεταξύ τους. Ανάμεσα στα μικροπινοκυτταρικά κυστίδια και σε άμεση σχέση με αυτά υπάρχουν λεπτά σωληνοειδή στοιχεία του ενδοπλασματικού δικτύου. Σε ορισμένες θέσεις οι κυτταρικές μεμβράνες των λείων μυϊκών ινών συνδέονται μεταξύ τους με χασματοσυνδέσεις οι οποίες είναι θέσεις χαμηλής ηλεκτρικής αντίστασης και επιτρέπουν την ελεύθερη διακίνηση ιόντων ανάμεσα στα κύτταρα και τη γρήγορη εξάπλωση της ώσης από κύτταρο σε κύτταρο. Οι συνδέσεις αυτές ελαττώνονται σε μέγεθος αλλά όχι σε αριθμό στους βρόγχους. Η διακίνηση ιόντων μεταξύ των χασματοσυνδέσεων δεν είναι εκλεκτική και είναι διπλής κατεύθυνσης.

Ανάμεσα στις δεσμίδες των λείων μυϊκών ινών υπάρχει μικρή ποσότητα χαλαρού συνδετικού ιστού, που χρησιμεύει και ως φορέας των αγγείων και των νεύρων. Οι νευρικές ίνες προέρχονται κυρίως από τα γάγγλια του τραχειακού πλέγματος. Άλλες πηγές των νευρικών ινών είναι το πνευμονογαστρικό νεύρο, τα συμπαθητικά γάγγλια (το ανώτερο αυχενικό και το αστεροειδές γάγγλιο) και τα γάγγλια των νωτιαίων ριζών.

Οι περισσότερες από τις λείες μυϊκές ίνες είναι εγκάρσιες και προσφύονται στην εσωτερική ή την εξωτερική επιφάνεια των ελεύθερων άκρων των χόνδρινων ημικρικών ανάλογα με το είδος. Με την επίδραση κάποιου ερεθίσματος ο μυς συσπάται με αποτέλεσμα το πλησίασμα και τη μερική επικάλυψη των ελεύθερων άκρων των ημικρικών και τελικά τη σμίκρυνση της διαμέτρου της τραχείας. Μερικές

από τις επιφανειακές λείες μυϊκές ίνες έχουν επιμήκη φορά, μπορεί να έχουν ασύμμετρη κατανομή και να είναι σε συνέχεια με τις εγκάρσιες δεσμίδες.

Ο βλεννογόνος της τραχείας είναι προσκολλημένος στο περιχόνδριο των ημικρικών και στον ινοελαστικό υμένα της οπίσθιας μοίρας της. Αποτελείται από επιθήλιο, χόριο και αδένες.

Το επιθήλιο είναι ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό κροσσωτό με άφθονα καλυκοειδή κύτταρα μεταξύ των κυλινδρικών κροσσωτών κυττάρων και παρουσιάζει μετρίως υψηλά επίπεδα δραστηριότητας μιτοχονδριακών και λυσοσωμιακών ενζύμων. Πολυάριθμα μιτοχόνδρια βρίσκονται συγκεντρωμένα στο κορυφαίο τμήμα των κροσσωτών κυττάρων, γεγονός που σχετίζεται με την αυξημένη ενέργεια που χρειάζεται για την κίνηση του μεγάλου αριθμού των κροσσών των κυττάρων αυτών. Στην περιοχή πάνω από τον πυρήνα των κροσσωτών κυττάρων βρίσκονται η συσκευή Golgi και λυσοσωμάτια. Στα κροσσωτά κύτταρα υπάρχει μέτριος αριθμός ριβοσωμάτων τα οποία είναι είτε ελεύθερα είτε προσκολλημένα πάνω στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι πυρήνες των καλυκοειδών κυττάρων είναι τοποθετημένοι σε μια ενδιάμεση ζώνη μεταξύ των πυρήνων των κυλινδρικών κυττάρων και των πυρήνων των βασικών κυττάρων του επιθηλίου, τα οποία έχουν χαρακτηριστικά ανώριμων επιθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα του επιθηλίου είναι τοποθετημένα πάνω σε παχιά βασική μεμβράνη.

Το χόριο περιέχει άφθονες ελαστικές ίνες με επιμήκη φορά στην έξω επιφάνειά του και μικρούς οροβλεννογόνιους αδένες της τραχείας. Η βλέννη που καλύπτει την ελεύθερης επιφάνειας του επιθηλίου και είναι προϊόν εκκρίσεως των καλυκοειδών κυττάρων και των αδένων της τραχείας, αποτελεί σημαντικό φραγμό για τα διάφορα ξένα σωματίδια που εισέρχονται στο αναπνευστικό σύστημα με τον εισπνεόμενο αέρα. Συχνά, το χόριο παρουσιάζεται διηθημένο από λεμφοκύτταρα. Ο βλεννογόνος

χωρίζεται από τον υποκείμενο ινοχόνδρινο σκελετό με χαλαρό συνδετικό ιστό, που περιέχει άφθονα αγγεία και ιδιαίτερα στην οπίσθια υμενώδη μοίρα⁵²⁻⁵⁴.

Βρογχικό δένδρο

Οι μεγάλοι ή κύριοι ή στελεχιαίοι βρόγχοι, δεξιός και αριστερός, προέρχονται από το διχασμό της τραχείας και εκτείνονται μέχρι τις πύλες κάθε πνεύμονα. Στη θέση αυτή ο δεξιός στελεχιαίος βρόγχος διαιρείται σε τρεις κλάδους, ενώ ο αριστερός σε δύο, ένα για κάθε λοβό του αντίστοιχου πνεύμονα. Από τους δευτερεύοντες αυτούς βρόγχους των λοβών του πνεύμονα εκφύονται οι τμηματικοί βρόγχοι, καθένας από τους οποίους διανέμεται σε ορισμένη περιοχή του λοβού, που ονομάζεται βρογχοπνευμονικό τμήμα. Το κάθε βρογχοπνευμονικό τμήμα έχει σχήμα κώνου, η βάση του οποίου βρίσκεται κάτω από τον υπεζωκότα και η κορυφή του προς την πύλη του πνεύμονα ενώ αποτελεί ανατομικά και λειτουργικά ανεξάρτητη περιοχή του πνευμονικού παρεγχύματος. Οι τμηματικοί βρόγχοι διακλαδίζονται περαιτέρω σε ολοένα μικρότερους κλάδους και τελικά στα βρόγγια ή βρογχιόλια⁵¹.

Το τοίχωμα των στελεχιαίων βρόγχων έχει την ίδια κατασκευή με το τοίχωμα της τραχείας. Αποτελείται από ινοχόνδρινο σκελετό που εκτείνεται στην πρόσθια και στις πλάγιες επιφάνειες και από υμενώδη μοίρα στην οπίσθια επιφάνεια. Στην οπίσθια επιφάνεια βρίσκεται ο μυϊκός χιτώνας που αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες. Ο βλεννογόνος αποτελείται από ψευδοπολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο, χόριο με πολλές ελαστικές ίνες και μικρούς οροβλεννογόνιους αδένες.

Καθώς όμως οι βρόγχοι διακλαδίζονται η κατασκευή του τοιχώματος του βρογχικού δένδρου μεταβάλλεται προοδευτικά. Ο ινοχόνδρινος σκελετός των στελεχιαίων βρόγχων βρίσκεται στους δευτερεύοντες, τους τμηματικούς και τις υποδιαίρέσεις τους με τη μορφή χόνδρινων τμημάτων που αλληλοσυνδέονται με

πυκνό ινοελαστικό συνδετικό ιστό. Ο αριθμός και το μέγεθος των χόνδρινων τμημάτων ελαττώνονται προοδευτικά από τους μεγάλους προς τους μικρούς βρόγχους έτσι ώστε στα τελικά βρογχιόλια να μην υπάρχει χόνδρινο υπόστρωμα.

Ο μυϊκός χιτώνας, ο οποίος στους στελεχιαίους βρόγχους βρισκόταν μόνο στην οπίσθια υμενώδη μοίρα του τοιχώματος, στους δευτερεύοντες βρόγχους και τις υποδιαίρέσεις τους βρίσκεται με τη μορφή κυκλωτερών και λοξών μυϊκών ινών που φέρονται σπειροειδώς, μεταξύ των χόνδρινων τμημάτων και του βλεννογόνου. Οι λείες αυτές μυϊκές ίνες υπάρχουν σε όλες τις διακλαδώσεις του βρογχικού δένδρου αλλά προοδευτικά λεπτύνονται και γίνονται αραιότερες.

Ο βλεννογόνος παρουσιάζει επίσης διαφορές στις διάφορες μοίρες του βρογχικού δένδρου. Το επιθήλιο το οποίο στους δευτερεύοντες και τμηματικούς βρόγχους είναι ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό κροσσωτό με καλυκοειδή κύτταρα, μεταπίπτει σταδιακά σε μονόστιβο κυλινδρικό κροσσωτό με λιγότερα καλυκοειδή κύτταρα. Το χόριο προοδευτικά λεπτύνεται στις διάφορες διακλαδώσεις, και συγχρόνως αυξάνεται η περιεκτικότητά του σε ελαστικές ίνες. Οι βρογχικοί αδένες είναι οροβλεννογόνοι, βρίσκονται στον ινοχόνδρινο χιτώνα και ο αριθμός τους ελαττώνεται προς τους μικρότερους βρόγχους. Στα βρογχιόλια είναι σπάνιοι ή λείπουν εντελώς⁵²⁻⁵⁴.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΠΑΣΗΣ-ΧΑΛΑΣΗΣ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ

Η σύζευξη της διέγερσης με τη συστολή στις λείες μυϊκές ίνες

Αντίθετα με τους σκελετικούς μύες οι οποίοι ενεργοποιούνται αποκλειστικά από το νευρικό σύστημα, οι λείοι μύες μπορούν να διεγείρονται για συστολή από πολλά είδη ερεθισμάτων: από νευρικές ώσεις, ορμονικά ερεθίσματα, καθώς και με πολλούς άλλους τρόπους. Η συμμετοχή μεγάλης ποικιλίας παραγόντων στη διέγερση των λείων μυϊκών ινών αφενός και οι ιδιαιτερότητες του συστήματος των δεύτερων διαβιβαστών καθώς και οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει ο συσταλτικός μηχανισμός τους σε σύγκριση με το συσταλτικό μηχανισμό των σκελετικών μυών αφετέρου, καθιστούν τη διαδικασία της σύζευξης της διέγερσης με τη συστολή των λείων μυών, ένα πολύπλοκο φαινόμενο⁵⁵.

Ο συντονισμός και η ρύθμιση των ενδοκυττάριων λειτουργιών εξαρτάται από σήματα, πληροφορίες που προέρχονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία (π.χ. ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, φαρμακολογικά ερεθίσματα) συνδέονται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να διακριθούν σ' αυτούς από τους οποίους το σήμα μεταδίδεται μέσω πρωτεϊνών G (οι G πρωτεΐνες έχουν δραστηριότητα γουανουσινοτριφωσφατάσης, καταλύουν την μετατροπή της γουανουσινοτριφωσφατάσης σε γουανουσινοδιφωσφατάσης και βρίσκονται στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών) και σ' εκείνους που έχουν ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα (π.χ. τυροσίνη-κινάση, γουανυλική κυκλάση) που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός ενδοκυττάριου μεταβιβαστή ή στην τροποποίηση μιας ενδογενούς πρωτεΐνης. Οι εξωκυττάριοι μεταβιβαστές που συνδέονται με πρωτεϊνικούς υποδοχείς ονομάζονται χημικοί μεταβιβαστές (ligands) ενώ οι φαρμακολογικοί παράγοντες αγωνιστές και ανταγωνιστές ανάλογα με τη δράση τους.

Η σύνδεση των αγωνιστών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα και τη μετάδοση του σήματος ενδοκυττάρια, ενώ η σύνδεση των ανταγωνιστών όχι μόνο δεν ενεργοποιεί τον υποδοχέα αλλά και προλαμβάνει τη σύνδεση κάποιου αγωνιστή σ' αυτόν^{15,55-56}.

Οι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες υποδοχείς που απαντούν σε ποικιλία ερεθισμάτων, ρυθμίζουν τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) και του κυκλικού GMP (cGMP), και διαύλους ιόντων. Οι υποδοχείς αυτοί είναι πρωτεΐνες με εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο τμήμα, το οποίο αλληλεπιδρά με G πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από κάποιον αγωνιστή οδηγεί στην ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την απελευθέρωση γουανοσινοδιφωσφατάσης (GDP) και τη δέσμευση γουανοσινοτριφωσφατάσης (GTP). Η ενεργοποιημένη G πρωτεΐνη μεταδίδει το σήμα τροποποιώντας τη δραστηριότητα κάποιου ενζύμου. Το σύστημα της αδενυλικής κυκλάσης που ρυθμίζει τη σύνθεση cAMP, περιλαμβάνει διεγερτικούς και ανασταλτικούς υποδοχείς οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα μέσω δύο G πρωτεϊνών οι οποίες είναι γνωστές σαν G_s και G_i λόγω της ικανότητάς τους να διεγείρουν ή να αναστέλλουν αντίστοιχα την καταλυτική μονάδα της αδενυλικής κυκλάσης. Το cAMP όπως και το cGMP λειτουργούν ως δεύτεροι μεταβιβαστές^{15,57}.

