

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
(IGF) ΣΤΗ ΔΙΑΚΙΝΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ
ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Διδακτορική Διατριβή του

Κουρίτα Βασιλείου του Κων/νου

ειδικευομένου ιατρού

ΛΑΡΙΣΑ 2008

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Βασίλειος
Επίθετο: Κουρίτας
Ημ/νία Γέννησης: 2 Σεπτεμβρίου 1977
Διεύθυνση Κατοικίας: Γιαννιτσών 18, Τρίκαλα, 42 100, Ελλάδα
Τηλ: 2431073977
E-mail: kouritas@otenet.gr, vasileios@doctors.org.uk

ΣΠΟΥΔΕΣ

1996-1997 Γενετική (School of Pure & Applied Biology)
Πανεπιστήμιο Ουαλίας, Cardiff, UK

1997-2003 Ιατρική Σχολή
Σχολή Επιστημών Υγείας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2004-σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΡΓΑΣΙΑ

2004-2005 Αγροτικός Ιατρός
Κέντρο Υγείας Παλαμά
Καρδίτσα

2005 Αποσπασμένος Ιατρός
Κλινική Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων
Πανεπιστημιακό Περιφεριακό Νοσοκομείο Λάρισας

2006 Senior House Officer (Hon)
Department of Spinal Surgery and Orthopaedics
The James Cook University Hospital
Middlesbrough, UK

2006-σήμερα Ειδικευόμενος Ιατρός Γενικής Χειρουργικής
Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική
Πανεπιστημιακό Περιφεριακό Νοσοκομείο Λάρισας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Foroulis CN, Gerogianni I, **KOURITAS VK**, Karetsi E, Klapsa D, Gourgoulisanis KI, Petinaki E. Direct detection of Clostridium Sordelii in pleural fluid of a patient with pneumonic empyema by a broad-range 16S rRNA PCR. Scand J Infect Dis 2007; 39: 617 – 619.
2. **KOURITAS VK**, Hatzoglou C, Foroulis CN, Hevas A, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Low glucose level and low pH alter the electrochemical function of human parietal pleura. Eur Respir J 2007; 30: 354 – 357.
3. Efthimiou M, **KOURITAS VK**, Fafoulakis F, Fotakakis K, Hatzitheofilou K. Primary omental torsion: report of two cases. Surg Today (In Press).

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. Μανωλάκης Ο, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**. Μηχανική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. 4^ο Επιστημονικό Συμπόσιο Ελληνικής Ορθοπαιδικής Εταιρείας, Βόλος, Ελλάς, 1997.
2. Μανωλάκης Ο, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**. Αρθροσκοπική αντιμετώπιση της χονδρομαλάκυνσης επιγονατίδας. 15^ο Σεμινάριο Ορθοπαιδικής και Τραύματος, Λάρισα, Ελλάς, 1999.
3. Φυτιλή Π, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Τσικλής Ν, Μαλίζος Κ. Τελευταίες απόψεις για την πόρωση των καταγμάτων. 15^ο Σεμινάριο Ορθοπαιδικής και Τραύματος, Λάρισα, Ελλάς, 1999.
4. Παστάκα Χ, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Μιτσιός Α, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Η λειτουργία του πνεύμονα στη βιομηχανία. Οι επιπτώσεις της εργασίας και του καπνίσματος. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, Ελλάς, 1999.
5. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Αγορογιάννης Ε, Σταραντζής Κ, Γεωργιάδου Ε, Σαμαρίνας Μ, Γουργουλιάνης ΚΙ. Τα αέρια αίματος στην οξεοβασική ισορροπία: από την παθοφυσιολογία στην παθολογία. Στρογγυλή Τράπεζα, 6^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, 2000.
6. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Σαμαρίνας Μ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Σύνδρομο απνοιών στον ύπνο: διάγνωση μέσω internet. 6^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, 2000.
7. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Βενουζίου Α, Τσίπα Β, Γουργούλια Σ, Γατσέλης Ν, Χατζοθεοφίλου Κ. Θωρακικό – Κοιλιακό τραύμα στον πολυτραυματία. 7^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Λάρισα, Ελλάς, 2001.
8. Lappas DA, Leonardou PA, Revenas K, Liasovitis V, Damilakos P, Bramis K, Leonardou AA, Kontos M, Bramis I, Leukides H, Kalampokas T, Pavlakis E, Ziori H, Pappa T, **KOURITAS VK**, Stavropoulos N, Liakopoulos D, Hadzizacharias N, Psaropoulou P. Vasculature variations of the large intestine – branches of the inferior mesenteric artery. 1st Interbalkan seminar on colorectal Cancer, Athens, Greece, 2001.
9. Lappas DA, Leonardou PA, Revenas K, Kotsiomitis E, Hadzikonstantinou K, Labadariou A, Goulas S, Manthios N, Hatzioakimides K, Klonaris H, Bramis I, Leukides H, Kalampokas T, Seremeti H, Pavlakis E, Ziori H, Pappa T, **KOURITAS VK**, Stavropoulos N, Spanaki F, Pazaiti A, Papoutsidakis N, Psaropoulou P. Variations of the Vermicular artery. 1st Interbalkan seminar on colorectal Cancer, Athens, Greece, 2001.

10. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Κουσίδης Γ, Κεραμάρης Ν, Πουλτσίδης Γ. Προπτυχιακή και μεταπτυχιακή εκπαίδευση στην Ελλάδα. 57^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάς, 2002.
11. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Ματαφιά Γ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Επίδραση της ινσουλίνης στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, Ελλάς, 2003.
12. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Ματαφιά Γ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Επίδραση της ινσουλίνης στις υπεζωκοτικές συλλογές μέσω διαύλων νατρίου και αντλιών νατρίου – καλίου. 30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάς, 2004.
13. Ματαφιά Γ, Χατζόγλου Χ, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Ταχεία επίδραση της αλδοστερόνης στη υπεζωκοτική συλλογή μέσω παραγωγής ΝΟ. 30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Ελλάς, 2004.
14. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Φορούλης ΧΝ, Ματαφιά Γ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Διαφοροποιήσεις της φυσιολογίας της υπεζωκοτικής κοιλότητας του προβάτου και του ανθρώπου: διαφοροποιήσεις των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των μεσοθηλιακών κυττάρων ή της λεμφικής απαγωγής; 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πάτρα, Ελλάς, 2004.
15. Ματαφιά Γ, Χατζόγλου Χ, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Ταχεία επίδραση της βαζοπρεσίνης στην ανάπτυξη υπεζωκοτικών συλλογών. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πάτρα, Ελλάς, 2004.
16. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Foroulis CN, Hatzoglou C, Matafia G, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Effect of insulin on Human parietal pleura through Na⁺ channels and Na⁺/K⁺ pumps. European Respiratory Symposium (ERS), Glasgow, Scotland, UK, 2004.
17. Matafia G, Hatzoglou C, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Rapid Effect of Aldosterone on pleural effusions thought NO production. European Respiratory Symposium (ERS), Glasgow, Scotland, UK, 2004.
18. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Foroulis CN, Hatzoglou C, Matafia G, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Variation of capability of human and sheep pleural mesothelial cells to transport Na⁺ and H₂O vs involvement of lymphatic drainage. European Respiratory Symposium (ERS), Copenhagen, Denmark, 2005.
19. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Foroulis CN, Hatzoglou C, Matafia G, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Variation of capability of human and sheep pleural mesothelial cells to recycle K⁺-Na⁺ and involvement of lymphatic drainage. European Respiratory Symposium (ERS), Copenhagen, Denmark, 2005.
20. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Hatzoglou C, Matafia G, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Physiology variations of sheep pleura: variation in capability of mesothelial cells to transport electrolytes as a response to insulin action. European Respiratory Symposium (ERS), Copenhagen, Denmark, 2005.
21. Matafia G, **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Hatzoglou C, Gourgoulisianis KI, Molyvdas PA. Rapid Actions of Vasopressin on sheep visceral and parietal pleura. European Respiratory Symposium (ERS), Copenhagen, Denmark, 2005.
22. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Φορούλης ΧΝ, Χέβας Α, Καλαφάτη Γ, Δεσιμόνας Ν, Ματαφιά Γ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Συγκριτική φυσιολογία πρόβειου και ανθρώπινου υπεζωκότα. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, 2005.

23. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Φορούλης ΧΝ, Χέβας Α, Καλαφάτη Γ, Δεσιμόνας Ν, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Ανθρώπινος μεσαυλιακός υπεζωκότας: ενεργή μεσοθηλιακή μεμβράνη ή απλή στηρικτική δομή; 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, 2005.
24. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Papastefanou SL, Kedzierski M, Marwah G, Greenough G. Blood use and products in simple and complex spinal surgery. National Audit Meeting, The James Cook University Hospital, Middlesbrough, UK, 2005.
25. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Φορούλης ΧΝ, Χέβας Α, Καλαφάτη Γ, Δεσιμόνας Ν, Τσιλιμίγκας Ν, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Πειραματική μελέτη επί των διαφορών της ηλεκτροχημικής λειτουργίας του ανθρώπινου υπεζωκότα ανάλογα με την εντόπιση στο ημιθωράκιο. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, 2006.
26. **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Hatzoglou C, Foroulis CN, Hevas A, Desimonas N, Kalafati G, Tsilimingas N, Gourgoulisanis ΚΙ, Molyvdas PA. Low glucose level alters the electrochemical function of human parietal pleura. European Respiratory Symposium (ERS), Stockholm, Sweden, 2007.

ΒΡΑΒΕΙΑ

2^ο βραβείο για: **ΚΟΥΡΙΤΑΣ ΒΚ**, Χατζόγλου Χ, Φορούλης ΧΝ, Ματαφιά Γ, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Διαφοροποιήσεις της φυσιολογίας της υπεζωκοτικής κοιλότητας του προβάτου και του ανθρώπου: διαφοροποιήσεις των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των μεσοθηλιακών κυττάρων ή της λεμφικής απαγωγής; 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Πάτρα, Ελλάς, 2004.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα 2004 – 2007.

Ευχαριστώ θερμά,

Τον Καθηγητή Φυσιολογίας Πασχάλη – Αδάμ Μολυβδά, για την επιστημονική βοήθεια, τις συμβουλές και τις πολυτιμότες παρατηρήσεις του

Τον Καθηγητή Πνευμονολογίας Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη ο οποίος πέραν της επιστημονικής βοήθειας και της διδασκαλίας του από τα φοιτητικά μου ακόμη χρόνια, επανακαθόρισε το στόχο ειδίκευσής μου και εμφύτευσε στέρεο το μικρόβιο της έρευνας στην επιστημονική μου αναζήτηση στο χώρο της ιατρικής

Τη Λέκτορα Φυσιολογίας Χατζόγλου Χρυσή για την αμέριστη επιστημονική αλλά και προσωπική υποστήριξη κατά την εκπόνηση, συγγραφή και παρουσίαση της διατριβής αυτής

Θερμότατα τον τεχνικό του εργαστηρίου και φίλο κ. Ιωάννη Μακαντάση για την εξαιρετη τεχνική υποστήριξη τόσο του set-up όσο και για την υποστήριξη στους υπολογιστές αλλά και σε προσωπικό επίπεδο

Τους γονείς μου, που συνεκπόνησαν αυτή τη διατριβή μαζί μου σε προσωπικό επίπεδο με την αμέριστη συμπαράστασή τους

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ – ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ

Λέκτορας Φυσιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ – ΑΛΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΧΑΤΖΗΘΕΟΦΙΛΟΥ

Καθηγητής Χειρουργικής

ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Φαρμακολογίας

ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΝΑΝΟΥ – ΤΖΕΛΑΚΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΤΣΙΛΙΜΙΓΚΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων

ΧΡΥΣΗ ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ

Λέκτορας Φυσιολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η υπεζωκοτική συλλογή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εκδηλώσεις νόσων του αναπνευστικού συστήματος. Η διαταραχή στην ισορροπία της παραγωγής και της απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού οδηγούν σε παθοφυσιολογικές διαταραχές που τελικό αποτέλεσμα έχουν τη συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τελευταία η προηγούμενη θεώρηση της απλής παθητικής ανακύκλωσης του υπεζωκοτικού υγρού που προκύπτει από τη διαφορά στη σύστασή του με το διάμεσο υγρό έχει μεταβληθεί, εμπεριέχοντας στο όλο σύστημα την ενεργητική μετακίνηση υγρού και ηλεκτρολυτών. Με τον τρόπο αυτό και η διαφορετική σύσταση του υπεζωκοτικού υγρού σε σχέση με το αίμα αλλά και το διάμεσο υγρό σε κανονικές συνθήκες μπορεί να εξηγηθεί αλλά και η σύστασή του σε διάφορες νοσογόνους οντότητες. Ακόμη, με γνώμονα την ικανότητα του μεσοθηλίου να εμφανίζει μεταβολική δραστηριότητα καθώς και διεργασίες ενεργητικής μεταφοράς καθίσταται ως πεδίο δράσης ουσιών που μεταβάλλουν τη λειτουργία του οργανισμού και επομένως και τη λειτουργία του υπεζωκότα, όπως επί παραδείγματι οι ορμόνες.

Με τη γνώση της άμεσης επίδρασης των ορμονών στον υπεζωκότα θα καταστεί δυνατή η εξήγηση μορφών υπεζωκοτικών συλλογών που εμφανίζουν ιδιαίτερα βιοχημικά χαρακτηριστικά αλλά επίσης θα γίνει και κατανοητή η διασυστηματική δράση των ορμονών με τις διάφορες εκφάνσεις τους που σήμερα δεν έχει ακόμη γίνει κατανοητή ή πλήρως αποσαφηνισμένη. Με τον τρόπο αυτό θα δοθούν νέες κατευθύνσεις στην έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση νόσων που χαρακτηρίζονται από ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Σελίδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΑΝΑΤΟΜΙΑ.....	6
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ.....	7
ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ.....	11
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	13
Αναδρομή έρευνας φυσιολογίας.....	13
Θεωρίες περί παραγωγής και ομοιόστασης υπεζ. υγρού.....	15
Ο ρόλος των πιέσεων.....	17
Αντιφατικά πειραματικά δεδομένα.....	23
Ενεργητική μεταφορά από το μεσοθήλιο.....	24
Ο ρόλος των λεμφαγγείων.....	26
Άλλη οδός αποχέτευσης.....	28
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	29
Υπεζωκοτική κοιλότητα.....	29
Υπεζωκοτικό υγρό.....	30
Υαλουρονικό οξύ.....	31
Υπεζωκοτικές συλλογές.....	32
ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ – ΧΑΜΗΛΗ ΓΛΥΚΟΖΗ.....	36
Παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές.....	36
Κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές.....	37
Υπεζωκοτικές συλλογές σε συστηματικά νοσήματα.....	41
Ρευματοειδής αρθρίτις.....	41

Ερυθματώδης λύκος.....	41
Σακχαρώδης διαβήτης.....	42
ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	44
Γενικές έννοιες.....	44
Διάχυση.....	45
Ενεργητική μεταφορά.....	45
Μεταφορά διαμέσου επιθηλίων.....	46
ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	48
Μέθοδος Ussing.....	48
ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ.....	52
Αμιλορίδη.....	52
Ουαμπαΐνη.....	53
Μονοξείδιο του αζώτου.....	53
Γλιβενκλαμίδη.....	54
Ινσουλίνη.....	56
Γενικές έννοιες.....	56
Επίδραση ινσουλίνης στα επιθήλια.....	59
Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων (IGF – 1).....	62
Γενικές έννοιες.....	62
Επίδραση IGF – 1 στη μετακίνηση ηλεκτρολυτών.....	63

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	67
ΜΕΡΟΣ Α: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑ ΠΡΟΒΑΤΑ.....	67
Συλλογή και προετοιμασία ιστού.....	67

Πειραματική διαδικασία.....	68
Πειράματα με ινσουλίνη.....	71
Πειράματα με IGF – 1.....	73
Στατιστική ανάλυση.....	74
ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΙΣΤΟ.....	74
Συλλογή και προετοιμασία ιστού.....	74
Πειραματική διαδικασία.....	75
Πειράματα με ινσουλίνη.....	75
Πειράματα με IGF – 1.....	75
Στατιστική ανάλυση.....	75
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
Αποτελέσματα πειραμάτων ινσουλίνης.....	76
Μέρος 1 ^ο : Πρόβειος ιστός.....	76
Μέρος 2 ^ο : Ανθρώπινος ιστός.....	101
Αποτελέσματα πειραμάτων IGF – 1.....	109
Μέρος 1 ^ο : Πρόβειος ιστός.....	109
Μέρος 2 ^ο : Ανθρώπινος ιστός.....	113
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	114
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	142
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	144
SUMMARY.....	145
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	146

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τελευταία, σύγχρονες μελέτες έχουν οδηγήσει τις έρευνες της αποσαφήνισης των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού και τη φυσιολογία του υπεζωκότα γενικότερα, σε νέες θεωρήσεις του όλου συστήματος. Έτσι, η από χρόνια καθιερωμένη αντίληψη ότι η πορεία του υπεζωκοτικού υγρού ακολουθεί την οδό παραγωγής από τον τοιχωματικό υπεζωκότα λόγω υψηλών πιέσεων προς τον σπλαχνικό υπεζωκότα λόγω χαμηλών πιέσεων φαίνεται ότι δέχεται κριτική. Από τη μία μελετητές που θέτουν τις έννοιες της διαβάθμισης της πίεσης στην υπεζωκοτική κοιλότητα που εξαρτάται και από τις κινήσεις που επισυμβαίνουν στον θωρακικό κλωβό λόγω των καρδιακών και εισπνευστικών κινήσεων αλλά και την εξέλιξη των παρατηρήσεων σε διάφορα θηλαστικά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα όπου συμμετέχουν στην προσφορά υπεζωκοτικού υγρού και οι βρογχικές αρτηρίες. Ακόμη, πολύ σημαντική και ελκυστική τελευταία εμφανίζεται η θεωρία της αποχέτευσης του υπεζωκοτικού υγρού από ανοίγματα στο τοιχωματικό μεσοθήλιο που επικοινωνούν απευθείας με το υπούπεζωκοτικό λεμφαγγειακό δίκτυο, τα στόματα.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια περισσότερες ενδείξεις έρχονται να ενισχύσουν άλλον έναν παράγοντα που εν δυνάμει επηρεάζεται στο σκηνικό της φυσιολογίας του υπεζωκότα και που μέχρι τώρα δεν σχολιαζόταν. Πρόκειται για τα ίδια τα μεσοθηλιακά κύτταρα που από απλό επικάλυμμα του κλωβού ή του πνεύμονα φαίνεται ότι εξελίσσονται σε ενεργητικά κύτταρα, με πολυάριθμες διεργασίες και ιδιαίτερες ικανότητες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού και επομένως στην κύρια φυσιολογική δραστηριότητα που εκτελείεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Με αυτές τους τις ιδιότητες τα

μεσοθηλιακά κύτταρα εφοδιάζουν τον υπεζωκότα με ικανότητα ενεργητικής μετακίνησης ηλεκτρολυτών άρα και νερού με πρώιμες ενδείξεις αυτών τη συμμεταφορά ιόντων $\text{Na}^+ - \text{Cl}^- / \text{Na}^+ - \text{H}^+$ και $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ και τη δράση αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ στην αντίθετη επιφάνεια του υπεζωκότα. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν ακόμη τη δημιουργία διαφοράς δυναμικού μεταξύ της τραχείας και πνευμονικών αγγείων αλλά και μεταξύ υπεζωκότα και πνευμονικών αγγείων, πιθανότατα λόγω ενεργητικής μεταφοράς Na^+ και Cl^- . Γενικότερα, επικρατεί η αντίληψη ότι τόσο ο πνευμονικός όσο και ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποτελούν εξαιρετικά διαπερατές μεμβράνες που επιτρέπουν την ελεύθερη μετακίνηση υγρού και πρωτεϊνών. Εξαιρετικά σημαντικές είναι οι παρατηρήσεις σε απομονωμένους ιστούς θηλαστικών κατόπιν χρήσης αναστολέων ιοντικών μεταφορέων και μελέτης των ηλεκτροφυσιολογικών μεταβολών που επέρχονται στους ιστούς αυτούς με τις οποίες αποκτήθηκαν βασικές πληροφορίες για την ικανότητα του μεσοθηλίου να μετακινεί ενεργητικά ηλεκτρολύτες. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να εξηγήσουν τις εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές όπου η απλή μεταβολή των πιέσεων, που εξηγεί εν μέρει τις καλοήθειες διδρωματικές συλλογές, δεν μπορεί να το κάνει πλήρως.

Φυσικά, η εξήγηση της άμεσης βλάβης του μεσοθηλίου ή οι διαταραχές της φυσιολογίας του υπεζωκότα που προκαλούνται από τα παθολογικά κύτταρα ή από την κατάληψη του υπεζωκότα από τη νόσο αποτελεί μια εξήγηση που για πολλές δεκαετίες δίδει μια ρεαλιστική εξήγηση του θέματος. Ωστόσο, δεν εξηγείται τί είναι εκείνο που επιβαρύνει ακόμη περισσότερο μια μικρή υπεζωκοτική συλλογή, τί συμβαίνει στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει επίσημη κατάληψη του υπεζωκότα από τη νόσο και κυρίως γιατί σχηματίζονται εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές σε συστηματικά νοσήματα και μάλιστα γιατί αυτές να έχουν συγκεκριμένα κάθε φορά

χαρακτηριστικά που είναι σχεδόν παθογνωμονικά όπως επί παραδείγματι η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης σε καρκινικές υπεζωκοτικές συλλογές ή σε συλλογές που επιπλέκουν ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ακόμη, γιατί σχηματίζεται υπεζωκοτική συλλογή ως αποτέλεσμα ινσουλινοθεραπείας στα πλαίσια αγωγής διαβητικών ασθενών (insulin oedema syndrome). Πέραν των παραπάνω απλουστευμένων εξηγήσεων διάφοροι μεσολαβητές της φλεγμονής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πιθανώς να εμπλέκονται στο όλο σύστημα όπως οι TNF και IGF αλλά και άλλοι.

Από προηγούμενες μελέτες, διαφαίνεται ότι ο υπεζωκότας είναι ευαίσθητος σε διέγερση από διάφορους τέτοιους μεσολαβητές ή άλλες ουσίες όπως οι ορμόνες. Φαίνεται ότι οι ορμόνες μπορούν να ενεργοποιήσουν απευθείας τον υπεζωκότα μεταβάλλοντας την ικανότητά του να μετακινεί ηλεκτρολύτες και υγρό εντός και εκτός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Εάν αυτό είναι αληθές, τότε είναι πιθανό να εμπλέκονται διάφορες άλλες ουσίες που παράγονται τοπικά ή επιδρούν μέσω της κυκλοφορίας στην όλη παθογένεση υπεζωκοτικών συλλογών που επιπλέκουν για παράδειγμα συστηματικά νοσήματα και καρκίνους όπως προαναφέρθηκε.

Στο πλαίσιο λοιπόν αυτό, σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να διερευνήσει εάν η ινσουλίνη ως ο κύριος ρυθμιστής της γλυκόζης στον οργανισμό, μπορεί να ενεργοποιήσει τον υπεζωκότα, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε μεταβολή της ικανότητάς του να μετακινεί ηλεκτρολύτες και υγρό στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Ακόμη, σκοπός της μελέτης είναι η διευκρίνηση του εάν οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες (πιο συγκεκριμένα ο IGF – 1) που εμφανίζουν ομοιότητες με την ινσουλίνη αλλά ενοχοποιούνται για πλήστες δράσεις στην καρκινογένεση και μη, μπορούν να ενεργοποιήσουν με τον ίδιο τρόπο τον υπεζωκότα.

Για την επίτευξη των παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν: φυσιολογικές και παθολογικές συγκεντρώσεις ινσουλίνης και IGF – 1, αναστολείς κυτταρικών ιοντικών μεταφορέων όπως η αμιλορίδη (αναστολέας διαύλων νατρίου), η ουμπαΐνη (αναστολέας αντλιών νατρίου – καλίου), L-NAME (αναστολέας παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου) και η γλιβενκλαβίδη (σουλφονουρία, φάρμακο που χρησιμοποιείται στην θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη και αναστέλει τους διαύλους καλίου που απαιτούν τριφωσφορική αδενοσίνη - ATP). Ακόμη προσομοιώθηκαν υπεζωκοτικές συλλογές με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, χαμηλό pH, χαμηλό νάτριο, κάλιο ή ασβέστιο. Επίσης, έγινε σύγκριση σπλαχνικού με τον τοιχωματικό υπεζωκότα του προβάτου (από διαφορετικές ανατομικές περιοχές) αλλά και σύγκριση μεταξύ του τοιχωματικού υπεζωκότα του προβάτου και του ανθρώπου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γ Ε Ν Ι Κ Ε Σ Ε Ν Ν Ο Ι Ε Σ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Ο υπεζωκότας είναι ένας υμένας που καλύπτει – περιβάλλει τους πνεύμονες και τις μεσολόβιες σχισμές και καλείται *περισπλάχνιος – πνευμονικός υπεζωκότας*. Το πέταλο αυτό ανακάμπτει στις πύλες των πνευμόνων στο τοιχωματικό πέταλο του υπεζωκότα το οποίο επαλείφει εκ των έσω το θωρακικό κλωβό (*τοιχωματικός υπεζωκότας*). Έξω από τον τοιχωματικό υπεζωκότα υπάρχει ένα στρώμα από χαλαρό συνδετικό ιστό, η ενδοθωρακική περιτονία, και έτσι ο τοιχωματικός υπεζωκός μπορεί να διαχωρισθεί από τα υποκείμενα αρκετά εύκολα. Στις θέσεις του διαφράγματος ο τοιχωματικός υπεζωκότας αποτελεί τον διαφραγματικό υπεζωκότα, ενώ στις περιοχές του μεσοπνευμονίου τον μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα. Κατά την ανάκαμψη του πλευρικού προς το διαφραγματικό υπεζωκότα δημιουργείται το πλευροδιαφραγματικό κόλπωμα. Κατά την ανάκαμψη του πλευρικού υπεζωκότα προς το μεσοπνευμονικό υπεζωκότα σχηματίζεται προς τα εμπρός το στερνομεσοπνευμόνιο και προς τα πίσω το σπονδυλομεσοπνευμόνιο κόλπωμα. Στο άνω στόμιο του θώρακα από την ανάκαμψη του πλευρικού στο μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα σχηματίζεται ο θόλος του υπεζωκότα, που συγκρατείται στη θέση του με δεσμίδες συνδετικού ιστού που φέρονται στην εν τω βάθει τραχηλική περιτονία. Μεταξύ των δύο ημιθωρακίων σχηματίζεται το μεσοθωράκιο ή μεσοπνευμόνιο. Τα δύο ημιθωράκια έρχονται σε επαφή μόνο στην περιοχή πίσω από το άνω μισό του στέρνου.

Μεταξύ των δυο πετάλων του υπεζωκότα σχηματίζεται ένας σχισμοειδής χώρος, η *υπεζωκοτική κοιλότητα*, που υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει πάχος περίπου 18 – 20 μm . Αυτή η κοιλότητα περιέχει ορώδες υγρό, το *υπεζωκοτικό υγρό*, με το

οποίο υφυγραίνονται και απομακρύνονται οι επιφάνειες του υπεζωκότα και επιτρέπεται έτσι η ομαλή ολίσθηση των επιφανειών της μίας πάνω στην άλλη κατά τις κινήσεις της αναπνοής. Η ποσότητα του υγρού αυτού είναι της τάξης των 15 – 20 ml στον άνθρωπο. Η ποσότητα του υπεζωκότικου υγρού στο πρόβατο είναι περίπου 3,5 ml και για τα δυο ημιθωράκια.