Η διαδικασία της συστολής των λείων μυϊκών ινών ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$). Η αύξηση $[Ca^{2+}]_i$ προκαλεί μια σειρά αντιδράσεων στις λείες μυϊκές ίνες που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μηχανισμού διολίσθησης των νηματίων της μυοσίνης και της ακτίνης όπως στις σκελετικές μυϊκές ίνες. Στις λείες μυϊκές ίνες όμως, το Ca^{2+} δεν λειτουργεί ως διακόπτης αλλά ρυθμίζει τόσο τον αριθμό των εγκάρσιων γεφυρών της μυοσίνης που θα συνδεθούν με τα νημάτια της ακτίνης, όσο και το ρυθμό εναλλαγής σύνδεσης-απελευθέρωσης των κεφαλών της μυοσίνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα

νημάτια της ακτίνης των λείων μυών δεν έχουν τροπονίνη C και στο ότι η πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο και ενεργοποιείται είναι η καλμοδουλίνη⁵⁸.

Το πρώτο βήμα για την έναρξη της διαδικασίας της συστολής περιλαμβάνει τη δέσμευση ουσιών (π.χ. νευροδιαβιβαστές, ορμόνες, κτλ.) στους ειδικούς τους υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη των λείων μυϊκών κυττάρων. Το γεγονός αυτό ενεργοποιεί διάφορους τύπους G πρωτεϊνών οι οποίες ενώνονται με διαύλους ιόντων και ένζυμα και τροποποιούν τις δραστηριότητές τους. Στα ένζυμα αυτά περιλαμβάνονται η φωσφολιπάση C (PLC) και η αδενυλική κυκλάση. Η PLC μεταβολίζει την φωσφατιδυλινοσιτόλη της μεμβράνης και παράγονται τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και διαγλυκερόλη (DAG). Η μεν IP_3 προκαλεί απελευθέρωση Ca^{2+} από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου η δε DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία προκαλεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των διαύλων Ca^{2+} της μεμβράνης. Η αδενυλική κυκλάση μεταβολίζει το ATP και παράγεται cAMP. Κάποιοι υποδοχείς ενώνονται απευθείας με τη γουανυλική κυκλάση η οποία μεταβολίζει το GTP και παράγεται cGMP^{57,59-60}.

Το δεύτερο βήμα στη διαδικασία της συστολής περιλαμβάνει αλλαγές στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$). Κατά την ηρεμία η $[Ca^{2+}]_i$ είναι $<0,2\mu M$ ενώ αυξάνεται απότομα σε $0,5-1\mu M$ κατά τη διαδικασία της σύσπασης. Πηγή Ca^{2+} για τις λείες μυϊκές ίνες είναι κύρια ο εξωκυττάριος χώρος, χωρίς ωστόσο η απελευθέρωση από το ενδοπλασματικό δίκτυο να θεωρείται αμελητέα. Ο μηχανισμός εισόδου Ca^{2+} περιλαμβάνει διαύλους Ca^{2+} που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης, διαύλους ιόντων, ενεργοποίηση του δρόμου εισροής Ca^{2+} με την απελευθέρωση Ca^{2+} και αντίστροφη λειτουργία του μηχανισμού ανταλλαγής Na^{2+}/Ca^{2+} . Μείωση της $[Ca^{2+}]_i$ συμβαίνει με την απομάκρυνση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την έξοδό του από τις αντλίες Ca^{2+} της μεμβράνης και την

ανταλλαγή $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$. Δεύτεροι μεταβιβαστές όπως η IP_3 , η DAG, το cAMP και το cGMP μεταβάλλουν την $[\text{Ca}^{2+}]_i$ επηρεάζοντας τους παραπάνω μηχανισμούς⁵⁹.

Συνοπτικά, μεταβολή της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ συμβαίνει μετά από:

1. Εισροή Ca^{2+} από διαύλους που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης.
2. Εισροή Ca^{2+} από διαύλους συνδεδεμένους με υποδοχείς και οι οποίοι ενεργοποιούνται μετά από σύνδεση του υποδοχέα με νευροδιαβιβαστές, ορμόνες ή τοπικές ορμόνες που βρίσκονται στο μεσοκυττάριο χώρο.
3. Απελευθέρωση Ca^{2+} που είναι αποθηκευμένο στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μέσω της διάσπασης της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της παραγωγής IP_3 ή της πυροδότησης απελευθέρωσης Ca^{2+} από την ίδια την αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$
4. Μείωση της δραστηριότητας της αντλίας Ca^{2+} ⁵⁸⁻⁵⁹

Το επόμενο σημαντικό βήμα είναι η φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης (MLC) από την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης (MLCK). Η δραστηριότητα της MLCK ρυθμίζεται από το σύμπλοκο Ca^{2+} -καλμοδουλίνη (Ca^{2+} -CaM), το οποίο σχηματίζεται όταν αυξηθεί η $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Οι φωσφορυλιωμένες MLC μπορούν πλέον να συνδεθούν με τα νημάτια της ακτίνης και ο μηχανισμός διολίσθησης τίθεται σε λειτουργία, ώστε να προκληθεί σύσπαση. Οι φωσφορυλιωμένες MLC αποφωσφορυλιώνονται από την MLC φωσφατάση, γεγονός που οδηγεί σε χάλαση. Επομένως το ποσό της φωσφορυλιωμένης MLC εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της MLC κινάσης και της MLC φωσφατάσης. Αγωνιστές και δεύτεροι μεταβιβαστές τροποποιούν την αναλογία MLC κινάσης/MLC φωσφατάσης ανεξάρτητα από την $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Τόσο το cAMP όσο και το cGMP αλλάζουν την ισορροπία MLC κινάσης/MLC φωσφατάσης και προκαλούν χάλαση⁵⁸⁻⁵⁹.

Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί χρησιμοποιούν ενέργεια που παράγεται κυρίως από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και μερικώς από την αερόβια γλυκόλυση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση προμηθεύει ATP κυρίως στα συστατικά στοιχεία ενώ η αερόβια γλυκόλυση προμηθεύει ATP κυρίως στις αντλίες ιόντων της μεμβράνης⁵⁹.

Ο ρόλος των διαύλων και της αντλίας ασβεστίου

Η μετακίνηση των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι ένας σημαντικός μηχανισμός στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας ή στην ενεργοποίηση του κυττάρου. Τα ιόντα διαπερνούν τη μεμβράνη μέσω «ανοιγμάτων» που καλούνται διάυλοι ή κανάλια. Οι διάυλοι των ιόντων ανοίγουν ή κλείνουν εξαρτώμενοι από διαφορετικούς παράγοντες ο καθένας.

Δύο τύποι διαύλων ασβεστίου έχουν αναγνωρισθεί στη μεμβράνη των λείων μυϊκών ινών: οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης ή τασσεοεξαρτώμενοι διάυλοι ασβεστίου (voltage-dependent channels-VDCs) και οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση κάποιου αγωνιστή με την πρωτεΐνη του διαύλου ή με μια άλλη συζευγμένη με αυτόν πρωτεΐνη (υποδοχέα) (receptor-operated channels-ROCs)⁶¹.

Η δίοδος Ca^{2+} μέσω των τασσεοεξαρτώμενων διαύλων είναι ανάλογη της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης. Επομένως η εκπόλωση της μεμβράνης αυξάνει όχι μόνο την πιθανότητα ανοίγματος των διαύλων αλλά και τη χρονική διάρκεια που παραμένουν ανοιγμένα. Έχουν αναγνωρισθεί δύο κύριοι τύποι τασσεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} ανάλογα με τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες: α) οι L(long-lasting)-τύπου διάυλοι (βραδείς) και οι β) οι T(transient)-τύπου διάυλοι(ταχείς). Στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών υπάρχει αφθονία L-τύπου διαύλων ασβεστίου. Τα κανάλια αυτά ανοίγουν απαντώντας στην εκπόλωση του κυττάρου, με είσοδο Ca^{2+} στο

κύτταρο και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου. Επίσης είναι υπεύθυνα για τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλείται από διάλυμα KCL. Οι διάλυλοι αυτοί δεσμεύονται από διυδροπυριδίνες (π.χ. νιφεδιπίνη) ή τις φαινυλαλκυλαμίνες (π.χ. βεραπαμίλη). Η απενεργοποίηση των L-τύπου διαύλων ασβεστίου μπορεί να συμβεί σαν συνέπεια της εισόδου Ca^{2+} στο κύτταρο⁶². Ο ρυθμιστικός ρόλος των κυκλικών νουκλεοτιδίων cAMP και cGMP φαίνεται ότι είναι ανασταλτικός, αφού πολλοί παράγοντες(π.χ. οξείδιο του αζώτου, νιτροπρωσικό νάτριο) που τα αυξάνουν προκαλούν αγγειοχάλαση. Επίσης φαίνεται ότι οι L-τύπου διάλυλοι ασβεστίου ενεργοποιούνται από την αύξηση του ATP⁵⁸.

Ένας άλλος τύπος διαύλων που υπάρχει στη μεμβράνη των λείων μυϊκών ινών είναι εκείνοι που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση κάποιας ουσίας (π.χ. κάποιου αγωνιστή που απελευθερώνεται από τις νευρικές απολήξεις, κάποιας ορμόνης, κτλ) με ειδικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης. Με την ενεργοποίησή τους οι διάλυλοι αυτοί ανοίγουν και αυξάνει η αγωγιμότητά τους σε θετικά ιόντα (κυρίως ασβέστιο). Με την εισροή θετικών ιόντων είναι δυνατό να αυξηθεί το δυναμικό της μεμβράνης μέχρι τον ουδό οπότε ανοίγουν κανάλια που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης. Αλλά και μόνο η ενεργοποίηση των διαύλων που ανοίγουν μετά από τη σύνδεση κάποιου αγωνιστή σε υποδοχέα της μεμβράνης, προκαλεί αρκετή είσοδο ιόντων ασβεστίου για την πρόκληση ικανοποιητικού βαθμού σύσπασης^{58,62}.

Για να προκληθεί χάλαση των συσταλών στοιχείων των λείων μυϊκών ινών απαιτείται η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου. Η απομάκρυνση αυτή επιτελείται με τις αντλίες ασβεστίου, μέσω των οποίων αντλούνται ιόντα ασβεστίου έξω από το λείο μυϊκό κύτταρο προς τον εξωκυττάριο χώρο ή προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Οι αντλίες αυτές όμως είναι πολύ βραδείες συγκριτικά με την ταχεία αντλία του σαρκοπλασματικού δικτύου στους γραμμωτούς μύες. Γι'αυτό και η διάρκεια της

συστολής των λείων μυϊκών ιών συχνά είναι της τάξης των δευτερολέπτων μάλλον παρά εκατοστών έως δεκάτων δευτερολέπτου όπως συμβαίνει στους σκελετικούς μύες⁵⁵.

Ο ρόλος των ιόντων

Σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες του σώματος υπάρχει μηχανισμός ενεργητικής μεταφοράς του νατρίου και του καλίου, που λέγεται αντλία Na^+/K^+ . Η αντλία αυτή μεταφέρει το νάτριο από το εσωτερικό του κυττάρου προς τα έξω και το κάλιο προς την αντίθετη φορά. Η λειτουργία της αντλίας αυτής που συμμετέχει στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης, απαιτεί ενέργεια η οποία προέρχεται από την υδρόλυση ATP από ένα ενζυμικό σύστημα της μεμβράνης γνωστό ως Na^+/K^+ ATPase. Για κάθε τρία ιόντα Na^+ που εξέρχονται, εισέρχονται δύο ιόντα K^+ . Το νάτριο και το κάλιο διαχέονται από ξεχωριστούς κυρίως πόρους που ονομάζονται κανάλια Na^+ και κανάλια K^+ . Τα κανάλια K^+ είναι 50-100 φορές πιο διαπερατά από του Na^+ ⁶³⁻⁶⁴.