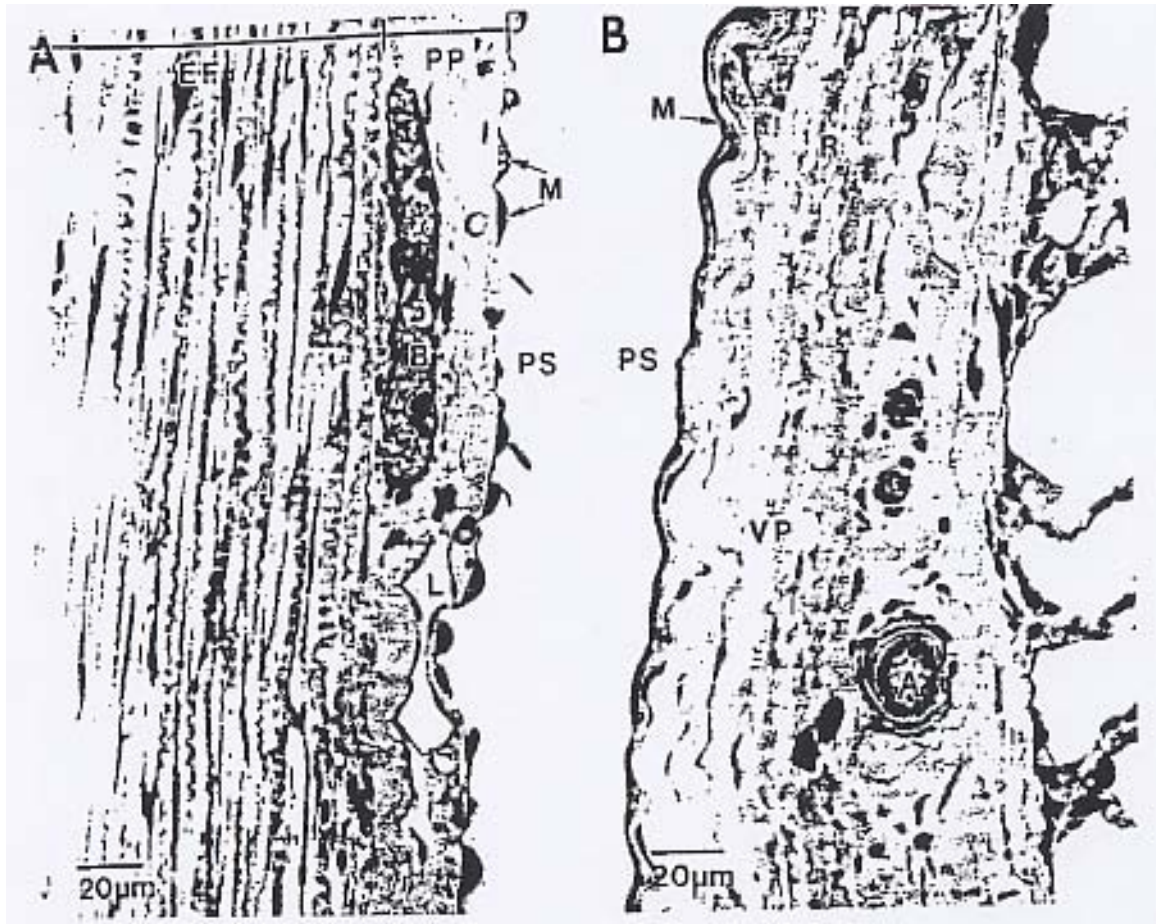
Η ολική επιφάνεια του υπεζωκότα ποικίλει ανάλογα με το σωματικό βάρος και μάλιστα κατά προσέγγιση ισούται με το σωματικό βάρος εις την $2/3$ ($\Sigma B^{2/3}$). Έτσι, ο σπλαχνικός υπεζωκότας θα μπορούσε να υπολογιστεί περί τα 4.000cm^2 σε έναν άνθρωπο 70 kg.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Αποτελείται από δύο στιβάδες: μια στιβάδα με κύτταρα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα και μια στιβάδα συνδετικού ιστού. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας βρίσκεται μεταξύ της υπεζωκοτικής κοιλότητας και της ενδοθωρακικής περιτονίας, ενώ τα όρια του πνευμονικού είναι η υπεζωκοτική κοιλότητα και οι πνευμονικές κυψελίδες (εικόνα 1).

Τα *μεσοθηλιακά κύτταρα* τοποθετούνται σε μονή στιβάδα κυττάρων και είναι κυβοειδή ή επίπεδα κύτταρα που κατά τόπους φέρουν μικρολάχνες με γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε υαλουρονικό οξύ. Τα επίπεδα κύτταρα είναι πιο άφθονα σε αριθμό και απαντώνται κυρίως πάνω από σταθερές δομές όπως πάνω από πλευρές, ενώ τα κυβοειδή κύτταρα είναι αριθμητικά λιγότερα και απαντώνται πάνω από πιο χαλαρές δομές όπως πνεύμονες ή μεσοπνευμόνιο. Μεταξύ των πλαϊνών κυττάρων υπάρχουν δεσμοσωμάτια (desmosomes), ενώ μικροπινοκυτικά μικροσωμάτια (micropinocytotic vessels) βρίσκονται άφθονα στο κυτταρόπλασμα των μεσοθηλιακών κυττάρων, τα οποία έχουν μεταβολικές λειτουργίες σύνθεσης ποικιλίας πρωτεϊνών. Τα

μεσοθηλιακά κύτταρα συνδέονται ακόμη και με στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions). Το πάχος της στοιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι εξαιρετικά λεπτό της τάξης των 2μm.[1]



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

Οι μικρολάχνες των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι διαφορετικές σε αριθμό και μήκος αναλόγως την τοποθεσία που βρίσκονται μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Γενικά, είναι περισσότερες και πυκνότερες στον πνευμονικό υπεζωκότα και στους κάτω λοβούς από τους άνω. Ακόμη πιο πολλές βρίσκονται στον διαφραγματικό υπεζωκότα, όπου όμως είναι μακρότερες. Εξίσου μεγάλος αριθμός μικρολαχμών παρατηρούνται και στον πλευρικό τοιχωματικό υπεζωκότα. Οι μικρολάχνες αυξάνουν κατά πολύ την επιφάνεια του υπεζωκότα και συμβάλλουν στην ελάττωση των τριβών μεταξύ των δυο πετάλων με τον γλυκοκάλυκα που φέρουν στη επιφάνειά τους.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται πάνω σε βασική μεμβράνη (basal lamina) η οποία περιέχει μια πυκνή στιβάδα 30 – 40 nm (lamina densa) και μια διαφανή στιβάδα 20 – 30 nm (lamina lucida) με τις οποίες διαχωρίζεται η κυτταρική μεμβράνη των μεσοθηλιακών κυττάρων (plasma membrane).

Ο συνδετικός ιστός πάνω στον οποίο διατάσσονται τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι χαλαρός συνδετικός ιστός το πάχος του οποίου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή: είναι μικρότερο και πιο ομοιογενές στις διάφορες περιοχές του τοιχωματικού υπεζωκότα σε σχέση με του πνευμονικού. Στους άνω και μέσους λοβούς το πάχος του συνδετικού ιστού εξομοιώνεται. Αντίστοιχα προς τις πλευρές και εκεί που ο μεσοπνευμόνιος υπεζωκότας εφάπτεται με το περικάρδιο αφθονούν οι κολλαγόνες ίνες, ενώ στο διαφραγματικό υπεζωκότα αφθονούν οι ελαστικές. Αυτές οι ίνες διατάσσονται με συγκεκριμένη κατεύθυνση και προσανατολισμό, ενώ είναι τοποθετημένα σε διάφορα στρώματα μέσα στην ενδιάμεση ουσία (interstitial matrix) η οποία εμπεριέχει: γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και νερό, τα οποία ρέουν ενδιάμεσα σε αυτά τα στρώματα των ινών ελεύθερα.[2-5] Η απόσταση των αγγείων από την υπεζωκοτική κοιλότητα είναι 10 – 12 μm ενώ κυμαίνεται μεταξύ 18 – 56 μm

στον πνευμονικό. Η απόσταση αυτή αυξάνεται από τους άνω προς τους κάτω λοβούς γιατί και το πάχος του υπεζωκότα στους κάτω λοβούς είναι μεγαλύτερο. Η αύξηση του πάχους οφείλεται στη στιβάδα κολλαγόνων και ελαστικών ινών μεταξύ της μικροκυκλοφορίας και του μεσοθηλίου. Το πάχος της στοιβάδας του συνδετικού ιστού είναι που καθορίζει το όλο πάχος του υπεζωκότα και μάλιστα αυξάνει με το μέγεθος του οργανισμού (από 7μm στο ποντίκι έως 30 – 40 μm στον άνθρωπο). Με βάση κάποιους ερευνητές,[6] το πάχος του σπλαχνικού υπεζωκότα χωρίζει τους οργανισμούς – θηλαστικά σε τρεις κατηγορίες: αυτά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα όπως το γουρούνι, το πρόβατο και η αγελάδα, με ενδιάμεσο πάχος όπως ο άνθρωπος και το άλογο και μικρό πάχος όπως το ποντίκι, ο σκύλος, η γάτα και το κουνέλι. Ο τοιχωματικός υπεζωκότας φαίνεται ότι εμφανίζει σταθερό πάχος.[7] Η κορυφαιο – βασική μεταβολή του πάχους του σπλαχνικού υπεζωκότα (πχ από 25μm στην κορυφή σε 85μm στο διάφραγμα των προβάτων) [8] φαίνεται ότι σχετίζεται με τις κινήσεις του πνεύμονα κατά την αναπνοή. Η διαφορά αυτή του πάχους του σπλαχνικού υπεζωκότα σχετίζεται και με την αιμάτωσή του.

Τα κυτταρολογικά, κυτταροχημικά και δομικά συστατικά των μεσοθηλιακών κυττάρων φαίνεται ότι ομοιάζουν σε αρκετά είδη οργανισμών όπως στον άνθρωπο, στο πρόβατο, στο σκύλο κτλ [9-11] επαληθεύοντας τον ρόλο του μεσοθηλίου ως ολοκληρωμένη οντότητα.[11] Έτσι, εμφανίζουν ιδιότητες ενεργών κυττάρων και όχι απλών κυττάρων που περιβάλλουν την υπεζωκοτική κοιλότητα: εμφανίζουν ενζυματικές δραστηριότητες, συνθέτουν μακρομοριακές ενώσεις, διαθέτουν πολλά μικροοργανίδια, αντιδρούν σε καταστάσεις φλεγμονής κ.α. Πολύ σημαντική είναι και η ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων να μεταφέρουν ενεργητικά ουσίες.[13-19]

ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ

Ο τοιχωματικός υπεζωκότας αιματώνεται κυρίως από τις μεσοπλεύριες αρτηρίες αλλά και από την έσω θωρακική αρτηρία και τις μυοφρενικές αρτηρίες. Η απαγωγή του αίματος γίνεται προς τις μεσοπλεύριες και βρογχικές φλέβες. Ο πνευμονικός υπεζωκότας αιματώνεται αποκλειστικά από τις βρογχικές αρτηρίες ενώ το αίμα απάγεται από τις πνευμονικές φλέβες. Οι διαφορές στη ροή του αίματος δημιουργούν διαφορετική πίεση διήθησης μεταξύ των δυο πετάλων. Έτσι, η πίεση διήθησης του πνευμονικού υπεζωκότα είναι μικρότερη σε σχέση με τον τοιχωματικό, γιατί οι βρογχικές αρτηρίες που τροφοδοτούν τον πνευμονικό, εκβάλλουν σε πνευμονικά αγγεία χαμηλής πίεσης και όχι στις φλέβες της συστηματικής κυκλοφορίας. Φαίνεται ότι η παροχή αίματος σχετίζεται με το είδος των θηλαστικών. Έτσι, για τους οργανισμούς με παχύ και ενδιάμεσου πάχους σπλαχνικό υπεζωκότα εμφανίζουν και παροχή από τις βρογχικές αρτηρίες, κάτι που δε συμβαίνει με τους οργανισμούς με λεπτού πάχους σπλαχνικό υπεζωκότα.[8, 20, 21]

Η λεμφική απαγωγή του τοιχωματικού υπεζωκότα επιτυγχάνεται μέσω του λεμφικού δικτύου του θωρακικού κλωβού δηλαδή διαμέσου των μεσοπλεύριων, παραστερνικών, οπίσθιων μεσοπνευμονίων και διαφραγματικών λεμφαδένων. Για τον πνευμονικό υπεζωκότα η λεμφική αποχέτευση ακολουθεί την αποχέτευση της λέμφου των πνευμόνων: διαμέσου του πνευμονικού ιστού και του τοιχώματος των βρόγχων η λέμφος ρέει προς τους πυλαίους λεμφαδένες διαμέσου των επιφανειακών και των εν τω βάθει λεμφαγγείων. Ωστόσο για την υπεζωκοτική κοιλότητα υπάρχουν δυο διαφορετικά συστήματα λεμφικής αποχέτευσης με κύριο και πραγματικό αυτό του τοιχωματικού υπεζωκότα, αφού το λεμφικό αποχετευτικό δίκτυο του πνευμονικού υπεζωκότα δεν επικοινωνεί ευθέως με την υπεζωκοτική κοιλότητα, όπως συμβαίνει με το δίκτυο του τοιχωματικού υπεζωκότα. Το υπούπεζωκοτικό δίκτυο λεμφαγγείων

του τοιχωματικού υπεζωκότα συνδέεται άμεσα με την υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω ανοιγμάτων που καλούνται «στόματα»: τα στόματα έχουν σχήμα κυκλικό ή ωοειδές, μέγεθος περίπου 2 – 6 μm,[22] βρίσκονται κυρίως στο διαφραγματικό, πλευρικό και μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, ενώ επιτρέπουν τη διέλευση μεγαλομοριακών ενώσεων αλλά και κυττάρων, όπως μακροφάγα και ερυθροκύτταρα (εικόνα 2). Η πυκνότητα των στομάτων επίσης ποικίλει: 1 – 80 /mm² στα κουνέλια ενώ 1000 – 2000 /mm² στα πρόβατα.[22, 23] Δεν ανευρίσκονται στόματα στον σπλαχνικό υπεζωκότα.[1, 9] Από τον τοιχωματικό υπεζωκότα η λέμφος ρέει προς τον δεξιό θωρακικό πόρο.[24, 25]



Εικόνα 2: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου αναδεικνύεται ανοικτό στόμα (S). Ακόμη διακρίνεται προέκταση ενδοθηλιακού κυττάρου (EC). Γύρω από το στόμα διακρίνονται μεσοθηλιακά κύτταρα (MC) με τις μικρολάχνες τους.[26]

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η μικρή ποσότητα υγρού που υπάρχει στην υπεζωκοτική κοιλότητα έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας διότι η ποσότητά του αυξάνει ως αποτέλεσμα πολλών πνευμονικών και εξωπνευμονικών νοσημάτων αλλά και φυσιολογικών διεργασιών όπως η εγκυμοσύνη, η συσσώρευσή του μπορεί να διαγνωσθεί κλινικά και να εξετασθεί βιοχημικά και με τον τρόπο αυτό να επιτευχθεί διάγνωση σε μεγάλο αριθμό ασθενών. Παρόλα αυτά υπάρχουν πολλά ερωτήματα και διαφωνίες ως προς τη σημασία της φυσιολογίας του υπεζωκοτικού αυτού υγρού αλλά και των δυνάμεων που επιδρούν στην παραγωγή και στην απομάκρυνσή του.

Δύο αντίθετες δυνάμεις επιδρούν στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η μια προέρχεται από το θωρακικό κλωβό και η άλλη από τους πνεύμονες. Έτσι, επιδρούν συνεχώς στην υπεζωκοτική κοιλότητα η συστηματική και η πνευμονική κυκλοφορία, η λεμφική κάθαρση με τη συμμετοχή των μηχανικών ιδιοτήτων του θωρακικού κλωβού και της λειτουργίας της καρδιάς. Με την αρμονική συνεργασία όλων αυτών των παραγόντων και δυνάμεων επιτυγχάνεται η μετακίνηση των δύο πετάλων του υπεζωκότα μεταξύ τους άρα και του πνεύμονα πάνω στο θωρακικό τοίχωμα με τη μικρότερη δυνατή ύπαρξη υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Αναδρομή έρευνας φυσιολογίας

Ο Von Recklinghausen, το 1863, ήταν ο πρώτος που ανέφερε την επαναρρόφηση συγκεκριμένων ουσιών από την περιτοναϊκή κοιλότητα. Επεσήμανε την επικοινωνία της περιτοναϊκής κοιλότητας με τους υποορογόνιους λεμφαδένες διαμέσου ανοιγμάτων που απαντώνται στην υποδιαφραγματική περιοχή. Τα ανοίγματα αυτά τα ονόμασε 'στίγματα' και 'στόματα' και τα ανέφερε ως την κύρια δίοδο ροής ουσιών από την ορογόνο κοιλότητα προς τα λεμφαγγεία. Το 1866 ο

Dybkowski περιέγραψε την απορρόφηση ουσιών από την υπεζωκοτική κοιλότητα σε κουνέλια και σκύλους, πρότεινε την ύπαρξη στομάτων στις πλευρικές περιοχές του τοιχωματικού υπεζωκότα και υποστήριξε τη μετακίνηση ουσιών μέσω αυτών με τη βοήθεια των αναπνευστικών κινήσεων. Η γενικότερη και πιο παραδεκτή θεωρία της εποχής ήτανε ότι οι ορογόνες κοιλότητες αποτελούσαν προέκταση του λεμφικού συστήματος και ότι η απορρόφηση υγρών και ουσιών γινόταν απαραίτητα από τα λεμφαγγεία.[27] Το 1894, οι Starling και Tubby εξέτασαν το ρυθμό απορρόφησης χρωστικών ουσιών από την υπεζωκοτική και περιτοναϊκή κοιλότητα σε αναισθητοποιημένα σκυλιά όπου οι χρωστικές ουσίες εμφανίζονταν γρηγορότερα στα ούρα από ότι στη λέμφο του θωρακικού πόρου κάτι που θεωρήθηκε ως απόδειξη άμεσης απορρόφησης χρωστικών ουσιών από τα αιμοφόρα αγγεία. Το 1895, οι Leathes και Starling προκάλεσαν υπεζωκοτικές συλλογές με ισοτονικά διαλύματα σε σκύλους και βρήκανε ότι ο ρυθμός απορρόφησης ήταν αργός και ομοιόμορφος περίπου 5 ml/ώρα.[27] Έτσι στη συνέχεια, η επικρατούσα άποψη περί της ανακύκλωσης του υπεζωκοτικού υγρού θεωρούσε ότι αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των αιμοφόρων αγγείων και σε μικρότερο σκοπό από τα λεμφαγγεία. Αρκετά χρόνια πέρασαν μέχρι η ισχύουσα αυτή θεωρία να επανεξετασθεί το 1949 από τους Courtice και Simmonds, οι οποίοι μελέτησαν το ρυθμό απορρόφησης χλωριούχου νατρίου 0.9% και ομόλογου πλάσματος ραδιοσημασμένου με την κυανή χρωστική T-1824 από την υπεζωκοτική κοιλότητα αναισθητοποιημένων και μη κουνελιών. Όταν ενίονταν 6ml/kg βάρους σώματος ορού ή πλάσματος αυτά απορροφούνταν πλήρως σε 24 ώρες. Η αναισθησία προκαλούσε μείωση του ρυθμού απορρόφησης και η ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη απορροφούνταν σχεδόν πλήρως από την λεμφική οδό, διαμέσω κυρίως του αριστερού λεμφικού πόρου. Παρατήρησαν επίσης ότι η αύξηση του αερισμού στα αναισθητοποιημένα πειραματόζωα προκαλούσε και αύξηση του

ρυθμού απορρόφησης των πρωτεϊνών.[27] Το 1924 ο Krogh παρατήρησε ότι η κολλοειδωσμοτική πίεση του πλάσματος στα τριχοειδή είναι λίγο πιο υψηλή από την υδροστατική πίεση.[27] Σε αυτές τις παρατηρήσεις ο Von Neergaard, το 1927, στήριξε τη θεωρία περί μετακίνησης του υπεζωκοτικού υγρού βάσει διαφορών της κολλοειδωσμοτικής και της υδροστατικής πίεσης των αγγείων που τροφοδοτούν τον υπεζωκότα.

Οι απόψεις περί της παραγωγής και ομοιόστασης του υπεζωκοτικού υγρού

Οι Agostoni και συνεργάτες, το 1957, μέτρησαν την πίεση των τριχοειδών του πνευμονικού υπεζωκότα σε σκύλους. Βρέθηκε απορρόφηση υγρού από τις υπεζωκοτικές επιφάνειες των πνευμόνων με μια μέση πίεση 13mmHg περίπου, η οποία αντιστοιχούσε σε διαφορά κολλοειδωσμοτικής και υδροστατικής πίεσης των τριχοειδών της πνευμονικής κυκλοφορίας που τροφοδοτεί τον πνευμονικό υπεζωκότα. Για τον τοιχωματικό υπεζωκότα τέτοια πίεση απορρόφησης δεν ανευρέθη.[27] Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις εκφράζεται η υπόθεση ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες το υπεζωκοτικό υγρό παράγεται από τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα ενώ απάγεται από τα τριχοειδή του πνευμονικού υπεζωκότα. Ακόμη, ο βασικός μηχανισμός που φαίνεται να κρατάει τους πνεύμονες κοντά στο θωρακικό τοίχωμα συντηρείται από την πίεση απορρόφησης η οποία προέρχεται από τα τριχοειδή του πνευμονικού υπεζωκότα. Δηλαδή, ότι το υπεζωκοτικό υγρό βρίσκεται σε μια υδροστατική ισορροπία όπως συμβαίνει και στα τριχοειδή του αίματος και σημαίνει ότι το υπεζωκοτικό υγρό επαναρροφάται από την κυκλοφορία μέχρις ότου οι υδροστατικές και κολλοειδωσμοτικές πιέσεις μεταξύ του υπεζωκοτικού υγρού και της αιματικής κυκλοφορίας εξισορροπήσουν. Αυτή η απορροφητική δύναμη υπολογίστηκε περίπου σε $-11 \text{ cmH}_2\text{O}$, η οποία είναι πιο

αρνητική από την πίεση της πλευρικής επιφάνειας (περίπου $-6 \text{ cmH}_2\text{O}$ στο μέσο της υπεζωκοτικής κοιλότητας σε ήρεμη αναπνοή) και επομένως αναγκάζει τον πνεύμονα και το θωρακικό τοίχωμα να απωθούνται στα σημεία όπου τείνουν να συμπέσουν. Ο μηχανισμός αυτός είναι αυτορυθμιζόμενος, υπό την έννοια ότι όσο απορροφάται υγρό τα πέταλα του υπεζωκότα έρχονται σε επαφή σε πολλά σημεία. Σε αυτό το στάδιο οποιαδήποτε επαναρρόφηση υγρού είναι αντίθετη στις τοπικές δυνάμεις που παραμορφώνουν τα πέταλα του υπεζωκότα όταν έρχονται σε επαφή. Έτσι, επέρχεται δυναμική ισορροπία μεταξύ της πίεσης του υπεζωκοτικού υγρού και της πίεσης πλευρικής επιφάνειας που τείνει να παραμορφώσει τον υπεζωκότα άρα η είσοδος και έξοδος του υπεζωκοτικού υγρού πλέον ισορροπούν και επομένως αποτρέπεται περαιτέρω μείωση της ποσότητάς του και με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η κίνηση των δύο πετάλων του υπεζωκότα με το μικρότερο δυνατό όγκο υπεζωκοτικού υγρού. Σε όλη αυτή τη θεωρία, τα λεμφαγγεία φαίνεται να έχουν μικρό ρόλο, απομακρύνοντας ενδεχομένως την περίσσεια πρωτεϊνών από την υπεζωκοτική κοιλότητα. Προφανώς, δεν συμπεριελήφθηκε στη θεωρία αυτή το γεγονός της πιθανής πλήρους ή μερικής αιμάτωσης του πνευμονικού υπεζωκότα από τη συστηματική κυκλοφορία καθώς επίσης και την πιθανή απορροφητική λειτουργία του μεσοπνευμονίου ή η ικανότητα του μεσοθηλίου να συμμετέχει ενεργητικά στη απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού (active transportation). Παρά τα αναπάντητα ερωτήματα της θεωρίας του Agostoni και συνεργατών, δόθηκε πλήρης έμφαση στην ισορροπία μεταξύ των υδροστατικών και κολλοειδωσμοτικών δυνάμεων που δρουν στα μεσοθήλια.

Μια δεύτερη θεωρία με κύριους εκφραστές τους Lai – Fook και συνεργάτες εμφανίστηκε αργότερα, στις αρχές του 1990,[28-32] κατά την οποία η κύρια δύναμη που καθορίζει την είσοδο του υπεζωκοτικού υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα

αλλά και την ομοιοστασία του είναι η πίεση της πλευρικής επιφάνειας. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει μια κατακόρυφη μεταβολή της πίεσης πλευρικής επιφάνειας (η πίεση που εκτείνει τον πνεύμονα) η οποία σε κάθε ύψος είναι αντίθετη με την πίεση που εκτείνει το θωρακικό κλωβό και μεταφέρεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα υδραυλικά. Σε κάθε ύψος ισούται με την πίεση του υπεζωκοτικού υγρού. Αυτή η κατακόρυφη μεταβολή οδηγεί σε κατακόρυφη ιξώδη ροή του υπεζωκοτικού υγρού προς τη βάση της κοιλότητας με ταυτόχρονη απώλεια πίεσης από αυτή την ιξώδη κίνηση να εξισορροπεί πιθανές διαφορές μεταξύ της πίεσης επιφάνειας και υπεζωκοτικού υγρού. Με την αναπνοή και τις καρδιακές κινήσεις εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη πυκνότητα του υπεζωκοτικού υγρού με ανακατανομή του. Αυτή η θεωρία έχει βασικές διαφορές με αυτή που διατυπώθηκε από τους Agostoni και συνεργάτες στο ότι θεωρεί τη βάση της υπεζωκοτικής κοιλότητας ως την περιοχή όπου η απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού κυρίως επισυμβαίνει αλλά και στο γεγονός ότι λαμβάνει σοβαρά υπόψιν την συμμετοχή της αποχέτευσης του υπεζωκοτικού υγρού μέσω των στομάτων. Επίσης, με βάση τη θεωρία αυτή δεν είναι δυνατή η ύπαρξη περιοχών επαφής των πετάλων του υπεζωκότα.

Ο ρόλος των πιέσεων

Η θεωρία της ισορροπίας μεταξύ υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης, με κύριο εκφραστή τους Agostoni και συνεργάτες, επικράτησε όπως προαναφέρθηκε για αρκετά χρόνια, αλλά και στη σύγχρονη βιβλιογραφία φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό μηχανισμό παραγωγής, κυκλοφορίας και αποχέτευσης του υπεζωκοτικού υγρού. Βασίζεται στη βασική διατύπωση της εξίσωσης του Starling:

$$\text{Διαμεσοθηλιακή ροή υγρού (Jv)} = Lp \cdot S \cdot \Delta P \text{ (τοιχωματικός ή σπλαχνικός)}$$

όπου Lp = υδραυλική αγωγιμότητα (μέτρο διαπερατότητας νερού)

$S = \eta$ επιφάνεια του υπεζωκότα

$$\Delta P = \text{ολική διαφορά πιέσεων} = [(P_c - P_{liq}) - \sigma(\pi_{liq} - \pi_c)]$$

Τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία και έχουν, όπως όλα τα τριχοειδή, υδροστατική πίεση (P_c) 30 cm H₂O. Οι δυνάμεις ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων καθιστούν την ενδοθωρακική πίεση μικρότερη της ατμοσφαιρικής κατά το μεγαλύτερο μέρος της αναπνοής. Η ενδοθωρακική πίεση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η βαρύτητα και ο τύπος της αναπνοής. Η μέση τιμή είναι -5 cm H₂O. Επομένως, υπάρχει μια διαφορά πίεσης 35 cm H₂O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τα τριχοειδή του πνευμονικού υπεζωκότα προέρχονται κυρίως από την πνευμονική κυκλοφορία, με υδροστατική πίεση (P_c) 11 cm H₂O. Η διαφορά μεταξύ της υδροστατικής πίεσης του πνευμονικού υπεζωκότα και της πίεσης της υπεζωκοτικής κοιλότητας (P_{liq}), 16 cm H₂O, συντελεί στη ροή υγρού από τον πνευμονικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική κοιλότητα (Σχήμα 1). Η κολλοειδωσμοτική πίεση και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα (π_c) είναι 34 cm H₂O, ενώ μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα (π_{liq}) είναι μικρότερη, 8 cm H₂O, αφού μόνο μικρό ποσοστό μεγάλων μορίων μπορεί να διέλθει από το ενδοθήλιο των τριχοειδών και να μπει στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η ωσμωτική πίεση τείνει να συγκρατήσει υγρό εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Έτσι, η διαφορά πίεσης μεταξύ του τοιχωματικού υπεζωκότα και υπεζωκοτικής κοιλότητας έλκει υγρό από την κοιλότητα προς τον τοιχωματικό υπεζωκότα. Η ίδια διαφορά υπάρχει και μεταξύ πνευμονικού υπεζωκότα και υπεζωκοτικής κοιλότητας που έλκει υγρό από την κοιλότητα στον πνευμονικό υπεζωκότα. Τελικά υπάρχει μια διαφορά πιέσεων 9 cm H₂O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς την υπεζωκοτική







κοιλότητα και μια διαφορά 10 cm H₂O που ωθεί υγρό έξω από την κοιλότητα προς τον πνευμονικό υπεζωκότα (Σχήμα 1). Η ανατομική διαφορά ανάμεσα στα τριχοειδή του περισπλάχνιου και του τοιχωματικού πετάλου του υπεζωκότα είναι ο βασικός παράγοντας που δημιουργεί τη φυσική ροή του υγρού από τον τοιχωματικό στον πνευμονικό υπεζωκότα μέσω της υπεζωκοτικής κοιλότητας.

	ΤΟΙΧΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ	ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ
ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	30	-5	11
ΩΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	34	8	34
ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (cm H ₂ O)	9		10

Σχήμα 1: Υδροστατικές και ωσμωτικές πιέσεις στον τοιχωματικό, πνευμονικό υπεζωκότα και την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τελικά υπάρχει μια διαφορά πίεσης 9 cm H₂O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα και μια διαφορά 10 cm H₂O που το οδηγεί από την υπεζωκοτική κοιλότητα στον πνευμονικό υπεζωκότα.[33]

Αυτή η απλουστευμένη μελέτη της διακίνησης του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας

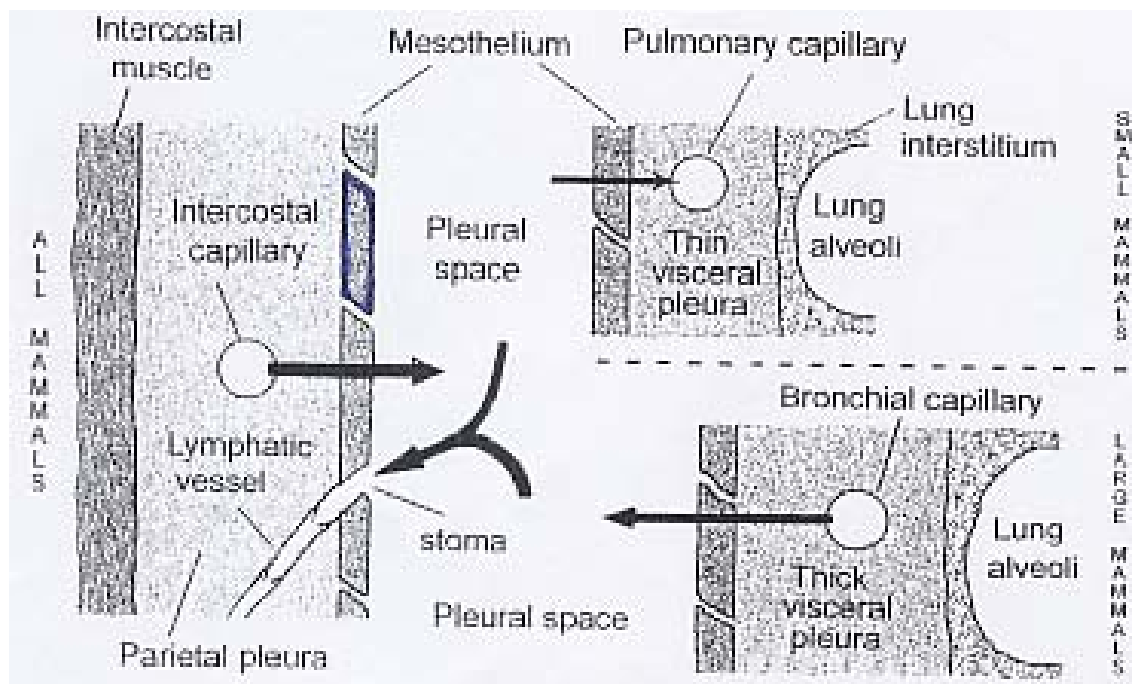
υπεζωκοτικής συλλογής σε αρκετά νοσήματα.[34, 35] Σήμερα, είναι γνωστό ότι ο πνευμονικός υπεζωκότας αιματώνεται πλήρως από τις βρογχικές αρτηρίες που προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία, κάτι που συμβαίνει για τα θηλαστικά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα όπως ο άνθρωπος. Επομένως, οι πιέσεις που διέπουν τη μετακίνηση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι διαφορετικές.[31, 36, 37]

	ΤΟΙΧΩΜΑΤΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ	ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ
ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	30	-5	24
		35	29
			
ΩΣΜΩΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ	34	8	34
		26	26
			
ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (cm H ₂ O)		9	3
			

Σχήμα 2: Υδροστατικές και ωσμωτικές πιέσεις στον τοιχωματικό, πνευμονικό υπεζωκότα και την υπεζωκοτική κοιλότητα. Τελικά υπάρχει μια διαφορά πίεσης 9 cm H₂O που οδηγεί υγρό από τον τοιχωματικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα και μια διαφορά 3 cm H₂O που το οδηγεί από τον πνευμονικό υπεζωκότα στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έτσι, τα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα παραμένουν η κύρια πηγή παραγωγής υπεζωκοτικού υγρού.[33]

Η υδροστατική πίεση στα τριχοειδή του τοιχωματικού υπεζωκότα είναι 30 cm H₂O και στην κοιλότητα -5. Αυτή η διαφορά προκαλεί πίεση 35 cm H₂O που τείνει να μεταφέρει υγρό από τα τριχοειδή προς την κοιλότητα. Η διαφορά όμως των

κολλοειδωσμοτικών πιέσεων είναι 26 cm H₂O και τείνει να μετακινήσει υγρό αντίθετα από τον υπεζωκότα προς τα τριχοειδή. Έτσι, η απόλυτη διαφορά υδροστατικής πίεσης (35 cm H₂O) και κολλοειδωσμοτικής πίεσης (26 cm H₂O) είναι 9 cm H₂O και επιβάλλει την κίνηση του υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα. Στον πνευμονικό υπεζωκότα η υδροστατική πίεση είναι στα τριχοειδή μικρότερη (24 cm H₂O) έτσι και η διαφορά υδροστατικών και κολλοειδωσμοτικών πιέσεων είναι μικρότερη (3 cm H₂O). (Σχήμα 2)



Εικόνα 3: Το υπεζωκοτικό υγρό προέρχεται από τον τοιχωματικό (*intercostals capillaries*) και τον πνευμονικό υπεζωκότα (*bronchial capillaries*) για τα θηλαστικά με παχύ σπλαχνικό υπεζωκότα (*large mammals*), ενώ η απαγωγή του υπεζωκοτικού υγρού επιταλείται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα μέσω των στομάτων (*stoma*). Για τα θηλαστικά με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα (*small mammals*) υπεζωκοτικό υγρό παράγεται και από τον σπλαχνικό υπεζωκότα (*pulmonary capillaries*).[38]

Επομένως, η κλασσική αντίληψη ότι το υγρό φυσιολογικά μετακινείται δια της υπεζωκοτικής κοιλότητας από τον τοιχωματικό υπεζωκότα λόγω υψηλών πιέσεων στον πνευμονικό που χαρακτηρίζεται από χαμηλές πιέσεις έχει αλλάξει. Η νέα θεωρία θεωρεί ότι το υπεζωκοτικό υγρό φυσιολογικά έρχεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα κυρίως από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας του τοιχωματικού υπεζωκότα αλλά και από τα αγγεία του πνευμονικού υπεζωκότα.[39] Η απομάκρυνση του υγρού υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα (εικόνα 3). Σημεία που οδηγούν στη θεωρία αυτή είναι:

1. Η πίεση της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι χαμηλότερη από την πίεση του διάμεσου ιστού και των δύο πετάλων του υπεζωκότα.[40] Αυτό δημιουργεί μια κλίση πιέσεων, που οδηγεί υγρό μέσα αλλά όχι έξω από την υπεζωκοτική κοιλότητα.
2. Τα πέταλα του υπεζωκότα είναι εξαιρετικά διαπερατά στα υγρά και στις πρωτεΐνες. Ο υπεζωκότας είτε εξετάζεται *in vitro* [41] είτε *in situ* [42] προβάλλει μικρή αντίσταση στην κίνηση των πρωτεϊνών.
3. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα δεν αναπτύσσουν διαφορά δυναμικού, όπως θα αναμένονταν αν υπήρχε ενεργητική μεταφορά από αυτά.[43] Το υπεζωκοτικό υγρό όμως είναι περισσότερο αλκαλικό από το πλάσμα [44] και μια τέτοια διαφορά είναι δύσκολο να διατηρηθεί αν δεχθούμε ότι το μεσοθήλιο είναι εξαιρετικά διαπερατό.
4. Η ροή του υπεζωκοτικού υγρού είναι αργή και παρόμοια με τις ροές που ισχύουν για τους διάμεσους ιστούς. Στα πρόβατα η είσοδος του υπεζωκοτικού υγρού βρέθηκε περίπου 0.01 ml/kg/hr.[45, 46]
5. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών κατά την απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού δεν αλλάζει.[47] Επιπλέον, η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την

υπεζωκοτική κοιλότητα γίνεται από τα λεμφαγγεία του τοιχωματικού υπεζωκότα.[48] Αυτά υποδηλώνουν πως η κύρια έξοδος μεγάλων μορίων είναι τα στόματα των λεμφαγγείων του τοιχωματικού υπεζωκότα.

Αντιφατικά πειραματικά δεδομένα

Η παλιά αυτή θεωρία αγνοούσε την ύπαρξη του διάμεσου ιστού, τις ικανότητες διαπερατότητας του υγρού και των λοιπών ουσιών αλλά και την ύπαρξη των λεμφαγγείων.

Όσον αφορά στο διάμεσο ιστό, η μέτρηση της υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής του πίεσης είναι εξαιρετικά δύσκολη. Στις αρχές του 1990 έγιναν μετρήσεις των πιέσεων του διάμεσου ιστού σε σκύλους [49, 50] αλλά φαίνεται ότι οι μετρήσεις αυτές έγιναν αρκετά πιο μακριά από την περιοχή του ενδιαφέροντος δηλαδή μεταξύ μεσοθηλίου και τριχοειδών. Ακόμη, στην όλη σύγχυση επέρχεται και το γεγονός ότι οι μετρήσεις αυτές θα αντιστοιχούσαν σε συστήματα «κλειστά» δηλαδή συστήματα που λαμβάνουν το υγρό τους μόνο από τα τριχοειδή τους κάτι που δε συμβαίνει με τον υπεζωκότα ο οποίος θεωρείται ανοικτό σύστημα καθώς λαμβάνει και πρωτεΐνες και υγρό από την υπεζωκοτική κοιλότητα άρα η υδροστατική και κυρίως η κολλοειδωσμοτική πίεση έχει αλλάξει.[51]

Στην όλη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού θα πρέπει να συνυπολογιστεί και η ικανότητα της μετακίνησης ουσιών διαμέσου του μεσοθηλίου. Για παράδειγμα όπως συμβαίνει στο επιθήλιο των μικροαγγείων όπου η διαπερατότητα σχετίζεται και με την ικανότητα του επιθηλίου στη μεταφορά ουσιών μέσω των πόρων «pore theory» που πρωτοαναφέρθηκε από τους Pappenheimer και συνεργάτες [52]: μικρές ουσίες μπορούν να περάσουν από μικρούς πόρους που αποτελούνται από μικρά ανοίγματα στο ενδοθήλιο. Μεγαλομοριακές ενώσεις όμως απαιτούν μεγάλους πόρους

που είτε πρόκειται για μεγάλα ανοίγματα στο ενδοθήλιο είτε για ένωση της ουσίας με κυστίδια (vesicles) του κυττάρου.[53] Εάν τέτοιοι μηχανισμοί τελικά δρουν στην όλη ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού τότε θα πρέπει να συνυπολογίζονται καθώς σαφώς επιδρούν στη μετακίνηση νερού αλλά και πρωτεϊνών αλλάζοντας έτσι την κολλοειδωσμοτική πίεση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό εξαρτάται και από το μέγεθος του θηλαστικού, από την αρτηριακή πίεση αλλά και από την αναπνοή.[54]

Αλλά και στη δεύτερη θεωρία οι απλουστεύσεις είναι εμφανείς. Η διακύμανση των πιέσεων της πλευρικής επιφάνειας και του υπεζωκοτικού υγρού που δημιουργεί την ιξώδη κίνηση του υγρού προς τη βάση της υπεζωκοτικής κοιλότητας θα οδηγούσε σε ένα σημείο όπου ο ρυθμός φιλτραρίσματος του υγρού να μικρύνει πάρα πολύ. Ακόμη, υπολογίζοντας τις πιέσεις στην πλευροφρενική περιοχή θα έπρεπε να υπάρχει μετακίνηση υγρού προς τον πνεύμονα κάτι που δεν ταιριάζει με τη θεωρία αποχέτευσης προς τα στόματα και τον κατώτερο τοιχωματικό υπεζωκότα.[55] Επίσης, φαίνεται ότι ο υπολογισμός των πιέσεων αυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βαρύτητα και τη θέση (όρθια, πρηνής θέση κτλ) του εξεταζόμενου ζώου.

Ενεργητική μεταφορά από το μεσοθήλιο

Ακόμη η προσπάθεια εξήγησης του φαινομένου της ανακύκλωσης του υπεζωκοτικού υγρού αγνοεί την ικανότητα που εμφανίζουν οι ημιδιαπερατές μεμβράνες να μεταφέρουν ιόντα και μόρια μέσω της ενεργητικής μεταφοράς,[56] που συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή άλλων μορίων μέσα από τις μεμβράνες με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών που λειτουργούν ως φορείς, μεταφέροντας ουσίες αντίθετα στο ενεργειακό πρηνές, δηλαδή από χαμηλή συγκέντρωση σε υψηλή συγκέντρωση.

Επόμενο είναι η όλη διαδικασία να απαιτεί δαπάνη επιπρόσθετης ενέργειας εκτός της κινητικής ενέργειας των μορίων.

Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν έμμεσες αποδείξεις ενεργητικής μεταφοράς ηλεκτρολυτών από τον υπεζωκότα.[12, 15, 16] Βρέθηκε μείωση του ρυθμού απορρόφησης προκλητού υδροθώρακα σε κουνέλια, όταν στο υγρό υπήρχαν ουσίες που παρεμπόδιζαν την μεταφορά ηλεκτρολυτών. Στις μελέτες αυτές προτάθηκε η ύπαρξη $\text{Na}^+/\text{H}^+ - \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ διπλού μεταφορέα και $\text{Na}^+ - \text{γλυκόζη}$ συµμεταφορέα που δρά σε συνέργια με αντλία Na^+/K^+ από την αντίθετη πλευρά. Ωστόσο, σε αυτές τις μελέτες υπάρχει η ερώτηση αν τα συµπεράσματα των µελετών αυτών µπορούν να αναχθούν στο φυσιολογικό µοντέλο καθώς κατά τον υδροθώρακα η ικανότητα του υπεζωκότα και όλων των συστηµάτων που επιδρούν αυξάνει κατά πολύ. Οι Engelberg και Radin έδειξαν την ύπαρξη διαφοράς δυναµικού (-5mV) µεταξύ πνευµονικού αγγείου και υπεζωκότα, ενώ µε αναστολείς διαύλων ηλεκτρολυτών έδειξαν ότι αυτή η διαφορά µπορεί να αποτελέσει δύναµη ενεργητικής μεταφοράς ιόντων.[14] Οι D' Angelo και συνεργάτες έδειξαν µικρή μεταφορά ιόντων Na^+ σε τοιχωµατικό υπεζωκότα σκύλου.[57] Επιπλέον, ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ παρατηρήθηκε σε µεσοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου υπεζωκότα.[58] Έµεσες ενδείξεις περί ενεργητικής μεταφοράς δόθηκαν και σε αποµονωµένους ιστούς υπεζωκότα ανθρώπου και προβάτων [59, 60] όπου υπήρξε µεταβολή ηλεκτροφυσιολογικών παραµέτρων µετά από χρήση αναστολέων διαύλων Na^+ και αντλιών Na^+/K^+ . Σε άλλες µελέτες προτάθηκε ότι η µετακίνηση νερού και ηλεκτρολυτών οφείλεται απλά σε αυξηµένη διαπερατότητα του υπεζωκότα, όπως συµβαίνει επί παραδείγµατι σε συνθήκες υποξίας.[61] Έτσι, παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα του υπεζωκότα έχουν τα χαρακτηριστικά για ενεργητική μεταφορά, είναι η αυξηµένη διαπερατότητα που διακινεί τους ηλεκτρολύτες µεταξύ των δύο

επιφανειών.[41, 43] Τέλος, η διάχυση δεν φαίνεται να συνεισφέρει καθώς η σύνθεση του υπεζωκοτικού υγρού που απορροφάται δεν αλλάζει [62] ενώ και η λεμφική αποχέτευση φαίνεται ότι μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στη μεταφορά υγρού και συστατικών όπως προαναφέρθηκε.[63, 64] Στον αντίποδα αυτών, μελέτες έδειξαν ότι μπορεί το μεσοθήλιο να μεταφέρει και ενεργητικά και άλλες ουσίες όπως πρωτεΐνες,[65, 66] το οποίο φαίνεται ότι επισυμβαίνει μέσω κυστιδίων. Ο μηχανισμός αυτός ακόμη δεν έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει στην όλη μετακίνηση του υγρού.

Ο ρόλος των λεμφαγγείων

Φαίνεται ότι το υγρό στην υπεζωκοτική κοιλότητα παρέχεται από τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας κυρίως του τοιχωματικού υπεζωκότα. Η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά φαίνεται να αμφισβητούνται. Επίσης, η θεωρία μόνο των πιέσεων δεν εξηγεί επαρκώς τη φυσιολογία της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Επομένως και κάτι ακόμη φαίνεται ότι συνεισφέρει στο όλο σύστημα μετακίνησης υγρού και συστατικών. Έτσι, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στα λεμφαγγεία. Ο πνευμονικός υπεζωκότας έχει αρκετά λεμφαγγεία αλλά αυτά δεν επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα.[67] Στον τοιχωματικό υπεζωκότα, τα λεμφαγγεία επικοινωνούν με την κοιλότητα μέσω των στομάτων τα οποία φαίνεται ότι κυρίως απομακρύνουν ύδωρ, λευκώματα, σωματίδια και ερυθροκύτταρα.[68] Η συμμετοχή της αποχέτευσης από τα λεμφαγγεία είναι από 60 μέχρι 100% της ποσότητας και αυτό μπορεί να αυξηθεί σε παθολογικές καταστάσεις. Η δομή των στομάτων έχει μελετηθεί για τον τοιχωματικό υπεζωκότα.[26]

Σήμερα η συμμετοχή των λεμφαγγείων στην αποχέτευση λέμφου και υπεζωκοτικού υγρού θεωρείται δεδομένη [25] και μάλιστα αυτή φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω των στομάτων.[35] Ωστόσο, παραμένει ακόμη να διευκρινιστεί η

έκταση της συμμετοχής και άλλων οδών όπως η διάχυση, η ενδοκυττάρωση (transcytosis) ή των διαμέσων λεμφαγγείων. Ο ρόλος του σπλαχνικού υπεζωκότα φαίνεται ότι είναι μηδαμινός, καθώς το μεσοθήλιο θεωρείται πολύ διαπερατό (leaky) και δεν υπάρχει κλίση πίεσης προς την κατεύθυνση αυτή.[69] Ακόμη, ο τρόπος που επιτυγχάνεται η αποχέτευση μέσω των λεμφαγγείων παραμένει σκοτεινή. Μια εξήγηση περιλαμβάνει: ο ρυθμός απορρόφησης καθορίζεται από τη σχέση πίεσης – όγκου στην υπεζωκοτική κοιλότητα.[70, 71] Όσο μικραίνει ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού, η πίεσή του άρα και η κλίση πίεσης απορρόφησης (στο $-7 \text{ cm H}_2\text{O}$) από τα λεμφαγγεία μικραίνει.[70] Μια άλλη εξήγηση είναι ότι η απορροφητική δύναμη των λεμφαγγείων προέρχεται από τη συστολή της καρδιάς και τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών σε συνδυασμό με τη δράση βαλβίδων που δρουν προς μια κατεύθυνση.[72, 73] Φαίνεται ωστόσο, ότι ο δεύτερος μηχανισμός είναι πιο αληθής καθώς πρώτον η πιθανότητα να υπάρξει στόμα ακόμη και σε περιοχές όπου τα στόματα είναι πολυπληθή είναι σχετικά μικρή, ενώ η πίεση του υπεζωκοτικού υγρού δεν εμφανίζει την ίδια κεφαλο – ουραία κατανομή και διακύμανση όπως συμβαίνει και στην πυκνότητα των στομάτων. Τέλος, σε αυξημένη ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού δεν μπορεί να βγεί συμπέρασμα [74] όσον αφορά την λειτουργία των λεμφαγγείων σε φυσιολογική κατάσταση καθώς η όλη ικανότητα του υπεζωκότα για μετακίνηση υγρού μεγαλώνει. Τα λεμφαγγεία δεν περιορίζουν την μετακίνηση των πρωτεϊνών από το ενδιάμεσο υγρό.[73] Αντίθετα, παρατηρήθηκε κεφαλο – ουραία διακύμανση στην απορρόφηση πρωτεϊνών ακριβώς με βάση το πρότυπο της διακύμανσης της παρουσίας των στομάτων αλλά και της πυκνότητας του υπεζωκοτικού υγρού.[75]

Άλλη οδός αποχέτευσης

Τέλος, εναλλακτική οδός απομάκρυνσης του υγρού μπορεί να γίνει μέσω των τριχοειδών της πνευμονικής κυκλοφορίας και των πνευμονικών λεμφαγγείων.[76] Αυτό φαίνεται ότι συμβαίνει σε θηλαστικά με λεπτό σπλαχνικό υπεζωκότα αλλά και πιθανόν σε καταστάσεις παθολογικές όπου η αυξημένη αποχετευτική ικανότητα από το μεσοθήλιο απαιτείται για την υπερνίκηση της συγκέντρωσης του πλεονάζοντος υγρού.[77] Η απόστασή τους από την επιφάνεια του πνευμονικού υπεζωκότα είναι ένα σημαντικό εμπόδιο για την απομάκρυνση του υγρού μέσω αυτής της οδού. Αυτό υπερνικάται από τις αυξημένες πιέσεις που αναπτύσσονται στην υπεζωκοτική κοιλότητα όταν αθροίζεται υπεζωκοτικό υγρό.

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΥΠΕΖΩΚΟΤΑ

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

Η υπεζωκοτική κοιλότητα αποτελεί διάμεσο χώρο μέσα στον οποίο μπορούν να συγκεντρωθούν μεγάλες ποσότητες υγρού. Φυσιολογικά εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας υπάρχει μικρή και σταθερή ποσότητα υγρού, του υπεζωκοτικού υγρού. Μια πιθανή θεωρία παραγωγής και απαγωγής του υπεζωκοτικού υγρού είναι η διακίνησή του μεταξύ τριών διαμερισμάτων που βρίσκονται σε κατά σειρά τοποθέτηση: την τριχοειδική συστηματική κυκλοφορία, τον διάμεσο ιστό του τοιχωματικού υπεζωκότα και την υπεζωκοτική κοιλότητα, τα οποία διαχωρίζονται από δυο αντιστάσεις επίσης σε σειρά συνδεδεμένες: το ενδοθήλιο των τριχοειδών και το μεσοθήλιο του υπεζωκότα ενώ δυο θεωρούνται από αυτή τη θεωρία ως οι κύριες οδοί αποχέτευσης του υπεζωκοτικού υγρού: τα υπεζωκοτικά και μη υπεζωκοτικά λεμφαγγεία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο πνευμονικός υπεζωκότας δεν συμμετέχει αξιόλογα στην απαγωγή του υπεζωκοτικού υγρού. Αυτές οι γνώσεις καθίστανται σημαντικές και χρήσιμες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας παραγωγής υπεζωκοτικών συλλογών. Έτσι, μια πιθανή αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου ή του μεσοθηλίου, πάνω από την ικανότητα λεμφικής απορροής, μπορεί να οδηγήσει σε συλλογή υπότονου υπεζωκοτικού υγρού (δίιδρωμα). Ακόμη, εάν αυξηθεί η διαπερατότητα των τριχοειδών της συστηματικής κυκλοφορίας για πρωτεΐνες, θα οδηγήσει σε συλλογή υπεζωκοτικού υγρού με μεγαλύτερη αναλογία σε πρωτεΐνες (εξίδρωμα). Εξιδρωματική συλλογή θα συμβεί επίσης εάν ο ρυθμός παραγωγής ξεπεράσει τη μέγιστη λεμφική ροή.

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ

Το υπεζωκοτικό υγρό αποτελεί στην ουσία ένα «υπερδιήθημα» του αίματος. Η ημερήσια παραγωγή του είναι περίπου 15 – 20 ml/ημέρα. Είναι διαυγές και άχρωμο ενώ περιέχει 1500 – 2500 κύτταρα/μl στα κουνέλια και στους σκύλους (<2% λευκοκύτταρα, 61 – 77% μονοκύτταρα, 7 – 11% λεμφοκύτταρα, 9 – 30% μεσοθηλιακά και απεπτοκότα κύτταρα) [42, 78, 79] και μικρή ποσότητα πρωτεϊνών (περίπου 1.5 gr/l). Στον άνθρωπο, βρέθηκαν περίπου 1700 κύτταρα/mm³ (75% μακροφάγα, 23% λεμφοκύτταρα, 1% μεσοθηλιακά).[80] Τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα φθάνουν στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω των υποπλευρίων αγγείων, τα λεμφοκύτταρα μέσω των στομάτων ενώ τα μονοκύτταρα – μακροφάγα εξελίσσονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα με τα οποία έχουν κοινή μεσοδερματική προέλευση.[80] Τα μικρότερα ζώα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό τους υγρό: 2.5 g/Kg στα ποντίκια ενώ καθώς μεγαλώνει το μέγεθος του ζώου αυτή η περιεκτικότητα μειώνεται σε 1 g/Kg, προκαλώντας έτσι μείωση της αναλογίας πρωτεΐνης υπεζωκοτικού υγρού προς πρωτεΐνη πλάσματος από 0.6 σε 0.1. Στα πρόβατα, που ο υπεζωκότας έχει παρόμοια ανατομία με αυτή των ανθρώπων, η φυσιολογική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπεζωκοτικό υγρό είναι 1 – 1.5 g/Kg. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό είναι χαμηλή εν συγκρίσει με αυτή του πλάσματος κάτι που υποδεικνύει ότι η διαπερατότητα των πρωτεϊνών στον υπεζωκότα είναι χαμηλή.[77]

Ο όγκος του υπεζωκοτικού υγρού ποικίλει ανάμεσα στα θηλαστικά. Στα ποντίκια είναι 2.5 cm³/Kg σωματικού βάρους ενώ στα πρόβατα μειώνεται στα 0.4 cm³/Kg σωματικού βάρους. Οι παραπάνω τιμές περιλαμβάνουν και την ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού που προσκολλάται στα τοιχώματα του υπεζωκότα.[78] Για τους ανθρώπους, η ποσότητα του υπεζωκοτικού υγρού κυμαίνεται στα 0.26 cm³/Kg.[80]

Περιέχει συγκεντρώσεις ιόντων παρόμοιες με αυτές του πλάσματος.[60] Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση Na^+ είναι μικρότερη ενώ η συγκέντρωση HCO_3^- και pH (≈ 7.6) είναι μεγαλύτερη από του ορού.[15] Η συγκέντρωση γλυκόζης είναι παρόμοια με του ορού.[79]

Η πυκνότητα του υπεζωκοτικού υγρού είναι σημαντική για την εκτίμηση της επαφής των πετάλων του υπεζωκότα και το μέγεθος του στρές ολίσθησης των υπεζωκοτικών επιφανειών κατά την αναπνοή [81] και κυμαίνεται μεταξύ 5 και 35 μm . Η πυκνότητα του υπεζωκοτικού υγρού φαίνεται ότι είναι ομοιόμορφη πλην διαβάθμισης στο πρόβατο [82] στις περιοχές των ορίων των λοβών και στις βάσεις των πνευμόνων.[83]

ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Το υαλουρονικό οξύ έχει αναγνωριστεί ότι επενδύει – καλύπτει τα μεσοθηλιακά κύτταρα και έχει προταθεί ως περιθωριακό λιπαντικό στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η ποσότητά του είναι περίπου 0.1 mg/Kg στα κουνέλια ενώ ανακυκλώνεται κάθε μια ημέρα περίπου. Ο ρόλος του στην εφύγραση της κοιλότητας παραμένει υποθετικός. Μια υπόθεση είναι ότι η γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει ενσωματώνεται με τις μικρολάχνες και δρα ως λιπαντικό στην περίπτωση της έλλειψης υπεζωκοτικού υγρού. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά του στην μετακίνηση των πετάλων είναι τέτοια που δεν θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τις τόσο μεγάλες δυνάμεις κατά την αναπνοή.

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

Η συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα χαρακτηρίζεται ως υπεζωκοτική συλλογή. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να αυξηθεί η εισροή υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα κατά 30 περίπου φορές από το φυσιολογικό ή να μειωθεί η απομάκρυνση του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα ή και τα δυο, όπως συμβαίνει συνήθως. Η πρωτοπαθής νόσος αφορά συχνότερα τον υπεζωκότα και τον πνεύμονα και σπανιότερα άλλα παρακείμενα όργανα.

Η συσσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα μπορεί να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω μηχανισμούς:

1. Αύξηση της υδροστατικής πίεσης στην μικροκυκλοφορία του υπεζωκότα. Παράδειγμα αυτού αποτελεί η υπεζωκοτική συλλογή της καρδιακής ανεπάρκειας, κυρίως στην αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια.
2. Ελάττωση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης, ελάττωση των λευκοματινών στην κυκλοφορία. Αποτελεί αδύναμο μηχανισμό ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής καθώς η λεμφική αποχέτευση έχει υψηλή αποχετευτική ικανότητα. Αν συνδυαστεί με άλλους μηχανισμούς όπως την έκπτωση της λεμφικής αποχέτευσης τότε μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη συλλογής.
3. Ελάττωση της πίεσης μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην ατελεκτασία του πνεύμονα. Έχει διαπιστωθεί ότι σε ολική ατελεκτασία του πνεύμονα η υπεζωκοτική πίεση μπορεί να κατέλθει σε επίπεδα κάτω του 20 cm H₂O. Σύμφωνα με την εξίσωση του Starling, οι αρνητικές αυτές πιέσεις προκαλούν απόλυτη αύξηση της υδροστατικής πίεσης και υπεζωκοτική συλλογή.
4. Αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών του υπεζωκότα. Μετά την αύξηση της υδροστατικής πίεσης αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό μηχανισμό

ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής. Παράδειγμα του μηχανισμού αυτού αποτελεί η συμπεριφορά του υπεζωκότα σε φλεγμονές (κατά τις φλεγμονές επι προσθέτως δυσχεραίνεται και η αποχέτευση του υγρού λόγω απόφραξης των στομάτων και της λεμφικής απορροής του υγρού).