Οι διάλυτοι K^+ παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης και της κυτταρικής διέγερσης και επομένως στον έλεγχο της σύσπασης των λείων μυϊκών ιών. Διάφοροι τύποι διαύλων K^+ έχουν αναγνωρισθεί. Οι τρεις πιο σημαντικοί διάλυτοι K^+ στους λείους μύες είναι: οι K_{ATP} (ενεργοποιούνται από την πτώση του ενδοκυττάρου ATP και από την αύξηση της αδενοσινοδιφωσφατάσης (ADP) ή της γουανοσινοδιφωσφατάσης (GDP) με αποτέλεσμα έξοδο ιόντων καλίου από το κύτταρο, αύξηση της αρνητικότητας εντός του κυττάρου και τελικά υπερπόλωση), οι BK_{Ca} (ενεργοποιούνται από την αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ αλλά και από την εκπόλωση της μεμβράνης με αποτέλεσμα να λειτουργούν σαν ένας μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης του δυναμικού της μεμβράνης που οδηγεί σε μείωση

της διέγερσης του κυττάρου) και οι K_v (ενεργοποιούνται από την εκπόλωση της μεμβράνης και οδηγούν σε επαναπόλωση). Συνοπτικά, το άνοιγμα των παραπάνω διαύλων οδηγεί σε έξοδο K^+ από το κύτταρο, υπερπόλωση της μεμβράνης, ελάττωση της διεγερσιμότητας και τελικά χάλαση των λείων μυϊκών ινών⁶⁵.

Έχει βρεθεί ότι το άνοιγμα των BK_{ca} μπορεί να συμβεί με την εκπόλωση της μεμβράνης από την διέγερση του β-αδρενεργικού υποδοχέα από κάποιους αγωνιστές του⁶⁶. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των β-αδρενεργικών υποδοχέων στις λείες μυϊκές ίνες διεγείρει την αδενυλκυκλάση και οδηγεί σε αύξηση του cAMP, που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA προκαλεί φωσφορυλίωση ειδικών πρωτεϊνών όπως ρυθμιστικές πρωτεΐνες, κανάλια ιόντων και ένζυμα εντός του κυττάρου. Στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών η PKA έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει διάυλο K^+ ο οποίος ανοίγει οδηγώντας σε έξοδο K^+ από το κύτταρο, υπερπόλωση και χάλαση⁶⁷.

Στα λείες μυϊκές ίνες υπάρχει και ο μηχανισμός ανταλλαγής Na^+ / Ca^{++} κατά τον οποίο ανταλλάσσονται 1 ιόν ασβεστίου με 3 ιόντα νατρίου. Η κατεύθυνση της μετακίνησης των ιόντων καθορίζεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση των ιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης καθώς και από το δυναμικό της. Ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιεί τη διαφορά στη συγκέντρωση του Na^+ για την έξοδο του Ca^{++} από το εσωτερικό του κυττάρου οδηγώντας σε μείωση της $[Ca^{2+}]_i$ και τελικά χάλαση⁶⁴.

Ο ρόλος του επιθηλίου

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών πραγματοποιήθηκαν πάρα πολλές μελέτες σχετικά με το ρόλο του επιθηλίου στον τόνο των λείων μυϊκών ινών. Μετά τα πειράματα των Furchgott και Zawadzki που οδήγησαν στην ανακάλυψη της αγγειοδιασταλτικής λειτουργίας του ενδοθηλίου το 1980, ακολούθησε πλήθος μελετών με αποτέλεσμα να διατυπωθεί στη συνέχεια η άποψη ότι από τον ερεθισμό των

ενδοθηλιακών κυττάρων παράγεται ένας παράγοντας (Endothelium Derived Relaxing Factor - EDRF), που συνδέει το ενδοθήλιο με τα λεία μυϊκά κύτταρα, και προκαλεί χάλαση⁶⁸. Λίγα χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκε η ομοιότητα του EDRF με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) καθώς και η ανάγκη παρουσίας ιόντων Ca^{++} για την παραγωγή του. Εκτός όμως από τις μελέτες στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων έχουν πραγματοποιηθεί και πολλές μελέτες σε αεραγωγούς και έχει βρεθεί ότι η καταστροφή του επιθηλίου και η μείωση στην παραγωγή του παράγοντα EDRF, άρα και του NO, μπορεί να προκαλέσει βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Εκτός από το NO, άλλη ουσία που παράγεται από το επιθήλιο και αναστρέφει τη σύσπαση που μπορεί να προκαλέσει κάποιος βρογχοσυσπαστικός παράγοντας, είναι και η προσταγλανδίνη PGE_2 . Έχει βρεθεί ότι η αφαίρεση του επιθηλίου αυξάνει τη σύσπαση που προκαλούν βρογχοσυσπαστικοί παράγοντες όπως η ακετυλοχολίνη, η ισταμίνη και η προσταγλανδίνη F2a καθώς και η εφαρμογή ηλεκτρικού ερεθίσματος⁶⁹⁻⁷³.

Η δράση του NO φαίνεται ότι επιτελείται μέσω της διέγερσης της γουανυλικής κυκλάσης και της παραγωγής cGMP⁷⁴⁻⁷⁶. Εκτός όμως από τον μηχανισμό χάλασης των λείων μυϊκών ινών μέσω της παραγωγής cGMP, το NO έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί άμεσα τα Ca^{2+} - εξαρτώμενα κανάλια καλίου (K_{ca}). Έτσι μπορεί να προκληθεί υπερπόλωση και τελικά χάλαση των λείων μυϊκών ινών ανεξάρτητα από το cGMP⁷⁶. Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός χάλασης που έχει προταθεί είναι η διέγερση της Na^+ / K^+ ATPάσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα υπερπόλωση που οδηγεί σε είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο (οι διάλυτοι ασβεστίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι τασεοεξαρτώμενοι) και επομένως αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$. Η αύξηση αυτή διεγείρει την παραγωγή και την απελευθέρωση NO⁷⁸.

Επίσης έχει βρεθεί ότι το NO αποτελεί σημαντικό νευροδιαβιβαστή του ανασταλτικού μη-αδρενεργικού μη-χολινεργικού συστήματος (i-NANC), μαζί με το

αγγειοδραστικό πεπτίδιο (VIP), χωρίς να είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός απελευθέρωσής του από τις νευρικές ίνες^{76,79-80}.

Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΕ ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα τελευταία χρόνια αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των μελετών που αφορούν τη δράση της ινσουλίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα και ιδιαίτερα από τη στιγμή που φάνηκε ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο μυϊκό τόνο των αγγείων και στην αρτηριακή πίεση του αίματος. Η εμφάνιση αρτηριακής πίεσης έχει συσχετισθεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων και έχει βρεθεί ότι η ινσουλίνη προκαλεί αναστολή της σύσπασής τους που προκαλείται από διάφορους παράγοντες. Οι Kahn και συν έδειξαν ότι η ινσουλίνη ανέστειλε κατά περίπου 50% τη σύσπαση λείων μυϊκών κυττάρων μηριαίας αρτηρίας σκύλου που είχε προκληθεί από σεροτονίνη ή από αγγειοτενσίνη II^3 . Επίσης οι Han και συν σε μελέτη τους σε τμήματα θωρακικής αορτής ποντικού, έδειξαν ότι η προσθήκη ινσουλίνης αναστέλλει τη σύσπαση που προκαλεί η νορεπινεφρίνη⁴. Εκτός όμως από τα αγγεία, η ανασταλτική δράση της ινσουλίνης έχει αποδειχθεί και σε άλλες λείες μυϊκές ίνες. Σε μελέτη των Altan και συν φάνηκε ότι η ινσουλίνη ανέστειλε τη σύσπαση λείων μυϊκών ινών ειλεού ινδικού χοιριδίου που προκλήθηκε από ακετυλοχολίνη ή από ισταμίνη καθώς και τη σύσπαση λείων μυϊκών ινών στομάχου ποντικού που προκλήθηκε από σεροτονίνη⁸¹.

Πάρα πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την αναζήτηση των μηχανισμών της δράσης της ινσουλίνης στους λείους μύες. Έχει βρεθεί ότι η ινσουλίνη διεγείρει τη δραστηριότητα της $Na^+ / K^+ ATP$ ασης με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης η οποία οδηγεί σε κλείσιμο των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} με αποτέλεσμα μείωση της εισόδου Ca^{2+} στα κύτταρα, ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} και επομένως χάλαση³. Σε μελέτη των Zemel και συν σε τμήματα αορτής ποντικού μετά την αφαίρεση του ενδοθηλίου, φάνηκε ότι η ινσουλίνη διεγείρει τη δραστηριότητα της αντλίας ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα

την έξοδο Ca^{2+} από το κύτταρο με αποτέλεσμα ελάττωση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ και τελικά χάλαση⁸². Οι Hasdai και συν έδειξαν ότι η ινσουλίνη προκαλεί χάλαση των στεφανιαίων αρτηριών χοίρου και ότι η δράση της αυτή οφείλεται σε ενεργοποίηση των διαύλων καλίου⁸³. Επίσης έχει βρεθεί ότι η χάλαση που προκαλεί η ινσουλίνη στις λείες μυϊκές ίνες αναστέλλεται απουσία ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και παρουσία κάποιου αναστολέα της συνθάσης του NO (π.χ. L-NAME, L-NMMA), οδηγώντας στην υπόθεση ότι η δράση της επιτελείται μέσω παραγωγής και απελευθέρωσης NO από το επιθήλιο⁴.

Η δράση της ινσουλίνης αρχίζει στις περισσότερες περιπτώσεις με τη σύνδεσή της στον υποδοχέα της, ο οποίος όπως έχει αναφερθεί, είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης. Έχει βρεθεί ότι η σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την κινάση της τυροσίνης, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει κάποια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη. Σε μελέτη των Tironati και συν η χάλαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλούσε η ινσουλίνη, αποδόθηκε σε αύξηση του cAMP και του cGMP μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από τον υποδοχέα (αναστέλλονταν από την επίδραση ενός αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης) με διέγερση της αδενυλικής και γουανυλικής κυκλάσης, ενώ η δράση της ινσουλίνης στο cGMP ήταν εξαρτώμενη του NO⁸⁴. Επίσης σε μελέτη των Bertuglia και Colantuoni βρέθηκε ότι η δράση της ινσουλίνης απαιτεί τη μεσολάβηση της δράσης της κινάσης της τυροσίνης⁸⁵. Οι Kahn και συν σε πρόσφατη μελέτη τους σε λεία μυϊκά κύτταρα μηριαίας αρτηρίας σκύλου, έδειξαν ότι η πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται στην ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην είσοδο Ca^{2+} στα κύτταρα που προκαλεί κάποιος αγωνιστής αλλά και στη διεγερτική της δράση στην παραγωγή cGMP⁸⁶.

Πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η ινσουλίνη προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών αγγείων με την ενεργοποίηση της συνδεδεμένης με τη μυοσίνη φωσφατάσης (Myosin-bound phosphatase –MBP) και με την αναστολή της Rho κινάσης⁸⁷. Η ινσουλίνη αναστέλλει το δρόμο -μέσω πρωτεϊνών Rho,- μετάδοσης του σήματος ενδοκυττάρια, μέσω του δρόμου NO/cGMP προκειμένου να προκαλέσει ενεργοποίηση της MBP⁸⁸.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Χρησιμοποιήθηκαν τμήματα τραχείας κουνελιών (βάρους 1-2 kg), τα οποία προηγουμένως είχαν αναισθητοποιηθεί με πεντοθάλη (δόση 20mg/kg, ενδοφλεβίως). Μετά την άμεση αφαίρεσή της, η τραχεία τοποθετούνταν σε διάλυμα Krebs (KS) στο οποίο διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης: 95% O₂ και 5% CO₂. Η σύνθεση του διαλύματος Krebs, σε mM, ήταν η ακόλουθη: Na⁺ 137, Mg²⁺ 1.1, K⁺ 5.9, Cl⁻ 123, Ca²⁺ 2.0, H₂PO₄⁻ 1.2, HCO₃⁻ 24.9, γλυκόζη 9.6 και pH 7.2-7.4 στους 37° C.

Από την τραχεία αφαιρούνταν τμήματα 2-3mm και τοποθετούνταν υπό τάση 1gr, σε μικρό λουτρό με συνεχή έγχυση KS και παροχή αερίου (95% O₂ και 5% CO₂) σε θερμοκρασία 37° C. Ο βλεννογόνος τοποθετούνταν προς την επιφάνεια του διαλύματος. Η μία άκρη του τμήματος σταθεροποιούνταν με τη βοήθεια λεπτής βελόνης και το άλλο στο βραχίονα ενός ισομετρικού καταγραφέα τάσης (Grass FT03C). Συγχρόνως υπήρχε συνεχής ένδειξη σήματος σε οθόνη παλμογράφου (Harvard Universal). Οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκονταν μεταξύ των δύο στηριγμάτων.