5. Ελάττωση της λεμφικής παροχέτευσης. Η απόφραξη του λεμφικού συστήματος από το ύψος των στομάτων μέχρι το ύψος των μεσαυλικών λεμφαδένων και η μείωση της λεμφικής ροής λόγω αύξησης της συστηματικής φλεβικής πίεσης συμβάλλει στη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής όπως επί παραδείγματι σε νεοπλασίες, φλεγμονές και ίνωση.
6. Εξωπνευμονικές εστίες συγκέντρωσης υγρού, όπως για παράδειγμα περιτοναϊκές συλλογές, πιθανώς λόγω μετακίνησης υγρού από την περιτοναϊκή στην υπεζωκοτική κοιλότητα μέσω των διαφραγματικών λεμφαγγείων ή μέσω διαφραγματικών ελλειμάτων λόγω της διαφοράς πιέσεων μεταξύ των δυο κοιλοτήτων.

Οι υπεζωκοτικές συλλογές διαχωρίζονται σε δυο μεγάλες υποομάδες: *διυδρώματα* και *εξιδρώματα*. Το σε ποια ομάδα θα καταταχθεί μια υπεζωκοτική συλλογή εν τέλει καθορίζεται από τον μηχανισμό σχηματισμού της συλλογής:

αν μια συλλογή χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των υδροστατικών και ωσμωτικών πιέσεων τότε δεν μεταβάλλει τη συγκέντρωση πρωτεΐνης και γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) και επομένως ανήκει στα *διυδρώματα*

αν μια συλλογή σχηματιστεί κατόπιν αύξησης της διαπερατότητας των τριχοειδών επιτρέπει την αύξηση της ποσότητας πρωτεΐνης, γαλακτικής

δεϋδρογονάσης και άλλων ουσιών στο υπεζωκοτικό υγρό και επομένως οδηγεί σε σχηματισμό εξιδρώματος.

Όλα τα παραπάνω ανακεφαλαιώνονται από τα κριτήρια του Light και διευκολύνεται έτσι ο καθορισμός της αιτιολογίας της υπεζωκοτικής συλλογής. Τα κριτήρια αυτά συμπεριλαμβάνουν:

1. την αναλογία πρωτεϊνών υπεζωκοτικού υγρού προς τις πρωτεΐνες του πλάσματος (>0.5 για τα εξιδρώματα)
2. την αναλογία LDH υπεζωκοτικού υγρού προς LDH στο πλάσμα (>0.6 για τα εξιδρώματα)
3. απόλυτη τιμή LDH στο υπεζωκοτικό υγρό (>200 IU/L για τα εξιδρώματα)
4. απόλυτη τιμή πρωτεϊνών στο υπεζωκοτικό υγρό (>3gr/dl για τα εξιδρώματα)

Για τα εξιδρώματα επιπλέον απαιτείται έλεγχος του αριθμού και τον τύπο λευκών αιμοσφαιρίων, τα επίπεδα γλυκόζης, την τιμή του pH, της αμυλάσης, της αδενοσινοδιαμινάσης, του αιματοκρίτη, των λιπιδίων και των δεικτών ανοσίας. Επίσης, σημαντική είναι και η κυτταρολογική ανάλυση της εξιδρωματικής συλλογής κατόπιν παρακέντησης. Ακόμη και το χρώμα και η σύσταση του υγρού κατά την παρακέντηση μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση του αιτίου της υπεζωκοτικής συλλογής. Η υπεζωκοτική συλλογή παρακολουθείται ως προς την εξέλιξή της και με βιοχημικούς δείκτες που μετρώνται σε αυτή, όπως η γλυκόζη και κυρίως το pH.

Στον πίνακα 1, ανευρίσκονται τα αίτια υπεζωκοτικών συλλογών ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν. Η πιο συχνή αιτία ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής είναι η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και οι μικροβιακές παραπνευμονικές συλλογές. Συχνότατη είναι και η ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής σε νεοπλασίες αλλά και σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα.

Δ Ι Ι Δ Ρ Ω Μ Α Τ Α

Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια

Απόφραξη άνω κοίλης φλέβας

Συμπιεστική περικαρδίτιδα

Υπερχορήγηση υγρών

Κίρρωση ήπατος

Υπολευκωματιναιμία

Νεφρωσικό σύνδρομο

Περιτοναϊκές διυλίσεις

Ατελεκτασία

Ε Ξ Ι Δ Ρ Ω Μ Α Τ Α

Λοιμώξεις

Ανοσιακά αίτια

Βακτήρια

Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης

Ερυθηματώδης λύκος

Ιοί

Σύνδρομο Sjogren

Παράσιτα

ΙΑτρογενή αίτια

Απόστημα

Ακτινοβολία – επεμβάσεις – φάρμακα

Υποδιαφραγματικό

Αιμοθώρακας

Ήπατος – σπληνός

Χυλοθώρακας

Νεοπλάσματα

Άλλα αίτια

Πνεύμονα – μαστού – λέμφωμα

Παγκρεατίτιδα

Μεσοθηλίωμα

Έκθεση σε αμιάντο

Μεταστατικό

Ουραιμία

Οισοφαγική ρήξη

Σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών

Δ Ι Ι Δ Ρ Ω Μ Α Τ Α Ή Ε Ξ Ι Δ Ρ Ω Μ Α Τ Α

Σαρκοείδωση

Υπεζωκοτική συλλογή εγκυμοσύνης

Μυξοίδημα

Σύνδρομο Meigs

Πνευμονική εμβολή

Πίνακας 1: Αίτια υπεζωκοτικών συλλογών

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ - ΧΑΜΗΛΗ ΓΛΥΚΟΖΗ

ΠΑΡΑΠΝΕΥΜΟΝΙΚΕΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

Οι επιπλεγμένες παραπνευμονικές συλλογές αποτελούν ένα μείζον κλινικό πρόβλημα με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 40% των ασθενών με πνευμονία θα αναπτύξουν παραπνευμονική συλλογή [84] και αυτό αντικατοπτρίζεται σε περίπου 60.000 περιπτώσεις το χρόνο στις Η.Π.Α.[85]

Η συλλογή του υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα επισυμβαίνει αρχικά με το *εξιδρωματικό στάδιο* όπου χαρακτηρίζεται από στείρο υπεζωκοτικό υγρό λόγω αυξημένης διαπερατότητας του υπεζωκότα [86, 87] αλλά και πιθανότατα λόγω αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, χημειοταξία ουδετεροφίλων και παραγωγής προ – φλεγμονωδών ουσιών όπως ιντερλευκίνες (IL-8) και TNF-α.[88] Στη συνέχεια, το απλό αυτό υγρό επιμολύνεται από βακτηριακούς οργανισμούς οδηγώντας έτσι στη φάση της *«επιπλεγμένης παραπνευμονικής συλλογής ή ινοπυώδες στάδιο»* όπου ινική εναποτίθεται στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα με τάση να δημιουργούνται συμφύσεις και κοιλότητες. Κατά το στάδιο αυτό, η φαγοκυττάρωση των βακτηρίων, η απελευθέρωση συστατικών των τοιχωμάτων των νεκρών μικροοργανισμών και ο αυξημένος μεταβολισμός των αμυντικών και βακτηριακών κυττάρων οδηγούν σε διαταραχή των βιοχημικών ευρημάτων που μετρούνται στο υπεζωκοτικό υγρό.[89-92] Σημαντικό στοιχείο στη φάση αυτή επίσης είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της πήξης και ινωδόλυσης, με ενεργοποίηση της πήξης και απενεργοποίηση της ινωδόλυσης, οδηγώντας στο σχηματισμό της ινικής.[93] Στην εξέλιξη της παραπνευμονικής συλλογής, στην *«οργανωτική φάση»* ινοβλάστες αναπτύσσονται στην υπεζωκοτική κοιλότητα, σχηματίζοντας ένα ανελαστικό εξωτερικό περίβλημα στην επιφάνεια τόσο του σπλαχνικού όσο και του τοιχωματικού υπεζωκότα και

ισχυρά, ανελαστικά διαφραγμάτια. Τελικά, πύο καταλαμβάνει την υπεζωκοτική κοιλότητα και τους χώρους που διαχωρίζονται από τα διαφραγμάτια που είναι γνωστό ως «εμπύημα».

Οι επιπλεγμένες υπεζωκοτικές συλλογές επιπολάζουν κυρίως σε πιο ηλικιωμένους και σε μικρές ηλικίες. Επιβαρυντικοί παράγοντες για την εμφάνιση των συλλογών αυτών αποτελούν κυρίως ο σακχαρώδης διαβήτης και η χρόνια λήψη αλκοόλ.[85, 94] Βέβαια, πολλές από τις περιπτώσεις επιπλεγμένων υπεζωκοτικών συλλογών αναπτύσσονται χωρίς κάποιον αναγνωρίσιμο επιβαρυντικό παράγοντα.

Η κύρια εξήγηση της χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης στην εξέλιξη της παραπνευμονικής υπεζωκοτικής συλλογής αποτελεί ο αυξημένος μεταβολισμός των αμυνοτικών κυττάρων και των βακτηρίων.[85]

ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

Οι νεοπλασματικές υπεζωκοτικές συλλογές αποτελούν τη δεύτερη πιο συχνή αιτία ανάπτυξης εξιδρώματος. Πολλές φορές η ανάπτυξη μόνο της καρκινωμάτους υπεζωκοτικής συλλογής αποτελεί το μοναδικό πρόδρομο εύρημα ενώ το 25% περίπου των ασθενών με νεοπλασματική υπεζωκοτική συλλογή είναι τελείως ασυμπτωματικοί. Η διάγνωση νεοπλασματικής υπεζωκοτικής συλλογής συνήθως συνεπάγεται και ότι η υπεύθυνη νεοπλασία είναι ανεγχείρητη και μη ιάσιμη. Σχεδόν όλες οι υπαρκτές μορφές καρκίνων σε κάποιο στάδιο θα δώσουν μετάσταση στον υπεζωκότα. Τα πιο συχνά αίτια είναι το βρογχογενές καρκίνωμα (36%), ο καρκίνος του μαστού (25%) και τα λεμφώματα (10%), καρκίνος ωοθηκών και όγκος στομάχου (5%) ενώ σε ένα ποσοστό 10% η πρωτοπαθής εστία παραμένει άγνωστη. Σπάνια αιτία ανάπτυξης κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής αποτελούν οι πρωτοπαθείς όγκοι

του υπεζωκότα με κύριο το κακόηθες μεσοθηλίωμα (περίπου 1 ανα 1.000.000 ανα έτος στον γενικό πληθυσμό που δεν έχει εκτεθεί σε άσβεστο).

Οι καρκινωματώδεις υπεζωκοτικές συλλογές καλύτερα ονομάζονται «*παρaneoπλασματικές υπεζωκοτικές συλλογές*» καθώς σχετίζονται και σχηματίζονται από κακοήθειες που δεν σχετίζονται άμεσα με υπεζωκοτική καρκινική συμμετοχή.
[95]

Ο πιο σημαντικός μηχανισμός ανάπτυξης κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής θεωρείται η ελαττωμένη λεμφική αποχέτευση υγρού από τον υπεζωκοτικό χώρο. Η παρακώλυση του λεμφικού αποχετευτικού συστήματος μπορεί να επισυμβεί καθ' όλη τη διαδρομή του: από τα στόματα του τοιχωματικού υπεζωκότα μέχρι τα μεσαυλιακά, παραστερνικά ή έσω μαστικά λεμφογάγγλια. Σε μια κλασική εργασία οι Meyer και Chernow και Shields [95-97] κατόπιν εξέτασης νεκροτομικών υλικών απέδειξαν τη σχέση μεταξύ σημαντικής υπεζωκοτικής συλλογής και διήθηση μεσαυλιακών λεμφογαγγλίων. Επίσης, ο Meyer έδειξε ότι οι υπεζωκοτικές συλλογές δεν αναπτύσσονται στα σαρκώματα λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχει λεμφοαγγειακή συμμετοχή. Ενισχυτικό της θεωρίας αυτής είναι και το γεγονός ότι τα λεμφώματα οδηγούν σε τεράστιες υπεζωκοτικές συλλογές.[98] Πέραν αυτών, η φλεγμονώδης απόκριση του υπεζωκότα στη διήθηση από καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε αυξημένη μικροαγγειακή διαπερατότητα. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν σε συσσώρευση καρκινικού υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα είναι οι ελεύθερες ρίζες που ελευθερώνονται στην κοιλότητα, μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως, πρωτεάσες και λεμφοκύτταρα που δρουν τοπικά.[95, 99] Συνήθως και τα δυο πέταλα του υπεζωκότα συμμετέχουν στη νόσο.

Η εμφάνιση της παρακέντησης του ύποπτου υπεζωκοτικού υγρού μπορεί αρχικά να δώσει πληροφορίες για την προέλευσή του. Ένα αιματηρό υγρό

προδιαθέτει για άμεση υπεζωκοτική συμμετοχή στη νόσο ενώ πιο ορρώδες συνήθως προκύπτει από απόφραξη των λεμφαγγειακών οδών ή από βρογχογενές καρκίνωμα και συνοδό ατελεκτασία. Αυξημένα ερυθροκύτταρα ($>100.000/\mu\text{l}$) [87] στην κυτταρολογική του υγρού απουσία τραύματος είναι σχεδόν καταδεικτικά κακοήθειας. Επίσης, από τα εμπύρηννα κύτταρα πάνω από 50% είναι λεμφοκύτταρα σε πάνω από τις μισές περιπτώσεις ασθενών.[95, 100] Πολυμορφοπύρηννα μπορούν επίσης να ανευρεθούν σε περιπτώσεις εξαιρετικής υπεζωκοτικής αντίδρασης στη φλεγμονή που δημιουργείται από τη διήθηση.[95, 101] Πρόκειται συνήθως για εξιδρώματα με συγκέντρωση πρωτεϊνών πάνω από 4gr/dl (1.5 – 8 gr/dl).[87, 95] Εξαιρετικά συνηθισμένο χαρακτηριστικό των καρκινωματωδών υπεζωκοτικών συλλογών είναι το χαμηλό pH (6.95 – 7.29) και η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης ($<60\text{ mg/dl}$), κάτι που αναφέρθηκε από τον Good et al σε ένα κλασσικό άρθρο το 1980.[102] Σε επόμενη μελέτη της ίδιας ομάδας,[103] θεωρήθηκε ότι οι ασθενείς με υπεζωκοτικό υγρό με τα παραπάνω χαρακτηριστικά τα έχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και πιθανότατα χαρακτηρίζονται από μεγάλο φορτίο όγκου και ίνωσης στον υπεζωκότα τους. Εξήγηση για τη χαμηλή γλυκόζη και το χαμηλό pH θεωρήθηκε η παθολογική πια υπεζωκοτική μεμβράνη η οποία δεν μπορεί να επιτρέψει την είσοδο θρεπτικών ουσιών όπως και η γλυκόζη, ενώ εμποδίζει την αποχέτευση των προϊόντων της καύσης της γλυκόζης με αποτέλεσμα έτσι την οξέωση του υπεζωκοτικού χώρου. Ο υπερμεταβολισμός της γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορεί να αποκλειστεί όπως επίσης και ο αυξημένος μεταβολισμός των κυττάρων της υπεζωκοτικής μεμβράνης ή των αμυντικών κυττάρων. Σε άλλες μελέτες [104] προτάθηκε ότι η μόνη εξήγηση της χαμηλής γλυκόζης και του χαμηλού pH είναι η υπερκατανάλωσή της στην υπεζωκοτική κοιλότητα και η υπερπαραγωγή γαλακτικού οξέως και διοξειδίου του άνθρακα από τον υπεζωκότα. Η σημαντικότητα των

ευρημάτων της χαμηλής γλυκόζης και του χαμηλού pH στην καρκινική υπεζωκοτική συλλογή αναδεικνύεται από τους Good and Sahn [105] για τους οποίους πέραν της διαγνωστικής τους αξίας σχετίζονται και με χαμηλή πιθανότητα επιβίωσης αλλά και φτωχή απόκριση στους σκληρυντικούς παράγοντες κατά την πλευροδεσία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αποδιοργανώνονται πέραν της ελάττωσής τους στην καρκινωματώδη υπεζωκοτική συλλογή. Έτσι, επί παραδείγματι, ένα χαρακτηριστικό των ινωδών μεσεγγυματικών (fibrous) όγκων του υπεζωκότα ή του πρωτοπαθούς καρκίνου του πνεύμονα αποτελεί η εμφάνιση περιφερικής υπογλυκαιμίας στο αίμα των ασθενών. Ο Shields αναφέρει, ότι σε μεγάλους τέτοιους όγκους του υπεζωκότα μέχρι και 3 – 4% των ασθενών μπορούν, να αναπτύξουν σοβαρή υπογλυκαιμία.[95] Συνήθως πρόκειται για ινοσαρκώματα χωρίς να αποκλείονται και νευροϊνώματα, ραβδομυοσαρκώματα, λιποσαρκώματα, λειομυοσαρκώματα ή μεσοθηλιώματα. Ήδη το 1968 είχαν αναφερθεί περί τις 58 περιπτώσεις με αντίστοιχες παρατηρήσεις ωστόσο ακόμη και πρόσφατα η βιβλιογραφία αναφέρεται πολλαπλώς στο θέμα.[106-110] Οι Nelson και συνεργάτες [95] αναζήτησαν τις αιτίες που πιθανώς προκαλούν την υπογλυκαιμία και εξέτασαν όλες τις μέχρι τότε πιθανές θεωρίες περί του θέματος: αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα, ανωμαλία στους ρυθμιστές της γλυκόζης στο αίμα δηλαδή της επινεφριδιοκορτικοτρόπου ορμόνης, της αυξητικής ορμόνης, του γλουκαγόνου ή ακόμη της έκτοπης παραγωγής ινσουλίνης, η ύπαρξη κάποιου διευκολυντή της κυκλοφορίας της ινσουλίνης και η παρουσία συστήματος σαν της ινσουλίνης (insulin like activity) με τους insulin like growth factors 1 ή/και 2 (IGF). Η μελέτη κατέληξε ότι η πιο πιθανή και δυνατή εξήγηση είναι αυτή της κατανάλωσης της γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα αλλά αρκετά μετά οι Bunn and Ridgeway [95] ανέφεραν ότι κατανάλωση γλυκόζης από όγκο σε τέτοιο βαθμό

που να προκαλεί υπογλυκαιμία δεν έχει με κανέναν τρόπο διασαφηνισθεί. Τελευταία, η πιο πιθανή εξήγηση φαίνεται ότι βρίσκεται στο σύστημα insulin like activity που εκφράζεται κυρίως με τις σωματομεδίνες και insulin like growth factors 1 και 2¹. Η συσχέτιση της υπογλυκαιμίας με το σύστημα αυτό φαίνεται να είναι άμεση καθώς η απομάκρυνση του όγκου επανέφερε και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα στα φυσιολογικά αλλά αποκατέστησε και τα επίπεδα των IGFs.[106-110]

ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Υπεζωκοτική συλλογή και Ρευματοειδής αρθρίτις

Περίπου ένα 5% των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα θα παρουσιάσουν υπεζωκοτική συλλογή σε κάποια στιγμή της ζωής τους. Πιο σύνηθες είναι σε ηλικιωμένους με δερματικά οζία. Το υπεζωκοτικό υγρό είναι τυπικό: πολύ χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (<30mg/dl), υψηλά επίπεδα LDH (>700 IU/l) και πολύ χαμηλό pH (<7.20). Θετικός επίσης ανευρίσκεται ο ρευματοειδής παράγων ($\geq 1:320$). Παρόμοιες διαταραχές στην συγκέντρωση ινσουλίνης παρατηρήθηκαν κατά την μελέτη του Quebec όπου οι συγκεντρώσεις ινσουλίνης ήταν κατά 57% πιο υψηλές σε ομάδα ασθενών με αρθρίτιδα σε πλαίσιο ρευματοειδούς αρθρίτιδος σε σχέση με ομάδα ταυτόσημη κατά φύλο και ηλικία.[111]

Υπεζωκοτική συλλογή και Ερυθρηματώδης Λύκος (ΣΕΛ)

Περίπου 40% των ασθενών με ΣΕΛ ή φαρμακευτικό ΣΕΛ θα αναπτύξουν κάποια στιγμή στην πορεία της νόσου υπεζωκοτική συλλογή. Πιθανό είναι επίσης η υπεζωκοτική αυτή συλλογή να είναι το πρώτο σύμπτωμα της νόσου. Τα χαρακτηριστικά της παρακέντησης του υγρού είναι παρόμοια ενώ τα αντιπυρηνικά

¹ Οι σωματομεδίνες, η ινσουλίνη και οι IGFs θα αναλυθούν παρακάτω.

αντισώματα είναι θετικά (σε τίτλο τουλάχιστο 1:160) ενώ ο λόγος αντιπυρηνικών αντισωμάτων υπεζωκοτικού υγρού προς το αίμα είναι τουλάχιστο 1 σε ασθενείς με ΣΕΛ και υπεζωκοτική συλλογή. Πρόσφατα αναφέρθηκαν κλινικές περιπτώσεις ασθενών με ΣΕΛ και υπογλυκαιμία. Κατά τη διάρκεια του επεισοδίου υπογλυκαιμίας σε μια ασθενή, η ινσουλίνη στο αίμα ήταν πολύ υψηλή αλλά και θετικά τα αντι – ινσουλινικά αντισώματα, ενώ η ασθενής εμφάνισε πλήρη κλινικό και εργαστηριακό ΣΕΛ.[112] Σε ποντίκια φαίνεται ότι σημαντική είναι η έκφραση IGF στα σπειράματα των ΣΕΛ πειραματόζων τα οποία εμφάνισαν υπογλυκαιμία και σπειραματονεφρίτιδα.

Υπεζωκοτική συλλογή και Σακχαρώδης Διαβήτης

Η κυριότερη μορφή ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη αποτελεί το σύνδρομο οιδήματος της ινσουλίνης «insulin oedema syndrome» και αφορά πιο σωστά τη χορήγηση ποσοτήτων ινσουλίνης στα πλαίσια της αντιμετώπισης του διαβήτη. Αν και όχι πολύ συχνή κλινική οντότητα, το εύρος του συνδρόμου περιλαμβάνει απλές κλινικές εμφανίσεις όπως οίδημα κάτω άκρων ή υπεζωκοτική συλλογή, μέχρι πιο σοβαρές εκδηλώσεις που μπορούν να αποβούν μοιραία για τη ζωή του ασθενούς όπως καρδιογενές σοκ, πνευμονικό οίδημα και οίδημα ανά σάρκας.[113, 114] Η εξήγηση του συνδρόμου μέχρι στιγμής αναζητείται στην οιδηματογενή δράση της ινσουλίνης, η οποία φαίνεται ότι επιδρά στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών προκαλώντας διαμεμβρανική μετακίνηση ιόντων (κυρίως νατρίου) αλλά και νερού με αποτέλεσμα την υπερφόρτωση της κυκλοφορίας.

Ακόμη, εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές είναι συχνές σε υπόβαθρο σακχαρώδους διαβήτη μέχρι και ανάπτυξη υπεζωκοτικών συλλογών σε ασθενείς που

πάσχουν από σαρκοείδωση και διαβήτη τύπου I μετά τον τοκετό έχουν αναφερθεί υπομαρτυρώντας μια πιθανή σχέση μεταξύ της διαταραχής της γλυκόζης στον οργανισμό και άλλων ανοσολογικών οντοτήτων.[115-117]

ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας που επιτρέπει στο κυτταρόπλασμα να διατηρεί σύσταση πολύ διαφορετική από εκείνη του εξωκυττάριου υγρού.

Περίπου 180 λίτρα υγρού απορροφούνται καθημερινά από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, 9 λίτρα/ημέρα από το επιθήλιο του λεπτού εντέρου, πάνω από 700 ml/ημέρα από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, ωστόσο ακόμη υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς.[118] Ο Waymouth Reid σε μια κλασική του ανακάλυψη προ ενός αιώνα έδειξε ότι η διακίνηση υγρού διαμέσου της μεμβράνης μπορεί να γίνει χωρίς να επιδρά κάποια ωσμωτική δύναμη αλλά και ότι η απορρόφηση υγρού από το έντερο απαιτεί ακέραιο επιθήλιο.

Τα επιθήλια διαχωρίζουν το εξωτερικό από το εσωτερικό περιβάλλον και ρυθμίζουν τη μετακίνηση υγρών και ηλεκτρολυτών από και προς το σώμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα, που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι πολύστιβα, βρίσκονται τοποθετημένα σε μια βασική μεμβράνη. Πιστεύεται ότι την ικανότητα διακίνησης ουσιών την φέρουν τα κύτταρα αυτά καθεαυτά. Όλα τα επιθηλιακά κύτταρα ξεχωρίζουν από τα γειτονικά τους με ένα χώρο γνωστό ως: πλάγιος μεσοκυττάριος χώρος (lateral intercellular space) και συνδέονται μεταξύ τους με τις στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς ύδατος και ουσιών διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών είναι βασικά δύο: είτε *διαμέσου της λιπιδιακής διπλοστιβάδας* (παρακυττάριος οδός ή shunt pathway διαμέσου των στενών ή αποφρακτικών συνδέσεων) είτε *μέσω των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης* μέσω

της διάχυσης ή της ενεργητικής μεταφοράς. Τα επιθήλια στα οποία η παρακυττάριος οδός συνεισφέρει κατά πολύ στη μετακίνηση ουσιών (όπως επί παραδείγματι στα νεφρικά σωληνάκια ή στο λεπτό έντερο) καλούνται διαπερατά (leaky) ενώ αυτά τα επιθήλια όπου η κυτταρική δίοδος υπερισχύει καλούνται αποφρακτικά ή σφικτά (tight) επιθήλια (επί παραδείγματι σιελογόνοι αδένες, δέρμα αμφίβιων, ουροδόχος κύστη). Σε γενικές γραμμές, τα διαπερατά (leaky) επιθήλια ευθύνονται για μεγάλη επαναπορρόφηση ισοοσμωτικών διαλυμάτων και βρίσκονται πιο κεντρικά στο σώμα ενώ τα αποφρακτικά ή σφικτά (tight) επιθήλια είναι πιο εκλεκτικά στη διακίνηση ουσιών και βρίσκονται πιο περιφερικά τοποθετημένα στο σώμα.

ΔΙΑΧΥΣΗ

Διάχυση νοείται η τυχαία διακίνηση ουσιών, μόριο με μόριο, μέσα από χώρους που παρεμβάλλονται μεταξύ μορίων στη μεμβράνη, είτε σε συνδυασμό με πρωτεΐνη φορέα. Επιτελείται με τη δαπάνη κινητικής ενέργειας. Τα ιόντα διαχέονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα μόρια, καθώς επίσης και τα αιωρούμενα κolloειδή σωματίδια, τα οποία όμως κινούνται με πολύ μικρότερη ταχύτητα εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους. Διάχυση επιτελείται επίσης και δια της παρακυττάριας οδού μεταξύ των κυττάρων.

ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ

Η ενεργητική μεταφορά συνίσταται στη μεταφορά ιόντων ή άλλων ουσιών διαμέσου της μεμβράνης μέσω μιας πρωτεΐνης φορέα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα στο ενεργειακό πρηνές με τη δαπάνη επιπρόσθετης ενέργειας εκτός της ενεργητικής για την πραγματοποίηση της μετακίνησης.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΩΝ

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

Παράδειγμα αυτού αποτελούν τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Το συμπλήρωμα των μεταφορικών πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ψηκτροειδή παρυφή που βλέπει προς τον αυλό του λεπτού εντέρου ή του ουροφόρου σωληναρίου διαφέρει από τη σύσταση των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής μεμβράνης του κυττάρου. Οι στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν τη μίξη των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασεοπλευρικής όψης των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της πλευράς του αυλού, διατηρώντας έτσι την πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν τη δίοδο ύδατος και μικρών υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων. Έτσι, υπάρχουν δυο ειδών οδοί μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: μέσω των διακυτταρίων οδών, μέσα από τα κύτταρα και μέσω των παρακυτταρίων οδών ανάμεσα από τα κύτταρα.[119]

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν. Η διακίνηση από τις παρακυττάρια οδούς περιορίζεται στις στενές ή αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions), οι οποίες συνήθως βρίσκονται στην κορυφαία (apical) πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων.[120, 121] Η μεταφορά μέσω των παρακυτταρίων οδών θεωρούνταν παθητική κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή ωσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά ιόντων.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται και ενεργητικά.[122-125]

Η μεταφορά ουσιών κατα μήκους ενός επιθηλίου εξαρτάται από:

1. τη διαθέσιμη επιφάνεια (ποσότητα που μετακινήθηκε/μονάδα χρόνου=επιφάνεια X ροή)
2. το χρόνο επαφής στη διαθέσιμη επιφάνεια
3. ηλεκτροχημικό πρυνές που επηρεάζεται από τη ροή του αίματος και τη ροή της λέμφου
4. χαρακτηριστικά του επιθηλίου δηλαδή εάν πρόκειται για tight ή leaky επιθήλιο.

Τα χαρακτηριστικά των στενών ή αποφρακτικών συνδέσεων (tight junctions) καθορίζουν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του επιθηλίου καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η διαπερατότητα των ιόντων (ion permeability) τόσο μικρότερη είναι η διεπιθηλιακή διαφορά δυναμικού (trans-epithelial potential difference). Έτσι, για τα διαπερατά (leaky) επιθήλια η διεπιθηλιακή διαφορά δυναμικού είναι της τάξης των 0 – 5 mV ενώ για τα αποφρακτικά (tight) επιθήλια είναι της τάξης των 20 mV.