Κάθε τμήμα σταθεροποιούνταν σε τάση ηρεμίας 1gr πριν από την έναρξη του πειράματος. Στη συνέχεια χορηγούνταν μια εφάπαξ δόση 0,05-0,1ml 10⁻¹ διάλυμα Ακετυλοχολίνης (Ach) με σκοπό την πρόκληση μυϊκής σύσπασης (φάση αρχικής σύσπασης). Ακολουθούσε συνεχής έκπλυση με KS και το τμήμα της τραχείας αφήνονταν να ηρεμήσει μέχρι να επανέλθει στη βασική γραμμή (φάση ηρεμίας). Η φάση αυτή διαρκούσε 90 λεπτά. Τα πειράματα που σχεδιάστηκαν περιγράφονται στη συνέχεια.

Χορήγηση ινσουλίνης

Μετά τη φάση ηρεμίας χορηγήθηκε διάλυμα 80mM KCl το οποίο περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης (10^{-9} – 10^{-5} M). Πριν από την έναρξη της χορήγησης της ινσουλίνης, λαμβάνονταν μια σύσπαση αναφοράς μετά από τη χορήγηση διαλύματος 80mM KCl (καμπύλη αναφοράς). Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση που έχει η ινσουλίνη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, στην καμπύλη σύσπασης που προκαλεί το KCl. Η παράμετρος που μετρήθηκε ήταν η % σύσπαση που προκαλούνταν (με την επίδραση του διαλύματος KCl και διαφορετικών συγκεντρώσεων ινσουλίνης) σε σχέση με την καμπύλη αναφοράς. Πραγματοποιήθηκαν δεκαέξι πειράματα.

Στη συνέχεια τα ίδια πειράματα επαναλήφθηκαν με τη χρησιμοποίηση διαλύματος Ach 10^{-5} στη θέση του διαλύματος 80mM KCl, το οποίο περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης (10^{-10} – 10^{-5} M). Πραγματοποιήθηκαν είκοσι πειράματα και μελετήθηκε η επίδραση που έχει η ινσουλίνη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, στην καμπύλη σύσπασης που προκαλεί η Ach.

Χορήγηση ινσουλίνης μετά από την αφαίρεση του επιθηλίου

Στα τμήματα της τραχείας που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά, έγινε αφαίρεση του επιθηλίου μηχανικά πριν την τοποθέτησή τους στο λουτρό. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία σταθεροποίησης, μετά τη φάση ηρεμίας χορηγήθηκε διάλυμα Ach 10^{-5} το οποίο περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης (10^{-10} – 10^{-5} M) και το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως το προηγούμενο. Στη φάση αυτή έγιναν δεκαπέντε πειράματα.

Χορήγηση ινσουλίνης παρουσία L-NAME

Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος τα τμήματα της τραχείας βρίσκονταν συνεχώς υπό την επίδραση N^ω –nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), ενός αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Όλα τα διαλύματα που χορηγούνταν στον ιστό, περιείχαν 10⁻⁴ M L-NAME. Στα τμήματα της τραχείας που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά, μετά τη φάση ηρεμίας χορηγήθηκε διάλυμα Ach 10⁻⁵ το οποίο περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης (10⁻¹⁰ –10⁻⁵ M) και το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως το προηγούμενο. Στη φάση αυτή έγιναν δεκαέξι πειράματα.

Σε όλα τα πειράματα, στο διάστημα που μεσολαβούσε μεταξύ της χορήγησης δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ινσουλίνης και ενώ ο ιστός ξεπλένονταν με KS, παράλληλα γινόταν προεπάση με ινσουλίνη στη συγκέντρωση που θα επακολουθούσε. Στο τέλος κάθε πειράματος χορηγούνταν ξανά ο ίδιος συσπαστικός παράγοντας που είχε χορηγηθεί προηγουμένως (διάλυμα Ach 10⁻⁵ M ή διάλυμα 80mM KCl) προκειμένου να ελεγχθεί η βιωσιμότητα του ιστού.

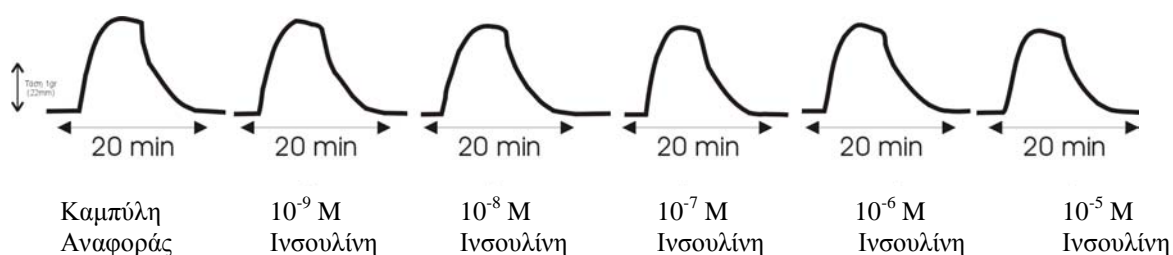
Η ινσουλίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Sigma (insulin from bovine pancreas) όπως και η ακετυλοχολίνη και το L-NAME.

Όλα τα στοιχεία καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και η στατιστική μελέτη έγινε με τη μέθοδο του t-test, με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS..

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από KCl σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού

Σε πειράματα που έγιναν σε λείες μυϊκές ίνες κουνελιού, φάνηκε ότι η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλείται από 80 mM KCl παρουσιάζει μικρή μείωση με την εφαρμογή διαλύματος ινσουλίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10^{-9} – 10^{-5} M), όπως φαίνεται στην καταγραφή (εικόνα 1).



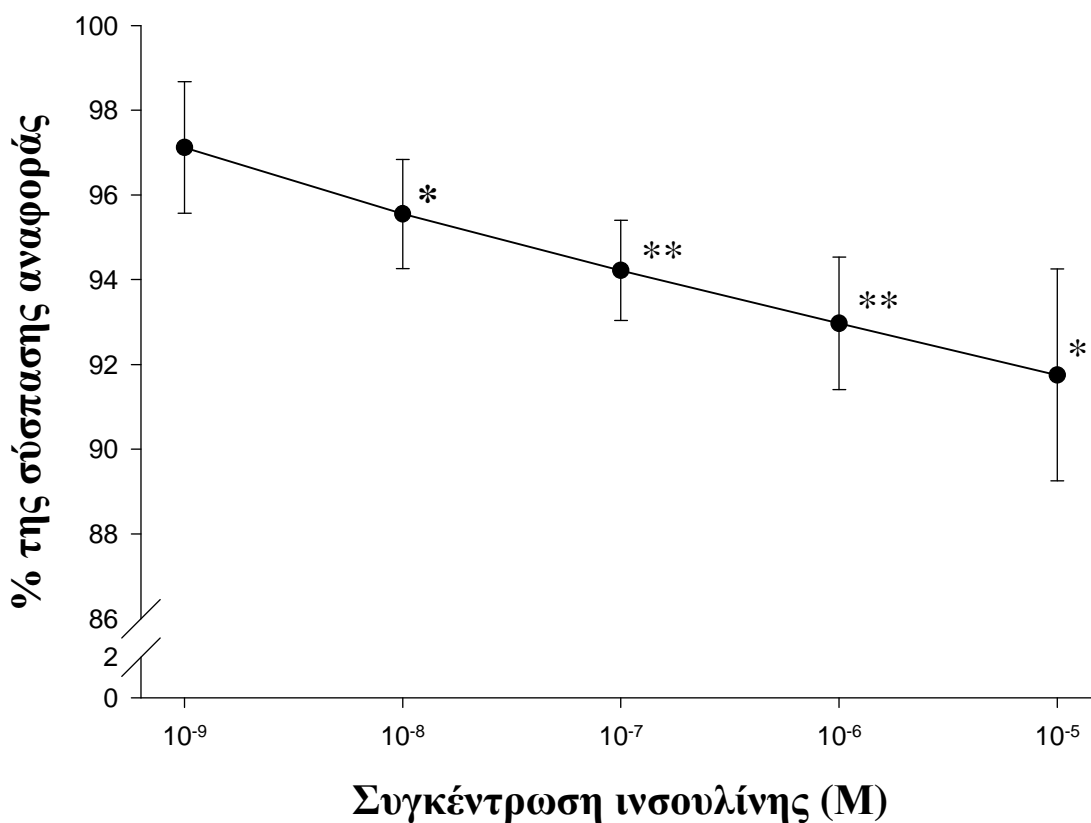
Εικόνα 1. Δράση ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 80mM KCL.

Η ινσουλίνη σε συγκέντρωση 10^{-8} M προκαλεί μείωση της σύσπασης που προκαλεί το KCl κατά 4,5% ενώ στη συγκέντρωση 10^{-5} M κατά 8,3%. Η χάλαση αυτή που προκαλεί η ινσουλίνη είναι στατιστικά σημαντική για τις συγκεντρώσεις 10^{-8} – 10^{-5} M της ινσουλίνης (πίνακας 1).

Συγκέντρωση ινσουλίνης (M)	Σύσπαση (%) (MO+/-SE)	P
10^{-9}	97,12+/-1,55	NS
10^{-8}	95,55+/-1,29	0,018
10^{-7}	94,22+/-1,18	0,005
10^{-6}	92,97+/-1,56	0,007
10^{-5}	91,75+/-2,50	0,022

Πίνακας 1. Η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού την προκαλούμενη από KCl 80mM. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος (MO)+/-SE από έξι πειράματα (n=6) και εκφράζουν την ποσοστιαία αναλογία (%) της καμπύλης αναφοράς που προκλήθηκε από 80mM KCl. (NS:μη στατιστικά σημαντικό).

Η αυξανόμενη μείωση της αρχικής σύσπασης, σε σχέση με τις εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης φαίνεται στο διάγραμμα (εικόνα 2).

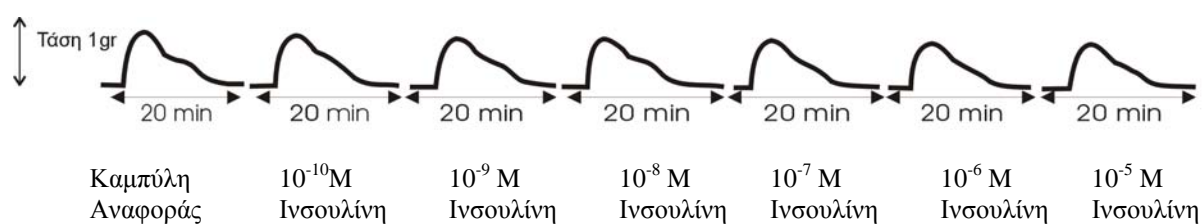


Εικόνα 2. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 80mM KCL.

* P<0,05 ** P<0,01

Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (ACh) σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού

Όταν η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών προκαλούνταν από 10^{-5} M ACh, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση διαλύματος ινσουλίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10^{-10} – 10^{-5} M) είχε σαν αποτέλεσμα την ήπια σταδιακή της μείωση (εικόνα 3).



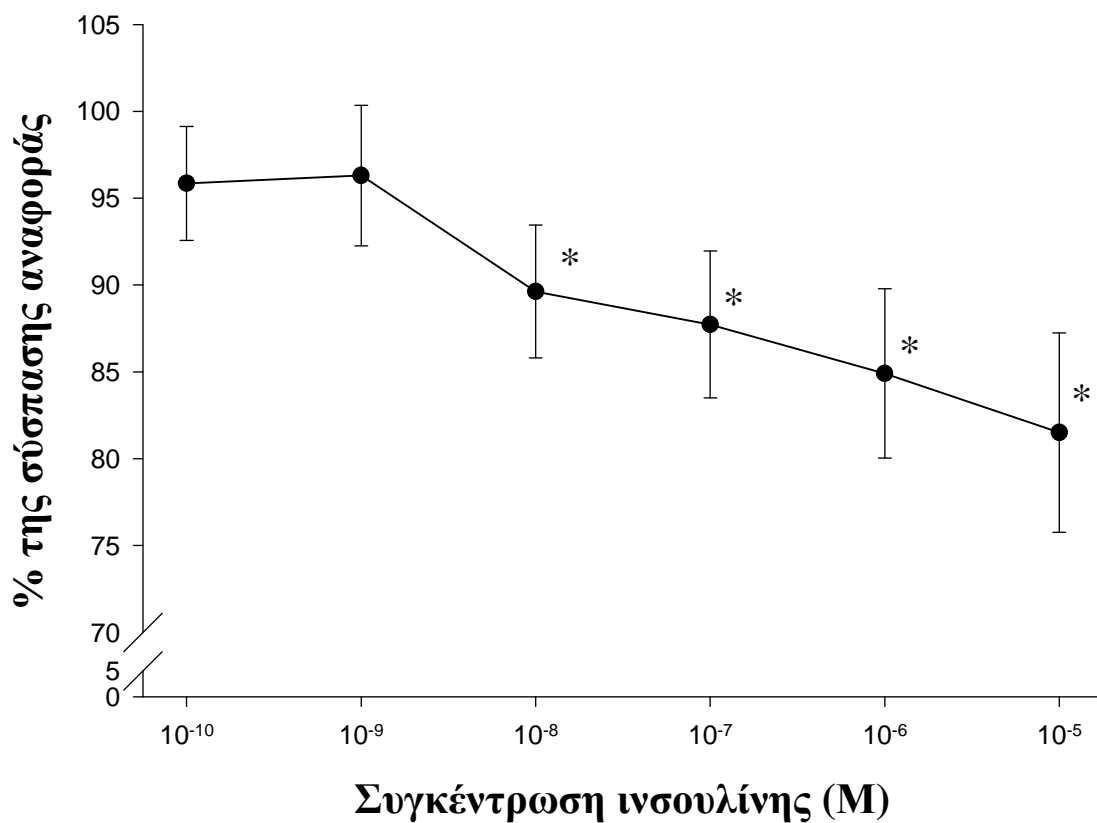
Εικόνα 3. Δράση ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh).