Το ηλεκτροχημικό αυτό πρυνές κυρίως στηρίζεται στη διακίνηση του Na^+ . Ωστόσο, νερό και Cl^- ακολουθεί παθητικά. Στα διαπερατά (leaky) επιθήλια γλυκόζη, αμινοξέα και φωσφορικά μπορούν να μεταφέρονται μαζί με το Na^+ . Επίσης, αντίθετη μεταφορά με H^+ ή συμμεταφορά με Cl^- και αντιμεταφορά με HCO_3^- .

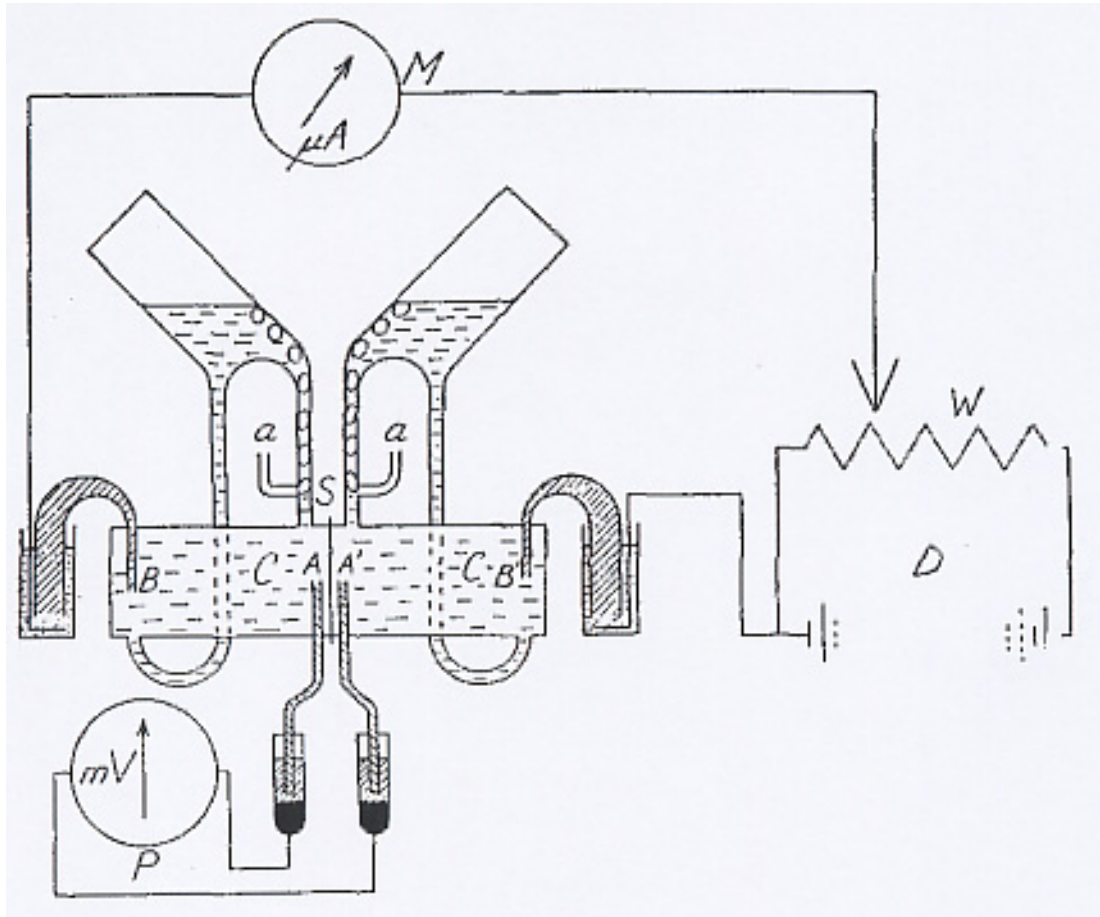
ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

ΜΕΘΟΔΟΣ USSING

Κλασική μέθοδος μελέτης της διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών αποτελεί η μέθοδος *Ussing*. [126] Πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Hans Ussing ο οποίος απέδειξε την λειτουργία αντλίας Na^+/K^+ και την ύπαρξη ενεργητικής μεταφοράς σε τμήματα δέρματος βατράχου. [126] Η πειραματική αυτή διάταξη (Εικόνα 4) μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της συμπεριφοράς φυσιολογίας και άλλων απομονωμένων επιθηλιακών ιστών. [126-128] Ο Ussing θεμελίωσε την εξής βασική αρχή διαπερατότητας των επιθηλίων:

δεν μπορεί να υπάρξει καμία διάχυση υγρού ή ηλεκτρολυτών κατά μήκος ενός επιθηλίου σε απουσία ηλεκτροχημικού πρηνούς. Κάθε τέτοια διακίνηση οφείλεται σε ενεργητική μετακίνηση.

Ο ιστός (δέρμα στις πρώτες μελέτες) τοποθετείται σαν επίπεδο στρώμα μεμβράνης που διαχωρίζει δυο χώρους – μπανάκια γεμάτα με Ringer's lactated. Το όλο σύστημα συνδέεται με μια αντλία. Μεταξύ των δύο χώρων δημιουργείται ένα πρηνές – διαφορά δυναμικού που μετράται με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων, που τοποθετούνται όσο το δυνατό πιο κοντά στον ιστό χωρίς όμως να τον ακουμπούν (Εικόνα 5). Η καταγραφή του δυναμικού γίνεται μέσω ενός μιλιβολτόμετρου. Το σύστημα επίσης είναι συνδεδεμένο με μια μπαταρία και ένα διαιρέτη τάσεως ώστε ρεύμα να μπορεί να χορηγηθεί εξωγενώς στον ιστό και να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων, που σε αντίθεση με τα άλλα τοποθετούνται όσο πιο μακριά γίνεται από τον ιστό.



Εικόνα 4: Διάγραμμα της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό ηλεκτρικών παραμέτρων σε δέρμα βατράχου από τον H. Ussing (Ussing HH et al, Ref. 162). C=αντλία, S=ιστός, a=είσοδοι για οξυγόνο, A and A'=ηλεκτρόδια για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού, B and B'=ηλεκτρόδια για την χορήγηση ρεύματος, D=μπαταρία, W=διαιρέτης τάσεως, M=μικροαμπερόμετρο, P=μιλιβολτόμετρο.

Η χορήγηση ρεύματος γίνεται αντίθετα στο πρηνές που δημιουργεί ο ιστός μέχρις ότου να μηδενισθεί η μετρούμενη τιμή. Αυτό αποτελεί το «μηδενισμό» του αυτόματου δυναμικού (nullification of the spontaneous potential difference) και ουσιαστικά χρησιμεύει στο μηδενισμό της παρακυττάριας οδού μετακίνησης ιόντων και η αφαίρεση της αντίστασης που δημιουργεί η παρουσία των ηλεκτροδίων αλλά και του υγρού με το οποίο γεμίζουν οι θάλαμοι του Ussing. Οποιαδήποτε διαφορά στο δυναμικό που μετράται στη συνέχεια οφείλεται στην ενεργητική μεταφορά μέσω

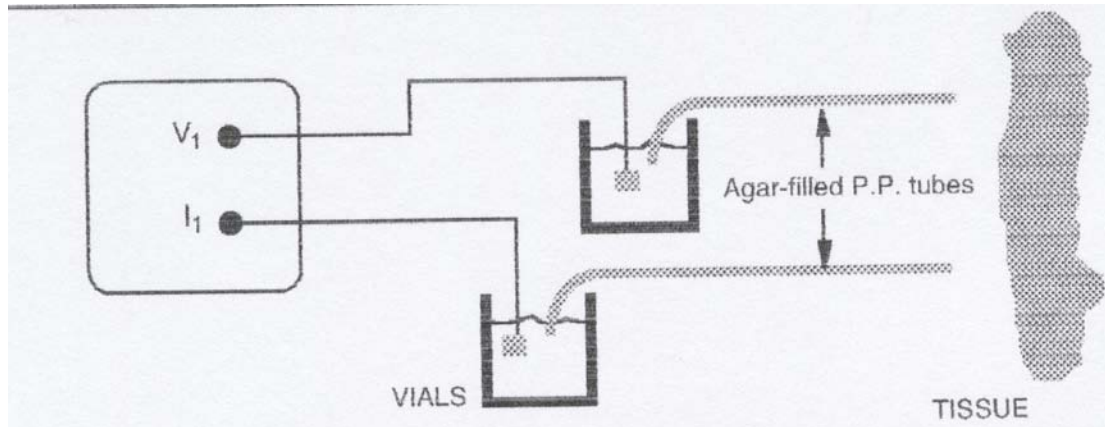
πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών μεταφορέων. Το όλο σύστημα θα μπορούσε να προσομοιαστεί σαν ένα σύστημα ηλεκτρικών αντιστάσεων συνδεδεμένων σε σειρά, με μια πηγή E στη θέση της πηγής χορήγησης ρεύματος. Επίσης, σε όλη την διάταξη εφαρμόζεται ο 2^{ος} νόμος του Kirchoff για κλειστό ηλεκτρικό κύκλωμα:

$E - I r - I R = 0$ δηλαδή κατά μήκος ενός κλειστού κυκλώματος που διαρρέεται από ρεύμα, το αλγεβρικό άθροισμα των διαφορών δυναμικού ($I x R$) είναι μηδέν.

Στην ουσία η συσκευή Ussing μετράει την αντίσταση της μεμβράνης με τη χρήση βολτόμετρου – αμπερόμετρου το οποίο όμως δεν προσδίδει απόλυτη ακρίβεια μιας και όλα τα βιολογικά υγρά, καλώδια, ηλεκτρόδια και τα λοιπά έχουν αντίσταση επομένως στη ουσία η όλη διάταξη πρόκειται για μια γέφυρα Wheatstone. Ωστόσο, η μηδένιση της αρχικής διαφοράς δυναμικού του ιστού και η μελέτη της μεταβολής στη συνέχεια της διαφοράς δυναμικού του ιστού, επιτρέπει τον καθορισμό της αντίστασης του ιστού με βάση βολτόμετρο – αμπερόμετρο δηλαδή με βάση τη χρήση του νόμου του Ωμ:

$R_x = V / I$ δηλαδή η αντίσταση ενός αγωγού ισούται με το λόγο της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται στα άκρα του αγωγού προς το ρεύμα που τον διαρρέει,

όπου στην περίπτωση του Ussing: V αποτελεί την μετρούμενη από τα ηλεκτρόδια διαφορά δυναμικού στην άκρη της μεμβράνης, I αποτελεί το ρεύμα που χορηγούμε κάθε φορά στον ιστό και είναι γνωστής έντασης και R_x η αντίσταση της μεμβράνης που αναζητούμε.



Εικόνα 5: Η τοποθέτηση του ιστού (tissue) γίνεται ως μονήρης στοιβάδα ιστού που διαχωρίζει δυο μανάκια. Τα ηλεκτρόδια (agar-filled P.P. tubes) που μετρούν τη διαφορά δυναμικού στα άκρα του ιστού βρίσκονται σε ικανή απόσταση από τον ιστό, το ίδιο και για τα ηλεκτρόδια που παρέχεται ρεύμα.

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

ΑΜΙΛΟΡΙΔΗ

Ο πιο ειδικός αναστολέας των διαύλων Na^+ είναι το διουρητικό φάρμακο αμιλορίδη.[129, 130] Αναστέλλει τη μεταφορά Na^+ γρήγορα και αναστρέψιμα. Η μεταφορά Na^+ ευαίσθητης στην αμιλορίδη μπορεί να διαχωρισθεί αυθαίρετα σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την ευαισθησία της αναστολής που προκαλεί η αμιλορίδη σε υψηλές εξωκυττάρειες συγκεντρώσεις Na^+ . [131] Η πρώτη κατηγορία περιέχει ειδικούς διαύλους Na^+ που αναστέλλονται από χαμηλές συγκεντρώσεις αμιλορίδης (μικρότερες από μM). Οι επιθηλιακοί διάυλοι Na^+ έχουν την υψηλότερη συγγένεια στην αμιλορίδη και το διουρητικό αυτό συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης γι' αυτούς τους διαύλους. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν συστήματα μεταφοράς ιόντων Na^+ που έχουν λίγο μικρότερη συγγένεια στην αμιλορίδη (αναστέλλονται από συγκεντρώσεις αμιλορίδης σε μM). Τα συστήματα αυτά είναι ουδέτερα και υπο φυσιολογικές συνθήκες ανταλλάσσουν ιόντα Na^+ με ιόντα H^+ . Επειδή ο βασικός ρόλος του συστήματος αυτού είναι η ρύθμιση του ενδοκυττάριου pH, ουσιαστικά βρίσκονται στις μεμβράνες όλων των κυττάρων. Η αμιλορίδη επίσης αναστέλλει την ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Η αναστολή του συστήματος αυτού απαιτεί συγκεντρώσεις αμιλορίδης σε mM. Αυτό το σύστημα μεταφοράς πρωταρχικά εμπλέκεται στην ενδοκυττάρια ομοιόσταση του Ca^{2+} και έχει βρεθεί σε διάφορα όργανα όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος και η υπόφυση.

ΟΥΑΜΠΑΪΝΗ

Η αντλία Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPάση) είναι αναπόσπαστο ένζυμο της μεμβράνης όλων των κυττάρων του οργανισμού. Στις περισσότερες περιπτώσεις αντλεί ιόντα K^+ μέσα στο κύτταρο, ενάντια στην ηλεκτροχημική κλίση συγκέντρωσης και με κατανάλωση ενέργειας από την υδρόλυση ενός μορίου ATP. Αυτή η άνιση άντληση κατιόντων κατά πλάτος της κυτταρικής μεμβράνης δημιουργεί ένα εξωτερικό ρεύμα που μεταφέρεται από τα ιόντα Na^+ . [132, 133] Ένας ειδικός αναστολέας αυτής της αντλίας είναι η ουαμπαΐνη. [134, 135]

ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα απλό και ασταθές μόριο υπό κανονικές συνθήκες. Συντίθεται από το αμινοξύ L-αργινίνη με τη βοήθεια ενός ενζύμου, της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). [136] Η αργινίνη μέσω της NOS μετατρέπεται σε NO και κιτρουλλίνη. Υπάρχουν τρεις γνωστοί υποτύποι της NOS. ο τύπος I (NOS I) εκφράζεται κυρίως στα νευρικά κύτταρα, με κύρια λειτουργία τη νευροδιαβιβαστική και η ενεργοποίησή της εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και καδμουλίνης. Ο τύπος II (NOS II) έχει περιγραφεί στα μακροφάγα και στα ηπατοκύτταρα, αλλά επίσης και σε νευρογλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος. Η ενεργοποίησή της είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και καλμοδουλίνης. Ο τύπος III (NOS III) ανακαλύφθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα οποία κυρίως εκφράζεται, αλλά έχει βρεθεί και σε νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ενεργοποίησή της εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και καλμοδουλίνης. [137]

Η ενδογενής παραγωγή του NO μπορεί να ανασταλλεί από διάφορα ανάλογα της L – αργινίνης που μπλοκάρουν τη δράση της NOS. Δύο από τους πιο συχνά

χρησιμοποιούμενους αναστολείς είναι η N^G – μόνο – μέθυλο – L – αργινίνη (L-NMMA) και ο N^O – νίτρο – L – αργινίνη – μέθυλο – εστέρας (L-NAME). Εκτός από τα ανάλογα της L – αργινίνης χρησιμοποιούνται και άλλες ουσίες όπως οι αναστολείς του Ca^{2+} και της καλμοδουλίνης, ουσίες που περιέχουν άζωτο και αναστολείς της BH_4 συνθάσης.

Η παραγωγή του NO μπορεί να επιτευχθεί με μια ποικιλία ουσιών που έχουν και κλινικές εφαρμογές σε αγγειοδιασταλτικά φάρμακα. Τυπικά παραδείγματα δοτών NO είναι το νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP), η νιφεδιπίνη και η S – νιτρόσο – N – ακετυλοπενικιλλαμίνη (SNAP).[138, 139]

Μερικές από τις λειτουργίες του NO είναι η ρύθμιση της αιματικής ροής και της αρτηριακής πίεσης, η χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και των λεμφαγγείων,[138, 139] η διακυττάρια επικοινωνία στο κεντρικό νευρικό σύστημα με ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης στους νευρώνες στόχους, η ρύθμιση μηχανισμών άμυνας μετά από έκθεση σε βακτηριδιακά προϊόντα και η ρύθμιση διακίνησης ιόντων.[140]

ΓΛΙΒΕΝΚΛΑΜΙΔΗ

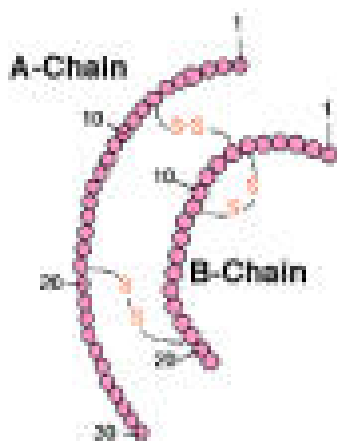
Η γλιβενκλαμίδα (glibenclamide) αποτελεί μέλος των σουλφινουριών και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II κυρίως. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους αποτελείται από την αναστολή των διαύλων καλίου που απαιτούν τριφωσφορική αδενοσίνη για τη λειτουργία τους ($K(ATP)$).[141] Αυτοί οι διάυλοι βρίσκονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη των β – παγκρεατικών κυττάρων και σχετίζονται με την έκκριση ή την αναστολή έκκρισης της ινσουλίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στον οργανισμό.[142, 143] Έτσι, όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα αυξάνει, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σε ATP

ευοδώνει το κλείσιμο των K(ATP) με αποτέλεσμα την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, την είσοδο ασβεστίου και την έκκριση ινσουλίνης. Το αντίθετο συμβαίνει στις περιπτώσεις όπου έχουμε ελάττωση της συγκέντρωσης γλυκόζης με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης. K(ATP) εμφανίζουν τμήματα που συνθέτονται από κανάλια καλίου που οδηγούν σε είσοδο καλίου (Kir) και υποδοχείς σουλφυλυουρίας (SUR) που αναστέλλονται από την γλιβενκλαμίδα.[144] Δυο γονίδια για τους SUR φαίνεται ότι υπάρχουν [145] όπως SUR1 που απαντούν στα β – παγκρεατικά κύτταρα και SUR2A που εμφανίζονται στις μυϊκές ίνες της καρδιάς και στους σκελετικούς μύες και SUR2B που εμφανίζονται στις λύες μυϊκές ίνες των αγγείων. Στα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι υπάρχει υψηλή ικανότητα σύνδεσης των σουλφυλυουριών με τον υποδοχέα τους.[146, 147] K(ATP) στα νεφρικά επιθήλια έχουν περιγραφεί [148] αλλά και σε άλλους ιστούς όπως νευρικά κύτταρα, λείες μυϊκές ίνες και αλλού. Τελευταία, παρατηρήθηκαν και K(ATP) στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων κυττάρων [149-151] που πέραν της αντιδιαβητικής δράσης του φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην βλάβη των κυττάρων που προκαλείται από ισχαιμία, όπου σε χαμηλές συγκεντρώσεις η γλιβενκλαμίδα είχε προστατευτικό ρόλο [152] ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οδήγησε σε καταστροφή των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων.

ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Γενικές έννοιες

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (M.B. 5808), που αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αλυσίδα A αποτελείται από 21 αμινοξέα ενώ η B από 30 αμινοξέα. Παράγεται από τα β – κύτταρα των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος. Η ινσουλίνη μόσχου και γουρουνιού διαφέρουν μόνο σε μερικά αμινοξέα από την ανθρώπινη ινσουλίνη και χρησιμοποιούνταν στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη μέχρι πρόσφατα οπότε και παράγεται ανθρώπινη ινσουλίνη με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA.



Εικόνα 6: Η αλληλουχία αμινοξέων της ινσουλίνης με τις δυο αλυσίδες A και B που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς.

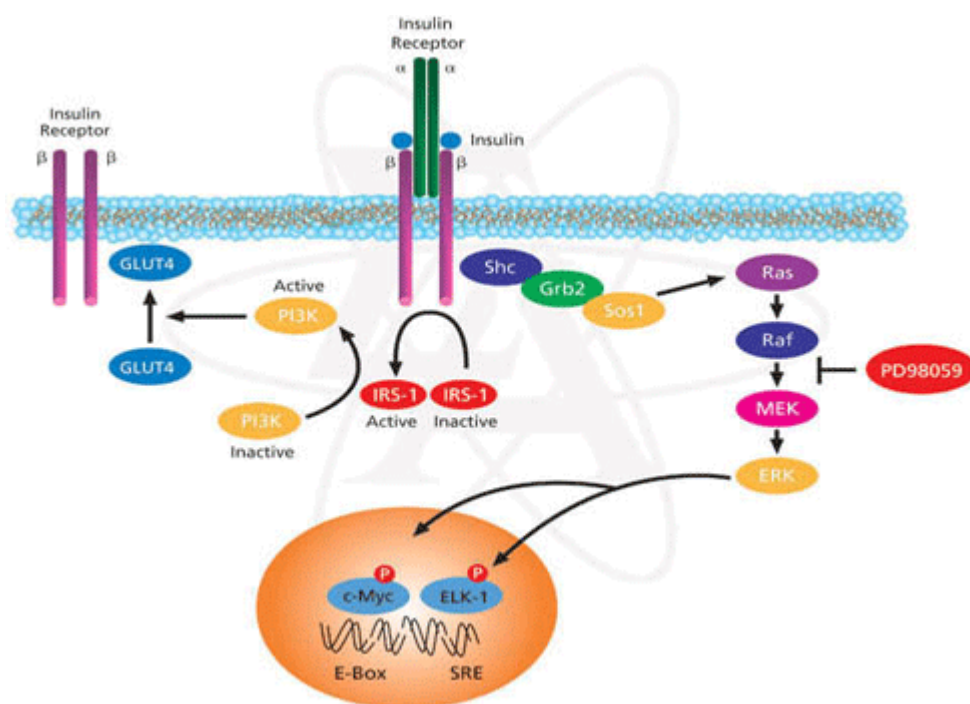
Η ινσουλίνη συντίθεται αρχικά ως προ-προϊνσουλίνη (M.B. 11.500) στα ριβοσώματα και κόβεται σύντομα στα σωμάτια Golgi μετά την παραγωγή της σε προ-ινσουλίνη (M.B. 9.000). Η προ-ινσουλίνη πακετάρεται σε κυστίδια και μετατρέπεται σε ινσουλίνη αφού αποκοπούν τα συνδετικά πεπτίδια ώσπου να συντεθούν οι δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B (Εικόνα 6). Η ινσουλίνη απελευθερώνεται από τα κύτταρα με εξωκύττωση ανάλογα με το σάκχαρο στο αίμα. Εκκρίνεται στην πυλαία φλέβα και φθάνει έτσι στο ήπαρ άμεσα. 50% περίπου της παραγωγής της

ανακυκλώνεται από το ήπαρ από την ινσουλινάση και άλλο ένα πολύ μικρό μέρος από τους νεφρούς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στο αίμα είναι μόλις λίγα λεπτά και επομένως εξαφανίζεται από την κυκλοφορία σε 10 – 15 λεπτά.

Η κύρια δράση της ινσουλίνης είναι να μειώνει το σάκχαρο στην κυκλοφορία του αίματος διευκολύνοντας την πρόσληψή της από τα μυϊκά κύτταρα και τον λιπώδη ιστό καθώς και ελαττώνοντας την παραγωγή από το ήπαρ. Στο ήπαρ η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη σύνθεση λίπους και γλυκαγόνου, ενώ καταστέλλει την αποικοδόμηση του γλυκαγόνου και την παραγωγή κετονικών σωμάτων. Στους μυς, ευοδώνει την πρόσληψη γλυκόζης και αμινοξέων, ευοδώνει τη σύνθεση γλυκαγόνου και πρωτεϊνών, ενώ στον λιπώδη ιστό ενεργοποιεί εκτός της πρόσληψης γλυκόζης και τη σύνθεση τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη ακόμη ευοδώνει την πρόσληψη K^+ , Mg^{2+} και φωσφορικών από τα κύτταρα (επομένως μειώνοντας τα επίπεδα K^+ στο αίμα). Οι επιδράσεις αυτές είναι ταχύτατες, συμβαίνουν εντός δευτερολέπτων από τη σύνδεση της ινσουλίνης με τους υποδοχείς της. Στα επόμενα 10 – 15 λεπτά επιτελείται μεταβολή του επιπέδου δραστηριότητας πολλών ενδοκυττάρων ενζύμων που έχουν σχέση με τον μεταβολισμό. Σε διάστημα ωρών ή ημερών επέρχονται μεταβολές στο ρυθμό μετάφρασης του αγγελιοφόρου RNA από τα ριβοσώματα για το σχηματισμό νέων πρωτεϊνών καθώς και ακόμη βραδύτερες μεταβολές στην αντιγραφή του DNA στον πυρήνα των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό η ινσουλίνη αναδιαμορφώνει ένα μεγάλο μέρος από τον ενζυμικό κυτταρικό μηχανισμό για να επιτύχει τους μεταβολικούς της στόχους.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η σύνδεση της ινσουλίνης στον ειδικό υποδοχέα της (M.B. 300.000) πάνω στην κυτταρική μεμβράνη ενεργοποιεί πολλά μεταβολικά γεγονότα και επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα του cAMP φαίνεται να μειώνονται μετά την σύνδεση της ινσουλίνης με τον

υποδοχέα της, ωστόσο συγκεκριμένο ενδιάμεσο προϊόν δεν έχει αναγνωρισθεί. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης αποτελείται από δύο υποομάδες α οι οποίες συνδέονται με την ορμόνη και δυο β υποομάδες οι οποίες εμφανίζουν δράση τυροσινικής κινάσης και συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Η πλήρως αυτοφωσφορυλιωμένη πλέον τυροσινική κινάση ενεργοποιεί – φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεϊνικές κινάσες: τυροσίνη, κινάση σερίνης – θρεονίνης, αλλά και πρωτεϊνικές φωσφατάσες οι οποίες ελέγχουν μεταβολικούς καταρράκτες που οδηγούν σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενζύμων κλειδιών (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα μερικών συμβάντων που ακολουθούν τη σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της.

Το αποτέλεσμα είναι η μετατροπή του μεταφορέα - πρωτεΐνη GLUT 4 από μία ενδοκυττάρια αποθήκη στην κυτταρική μεμβράνη και την είσοδο γλυκόζης στο κύτταρο. Η ινσουλίνη ακόμη ρυθμίζει αρνητικά τον υποδοχέα της ενεργοποιώντας την ενδοκυτταρική πρόσληψη και καταστροφή στα κύτταρα παίζοντας έτσι πιθανό

ρόλο στην ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη στους παχύσαρκους. Ο υποδοχέας ανακυκλώνεται εντός του κυττάρου ώστε να επαναπαρουσιασθεί στην επιφάνεια του κυττάρου.

Τα επίπεδα της ινσουλίνης αυξάνουν στο αίμα από το παρασυμπαθητικό, τη γλυκόζη, το γλυκαγόνο, την αργινίνη και φάρμακα όπως οι σουλφονουλορίες. Το συμπαθητικό και η σωματουλίνη ελαττώνει την έκκριση της ινσουλίνης. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει και η λεπτίνη.

Η φυσιολογική συγκέντρωση ινσουλίνης στον άνθρωπο είναι της τάξης των 5 – 25 IU/l ενώ στα πρόβατα 302.66 ± 49.01 pM.[153]

Επίδραση ινσουλίνης στα επιθήλια

Η δράση της ινσουλίνης στα επιθήλια έχει μελετηθεί διεξοδικά και κυρίως σε νεφρικά επιθήλια μιας και η ινσουλίνη θεωρήθηκε από πολύ παλιά ότι σχετίζεται μαζί με άλλες ορμόνες, όπως η αλδοστερόνη ή η αντιδιουρητική ορμόνη, με τη διακίνηση ηλεκτρολυτών και νερού από τους νεφρούς.

Από πολύ παλιά, η ινσουλίνη θεωρήθηκε ότι συμμετέχει στη διακίνηση Na^+ με μελέτες που έγιναν σε δέρμα αμφίβιων ή ουροδόχου κύστεως. [154, 155] Οι Cox και Singer [156] παρουσίασαν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η ινσουλίνη συμμετέχει στη διακίνηση του Na^+ σε ουροδόχους κύστες βατράχου. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η ινσουλίνη είναι αποτελεσματική μόνο εάν βρεθεί στον ορογόνο του οργάνου, ενώ η μεταφορά δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη μεταφορά της γλυκόζης. Η δράση της δε φαίνεται να σχετίζεται με cAMP ούτε οι μηχανισμοί της φαίνεται να είναι οι ίδιοι με αυτούς άλλων ορμονών όπως επί παραδείγματι της αλδοστερόνης.[157] Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η ινσουλίνη φαίνεται να ελαττώνει την περιεκτικότητα της κύστης σε Na^+ και επομένως δρα στην ορογόνο επιφάνεια

πιθανώς ενεργοποιώντας την αντλία Na^+/K^+ , δράση αντίθετη με της αλδοστερόνης η οποία φαίνεται ότι επιδρά στη βλεννογόνο επιφάνεια αυξάνοντας την περιεκτικότητα της κύστης σε Na^+ . Τέλος, φαίνεται ότι η συγκέντρωση K^+ στην ορογόνο επιφάνεια ρυθμίζει επίσης τη διακίνηση του Na^+ στην ουροδόχο κύστη. Με παρόμοιες τεχνικές και άλλοι ερευνητές έχουν καταδείξει τη διακίνηση Na^+ που ευοδώνεται από την ινσουλίνη.[158]

Η άποψη περί της δράσης της ινσουλίνης στα νεφρικά επιθήλια είναι ότι ως πρωτεϊνική ορμόνη εμφανίζει άμεσες επιπτώσεις στη διαπερατότητα μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα της στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων (basolateral membrane), ενώ το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της διαπερατότητας από την κορυφαία μεμβράνη (apical membrane) μέσω κυρίως της ενεργοποίησης των διαύλων Na^+ ευαίσθητων στην αμιλορίδη και όχι στην ενεργοποίηση Na^+/H^+ αντιμεταφορέων.[158-160] Οι Record et al [161] αποφάνθηκαν ότι πιθανότατα αυτή η επίδραση της ινσουλίνης γίνεται μέσω ενεργοποίησης του συστήματος της 3 – φωσφορικής κινάσης (3 PI – kinase) αλλά επίσης έδειξαν ότι και η φωσφορυλίωση μιας τυροσινικής κινάσης είναι απαραίτητη για τη δράση της ινσουλίνης.[157, 162] όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Με τη χρήση μιας μη επεμβατικής μεθόδου μέσω αναστολέων που προκαλούν ανάλυση του θορύβου (noise analysis blocker – induced) φαίνεται ότι η ινσουλίνη προκαλεί αυτή την δράση στην κορυφαία μεμβράνη μέσω αύξησης των διαύλων ευαίσθητων στην αμιλορίδη. Οι Marunaka et al δείξαν μια αύξηση στην πυκνότητα των ανοικτών διαύλων (open channel density) εντός 5 – 10 λεπτών από τη χορήγηση ινσουλίνης σε σειρές Α6 νεφρικών επιθηλίων.[163, 164] Δείξαν επίσης ότι η ινσουλίνη προκαλούσε αύξηση του κυτταρικού όγκου παρουσία ασβεστίου και καταλείξαν στην πρόταση ότι η ινσουλίνη παρουσία ασβεστίου ενεργοποιεί τους ευαίσθητους σε αμιλορίδη διαύλους Na^+ (amiloride – sensitive Na^+

channels) ενώ απουσία του ασβεστίου προκαλεί την ενεργοποίηση διαύλων K^+ ευαίσθητων σε κινίνη (quinine – sensitive K^+ channels).[164] Οι De Smet et al ωστόσο δείχναν ότι η προσθήκη της ινσουλίνης τελικά δεν απέφερε αύξηση του κυτταρικού όγκου σε σειρές A6.[165] Οι Erlj et al δείχναν ότι η ινσουλίνη προκαλούσε αύξηση των ανοιχτών διαύλων προς την κορυφαία μεμβράνη δυο ώρες από τη χορήγηση ινσουλίνης σε παρόμοιες κυτταρικές σειρές.[166] Οι Fidelman και Watlington πρότειναν το ότι η ινσουλίνη ευοδώνει και την παρακυττάρια διαπερατότητα του Na^+ εκτός της κυτταρικής αλλά αυτό το γεγονός είναι μόνο υποβοηθητικό στη συνολική διαπερατότητα του Na^+ .[167] Οι West και Blazer-Yost [168] συνέδεσαν ακόμη και το ποσοστό της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες σε σειρές νεφρικών κυττάρων A6 με τη διαπερατότητα του Na^+ . Οι Smet et al μελέτησαν την επίδραση της ινσουλίνης στις αντλίες Na^+/K^+ στην βασική μεμβράνη σειρών νεφρικών κυττάρων A6 και έδειξαν ότι η αύξηση της δραστηριότητας των αντλιών δεν οφείλεται στην αύξηση του αριθμού τους αλλά πιθανότατα στην αύξηση της ποσότητας Na^+ που παρουσιάζεται σε αυτές.[169] Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέλειξαν και οι Siegel και Civan οι οποίοι όμως θεώρησαν ότι η ινσουλίνη έχει και ευοδωτική δράση στις αντλίες Na^+/K^+ .[170]

Σε εξωνεφρικά επιθήλια, η ινσουλίνη φαίνεται ότι επιδρά στην αγγειοδιαστολή των αγγείων μέσω ενός μηχανισμού αγωνιστού που σχετίζεται με την ενεργοποίηση αντλιών Na^+/K^+ .[171, 172] Οι Sugahara et al έδειξαν μια αύξηση του δυναμικού διαφοράς των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II μετά την επίδραση ινσουλίνης σε αντίστοιχες σειρές κυττάρων [173] και οι Carstens et al σε ρινικά επιθήλια κουνελιών.[174] Επίσης, φαίνεται ότι η ινσουλίνη επιδρά σε κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των πρόβειων αεραγωγών προκαλώντας χάλαση μέσω ενός

δρόμου που σχετίζεται με παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου [175] όπως και στον λιπώδη ιστό.[176]

Η συμμετοχή της ινσουλίνης στη μετακίνηση γλυκόζης που αναπτύχθηκε πιο πάνω αφορούσε τη διευκολυνόμενη διάχυση της γλυκόζης (οικογένεια μεταφορέων GLUT). Ωστόσο, διάφοροι μελετητές ανέπτυξαν τη σκέψη της συνδυαστικής επίδρασης της ινσουλίνης στη διαπερατότητα ηλεκτρολυτών και γλυκόζης κατά μήκος επιθηλίων μέσω Na^+ -εξαρτώμενη μεταφορά γλυκόζης (οικογένεια μεταφορέων SGLT). Οι περισσότερες μελέτες αφορούν το εντερικό επιθήλιο.[177, 178] Παρόμοια συμμεταφορά Na^+ – γλυκόζης έχει ανευρεθεί ότι συμβαίνει και μέσω άλλων συστημάτων όπως της οικογένειας SLC5. [179]

ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΩΝ (INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 1, IGF – 1)

Γενικές έννοιες

Η αυξητική ορμόνη επιδρά στο ήπαρ και προκαλεί την παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους, που ονομάζονταν παλαιά σωματοδιαμεσίνες. Έχουν απομονωθεί τουλάχιστο 4 διαφορετικές σωματοδιαμεσίνες με σημαντικότερη τη σωματοδιαμεσίνη – C (M.B. 7.500) η οποία ακολουθεί πιστά τον ρυθμό έκκρισης της αυξητικής ορμόνης στο αίμα. Η κύρια δράση τους είναι μέσω παρακρινούς επίδρασης στα κύτταρα των ιστών αλλά και η δράση τους ως ορμόνη και εντοπίζεται σε έντονη μιτωτική επίδραση στους μυς και στα οστά. Ωστόσο, η σωματοδιαμεσίνη – C εξασκεί και επιδράσεις που ομοιάζουν με αυτές της ινσουλίνης για αυτό και ονομάστηκε ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων ή insulin growth factor ή insulin like growth factor (IGF ή ILGF). Παράγεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και σε έναν αριθμό άλλων οργάνων όπως επι παραδείγματι στους νεφρούς,[180] ακολουθώντας την

παραγωγή της αυξητικής ορμόνης. Παραδείγματα δράσης του IGF-1 αποτελεί η αύξηση της μάζας του σώματος, του βάρους των μυών, των οστών πχ της κνήμης, του θυρεοειδούς αδένου, του θύμου και του σπλήνα,[181] η αύξηση της αιμάτωσης των νεφρών και η αύξηση του ρυθμού διήθησης από τα σπειράματα των νεφρών.[182, 183] Η σωματοδιαμεσίνη – C συνδέεται με μια πρωτεΐνη του πλάσματος – φορέα (IGF binding protein) η οποία επίσης παράγεται από το ήπαρ αλλά και τους νεφρούς, με αποτέλεσμα να αποδίδεται με βραδύτητα στους ιστούς ενώ η ημίσεια ζωή της είναι περίπου 20 λεπτά. Η συγκέντρωση της IGF-1 είναι περίπου σταθερή στο πλάσμα και είναι της τάξης των 200 – 600 μg/ml. Υπάρχουν δύο υποδοχείς σύνδεσης των IGFs που εμφανίζουν συγγένεια σύνδεσης με τις αντίστοιχες IGF. Ωστόσο, οι IGF μπορούν να ενωθούν και με τους υποδοχείς της ινσουλίνης μιας και εμφανίζουν παρόμοια δομή με τους υποδοχείς των IGF. Έτσι, εξηγείται η εμφάνιση επιπλοκών από υπεργλυκαιμία πχ σε περιπτώσεις ακρομεγαλίας όπου ανευρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις του IGF-1.

Επίδραση IGF – 1 στη μετακίνηση ηλεκτρολυτών

Πέραν της δράσης του IGF-1 στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και μεταβολισμό των κυττάρων [184] φαίνεται ότι ασκεί επιδράσεις σε έναν αριθμό μεταφορέων ηλεκτρολυτών και μάλιστα διαμέσου διαφόρων οδών. Έτσι, στους νεφρούς ενεργοποιεί τη μεταφορά νατρίου που είναι ευαίσθητη στην αναστολή από αμιλορίδη [185, 186] και αυτό φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της PI3-K [187] από την βασική μεμβράνη των νεφρικών επιθηλίων. Επίσης, φαίνεται ότι ο IGF-1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των NHE στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια.[188] Εμπλέκεται επίσης στη διακίνηση του καλίου μέσω ρύθμισης των 70-ps διαύλων καλίου της βασικής μεμβράνης των

νεφρικών σωληναρίων άρα εμπλέκεται μέσω του ρόλου του αυτού και στη ρύθμιση της μετακίνησης του νατρίου.[189] Σε άλλους ιστούς, ενέχεται στη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου σε κύτταρα BALB/C 3T3,[190] σε κύτταρα νευρώνων ιπποκάμπου ποντικών,[191] σε κύτταρα μυοκαρδίου,[192, 193] ενώ ενεργοποιεί τις αντλίες Na^+/K^+ σε κύτταρα αστροκυττάρων,[194] σε κύτταρα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής [195] και σε ωοκύτταρα Xenopus.[196] Επίσης, εμπλέκεται και στη διακίνηση καλίου με αναστολή των διαύλων καλίου σε κύτταρα νευρώνων ιπποκάμπου και σε κύτταρα ωοκυττάρων Xenopus όπου ενεργοποιεί διαύλους καλίου ευαίσθητους σε γλιβενκλαμίδη.[197] Τέλος, ο IGF-1 εμφανίζει και παρακρινή δράση όπως προαναφέρθηκε για παράδειγμα σε T84 κύτταρα κόλου όπου αύξησε την μετακίνηση του νατρίου μέσω της παρακρινούς οδού [198] και σε κύτταρα μαστικού αδένου όπου μετέβαλε τα επίπεδα πρωτεϊνών των στενών – αποφρακτικών συνδέσεων (tight junctions).[199]

Ο ρόλος του IGF – 1 ενέχεται σε διάφορες διεργασίες του οργανισμού που αφορούν και σε μη φυσιολογικές λειτουργίες του (όπως αυτές αναφέρθηκαν παραπάνω) όπως για παράδειγμα η συμμετοχή του στη φλεγμονή και στην καρκινογένεση.[200-203] Ακόμη συμμετέχει λόγω των πολλαπλών δράσεών του στην παθογένεση πολλαπλών συστηματικών νοσημάτων.[202]

Όσον αφορά τον υπεζωκότα, ο ρόλος του IGF-1 ως προς την χρησιμοποίησή του στην κλινική πράξη ως δείκτη που θα βοηθήσει στη διάγνωση και επεξήγηση φαινομένων που σχετίζονται με την καρκινογένεση φαίνεται από τις προσπάθειες που καταβάλλονται προς την κατεύθυνση αυτή στη βιβλιογραφία.[204] Υπάρχουν αναφορές ότι ο IGF-1 ανευρίσκεται και στα υπεζωκοτικά υγρά ασθενών που πάσχουν από φλεγμονώδεις νόσους όπως για παράδειγμα συμβαίνει σε φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές αλλά και σε καρκινωματούδεις υπεζωκοτικές συλλογές.

Φαίνεται ότι στις υπεζωκοτικές αυτές συλλογές είναι δυνατό να αναγνωρισθεί ο IGF-1 η συγκέντρωση όμως του οποίου βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με τη συγκέντρωση στο αίμα αυτών των ασθενών και μάλιστα σε επίπεδα μικρότερα από τους μη ασθενείς.[205] Βέβαια, το τοπίο όσον αφορά τον IGF-1 παραμένει σκοτεινό καθώς με βάση την βιβλιογραφία που αναφέρθηκε και παραπάνω, σε άλλες αναφορές ο IGF-1 φέρεται ως αυξημένης συγκέντρωσης στην κυκλοφορία των ασθενών [109] αλλά και στα υπεζωκοτικά υγρά ασθενών με καρκινωμάτωσης υπεζωκοτικές συλλογές.[206, 207]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α': ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ

Συλλογή και προετοιμασία ιστού

Χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα πνευμονικού (σπλαχνικού) και τοιχωματικού υπεζωκότα που ελήφθησαν από πρόβατα ενήλικα, άρρενα και θήλεα. Η συλλογή των τοιχωματικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο χώρο του τοπικού νομαρχιακού σφαγείου, ενώ η λήψη των σπλαχνικών δειγμάτων από τον πνεύμονα έγινε στο εργαστήριο μετά από τη μεταφορά ολόκληρου του σφάγειου. Ο ιστός αμέσως μετά την λήψη από το σφαγείο, τοποθετήθηκε σε προ-οξυγονωμένο διάλυμα Krebs, το οποίο είχε ψυχθεί στους 4° C και μεταφέρθηκε εντός 30 λεπτών στο εργαστήριο μέσα σε ειδικό ψυγείο ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία στους 4° C. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην όσο το δυνατό μικρότερη επαφή με τον ιστό.

Μελέτες σε ιστούς τοιχωματικού [208, 209] και σπλαχνικού υπεζωκότα που απαιτούν αποκόλληση (stripping) του τεμαχίου από τον υποκείμενο πνεύμονα ή θωρακικό κλωβό και σε ιστούς που δεν απαιτούν αποκόλληση όπως ο μεσαυλιακός [210] υπεζωκότας έδειξαν ότι οι μεταβλητές μεταφοράς όπως επί παραδείγματι η υδραυλική αγωγιμότητα - μεταφορά (hydraulic conductivity) ήταν παρόμοια κάτι που σημαίνει ότι δεν μπορεί να επηρεάζεται ο παράγων τραύμα της αποκόλλησης του ιστού στην εξήγηση των αποτελεσμάτων.

Η σύνθεση του Krebs είναι: 117.5 NaCl, 1.15 NaH₂PO₄, 24.99 NaHCO₃, 5.65 KCl, 1.18 MgSO₄, 2.52 CaCl₂ και 5.55 γλυκόζη. Το pH του διαλύματος ήταν στο 7.45 ενώ στο διάλυμα διοχετευόταν συνεχώς αέριο μείγμα σύνθεσης 5% CO₂ – 95% O₂.

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ερευνήθηκαν για την ύπαρξη τρυπών, αίματος που παρέμεινε από την αποκόλληση ή ιστών που παρέμειναν όπως πνευμονικός ή λιπώδης ιστός. Η λήψη των δειγμάτων του σπλαχνικού υπεζωκότα έγινε από τους άνω και κάτω λοβούς. Η λήψη των δειγμάτων του τοιχωματικού υπεζωκότα έγινε από τις ανώτερες πλευρές (1^η-4^η), τις κατώτερες (8^η-12^η) και από το διάφραγμα.

Πειραματική διαδικασία

Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε ως μονήρης μεμβράνη (επίπεδο στρώμα) μεταξύ των δύο δεξαμενών – θαλάμων ενός συστήματος μελέτης Ussing (εικόνα 8). Στα άκρα των δύο δεξαμενών τοποθετήθηκαν δακτύλιοι από σιλικόνη εν είδει «Ο» (SYLGAR D Silicone – elastomer kit). Αυτή η μέθοδος βρέθηκε ότι ελαχιστοποιεί τη βλάβη που προκαλείται στον ιστό από την πίεση της αντλίας.[211] Κάθε δεξαμενή είχε σχήμα κωνικό με ολικό όγκο περίπου 20 ml. Η επιφάνεια του εκτεθειμένου ιστού είναι 1.43 cm². Εξαιτίας της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργητική μεταφορά των ιόντων, ο ιστός αφέθηκε να ισοροπήσει πριν από κάθε μέτρηση σε θερμοκρασία 37° C. Στην ίδια θερμοκρασία έγιναν και όλες οι μετρήσεις της διαφοράς δυναμικού. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων τα υγρά στις στήλες και στις δεξαμενές του Ussing οξυγονώνονταν συνεχώς με μείγμα αερίου 95% O₂ – 5% CO₂.

Η διαφορά δυναμικού στα άκρα του ιστού μετρήθηκε με ηλεκτρόδια (Εικόνα 9) Ag/AgCl (3M KCl, 3% Agar) τοποθετημένα σε απόσταση 3 χιλιοστών από τον ιστό ενώ η συνολική τους απόδοση ενισχύθηκε με τη χρήση ενισχυτή DVC – 3 (World Precision Instruments, input impedance 10¹²Ω).



Εικόνα 8: Η συσκευή τύπου Ussing DVC - 1000 (World Precision Instruments, Sarasota, USA) που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων.

Για να καθοριστεί η απόκριση του ιστού σε εξωγενή χορήγηση ρεύματος, συνεχές ρεύμα από γεννήτρια τύπου voltage – current clamp (DVC – 1000, World Precision Instruments) μέσω των προαναφερθέντων ηλεκτροδίων χορηγήθηκαν στον ιστό – μεμβράνη.



Εικόνα 9: Τύπος ηλεκτροδίων DVC – 3 που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επιτέλεση των πειραμάτων.

Δείγματα σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα τοποθετήθηκαν με τους τρόπους που αναφέρθηκαν παραπάνω στο σύστημα μελέτης Ussing. Η διαφορά δυναμικού (σε mV) στα άκρα της μεμβράνης (διαμεσοθηλιακή διαφορά δυναμικού, PD_{TM}) μετρήθηκε μετά από 1, 5, 10, 30, 60 και κάθε μισή ώρα για τις επόμενες 5 ώρες, σε 50 ιστούς (50 σπλαχνικούς και 50 τοιχωματικούς) χωρίς τη χορήγηση εξωγενούς ρεύματος. Στη συνέχεια χορηγούνταν ρεύμα με μεταβλητή ένταση ($0 - \pm 400 \mu A$) με θετική και αρνητική πόλωση και επαναμετρήθηκε η PD_{TM} . Η αντίσταση της μεμβράνης σε $\Omega \cdot cm^2$ (R_{TM}) υπολογίστηκε με βάση το νόμο του Όμ όπως περιγράφηκε στο Γενικό Μέρος. Τα πειράματα αυτά αποτελούν τα πειράματα αναφοράς (control) με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκαν οι συγκρίσεις με τα πειράματα των ορμονών.

Η επιφάνεια του υπεζωκότα που φυσιολογικά αντικρύζει την υπεζωκοτική κοιλότητα θα αναφέρεται ως μεσοθηλιακή επιφάνεια ή πλευρική επιφάνεια (mesothelial), ενώ η επιφάνεια που αντικρύζει το διάμεσο ιστό (θωρακικό κλωβό ή πνεύμονα) θα αναφέρεται ως διάμεση επιφάνεια ή εξωπλευρική επιφάνεια (interstitial). Αντίστοιχα, η μεμβράνη που αντικρύζει την υπεζωκοτική κοιλότητα θα

αναφέρεται ως *κορυφαία* μεμβράνη (basolateral membrane) ενώ η επιφάνεια που αντικρύζει το διάμεσο ιστό θα αναφέρεται ως *βασική* μεμβράνη (apical membrane).

Πειράματα με ινσουλίνη

Αρχικά οι μετρήσεις του PD_{TM} αφορούσαν υπεζωκότα που διαβρέχονταν και από τις δυο πλευρές μόνο από διάλυμα Krebs. Τριάντα λεπτά περίπου μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης γίνονταν μετρήσεις διαφοράς δυναμικού χωρίς και με παρουσία ρεύματος ($0 - \pm 400\mu A$). Σε μια σειρά πειραμάτων στη συνέχεια, διαλύματα ινσουλίνης συγκέντρωσης από $10^{-8}M$ έως $10^{-4}M$ προστέθηκαν προς την μεσοθηλιακή ($n=9$ πειράματα για κάθε συγκέντρωση) και τη διάμεση ($n=9$ πειράματα για κάθε συγκέντρωση) επιφάνεια τόσο του σπλαχνικού ($n=9$ πειράματα για κάθε συγκέντρωση) όσο και του τοιχωματικού ($n=9$ πειράματα για κάθε συγκέντρωση) υπεζωκότα προβάτου με τη χρήση διαφορετικού ιστού κάθε φορά. Με τις μετρήσεις αυτές διαμορφώθηκαν οι καμπύλες δόσης – απάντησης της ορμόνης. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 1, 5, 10 και 30 λεπτά από την προσθήκη. Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε με διαλύματα ινσουλίνης $10^{-5}M$ και αμιλορίδης $10^{-3}M$, ινσουλίνης $10^{-5}M$ και ουαμπαίνης $10^{-3}M$ και ινσουλίνης $10^{-5}M$ και N^{ω} -νίτρο-L-αργινίνη-μέθυλο-εστέρα (L-NAME) $10^{-3}M$, ώστε να διευκρινιστεί εάν η προσθήκη ινσουλίνης προάγει τη μετακίνηση ηλεκτρολυτών κατά μήκος του μεσοθηλίου και εάν το μονοξειδίο του αζώτου σχετίζεται με μια πιθανή δράση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα του προβάτου. Σε άλλη σειρά πειραμάτων, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η σύνδεση της ινσουλίνης στο μεσοθήλιο γίνεται αντιστρεπτά ή όχι, διαλύματα ινσουλίνης $10^{-7}M$ τοποθετήθηκαν στους θαλάμους και μετά το πέρας των τριάντα λεπτών τοποθετήθηκαν διαλύματα ινσουλίνης $10^{-5}M$ στον ίδιο θάλαμο. Σε άλλα πειράματα αντί των διαλύματων $10^{-7}M$ χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής διαλύματα

ινσουλίνης 10^{-5} M. Με τον τρόπο αυτό διευκρινίστηκε εάν το μεσοθήλιο μπορεί να ξαναντιδράσει σε μια δεύτερη διέγερση από τη ινσουλίνη, αφού πρώτα έχει αντιδράσει με την πρώτη φόρτιση. Ακόμη, πειράματα με ινσουλίνη 10^{-5} M και γλιβενκλαμίδα 10^{-3} M διενεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, ώστε να διευκρινιστεί εάν η ινσουλίνη δρα και μέσω διακίνησης καλίου ή σχετίζεται με τη δαπάνη ενέργειας ATP. Επίσης, πειράματα με Krebs χωρίς Ca^{2+} και ινσουλίνη 10^{-5} M διενεργήθηκαν με δύο τρόπους: πρώτον ο ιστός αφέθηκε για τουλάχιστο μια ώρα σε φυσιολογικό Krebs και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν από εκεί και ύστερα δεν περιείχαν Ca^{2+} και δεύτερον ο ιστός αφέθηκε σε διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} εξαρχής και τα διαλύματα της ινσουλίνης αποτελούνταν από Krebs με φυσιολογικό Ca^{2+} . Πειράματα με Krebs χωρίς γλυκόζη διενεργήθηκαν επίσης με παρόμοιο τρόπο, ώστε να διευκρινιστεί εάν οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν από την ινσουλίνη οφείλονται σε διακίνηση γλυκόζης και όχι ηλεκτρολυτών. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ινσουλίνη προωθεί την μετακίνηση καλίου πειράματα με Krebs χωρίς κάλιο επίσης διενεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο. Πειράματα με ιστούς που προετοιμάστηκαν σε διάλυμα ουαμπαΐνης και προσθήκη αμιλορίδης και ινσουλίνης επίσης διενεργήθηκαν ώστε να διευκρινιστεί εάν οι αντλίες νατρίου – καλίου ενεργοποιούνται απευθείας από την ινσουλίνη ή από την μετακίνηση του νατρίου. Στο ίδιο μήκος κύματος, πειράματα με Krebs 3mM νατρίου επίσης διενεργήθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο (δηλαδή δείγματα που προετοιμάστηκαν σε 3mM Na^+). Ακόμη, πειράματα σε pH 7.2 και προσθήκη ινσουλίνης πραγματοποιήθηκαν ώστε να αποσαφηνιστεί η δράση της ινσουλίνης σε περιβάλλον επιπλεγμένων υπεζωκοτικών συλλογών. Τέλος, πειράματα με ιστό από διαφορετικές ανατομικές περιοχές της υπεζωκοτικής κοιλότητας διενεργήθηκαν ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συγκεκριμένη περιοχή κατανομής της δράσης της ινσουλίνης. Όπως προαναφέρθηκε, ο αριθμός των πειραμάτων ήταν

εννιά (9) για κάθε σετ πειραμάτων, εννιά (9) για κάθε επιφάνεια του ιστού και εννιά (9) για κάθε πέταλο του υπεζωκότα. Οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν με βάση τις υψηλότερες ανασταλτικές επιδράσεις των ουσιών και με βάση τη βιβλιογραφία όπως αυτή αναφέρθηκε παραπάνω.

Οι συγκρίσεις έγιναν με τον ιστό που προέρχονταν από το ίδιο ζώο ώστε να αποφευχθούν τυχόν διαφορές που οφείλονται σε διαφορετικά ζώα. Επίσης συγκρίσεις διενεργήθηκαν μεταξύ σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα λόγω των ανατομικών διαφορών που εμφανίζουν τα δύο πέταλα μεταξύ τους.

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν πριν από κάθε πείραμα, θερμαίνονταν στους 37°C και οξυγονώνονταν συνεχώς. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποτελούν το μέσο όρο εννιά (9) διαφορετικών πειραμάτων.

Πειράματα με IGF – 1

Αρχικά οι μετρήσεις του PD_{TM} αφορούσαν υπεζωκότα που διαβρέχονταν και από τις δυο πλευρές μόνο από διάλυμα Krebs. Τριάντα λεπτά περίπου μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης γίνονταν μετρήσεις διαφοράς δυναμικού χωρίς και με παρουσία ρεύματος (0 - $\pm 400\mu A$). Σε μια σειρά πειραμάτων στη συνέχεια, διαλύματα IGF – 1 συγκέντρωσης από 1nM ($10^{-9}M$) έως 100nM ($10^{-7}M$) προστέθηκαν προς την μεσοθηλιακή (n=9 πειράματα για κάθε συγκέντρωση) και τη διάμεση (n=9 πειράματα για κάθε συγκέντρωση) επιφάνεια τόσο του σπλαχνικού (n=9 πειράματα για κάθε συγκέντρωση) όσο και του τοιχωματικού (n=9 πειράματα για κάθε συγκέντρωση) υπεζωκότα προβάτου με τη χρήση διαφορετικού ιστού κάθε φορά. Με τις μετρήσεις αυτές διαμορφώθηκαν οι καμπύλες δόσης – απάντησης της ορμόνης. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 1, 5, 10 και 30 λεπτά από την προσθήκη.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS V10.0 για Windows XP. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι (mean) διαμεσοθηλιακής αντίστασης R_{TM} σε $\Omega \cdot \text{cm}^2 \pm$ στατιστικό λάθος του μέσου όρου (standard mean error, SE). Άλλα αποτελέσματα εκφράζονται ως η καθαρή διαφορά της διαμεσοθηλιακής αντίστασης σε $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (net change R_{TM} , dR_{TM}) που υπολογίστηκε με την αφαίρεση του control R_{TM} από την R_{TM} σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε με τη χρήση του paired t – test και του student's t – test ή non – parametric tests όπου απαιτήθηκε. Η ύπαρξη σημαντικής στατιστικής διαφοράς θεωρήθηκε όταν $p < 0.05$.

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΙΣΤΟ

Συλλογή και προετοιμασία ιστού

Ακέραια τμήματα τοιχωματικού υπεζωκότα ελήφθησαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ανοικτή θωρακοχειρουργική επέμβαση ή σε Video Assisted Thoracoscopy (VATS) για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς με μάζα πνεύμονα. Ασθενείς που ανέπτυξαν υπεζωκοτική συλλογή πριν το χειρουργείο δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Επίσης, ασθενείς των οποίων τα προεγχειρητικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ήταν παθολογικά επίσης δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Πειράματα διενεργήθηκαν μόνο σε τοιχωματικό υπεζωκότα επειδή η λήψη σπλαχνικού οδηγεί σε αιμορραγία και διαφυγή αέρα που επιδεινώνει την μετεγχειρητική πορεία των ασθενών.

Πειραματική διαδικασία

Η μεταφορά, η προετοιμασία και η τοποθέτηση στην αντλία έγιναν με τον τρόπο που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον ιστό προβάτου. Ειδική μέριμνα δόθηκε στην απολύμανση της αντλίας μετά το πέρας των πειραμάτων.

Πειράματα με ινσουλίνη

Η συγκέντρωση ινσουλίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10^{-5} M κατόπιν των παρατηρήσεων στον ιστό προβάτου. Πριν διενεργηθούν τα πειράματα με ινσουλίνη, πειράματα με διαλύματα Krebs με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (1000mg, 100mg, 40mg, 0mg) διενεργήθηκαν ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος της γλυκόζης στη φυσιολογία του υπεζωκότα. Ξεχωριστά πειράματα με ουαμπαΐνη 10^{-3} M επίσης διενεργήθηκαν ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία αντλιών Na^+/K^+ στον ανθρώπινο υπεζωκότα. Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με την γκλιβενκλαμίδα 10^{-3} M. Παρόμοια πειράματα με αυτά του προβάτου όσον αφορά τους αναστολείς διαύλων ιόντων πραγματοποιήθηκαν και για τον ανθρώπινο υπεζωκότα.