Η ινσουλίνη στις συγκεντρώσεις 10^{-8} και 10^{-7} M προκάλεσε μείωση της αρχικής σύσπασης κατά 10,4% και 12,3% αντίστοιχα, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική. Στατιστικώς σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στην συγκέντρωση 10^{-6} ενώ η μεγαλύτερη χάλαση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 10^{-5} M η οποία ήταν 18,5%(πίνακας 2).

Συγκέντρωση ινσουλίνης (M)	Σύσπαση (%) (MO+/-SE)	P
10^{-10}	95,85+/-3,28	NS
10^{-9}	96,30+/-4,05	NS
10^{-8}	89,63+/-3,82	0,042
10^{-7}	87,73+/-4,23	0,034
10^{-6}	84,91+/-4,88	0,027
10^{-5}	81,51+/-5,74	0,023

Πίνακας 2. Η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού την προκαλούμενη από 10^{-5} M Ach. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος (MO)+/-SE από έξι πειράματα ($n=6$) και εκφράζουν την ποσοστιαία αναλογία (%) της καμπύλης αναφοράς που προκλήθηκε από 10^{-5} M Ach. (NS:μη στατιστικά σημαντικό).

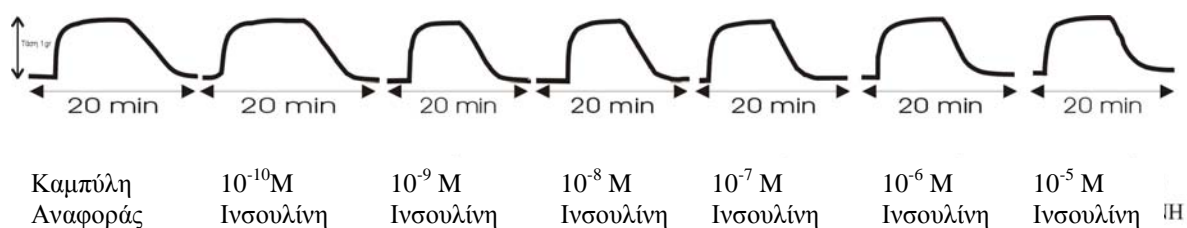
Η αυξανόμενη μείωση, της αρχικής σύσπασης που προκλήθηκε από την ακετυλοχολίνη, σε σχέση με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης φαίνεται στο διάγραμμα (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} Ach. * $P < 0,05$

Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (ACh) μετά από την αφαίρεση του επιθηλίου σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού

Όταν το προηγούμενο πείραμα έγινε μετά την αφαίρεση του επιθηλίου, η δράση της ινσουλίνης μειώθηκε. Σε πειράματα που έγιναν σε λείες μυϊκές ίνες κουνελιού μετά την αφαίρεση του επιθηλίου, όταν χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10^{-10} – 10^{-5} M) ινσουλίνης παρατηρήθηκε ότι η χάλαση που προκαλεί αυτή στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλούνταν από 10^{-5} M ACh μειώνεται ή και αναστρέφεται (σε σύγκριση με τα πειράματα κατά τα οποία το επιθήλιο ήταν ακέραιο) (εικόνα 5).



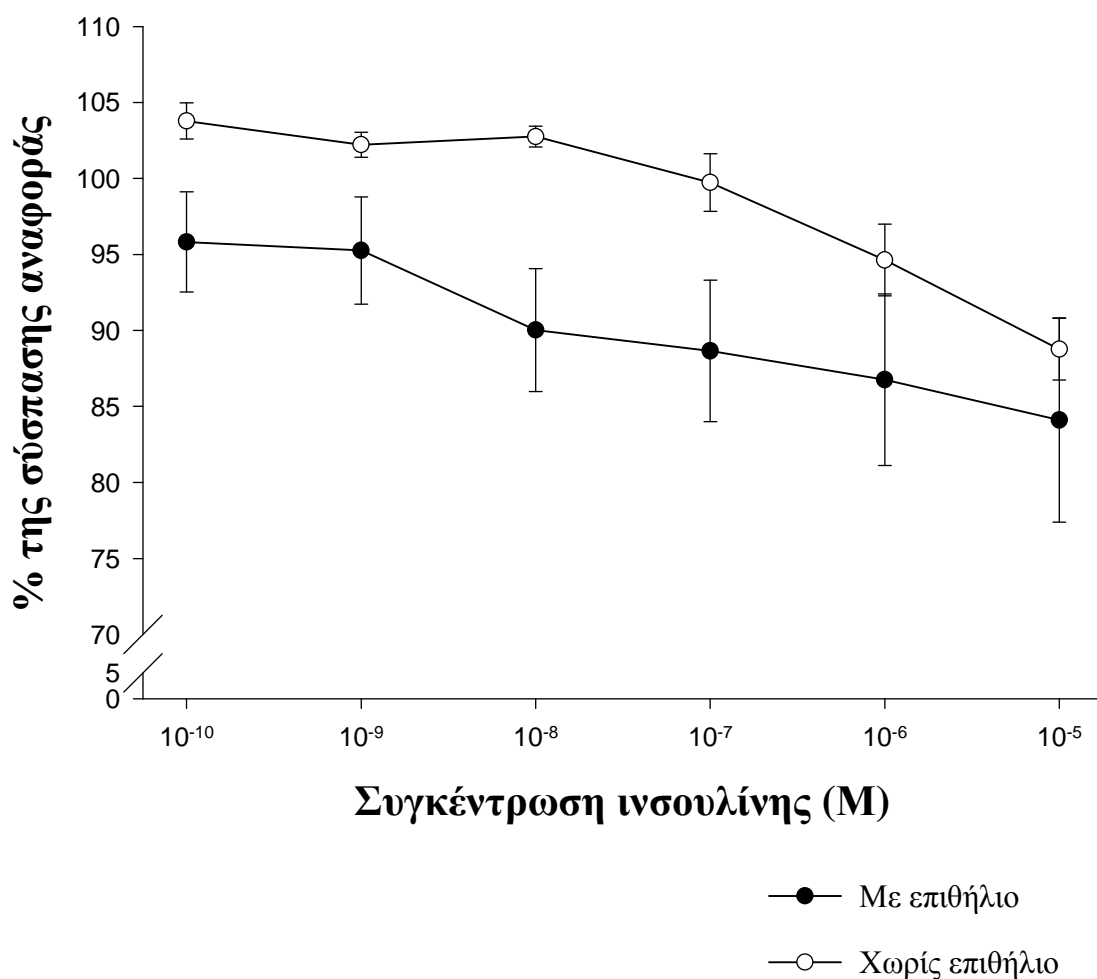
Εικόνα.5. Δράση ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh) μετά την αφαίρεση του επιθηλίου.

Για τη συγκέντρωση 10^{-10} M προκαλείται αύξηση της αρχικής σύσπασης κατά 3,78%. Αυξανόμενη η συγκέντρωση της ινσουλίνης σε 10^{-5} M προκαλεί χάλαση της τάξης του 10% της αρχικής σύσπασης της Ach. Για τις συγκεντρώσεις 10^{-8} M και 10^{-7} M, η αύξηση που προκλήθηκε ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) σε σχέση με τα αντίστοιχα πειράματα όπου το επιθήλιο ήταν ακέραιο (πίνακας 3).

Συγκέντρωση ινσουλίνης (M)	Σύσπαση (%) (MO+/-SE) Με επιθήλιο	Σύσπαση (%) (MO+/-SE) Χωρίς επιθήλιο	P
10^{-10}	95,85+/-3,28	103,78+/-1,18	NS
10^{-9}	96,30+/-4,05	102,22+/-0,82	NS
10^{-8}	89,63+/-3,82	102,75+/-0,69	0,016
10^{-7}	87,73+/-4,23	99,73+/-1,89	0,046
10^{-6}	84,91+/-4,88	94,63+/-2,36	NS
10^{-5}	81,51+/-5,74	88,77+/-2,03	NS

Πίνακας 3. Η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού την προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (Ach) 10^{-5} πριν και μετά από την αφαίρεση του επιθηλίου. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος (MO)+/-SE από έξι πειράματα ($v=6$) και εκφράζουν την ποσοστιαία αναλογία (%) της καμπύλης αναφοράς που προκλήθηκε από Ach 10^{-5} . (NS:μη στατιστικά σημαντικό).

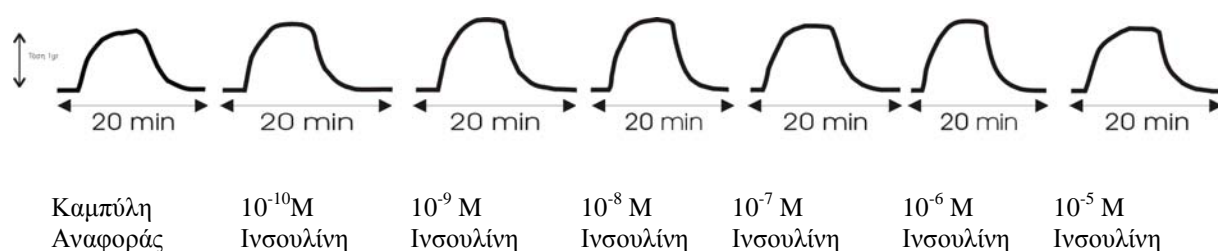
Η διαφορά στη δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση από Ach πριν και μετά την αφαίρεση του επιθήλιου φαίνεται στο διάγραμμα (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} Ach παρουσίας και απουσίας του επιθήλιου

Η δράση της ινσουλίνης στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (ACh) σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού παρουσία L-NAME

Η μείωση της δράσης της ινσουλίνης, στη σύσπαση που προκαλούνταν από 10^{-5} M ACh, ήταν μεγαλύτερη όταν αντί για αφαίρεση του επιθηλίου τα πειράματα πραγματοποιούνταν παρουσία 10^{-4} M L-NAME (εικόνα 7).