Πειράματα με IGF – 1

Η συγκέντρωση IGF – 1 που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10nM (10^{-8} M) κατόπιν των παρατηρήσεων στον ιστό προβάτου.

Στατιστική ανάλυση

Παρόμοια όπως αναφέρθηκε για τους ιστούς προβάτου.

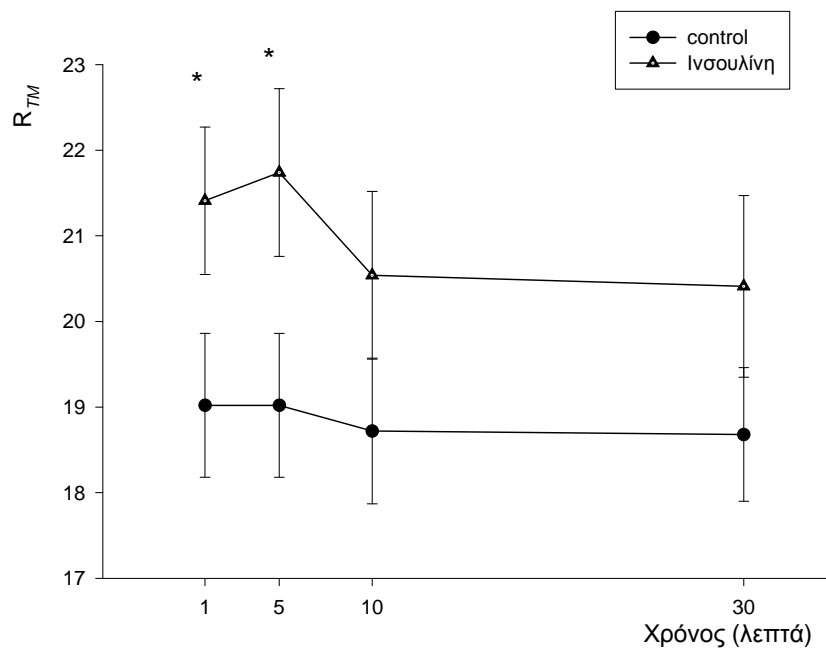
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α΄ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

ΜΕΡΟΣ 1^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

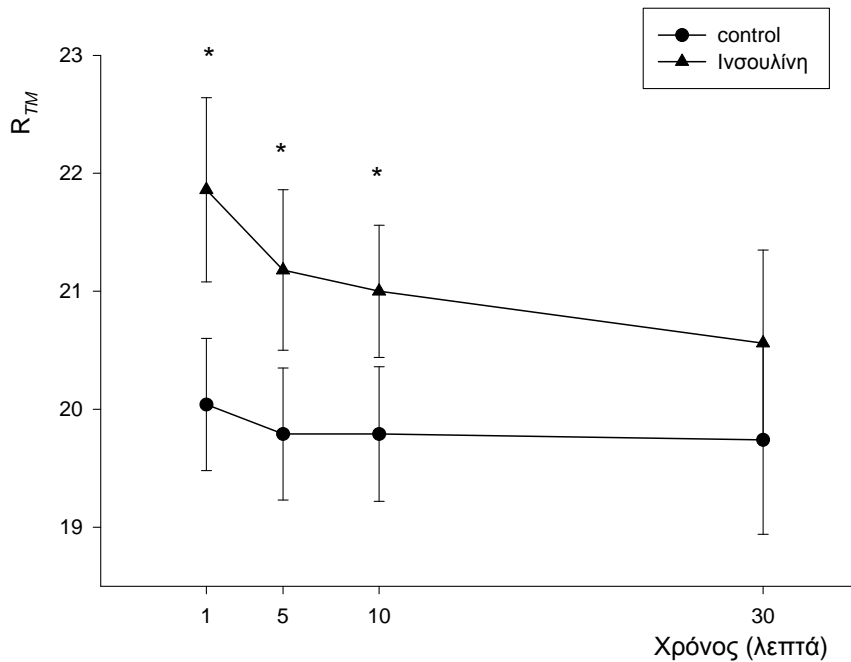
Τα επίπεδα αναφοράς – ιστός αναφοράς (control) για τα πειράματα που διενεργήθηκαν ήταν χαμηλά: $19.80 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για τον σπλαχνικό και $20.40 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για τον τοιχωματικό υπεζωκότα.

Η προσθήκη ινσουλίνης προκάλεσε αύξηση του PD_{TM} και της R_{TM} ταχύτητα, μέσα στο 1^ο λεπτό από την προσθήκη στην πλευρική επιφάνεια, παρέμεινε έως τα 10 λεπτά από την προσθήκη και επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς (control) μετά από 30 λεπτά από την προσθήκη.



*Διάγραμμα 1: Μεταβολή της R_{TM} κατόπιν προσθήκης ινσουλίνης $10^{-5}M$ στον σπλαχνικό υπεζωκότα προβάτου προς την πλευρική επιφάνεια. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.*

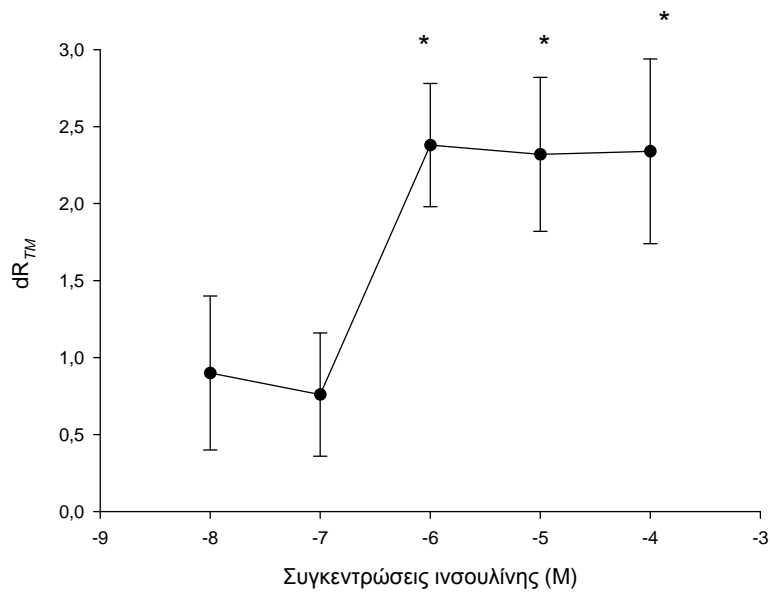
Η παρατήρηση αυτή αφορούσε κυρίως στην πλευρική (mesothelial) επιφάνεια των ιστών τόσο του σπλαχνικού (διάγραμμα 1) όσο και του τοιχωματικού υπεζωκότα (διάγραμμα 2).



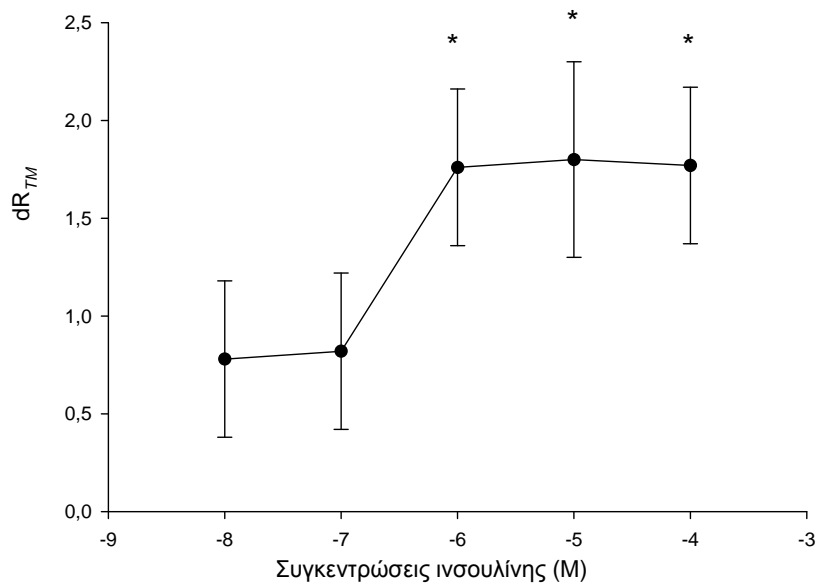
Διάγραμμα 2: Μεταβολή της R_{TM} κατόπιν προσθήκης ινσουλίνης $10^{-5}M$ στον τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου προς την πλευρική επιφάνεια. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

Η προσθήκη ινσουλίνης προς την εξωπλευρική (interstitial) επιφάνεια των ιστών δεν επέφερε μεταβολή του PD_{TM} και της R_{TM} .

Η παρατήρηση στην πλευρική επιφάνεια έγινε για συγκεντρώσεις ινσουλίνης 10^{-6} έως $10^{-4}M$. Για συγκεντρώσεις 10^{-8} και $10^{-7}M$ η αύξησή της ήταν μη σημαντική. Η γενικότερη αντίδραση του σπλαχνικού υπεζωκότα ήταν παρόμοια με του τοιχωματικού. Για τον σπλαχνικό υπεζωκότα η μέγιστη αύξηση της R_{TM} επήλθε στα 5 λεπτά από την προσθήκη των ουσιών. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 3 και 4, η προσθήκη διαλυμάτων ινσουλίνης στον σπλαχνικό υπεζωκότα ακολουθεί ένα μοτίβο σύνδεσης ορμόνης – υποδοχέα. Μέχρι την συγκέντρωση $10^{-7}M$ η αύξηση της R_{TM} δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σημαντική αύξηση της R_{TM} παρατηρήθηκε κατόπιν διαλυμάτων ινσουλίνης τουλάχιστο $10^{-6}M$, ενώ για πιο πυκνές συγκεντρώσεις έως την $10^{-4}M$ η αύξηση της R_{TM} ήταν παρόμοια, εμφανίζοντας πλατώ.



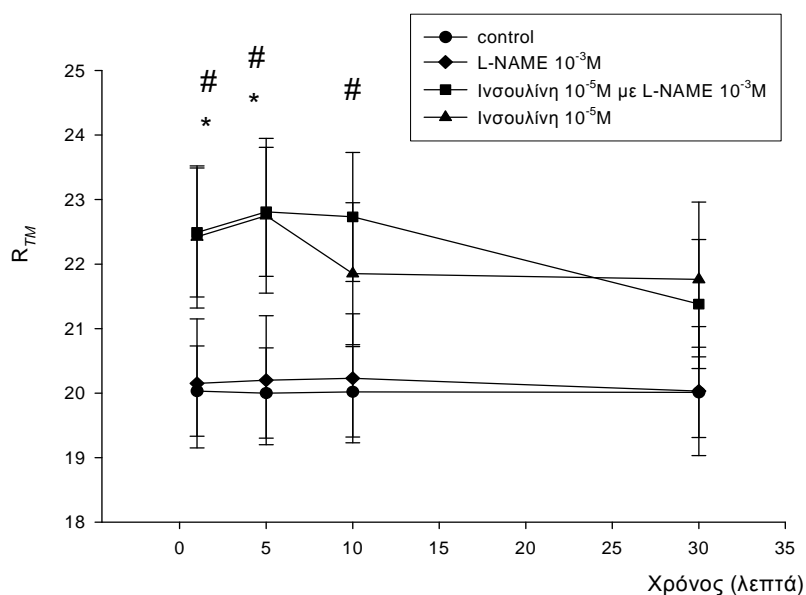
Διάγραμμα 3: Προσθήκη διαλυμάτων ινσουλίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με control



Διάγραμμα 4: Προσθήκη διαλυμάτων ινσουλίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

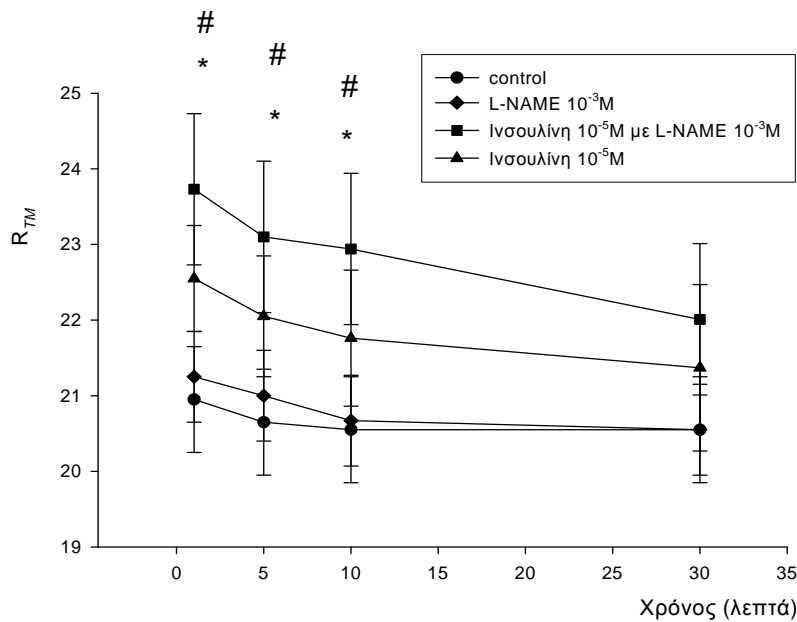
Το ίδιο μοτίβο ίσχυσε και για τα πειράματα του τοιχωματικού υπεζωκότα (διάγραμμα 4). Μεταξύ των συγκεντρώσεων 10^{-7} και 10^{-6} M αναγνωρίστηκε σημείο cut off (5×10^{-7} M) πάνω από το οποίο ο ιστός διεγέρθηκε σημαντικά από την ινσουλίνη.

Η προσθήκη ινσουλίνης με L-NAME αύξησε ξανά την R_{TM} με τρόπο παρόμοιο όπως συνέβη όταν προστέθηκε η ινσουλίνη μόνη της (διάγραμμα 5). Μάλιστα, η αύξηση της R_{TM} ήταν μεγαλύτερη από την αύξηση που προκλήθηκε από την προσθήκη της ινσουλίνης μόνη της αλλά χωρίς αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.



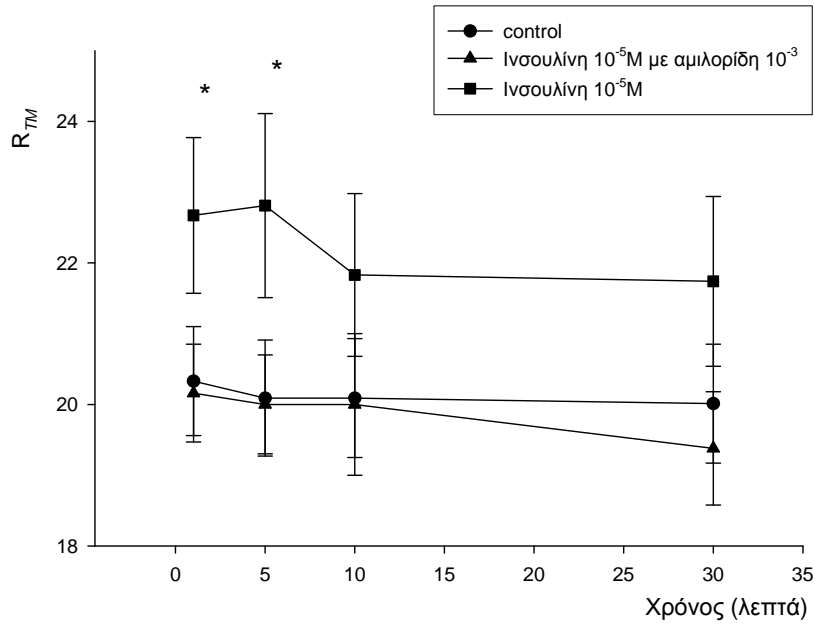
Διάγραμμα 5: Επίδραση του L-NAME 10^{-3} M στην δράση της ινσουλίνης 10^{-5} M στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης η επίδραση του L-NAME 10^{-3} M. * $p < 0.05$ ινσουλίνης σε σχέση με το control, # $p < 0.05$ της ινσουλίνης+L-NAME σε σχέση με το control.

Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα (διάγραμμα 6). Η προσθήκη μόνο L-NAME αύξησε ελάχιστα την R_{TM} σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 5 και 6.

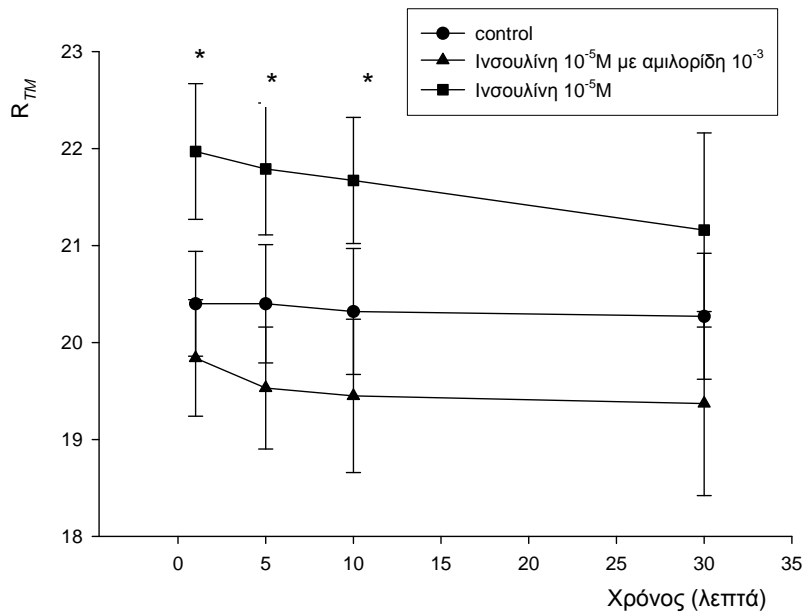


Διάγραμμα 6: Επίδραση του L-NAME $10^{-3}M$ στην δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης η επίδραση του L-NAME $10^{-3}M$. * $p < 0.05$ ινσουλίνης σε σχέση με το control, # $p < 0.05$ της ινσουλίνης+L-NAME σε σχέση με το control.

Η προσθήκη αμιλοριδής $10^{-3}M$ στα διαλύματα ινσουλίνης $10^{-5}M$ ανέστειλε την επίδραση της ινσουλίνης στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου που παρατηρήθηκε όταν η ινσουλίνη προσετέθη μόνη της. Η R_{TM} ελαττώθηκε άμεσα από το 1^ο λεπτό της συγχορήγησης ελάχιστα κάτω από το επίπεδο αναφοράς. Η R_{TM} ελαττώθηκε περαιτέρω στη συνέχεια με τη μέγιστη πτώση 30 λεπτά από τη χορήγηση του διαλύματος ινσουλίνης – αμιλοριδής όπως φαίνεται από το διάγραμμα 7 (χωρίς όμως η πτώση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική). Η ελάττωση αυτή ήταν παρόμοια για τον τοιχωματικό υπεζωκότα (διάγραμμα 8).

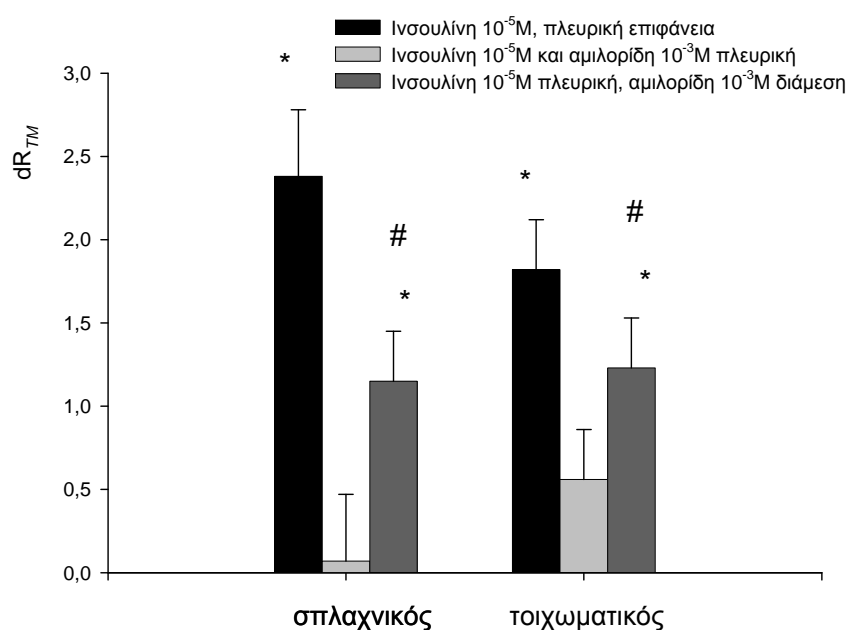


Διάγραμμα 7: Επίδραση αμιλοριδης $10^{-3}M$ στην δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. $*p < 0.05$ ινσουλίνης με το *control*.



Διάγραμμα 8: Επίδραση της αμιλοριδης $10^{-3}M$ στην δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. $*p < 0.05$ σε σχέση με το *control*.

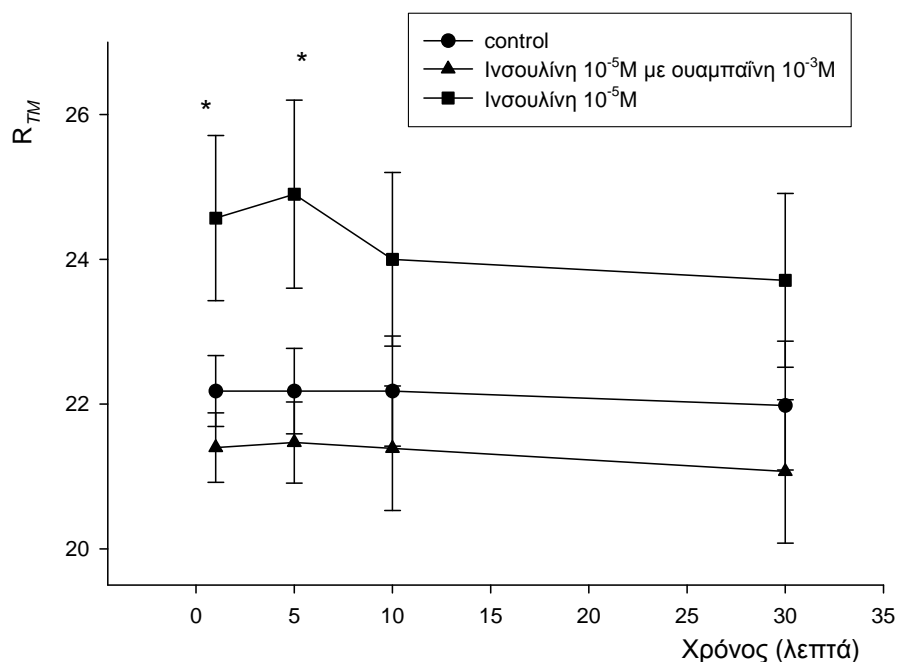
Η προσθήκη διαλύματος αμιλορίδης $10^{-3}M$ προς την εξωπλευρική επιφάνεια (interstitial) με χορήγηση ινσουλίνης $10^{-5}M$ προς την πλευρική επιφάνεια (mesothelial) δεν ανέστειλε τελείως την αύξηση της R_{TM} που προκλήθηκε από την ινσουλίνη από μόνη της. Ωστόσο, η εξάλειψη δεν ήταν πλήρης όπως παρατηρήθηκε όταν συγχορηγήθηκε ινσουλίνη με αμιλορίδη προς την ίδια επιφάνεια, όπως φαίνεται από το διάγραμμα 9. Η ίδια παρατήρηση έγινε για τον σπλαχνικό και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα.



Διάγραμμα 9: Επίδραση της αμιλορίδης $10^{-3}M$ στη δράση της ινσουλίνης 10^{-5} , στο 1° λεπτό όταν αυτή συγχορηγήθηκε μαζί με την ινσουλίνη προς την ίδια πλευρά του ιστού προβάτου (σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα) και όταν χορηγήθηκε προς την αντίθετη πλευρά του ιστού. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control. # $p < 0.05$ σε σχέση με την ινσουλίνη.

Η προσθήκη ουμπαΐνης $10^{-3}M$ στα διαλύματα ινσουλίνης $10^{-5}M$ ανέστειλε την επίδραση της ινσουλίνης στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα που παρατηρήθηκε όταν αυτή προσετέθη μόνη της. Η R_{TM} ελαττώθηκε άμεσα από το 1°

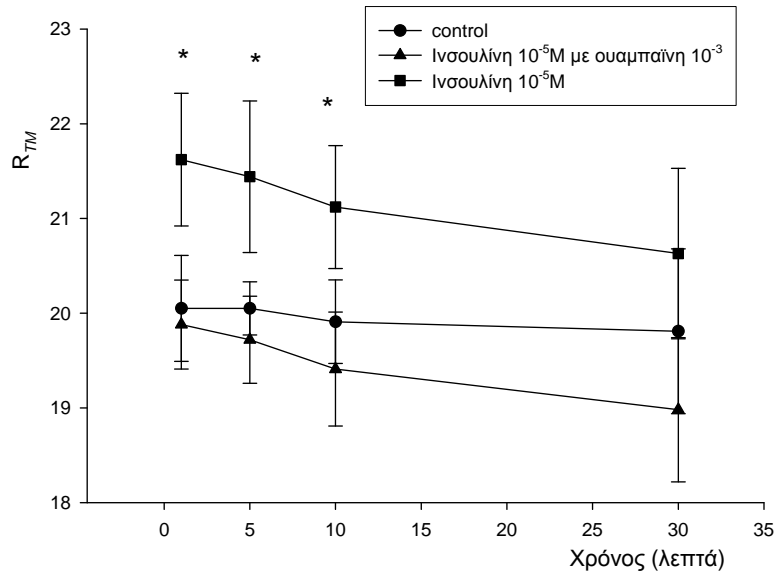
λεπτό της συγχορήγησης ελάχιστα κάτω από το επίπεδο αναφοράς (διάγραμμα 10). Η R_{TM} ελαττώθηκε περαιτέρω, όπως και με την αμιλορίδη, στη συνέχεια με τη μέγιστη πτώση 30 λεπτά από τη χορήγηση του διαλύματος ινσουλίνης – αμιλορίδης, χωρίς όμως η πτώση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.



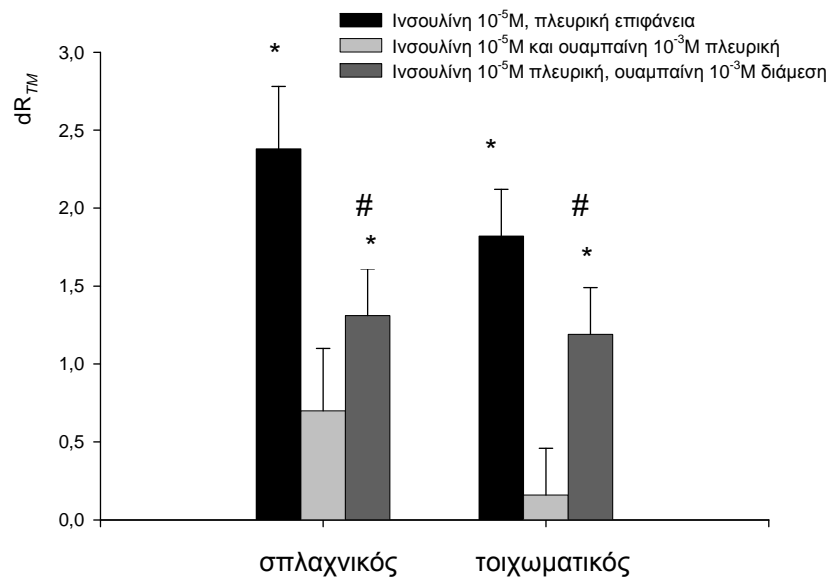
Διάγραμμα 10: Επίδραση της ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ στη δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα. * $p < 0.05$ ινσουλίνης σε σχέση με το control.

Η πτώση αυτή της R_{TM} δεν διέφερε στατιστικά από την πτώση που προκάλεσε η αμιλορίδη κατά τη συγχορήγηση με την ινσουλίνη.

Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και για την προσθήκη της ουαμπαΐνης στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα (διάγραμμα 11). Όπως και με την αμιλορίδη, η πτώση ήταν πιο εμφανής μετά το 10^ο λεπτό σε σχέση με τις παρατηρήσεις στον σπλαχνικό υπεζωκότα, με μέγιστη πτώση στο 30^ο λεπτό, χωρίς όμως να υπολογιστεί κάποια σημαντική στατιστική διαφορά.



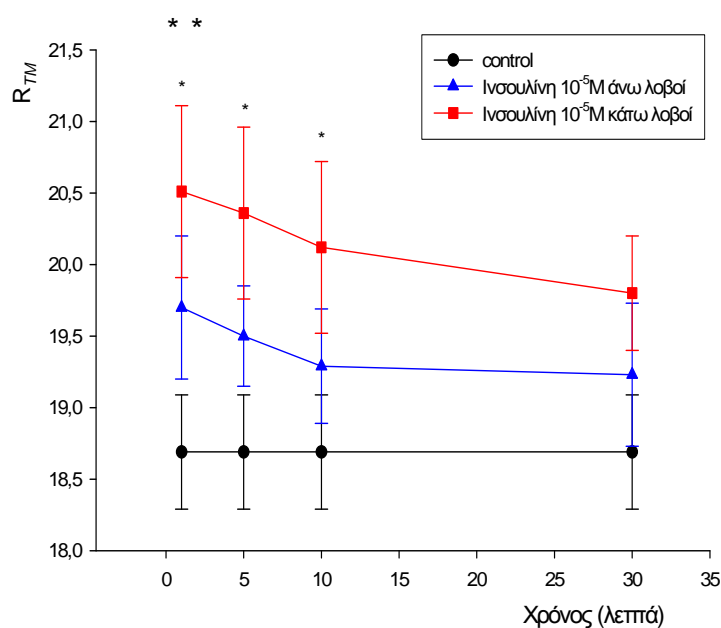
Διάγραμμα 11: Επίδραση της ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ στη δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.