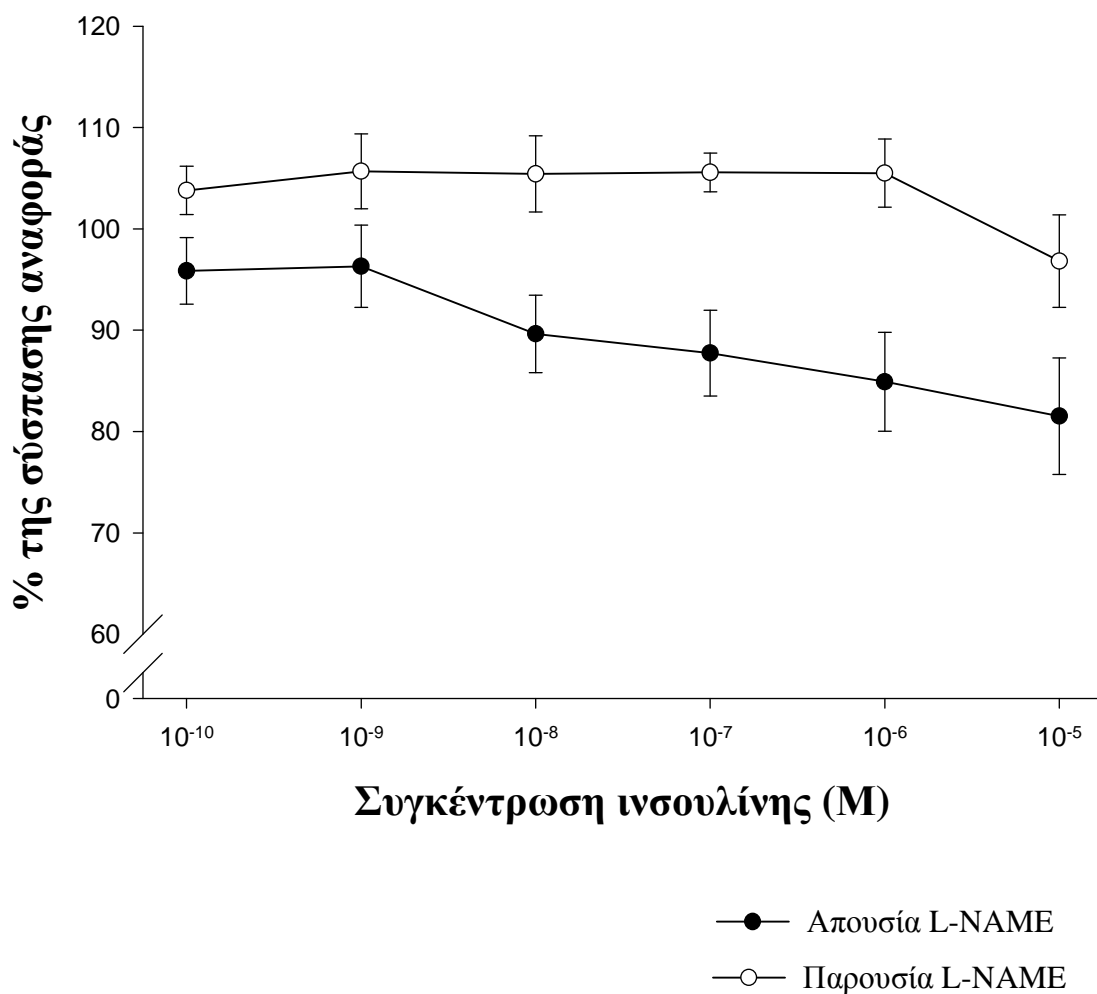
Εικόνα.7. Δράση ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh) παρουσία 10^{-4} M L-NAME.

Το L-NAME ευοδώνει τη σύσπαση της Ach και την αυξάνει κατά περίπου 5% για συγκέντρωση ινσουλίνης 10^{-9} M έως και 10^{-6} M ενώ στη συγκέντρωση 10^{-5} M παρατηρείται μείωση της αρχικής σύσπασης κατά 3,2%. Η αύξηση της αρχικής σύσπασης ήταν στατιστικώς σημαντική για τις συγκεντρώσεις 10^{-10} M ($P<0,05$), 10^{-8} M ($P<0,05$), 10^{-7} M ($P=0,01$) και 10^{-6} M ($P<0,05$) συγκριτικά με τη δράση της ινσουλίνης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις χωρίς όμως την παρουσία του L-NAME. (πίνακας 4).

Συγκέντρωση ινσουλίνης (M)	Σύσπαση (%) (MO+/-SE) Απουσία L-NAME	Σύσπαση (%) (MO+/-SE) Παρουσία L-NAME	P
10^{-10}	95,85+/-3,28	103,79+/-2,39	0,044
10^{-9}	96,30+/-4,05	105,68+/-3,69	NS
10^{-8}	89,63+/-3,82	105,41+/-3,77	0,022
10^{-7}	87,73+/-4,23	105,57+/-1,91	0,009
10^{-6}	84,91+/-4,88	105,50+/-3,36	0,031
10^{-5}	81,51+/-5,74	96,81+/-4,57	NS

Πίνακας 4. Η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού την προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη (Ach) 10^{-5} παρουσίας ή απουσίας 10^{-4} L-NAME. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος (MO)+/-SE από έξι πειράματα ($n=6$) και εκφράζουν την ποσοστιαία αναλογία (%) της καμπύλης αναφοράς που προκλήθηκε από Ach 10^{-5} . (NS:μη στατιστικά σημαντικό).

Η διαφορά στη δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση από Ach παρουσίας ή απουσίας L-NAME φαίνεται στο διάγραμμα (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ινσουλίνης σε σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού προκαλούμενη από 10^{-5} Ach παρουσίας και απουσίας 10^{-4} M L-NAME.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η ινσουλίνη μείωσε τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών της τραχείας κουνελιού που είχε προκληθεί από αυξημένη εξωκυττάρια συγκέντρωση καλίου $[K^+]_0$ (80 mM KCl). Την ίδια δράση είχε η ινσουλίνη και στην περίπτωση που η σύσπαση είχε προκληθεί από 10^{-5} M Ach. Η αφαίρεση του επιθηλίου ανέστειλε τη χάλαση που προκάλεσε η χορήγηση της ινσουλίνης στη σύσπαση που είχε προκαλέσει η ακετυλοχολίνη. Η παρουσία 10^{-4} M L-NAME στο υγρό διαπότισης είχε επίσης ως αποτέλεσμα να ανασταλεί η χάλαση που είχε προκαλέσει η ινσουλίνη στην προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών της τραχείας κουνελιού.

Όσον αφορά τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών υπάρχουν δύο μοντέλα για τη σύζευξη διέγερσης-σύσπασης: το ηλεκτρομηχανικό και το φαρμακομηχανικό. Το ηλεκτρομηχανικό εξαρτάται είτε από την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης η οποία ανοίγει διαύλους Ca^{2+} , οδηγώντας σε είσοδο Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο και επομένως αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, είτε εξαρτάται από την τασεοεξαρτώμενη απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυττάρια αποθήκες όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το φαρμακομηχανικό μοντέλο θεωρείται μη τασεοεξαρτώμενο. Στην περίπτωση αυτή, συμβαίνει είσοδος εξωκυττάρια Ca^{2+} μέσω διαύλων που ενεργοποιούνται από κάποιο χυμικό μεταβιβαστή (ligand) ή απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυττάρια αποθήκες. Η ενδοκυττάρια απελευθέρωση Ca^{2+} γίνεται είτε μέσω της δημιουργίας δευτέρων (ενδοκυττάρια) μεταβιβαστών από το χυμικό μεταβιβαστή, είτε μέσω της άμεσης δράσης του μεταβιβαστή στις ενδοκυττάρια αποθήκες Ca^{2+} του σαρκοπλασματικού δικτύου⁶¹.

Η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλείται από την επίδραση διαλύματος KCl έχει αποδοθεί στην ενδοκυττάρια είσοδο Ca^{2+} . Η αυξημένη

εξωκυττάρια συγκέντρωση καλίου $[K^+]_0$ προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία οδηγεί σε άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} και είσοδο Ca^{2+} με αποτέλεσμα αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} και σύσπαση⁶¹⁻⁶². Στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών υπάρχει αφθονία τασεοεξαρτώμενων L-τύπου διαύλων Ca^{2+} ⁶². Έχουν πραγματοποιηθεί πάρα πολλές μελέτες όσον αφορά τη δράση της ινσουλίνης στους λείους μύες, κυρίως αγγείων. Έχει βρεθεί ότι η ινσουλίνη διεγείρει τη δραστηριότητα της $Na^+ / K^+ ATP$ σης⁸⁹⁻⁹¹. Η διέγερση της $Na^+ / K^+ ATP$ σης, με την ανταλλαγή τριών ενδοκυττάριας ιόντων καλίου με δύο εξωκυττάρια ιόντα νατρίου, έχει σαν αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Σε λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων, η υπερπόλωση αυτή οδηγεί σε κλείσιμο των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} με αποτέλεσμα μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} και επομένως χάλαση^{3,92}. Οι Standley και συν. έδειξαν ότι η ινσουλίνη μειώνει την είσοδο Ca^{2+} μέσω των τασεοεξαρτώμενων διαύλων (VDCs) αλλά και των εξαρτώμενων από τη διέγερση υποδοχέα από κάποια ουσία διαύλων (ROC), σε πειράματα που πραγματοποίησαν σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής ποντικού⁹³. Επίσης οι Kahn και συν, έδειξαν ότι η ινσουλίνη αναστέλλει την είσοδο Ca^{2+} που προκαλεί η σεροτονίνη στα λεία μυϊκά κύτταρα μηριαίας αρτηρίας σκύλου και επομένως τη σύσπασή τους, μέσω τασεοεξαρτώμενων διαύλων⁹⁴. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν επίσης, ότι η ινσουλίνη παρουσιάζει την παραπάνω δράση μέσω μιας σειράς γεγονότων που προκαλεί, ξεκινώντας από την διέγερση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα⁹⁵.

Στην παρούσα μελέτη, η ινσουλίνη επίσης προκάλεσε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών της τραχείας που είχε προκληθεί από το KCl. Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες που αφορούν τη δράση της ινσουλίνης στα αγγεία, το αποτέλεσμα αυτό της δράσης της ινσουλίνης θα μπορούσε επίσης να

αποδοθεί σε μείωση της εισόδου Ca^{2+} στα κύτταρα λόγω φραγμού των διαύλων ασβεστίου μετά την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης στην οποία οδηγεί η διέγερση της Na^+/K^+ ΑΤΡασης.

Όταν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε 10^{-5} M Ach σαν συσπαστικός παράγοντας, η ινσουλίνη προκάλεσε ξανά χάλαση των λείων μυϊκών ινών της τραχείας, η οποία ήταν σχεδόν διπλάσια εκείνης που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του KCl. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι η χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών που προκαλεί η ινσουλίνη δεν οφείλεται μόνο στη αναστολή της εισόδου Ca^{2+} στα κύτταρα λόγω φραγμού των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου αλλά και σε άλλους μηχανισμούς.

Είναι πλέον γνωστός ο ρόλος του επιθηλίου και του NO στη χάλαση των λείων μυϊκών ινών^{68,74-75}. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε λείους μύες αεραγωγών έχει βρεθεί ότι μετά την αφαίρεση του επιθηλίου αυξάνει η σύσπαση που προκαλεί η ακετυλοχολίνη. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην έκλυση NO από το επιθήλιο, το οποίο διεγείρει την γουανυλική κυκλάση και επομένως την παραγωγή cGMP με αποτέλεσμα την χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Έχουν πραγματοποιηθεί πάρα πολλές μελέτες, κυρίως σε αγγεία, που έδειξαν ότι η ινσουλίνη προκαλεί χάλαση και η δράση της αναστέλλεται από την επίδραση κάποιου αναστολέα της συνθάσης του NO (π.χ. L-NMMA, L-NAME) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η δράση της εξαρτάται από το NO⁹⁶⁻⁹⁷. Οι Han και συν έδειξαν σε πειράματα που έκαναν σε αορτή ποντικού, ότι η χορήγηση ινσουλίνης αναστέλλει την σύσπαση που προκαλεί η νορεπινεφρίνη, δρώντας στο ενδοθήλιο, προκαλώντας αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ διέγερση της συνθάσης του NO (NOS) και απελευθέρωση NO το οποίο προκαλεί μείωση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ των λείων μυϊκών κυττάρων και χάλαση⁴. Επίσης οι Kahn και συν, μελετώντας λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων, έδειξαν ότι η ινσουλίνη αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυϊκών

κυττάρων παρουσία αυξημένης Ca^{2+}_i διεγείροντας τη συνθάση του NO (NOS) και τελικά την παραγωγή cGMP⁹⁸. Οι ίδιοι ερευνητές σε άλλη μελέτη τους σε λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων απουσία όμως ενδοθηλιακών κυττάρων, έδειξαν ότι η ινσουλίνη αναστέλλει τη σύσπασή τους και την είσοδο Ca^{2+} που προκαλεί η σεροτονίνη μέσω μηχανισμού που εξαρτάται από την NOS⁹⁹.

Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου στην παρούσα μελέτη είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της ινσουλίνης στη σύσπαση που είχε προκληθεί από 10^{-5} M Ach. Επίσης η χάλαση που προκάλεσε η ινσουλίνη μειώθηκε ή και αναστράφηκε όταν τα πειράματα έγιναν με ακέραιο επιθήλιο και παρουσία 10^{-4} M L-NAME. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων μελετών όπως αναφέρονται πιο πάνω και δείχνουν ότι η δράση της ινσουλίνης εξαρτάται από την ακεραιότητα του επιθηλίου και επιτελείται μέσω της δράσης του NO αφού αναστέλλεται παρουσία L-NAME. Επιπλέον οδηγούν στη σκέψη ότι η ινσουλίνη όπως η ισταμίνη και άλλες ορμόνες προκαλούν την απελευθέρωση NO από τα κύτταρα με αποτέλεσμα την αναστολή της σύσπασής τους¹⁰⁰.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η ανασταλτική δράση της ινσουλίνης ήταν μεγαλύτερη στα πειράματα που έγιναν με ακέραιο επιθήλιο και παρουσία 10^{-4} M L-NAME συγκριτικά με τα πειράματα που έγιναν μετά τη μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου απουσία L-NAME. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού θα μπορούσε να είναι η ατελής μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου με αποτέλεσμα να παραμένουν επιθηλιακά κύτταρα από τα οποία απελευθερώνεται NO μετά τη χορήγηση της ινσουλίνης, ενώ η παρουσία του L-NAME αναστέλλει τελείως την παραγωγή του. Από την άλλη πλευρά, το γεγονός ότι το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναπαραγωγίμο, οδηγεί στην υπόθεση της σύνθεσης NO όχι μόνο από τα επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, οι Kahn και συν έδειξαν σε μελέτη τους σε λεία μυϊκά κύτταρα

μηριαίας αρτηρίας σκύλου απουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, ότι η χάλαση που επιτυγχάνει η ινσουλίνη στη σύσπαση που προκαλεί η σεροτονίνη, αναστέλλεται παρουσία αναστολέα της συνθάσης του NO⁹⁹.

Η ινσουλίνη φαίνεται να έχει ανεπαίσθητη βρογχοδιασταλτική δράση σε αεραγωγούς με ακέραιο επιθήλιο. Πάρα πολλές μελέτες έχουν δείξει τη σπανιότητα συνύπαρξης βρογχικού άσθματος και σακχαρώδη διαβήτη¹⁰¹. Οι Vianna και συν έδειξαν ότι η ινσουλίνη παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της φλεγμονής σε ασθματική απάντηση σε κάποιο αντιγόνο¹⁰². Επιπλέον, οι Belmonte και συν έδειξαν ότι η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της φλεγμονής των αεραγωγών, την απώλεια της λειτουργίας των νευρικών M₂ μουσκαρινικών υποδοχέων και επομένως την υπεραντιδραστικότητα στην πρόκληση κάποιου αντιγόνου¹⁰³. Επομένως η ινσουλίνη φαίνεται να επηρεάζει τους αεραγωγούς με διαφορετικούς τρόπους.

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ινσουλίνης υψηλής περιεκτικότητας. Όμως, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της ινσουλίνης κατά την χορήγησή της μέσω του αναπνευστικού. Οι δόσεις ινσουλίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 15-20 φορές μεγαλύτερες εκείνων που χορηγούνται υποδόρια^{2,43-44,47-49}. Σε μελέτη των Heinemann και συν βρέθηκε ότι μόνο το 6-9% της εισπνεόμενης ινσουλίνης απορροφάται από τον βλεννογόνο των αεραγωγών προς την συστηματική κυκλοφορία και παραμένει βιολογικά ενεργό¹⁰⁴. Επιπλέον η ηπιότατη δράση της ινσουλίνης ακόμη και σε υψηλές δόσεις δείχνει ότι θα μπορούσε να χορηγηθεί χωρίς κανένα βιολογικό αποτέλεσμα ως βρογχοδιασταλτικός παράγοντας.

Παρά το γεγονός ότι η δράση της ινσουλίνης στους λείους μύες των αγγείων έχει μελετηθεί αρκετά (λόγω των επιπλοκών του Σ/Δ από το καρδιαγγειακό), δεν συνέβη στην περίπτωση των αεραγωγών. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η ινσουλίνη

ασκεί τοπική δράση στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών. Με τη σκέψη όμως ότι το αναπνευστικό σύστημα μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό δρόμο χορήγησης της ινσουλίνης, δημιουργείται η ανάγκη περαιτέρω μελέτης της δράσης της στους αεραγωγούς και τους πνεύμονες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην *in vitro* δράση της ινσουλίνης σε λείες μυϊκές ίνες αεραγωγών και στους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους αυτή η δράση ασκείται.

Τα αποτελέσματα της μελέτης οδήγησαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η ινσουλίνη αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών μετά από πρόκληση με χλωριούχο κάλιο και ακετυλοχολίνη.
2. Σε κυτταρικό επίπεδο φαίνεται ότι η δράση αυτή της ινσουλίνης οφείλεται μερικώς στην διέγερση της Na^+/K^+ ATPάσης με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και αναστολή της εισόδου Ca^{2+} μέσω των τασηοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου (VDCs).
3. Η ανασταλτικός μηχανισμός της ινσουλίνης στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών εκτός της αναστολής εισόδου Ca^{2+} μέσω των VDCs, φαίνεται ότι περιλαμβάνει και ενδοκυττάρια δράση μέσω του οξειδίου του αζώτου εκλύεται από το επιθήλιο των αεραγωγών.
4. Η αφαίρεση του επιθηλίου των αεραγωγών αναστέλλει τη δράση της ινσουλίνης.
5. Η δράση της ινσουλίνης αναστέλλεται όταν αναστέλλεται η δράση της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου και επομένως η παραγωγή του.
6. Η ινσουλίνη φαίνεται ότι προκαλεί έκλυση οξειδίου του αζώτου από το επιθήλιο των αεραγωγών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ινσουλίνη είναι η κύρια ορμόνη που ρυθμίζει τη γλυκόζη του αίματος. Εκτός όμως από τις γνωστές δράσεις της, σε πάρα πολλές μελέτες που έγιναν κυρίως σε αγγεία, η ινσουλίνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλεί κάποιος αγωνιστής. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το αναπνευστικό σύστημα αποτελεί εναλλακτική οδό χορήγησης της ινσουλίνης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, είναι αναγκαίο να μελετηθεί η δράση της ινσουλίνης στους λείους μύες των αεραγωγών.

Η δράση της ινσουλίνης μελετήθηκε *in vitro* στη σύσπαση λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού, που προκλήθηκε από διάλυμα 80mM KCl ή Ach 10^{-5} .

Χρησιμοποιήθηκαν τμήματα τραχείας που ελήφθησαν από νεαρά κουνέλια μετά από τη χορήγηση αναισθητικού (πεντοθάλη). Στη διάρκεια του πειράματος, το τμήμα της τραχείας παρέμενε βυθισμένο σε ειδικό λουτρό και σε συνεχή διαβροχή με διάλυμα Krebs (KS) στο οποίο διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης: 95% O₂ και 5% CO₂. Η μία άκρη του τμήματος ακινητοποιήθηκε και το άλλο συνδέθηκε με έναν μηχανομετατροπέα. Η σύσπαση καταγράφονταν σε ένα καταγραφικό τύπου Harvard. Αρχικά μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης (10^{-9} - 10^{-5} M) στη σύσπαση που είχε προκληθεί από το χλωριούχο κάλιο. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης (10^{-10} - 10^{-5} M) στη σύσπαση που είχε προκληθεί από την ακετυλοχολίνη, πριν και μετά την μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου. Τέλος, μελετήθηκε η δράση της ινσουλίνης στη σύσπαση που είχε προκληθεί από την ακετυλοχολίνη, παρουσία N^ω –nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), ενός αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).

Η ινσουλίνη προκάλεσε ελάττωση της σύσπασης που προκλήθηκε από το χλωριούχο κάλιο, η οποία ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιήθηκε ακετυλοχολίνη σαν

συσπαστικός παράγοντας. Η χορήγηση ινσουλίνης 10^{-5} M προκάλεσε χάλαση κατά 8,3% της αρχικής σύσπασης στην περίπτωση του KCl, ενώ στην περίπτωση της Ach η χάλαση που προκάλεσε ήταν 18,5%. Μετά την αφαίρεση του επιθήλιου η ινσουλίνη (10^{-8} , 10^{-7} M) προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) στη σύσπαση που είχε προκληθεί από την Ach σε σύγκριση με την περίπτωση που το επιθήλιο ήταν ακέραιο. Η αύξηση αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν τα πειράματα έγιναν παρουσία L-NAME και στατιστικώς σημαντική για τις συγκεντρώσεις 10^{-10} , 10^{-6} M ($P < 0,05$) 10^{-8} και 10^{-7} M ($P < 0,01$).

Η ινσουλίνη φαίνεται ότι αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών της τραχείας δρώντας στο επιθήλιο και απελευθερώνοντας NO το οποίο τελικά προκαλεί χάλαση, καθώς και ενεργοποιώντας την Na^+ / K^+ ATPase με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και αναστολή της εισόδου Ca^{2+} μέσω των τασηοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου (VDCs).

SUMMARY

Insulin is the principal hormone controlling blood glucose. Apart from the above well-known insulin's actions many recent studies have shown that insulin inhibits agonist-induced contraction of vascular smooth muscle. Since many studies concerning lung as an alternative route for insulin administration in patients with diabetes mellitus have been made, it has been necessary to see what insulin action on airways smooth muscles is.

In this project, insulin's action on trachea's smooth muscle contraction evoked from a solution containing either 80mM KCl or 10^{-5} M Ach was studied in vitro.

Portions of tracheas were obtained from rabbits that have been previously anaesthetized with Pentothal. Muscle strip (2-3mm width) taken from the trachea was put in a bathing chamber that was continuously perfused with Krebs solution, which was gassed with 95%O₂ and 5% CO₂. One edge of the strip was fixed while the other was connected to a transducer and an oscillograph recorded the muscle contraction. First it was studied the effect of insulin (10^{-9} - 10^{-5} M) on contraction induced by 80mM KCl. Then it was studied the effect of insulin (10^{-10} - 10^{-5} M) on contractions induced by 10^{-5} M Ach before and after epithelium removal and finally in the presence of 10^{-4} M N^o -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor.

Insulin evoked a concentration-dependent inhibition of tracheal smooth muscle contraction, induced by 80mM KCl, which was higher when 10^{-5} M Ach was used as a precontracted agent. The additional use of insulin (10^{-5} M) for KCl contraction induced a relaxation of 8.3% of the initial contraction whereas for 10^{-5} M Ach contraction insulin induced a relaxation of 18.5% of the initial contraction. After epithelium removal, insulin (10^{-8} , 10^{-7} M) evoked statistically significant increase ($p<0.05$) in the

contractions induced by 10^{-5} M Ach compared to the contraction induced by 10^{-5} M Ach and insulin in the presence of epithelium. This increase was higher when 10^{-4} M L-NAME was added to the bath and statistically significant for insulin concentrations of 10^{-10} M, 10^{-6} M ($p<0.05$), 10^{-8} M and 10^{-7} M ($p=0.01$).

It is seemed that insulin inhibits tracheal smooth muscle contraction by acting on epithelium and releasing NO which causes smooth muscle relaxation and by stimulating Na^+ , K^+ - ATPase which leads to hyperpolarization of the cell membrane thereby decreasing Ca^{2+} influx via VDC_s .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davis SN, Granner DK. Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. In Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 9th Ed. Mc Graw-Hill, International Edition, 1996.
2. Patton JC, Bukar J, Nagarajan S. Inhaled insulin. Adv Drug Deliv Rev 1999;35:235-247.
3. Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T. Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. Hypertension 1993;22:735-742.
4. Han SZ, Ouchi Y, Karaki H, Orimo H. Inhibitory effects of insulin on cytosolic Ca²⁺ level and contraction in rat aorta. Endothelium-Dependent and -Independent mechanisms. Circ Res 1995;77:673-678.
5. Bliss M. Η ανακάλυψη της ινσουλίνης. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1995.
6. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. Can Med Assoc J 1991;145(10):1281-1286.
7. Banting FG, Best CH. Pancreatic extracts. J Lab Clin Med 1990;115(2):254-262.
8. Shoelson SE, Halban PA. Insulin biosynthesis and chemistry. In Joslin's Diabetes Mellitus, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
9. Goth A. Ινσουλίνη, γλυκαγόνη και από του στόματος υπογλυκαιμικά φάρμακα. Ιατρική Φαρμακολογία, 10^η Έκδοση. Λίτσας, Αθήνα, 1987.
10. Guyton AG. Η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ιατρική Φυσιολογία, 8^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, 1992.

11. White MF, Kahn RC. The insulin signaling system (Minireview). *J Biol Chem* 1994;269(1):1-4.
12. Kahn RC, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 1988;82:1151-1156.
13. White MF, Kahn RC. Molecular aspects of insulin action. In *Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
14. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: Diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction and the glucose transport effector system. *Am J Med* 1998;105:331-345.
15. Manganiello VC, Blizotes MM, Moss J, Vaughan M. Receptors and signal transduction. In *The Lung: Scientific Foundations*, 2nd Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
16. Bennett PH. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and impaired glucose intolerance. In *Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
17. Warran JH, Rich SS, Krelewski AS. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In *Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
18. Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO study group. WHO, Geneva, 1994.
19. Trevisan R, Vedovato, Tiengo A. The epidemiology of diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(suppl 8):2-5.
20. Songini M. Incidence of IDDM in Southern Europe. *Diabetologia* 1995;38(12):1491-1492.
21. Bartsocas CS. The Greek contribution to diabetes research. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15(5):362-372.

22. Akazawa Y. Prevalence and incidence of diabetes mellitus by WHO criteria. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;24(suppl):S23-S27.
23. Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Tajima N. Epidemiology of type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese children. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;24(suppl):S7-S13.
24. Heine RJ. Diabetes in next century: challenges and opportunities. *Neth J Med* 1999;55(6):265-270.
25. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. *Diab Med* 1997;14(suppl 5):S7-S85.
26. Γερμενής ΑΕ. Αυτοανοσία. Ιατρική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2000.
27. Landin-Olsson M, Palmer JC, Lernmark A, Blom L, Sundkvist G, Nystrom L, Dahlquist G. Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia* 1992;35:1068-1073.
28. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlsen AE, Sundkvist G, Dahlquist G, Palmer JC, Lernmark A. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish. *J Clin Invest* 1995;95:1505-1511.
29. Yamamoto AM, Deschamps I, Garchon HJ, Roussely H, Moreau N, Beaurain G, Robert JJ, Bach JF. Young age and HLA markers enhance the risk of progression to type 1 diabetes in antibody-positive siblings of diabetic children. *J Autoimmunity* 1999;11:643-650.

30. Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, Desilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer J. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 β predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmunity* 1999;12:279-287.
31. Rosenzweig JL. Principles of insulin therapy. In *In Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
32. Chetty DJ, Chien YW. Novel methods of insulin delivery: an update. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(6):629-670.
33. Aungst BJ, Rogers NJ, Shefter E. Comparison of nasal, rectal, buccal, sublingual and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244(1):23-27.
34. Earle MP. Experimental use of oral insulin. *Israel J Med Sci* 1992;8:899-900.
35. Moses AC, Gough D. Alternative approaches to insulin therapy and recent advances in implantable glucose sensors. In *In Joslin's Diabetes Mellitus*, 13th Ed. Lea & Febiger, 1994.
36. Golomb G, Avramoff A, Hoffman A. A new route of drug administration: intrauterine delivery of insulin and calcitonin. *Pharm Res* 1993;10(6):828-833.
37. Meyers BR, Katzeff HL, Eschbach JC, Trimmer J, Zacharias SB, Rosen S, Sibalis D. Transdermal delivery of human insulin to albino rabbits using electrical current. *Am J Med Sci* 1989;297(5):321-325.
38. Monti LD, Piatti PM, Home PD, Tomson C, Alberti KG. The effect of intraperitoneal insulin delivery on carbohydrate metabolism in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1992;15(3):237-244.

39. Dunn FL, Nathan DM, Scavini M, Selam JL, Wingrove TG. Long-term therapy of IDDM with an implantable insulin pump. The insulin pump trial study group. *Diabetes Care* 1997;20(1):59-63.
40. Kaufman FR, Halvorson M, Miller D, Mackenzie M, Fisher LK, Pitukcheewanont P. Insulin pump therapy in type 1 pediatric patients: now and into the year 2000. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15(5):338-352.
41. Yamamoto A, Luo AM, Dobba-Kashi S, Lee VH. The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;249(1):249-255.
42. Pillion DJ, Atchison JA, Stott J, McCracken D, Gargiulo C, Meezan E. Efficacy of insulin eyedrops. *J Ocul Pharmacol* 1994;10(2):461-470.
43. Salzman R, Manson JE, Griffing GT, Kimmerle R, Ruderman N, McCall A, Stoltz EI, Mullin C, Small D, Armstrong J, Melby JC. Intranasal aerosolized insulin. Mixed-meal studies and long-term use in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 1985;312(17):1078-1084.
44. Hilsted J, Madsbad S, Hvidberg A, Rasmussen MH, Krarup T, Ipsen H, Hansen B, Pedersen M, Djurup R, Oxenboll. Intranasal insulin therapy: the clinical realities. *Diabetologia* 1995;38:680-684.
45. Elliott Rb, Edgar BW, Pilcher CC, Quested C, McMaster J. Parenteral absorption of insulin from the lung in diabetic children. *Aust Paediatr J*;23(5):293-297.
46. Laube BL, Georgopoulos A, Adams GK. Preliminary study of the efficacy of insulin aerosol delivered by oral inhalation in diabetic patients. *JAMA* 1993;269(16):2106-2109.
47. Colthorpe P, Farr SJ, Taylor G, Smith IJ, Wyatt D. The pharmacokinetics of pulmonary-delivered insulin: A comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharmac Res* 1992;9(6):764-768.

48. Jendle JH, Karlberg BE. Effects of intrapulmonary insulin in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:555-561.
49. Laube BL, Benedict GW, Dobs AS. The lung as an alternative route of delivery for insulin in controlling postprandial glucose levels in patients with diabetes. *CHEST* 1998;114:1734-1739.
50. Τρακατέλλης Α. Γλυκογονόλυση, γλυκογονογένεση, γλυκόζη αίματος. Βιοχημεία, 2^η Έκδοση. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1987.
51. Σαββας Α. Αναπνευστικό σύστημα. Επίτομη ανατομική του ανθρώπου και άτλας, 4^η Έκδοση. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1989.
52. Μιχαήλ Σ.Γ. Ιστολογία, 2^η Έκδοση. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 1991.
53. Κεραμέως-Φόρογλου Χ. Ιστολογία-Εμβρυολογία του ανθρώπου. Θεσσαλονίκη, 1987.
54. Weiss L. The respiratory system. In *Cell and Tissue Biology*, 6th Ed. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 1988.
55. Guyton A. Η συστολή και η διέγερση των λείων μυών. *Ιατρική Φυσιολογία*, 8^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, 1992.
56. Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature* 1988;333:129-134.
57. Hakonarsan H, Grunstein M. Regulation of second messenger associated with airway smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S115-S122.
58. Μολυβδάς ΠΑ. Η σύζευξη της διέγερσης με τη συστολή στις λείες μυϊκές ίνες. Σειρά Μαθημάτων Φυσιολογίας.

59. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano KI, Harada KI, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997;49(2):157-230.
60. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993;361(6410):315-325.
61. Rodger I. Voltage-dependent and Receptor-operated calcium channels. In *Airways smooth muscle: Peptide, receptor, ion channels and signal transduction*. Edited by D.Raeburn and M.Giembycz, Birkhauser Verlag, Basel,1995.
62. Small R, Foster R. Electrophysiology of calcium channels in airways smooth muscle. In *Airways smooth muscle: Development and regulation of contractility*. Edited by D.Raeburn and M.Giembycz, Birkhauser Verlag, Basel,1994.
63. Guyton A. Η μεταφορά των ιόντων μέσα από την κυτταρική μεμβράνη. *Ιατρική Φυσιολογία*, 8^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, 1992.
64. Μολυβδάς ΠΑ. Βιοφυσική διεγέρσιμων κυττάρων Ι. Σειρά Μαθημάτων Φυσιολογίας.
65. Nielsen-Kudsk JE. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. *Dan Med Bull* 1996;43(5):429-447.
66. Johnson M. The β -adrenoreceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S146-S153.
67. Barnes PJ. Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S123-S132.
68. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylholine. *Nature* 1980;288(5789):373-376.

69. Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μολυβδάς ΠΑ. Μηχανισμοί σύσπασης λείων μυών αεραγωγών στο άσθμα. Πνεύμων 1998;11:89-93.
70. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-142.
71. Murlas C. Effects of mucosal removal on guinea-pig airway smooth muscle responsiveness. *Clin Sci* 1986;70(6):571-575.
72. Aizawa H, Miyazaki N, Shigematsu N, Tomooka M. A possible role of airway epithelium in modulating hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 1988;93(1):139-145.
73. Knight DA, Adcock JA, Phillips MJ, Thompson PJ. The effect of epithelium removal on human bronchial smooth muscle responsiveness to acetylcholine and histamine. *Pulm Pharmacol* 1990;3(4):198-202.
74. Gao Y, Vanhoutte PM. Attenuation of contractions to acetylcholine in canine bronchi by an endogenous nitric oxide-like substance. *Br J Pharmacol* 1993;109:887-891.
75. Johansson Rydberg IG, Andersson RG, Grenegard M. Effects of nitric oxide-donor, GEA 3175, on guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 1997;329:175-180.
76. Ward JK, Barnes PJ, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in human trachea. *J Physiol* 1995;483(2):525-536.
77. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368(6474):850-853.
78. Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na^+/K^+ ATPase activity by nitric oxide: a cGmp-independent effect. *Am J Physiol* 1994;266(5Pt2):H2146-H2151.

79. Widdicombe GJ. Autonomic regulation.i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S171-S175.
80. Belvisi MG, Ward JK, Mitchell JA, Barnes PJ. Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995;329(1):97-110.
81. Altan VM, Ozturk Y, Yildizoglu-Ari N, Nebigil C, Lafci D, Ozcelikay AT. Insulin action on different smooth muscle preparations. *Gen Pharmacol* 1989;29(4):529-535.
82. Zemel MB, Johnson BA, Ambrozy SA. Insulin-stimulated vascular relaxaton. Role of Ca^{2+} ATPase. *Am J Hypertens* 1992;5(9):637-641.
83. Hasdai D, Rizza RA, Holmes DRJr, Richardson DM, Cohen P, Lerman A. Insulin and insulin-like growth factor-1 cause coronary vasorelaxation in vitro. *Hypertension* 1998;32(2):228-234.
84. Trovati M, Massucco P, Matiello L, Cavalot F, Mularoni E, Hahn A, Anfossi G. Insulin increases cyclic nucleotide content in human vascular smooth muscle cells: a mechanism potentially involved in insulin-induced modulation of vascular tone. *Diabetologia* 1995;38(8):936-941.
85. Bertuglia S, Colantuoni A. Insulin-induced arteriolar dilation after tyrosine kinase and nitric oxide synthase inhibition in hamster cheek pouch microcirculation. *J Vasc Res* 1998;35(4):250-256.
86. Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Song T. Protein kinase C mediates insulin-inhibited Ca^{2+} transport and contraction of vascular smooth muscle. *Am J Hypertens* 2000;13(4Pt1):383-388.
87. Begum N, Duddy N, Sandu O, Reinzie J, Ragolia L. Regulation of myosin-bound protein phosphatase by insulin in vascular smooth muscle cells: evaluation of the

- role of Rho kinase and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signalling pathways. *Mol Endocrinol* 2000;14(9):1365-1376.
88. Sandu OA, Ito M, Begum N. Selected contribution: Insulin utilizes NO/cGMP pathway to activate myosin phosphatase via Rho inhibition in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001;91(3):1475-1482.
89. Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na⁺ /K⁺ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 1995;269(92Pt1):C295-C311.
90. Rosic NK, Standaert ML, Pollet RJ. The mechanism of insulin stimulation of Na⁺ /K⁺ATPase transport activity in muscle. *J Biol Chem* 1985;260(10):6206-6212.
91. Tack CJJ, Lutterman JA, Vervoort G, Thien T, Smits P. Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilation in humans. *Hypertension* 1996;28:426-432.
92. Kahn AM, Song T. Insulin inhibits dog vascular smooth muscle contraction and lowers Ca²⁺ by inhibiting Ca²⁺ influx. *J Nutr* 1995;125(6 Suppl):S1732-S1737.
93. Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemel MB, Sowers JR. Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;88(4):1230-1236.
94. Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin inhibits serotonin-induced Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle. *Circulation* 1994;90:384-390.
95. Kahn AM, Lichtenberg RA, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin-stimulated glucose transport inhibits Ca²⁺ influx and contraction in vascular smooth muscle. *Circulation* 1995;92:1597-1603.
96. Scherrer U, Randin D, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994;94(6):2511-2515.

97. Schmetterer L, Muller M, Fasching P, Diepolder C, Gallenkamp A, Zanaschka G, Findl O, Strenn K, Mensik C, Tschernko e, Eichler HG, Wolzt M. Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. *Diabetes* 1997;46(11):1868-1874.
98. Kahn AM, Husid A, Odebunmi T, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin inhibits vascular smooth muscle contraction at a site distal to intracellular Ca²⁺ concentration. *Am J Physiol* 1998;274:E885-E892.
99. Kahn AM, Husid A, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase-dependent pathway. *Hypertension* 1997;30(4):928-933.
100. Gourgoulianis K, Iliodromitis Z, Hatziefthimiou A, Molyvdas PA. Epithelium-dependent regulation of airways smooth muscle function. A histamine-nitric oxide pathway. *Med Inflamm* 1998;7:409-411.
101. Casaco A. Is bronchial asthma a pancreatic disease? *Med Hypoth* 1995;44:516-518.
102. Vianna EO, Garcia-Leme J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:809-814.
103. Belmonte KE, Fryer AD, Costello RW. Role of insulin in antigen-induced airway eosinophilia and neuronal M₂ muscarinic receptor dysfunction. *J Appl Physiol* 1998;85(5):1708-1718.
104. Heinemann L, Traut T, Heise T. Time-action profile of inhaled insulin. *Diabetic Medicine*;199714:63-72.