Διάγραμμα 12: Επίδραση της ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ στη δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στο 1^ο λεπτό όταν συγχρονιγήθηκε με την ινσουλίνη προς την ίδια πλευρά (σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα) και όταν χορηγήθηκε προς την αντίθετη πλευρά του ιστού. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control. # $p < 0.05$ σε σχέση με την ινσουλίνη.

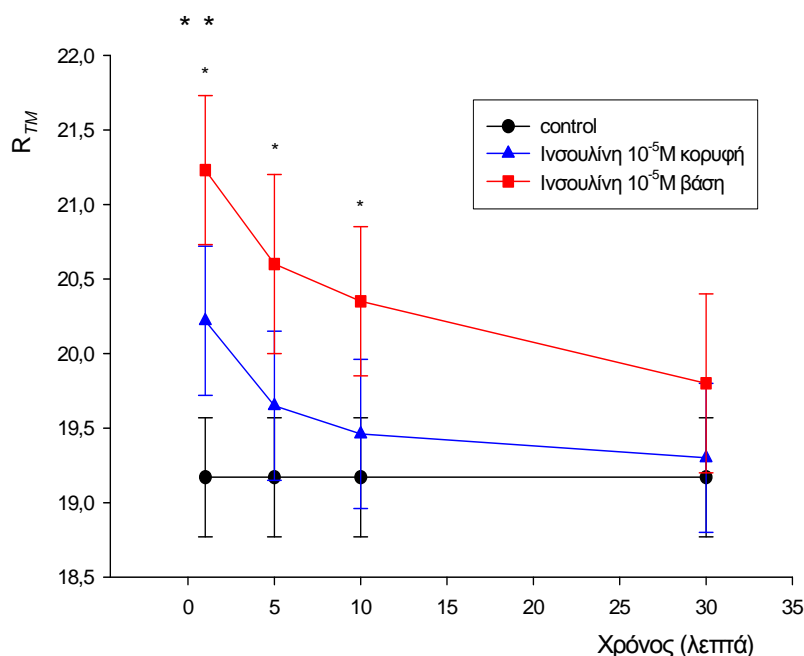
Η προσθήκη διαλύματος ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ προς την εξωπλευρική επιφάνεια με χορήγηση ινσουλίνης $10^{-5}M$ προς την πλευρική επιφάνεια δεν ανέστειλε τελείως την αύξηση της R_{TM} που προκλήθηκε από την ινσουλίνη από μόνη της. Ωστόσο, η εξάλειψη δεν ήταν πλήρης όπως παρατηρήθηκε όταν συγχορηγήθηκε ινσουλίνη με ουαμπαΐνη προς την ίδια επιφάνεια, όπως φαίνεται από το διάγραμμα 12. Η ίδια παρατήρηση έγινε και για τον σπλαχνικό και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα.

Η προσθήκη διαλυμάτων ινσουλίνης $10^{-5}M$ σε δείγματα σπλαχνικού υπεζωκότα από διαφορετικές περιοχές του, κατέδειξαν πιο μεγάλη αύξηση της R_{TM} στις περιοχές που προήλθαν από τους κάτω λοβούς σε σχέση με αυτούς των άνω λοβών (διάγραμμα 13).



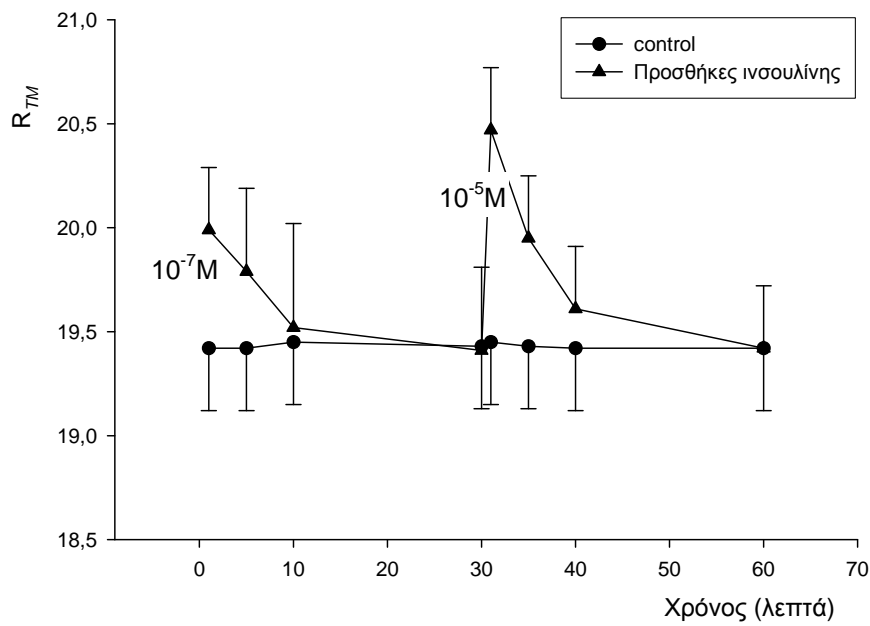
Διάγραμμα 13: Επίδραση ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια σε άνω και κάτω λοβούς του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. $*p<0.05$ σε σχέση με το control. $**p<0.05$ μεταξύ των κάτω και άνω λοβών.

Παρόμοια παρατήρηση έγινε και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα όπου η προσθήκη ινσουλίνης $10^{-5}M$ σε ιστό που προήλθε από τις πλευρές 8 – 12^η αύξησε την R_{TM} πιο πολύ σε σχέση με τους ιστούς που προήλθαν από τις πλευρές 1 – 5^η (διάγραμμα 14).

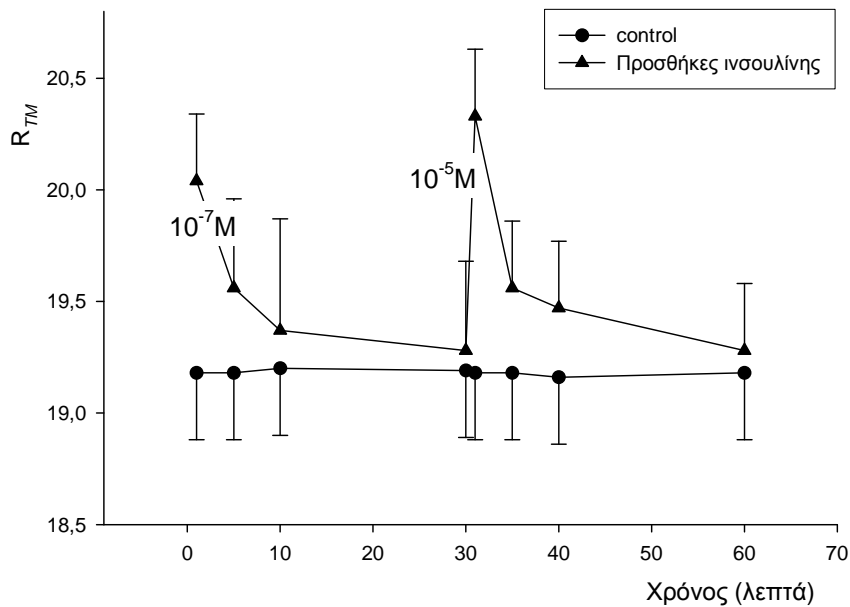


Διάγραμμα 14: Επίδραση ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια σε ανώτερες και κατώτερες περιοχές του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. $*p<0.05$ σε σχέση με το control. $**p<0.05$ μεταξύ των κάτω και άνω περιοχών.

Δεδομένης της παρατήρησης ότι η επίδρασή της ινσουλίνης σχετίζεται με πιθανή σύνδεση ορμόνης – υποδοχέα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με χορήγηση αρχικά χαμηλής συγκέντρωσης ινσουλίνης και στη συνέχεια πυκνής συγκέντρωσης. Έτσι, αρχικά προστέθηκαν διαλύματα ινσουλίνης συγκέντρωσης $10^{-7}M$ και έπειτα από μισή ώρα, οπότε η R_{TM} επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς, προστέθηκε διάλυμα ινσουλίνης $10^{-5}M$ στον ίδιο ιστό. Αρχικά η R_{TM} αυξήθηκε αλλά μη στατιστικά σημαντικά. Στη συνέχεια η προσθήκη ινσουλίνης $10^{-5}M$ δεν αύξησε την R_{TM} όπως θα αναμένετο (διαγράμματα 3, 4). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε για τον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου (διαγράμματα 15, 16).

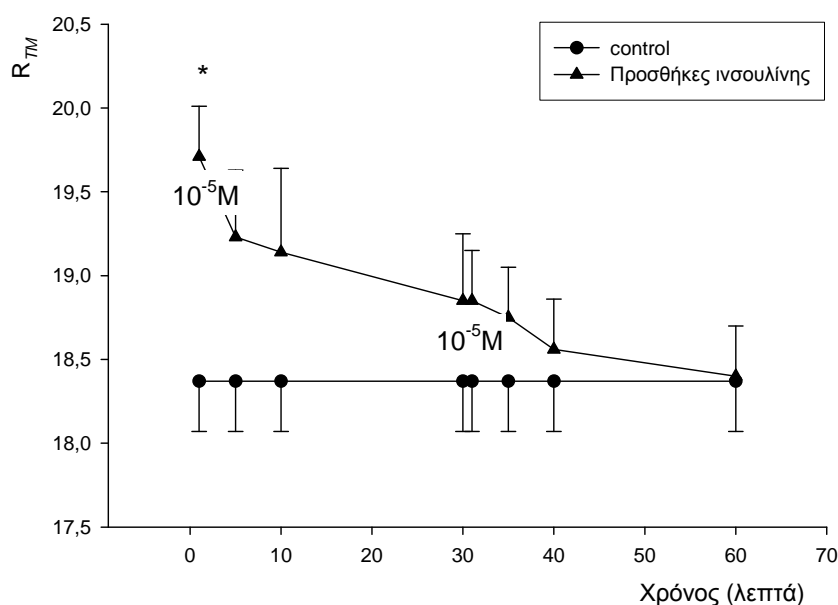


Διάγραμμα 15: Προσθήκη συγκεντρώσεων ινσουλίνης 10^{-7} και έπειτα $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου.



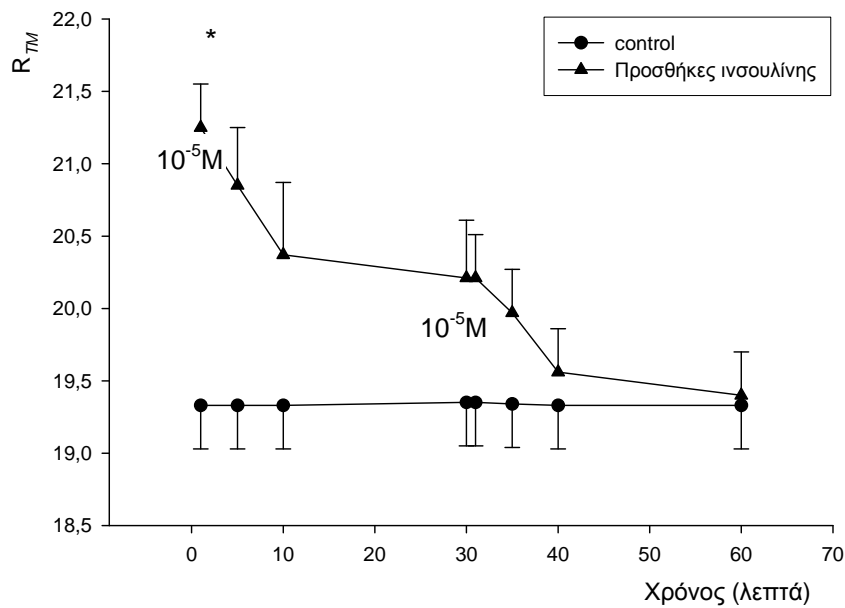
Διάγραμμα 16: Προσθήκη συγκεντρώσεων ινσουλίνης 10^{-7} και έπειτα $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.

Η χορήγηση αρχικά συγκέντρωσης ινσουλίνης $10^{-5}M$ επέφερε την αύξηση της R_{TM} που θα αναμένετο από τα διαγράμματα 3, 4. Ωστόσο, η προσθήκη ξανά διαλύματος ινσουλίνης $10^{-5}M$ στον ίδιο ιστό στη συνέχεια (διαγράμματα 17, 18), δεν επέφερε καμία περαιτέρω αύξηση της R_{TM} , παρά μείωση όπως αυτή παρατηρήθηκε στο τέλος των πειραμάτων στα διαγράμματα 1 και 2.



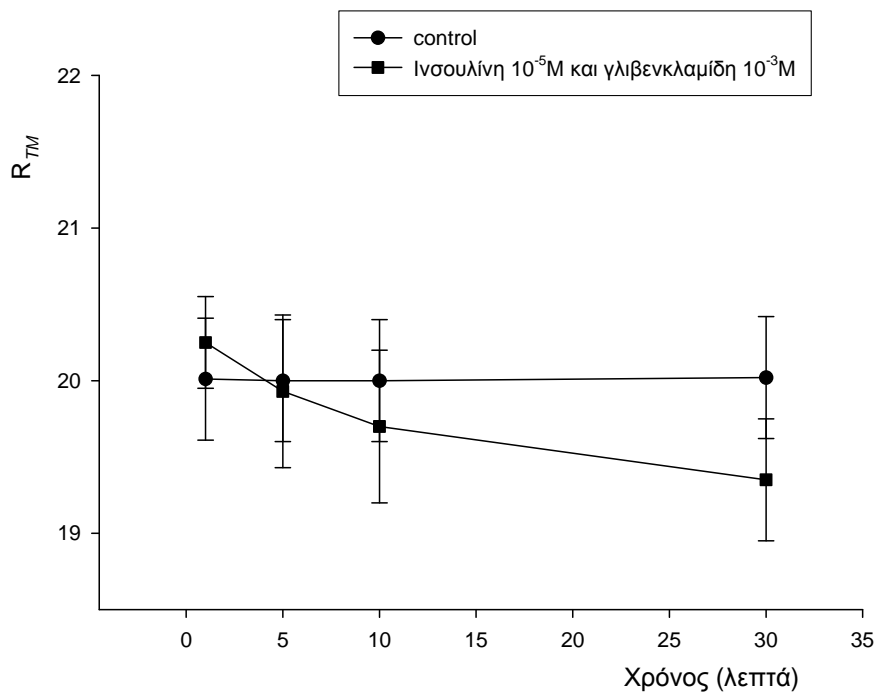
*Διάγραμμα 17: Προσθήκη συγκεντρώσεων ινσουλίνης 10^{-5} και έπειτα ξανά $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.*

Η R_{TM} μετά τη 2^η χορήγηση $10^{-5}M$ ινσουλίνης ήταν στατιστικά μικρότερη τόσο από την πρώτη χορήγηση όσο και από την αύξηση της R_{TM} που θα ανεμένετο να επιφέρει η χορήγηση ινσουλίνης $10^{-5}M$ όπως φαίνεται στα διαγράμματα 1 και 2.

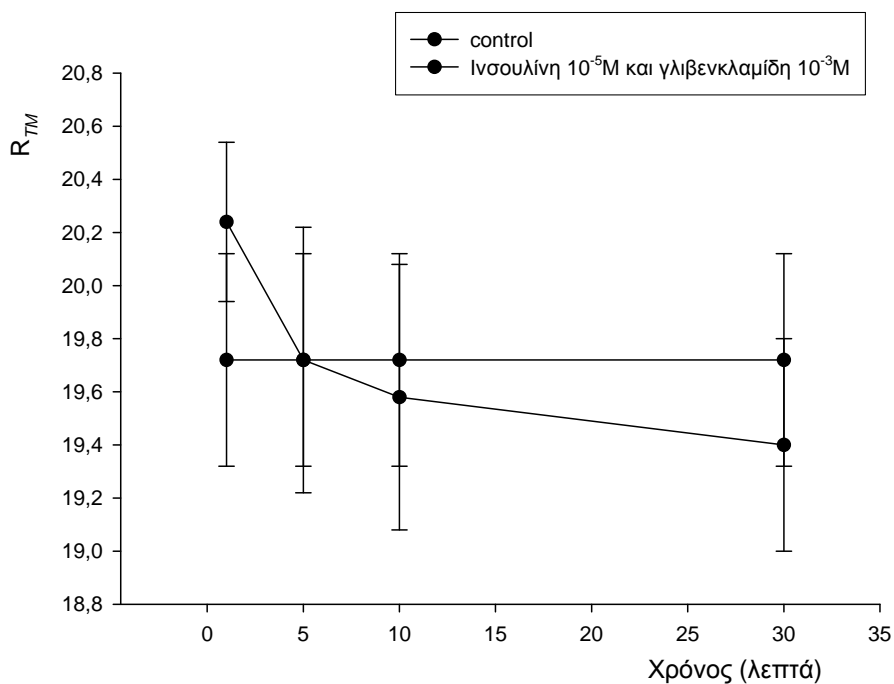


Διάγραμμα 18: Προσθήκη συγκεντρώσεων ινσουλίνης 10^{-5} και έπειτα ξανά $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. $*p<0.05$ σε σχέση με το control.

Η προσθήκη γλιβενκλαμίδης $10^{-3}M$ και ινσουλίνης $10^{-5}M$ είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή της επίδρασης της ινσουλίνης όταν αυτή προστέθηκε μόνη της στον υπεζωκότα προβάτου. Έτσι, μόνο μικρή αύξηση της R_{TM} παρατηρήθηκε η οποία ήταν πολύ μικρή και μη στατιστικά σημαντική, ενώ μετά από δέκα λεπτά από τη χορήγηση επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς και μάλιστα στο τέλος των μετρήσεων ήταν αρκετά χαμηλότερη από τα επίπεδα αναφοράς και μάλιστα οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0.06$). Η παρατήρηση αυτή έγινε τόσο για τον σπλαχνικό όσο και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα του προβάτου (διαγράμματα 19 και 20). Για τον τοιχωματικό υπεζωκότα η αύξηση στα πρώτα λεπτά ήταν μεγαλύτερη όχι όμως και στατιστικά σημαντική σε σχέση με την αύξηση του σπλαχνικού υπεζωκότα.

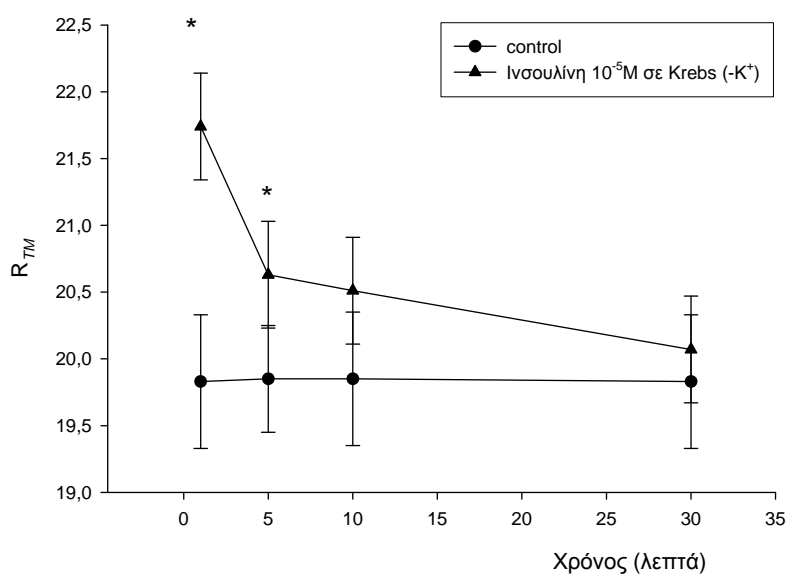


Διάγραμμα 19: Επίδραση ινσουλίνης $10^{-5}M$ με συγχορήγηση γλιβενκλαμίδης $10^{-3}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου.

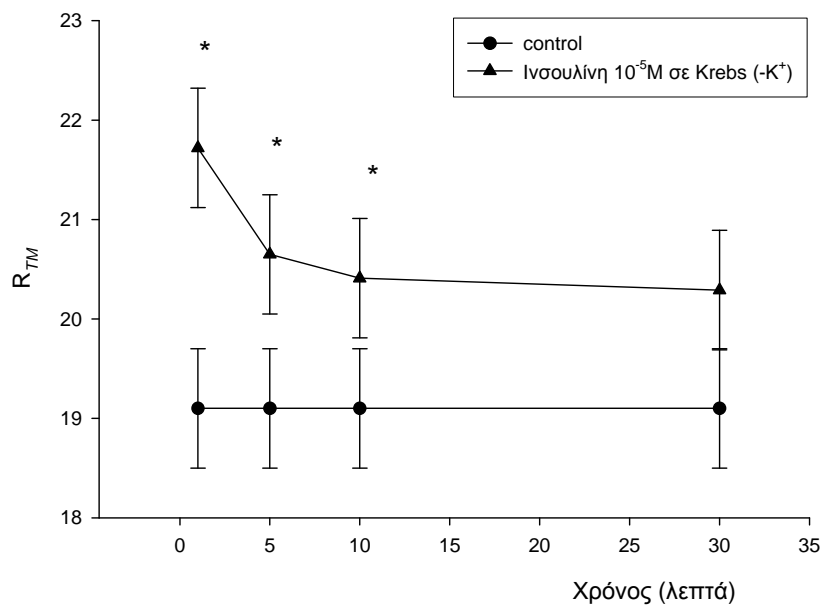


Διάγραμμα 20: Επίδραση ινσουλίνης $10^{-5}M$ με συγχορήγηση γλιβενκλαμίδης $10^{-3}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.

Στην προσπάθεια αποσαφήνισης εάν η ινσουλίνη επιδρά σε μεταφορείς και διαύλους καλίου ή σχετίζεται με ενεργοποίηση αυτών από μεταβολές των επιπέδων καλίου, διεξήχθησαν πειράματα με Krebs χωρίς κάλιο ((-K⁺)Krebs). Η ινσουλίνη έδρασε όπως θα αναμένετο από τα διαγράμματα 1 και 2. Η R_{TM} αυξήθηκε πάνω από τα επίπεδα αναφοράς σε όλα τα πειράματα με (-K⁺)Krebs τόσο για τον σπλαχνικό (διάγραμμα 21) όσο και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα (διάγραμμα 22). Στη συνέχεια η R_{TM} μειώθηκε και επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς μετά από 10 λεπτά από τη χορήγηση στον σπλαχνικό υπεζωκότα και πέραν των δέκα λεπτών για τον τοιχωματικό υπεζωκότα.



Διάγραμμα 21: Επίδραση της ινσουλίνης 10⁻⁵M στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου όταν αυτή χορηγήθηκε σε διάλυμα Krebs χωρίς προσθήκη καλίου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

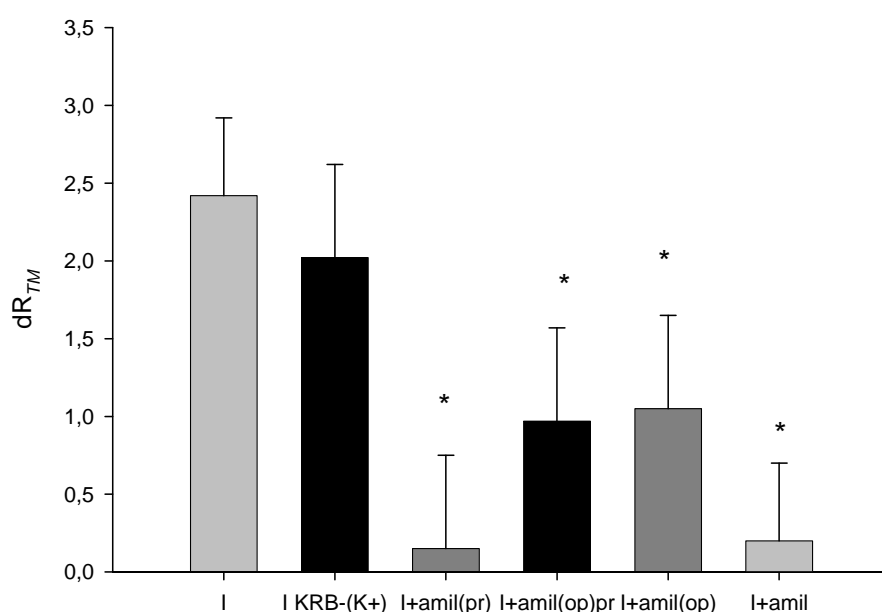


Διάγραμμα 22: Επίδραση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου όταν αυτή χορηγήθηκε σε διάλυμα Krebs χωρίς προσθήκη καλίου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

Για τον σπλαχνικό υπεζωκότα η αύξηση της R_{TM} ήταν στατιστικά παρόμοια με αυτή που θα αναμέναμε όταν η ινσουλίνη προστέθηκε μόνη της. Για τον τοιχωματικό υπεζωκότα, η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν μεγαλύτερη σε περιβάλλον χωρίς κάλιο σε σχέση με την προσθήκη της ινσουλίνης σε Krebs με κανονική συγκέντρωση καλίου.

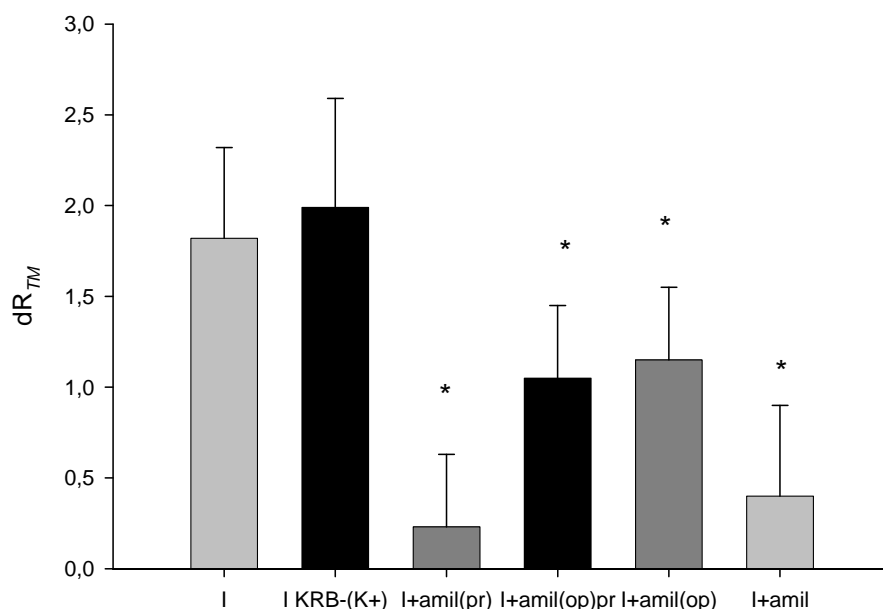
Δεδομένης της σημαντικότητας της διαμεσοθηλιακής δράσης της ινσουλίνης, στην προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η ινσουλίνη ενεργοποιεί απευθείας αντλίες, διεξήχθησαν πειράματα με ιστό που αφέθηκε σε Krebs με ουαμπαΐνη για τουλάχιστο μισή ώρα προ της έναρξης των πειραμάτων. Με τον τρόπο αυτό ανεστάλη η δράση των αντλιών Na^+/K^+ και στις δυο επιφάνειες του ιστού. Στη συνέχεια προσετέθη ινσουλίνη $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του ιστού μαζί με αμιλορίδη $10^{-3}M$ ώστε να ανασταλεί και η ενεργοποίηση των διαύλων νατρίου ευαίσθητα στην αμιλορίδη.

Χωρίς την ουαμπαΐνη, παρόμοια πειράματα οδήγησαν σε αναστολή της δράσης της ινσουλίνης. Και με ουαμπαΐνη το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο (διάγραμμα 23). Η προσθήκη ινσουλίνης πλευρικά και αμιλορίδης στην εξωπλευρική επιφάνεια σε ιστό που προετοιμάστηκε με ουαμπαΐνη, είχε ως αποτέλεσμα η ινσουλίνη να επιδείξει μερικώς την δράση της κάτι που είχε παρατηρηθεί και όταν η αμιλορίδη προστέθηκε στην αντίθετη επιφάνεια από την ινσουλίνη χωρίς την παρουσία ουαμπαΐνης. Επομένως, η ινσουλίνη ενεργοποιεί απευθείας και τις αντλίες νατρίου - καλίου ως απάντηση στις μεταβολές νατρίου που προκαλούνται από την ενεργοποίηση διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη και όχι μετά από μεταβολές της συγκέντρωσης καλίου στο μέσο που διαβρέχει τον ιστό.



*Διάγραμμα 23: Επίδραση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου και η μεταβολή αυτής μετά από προσθήκη διαλυμάτων Krebs χωρίς κάλιο, προσθήκη αμιλορίδης σύστοιχα και αντίθετα (op) από την προσθήκη της ινσουλίνης σε ιστό προετοιμασμένο (pr) και μη με ουαμπαΐνη, στο 1^o λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με την αύξηση που προκάλεσε η ινσουλίνη.*

Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και στα πειράματα του τοιχωματικού υπεζωκότα με μόνη τη διαφορά που προαναφέρθηκε (διάγραμμα 24).

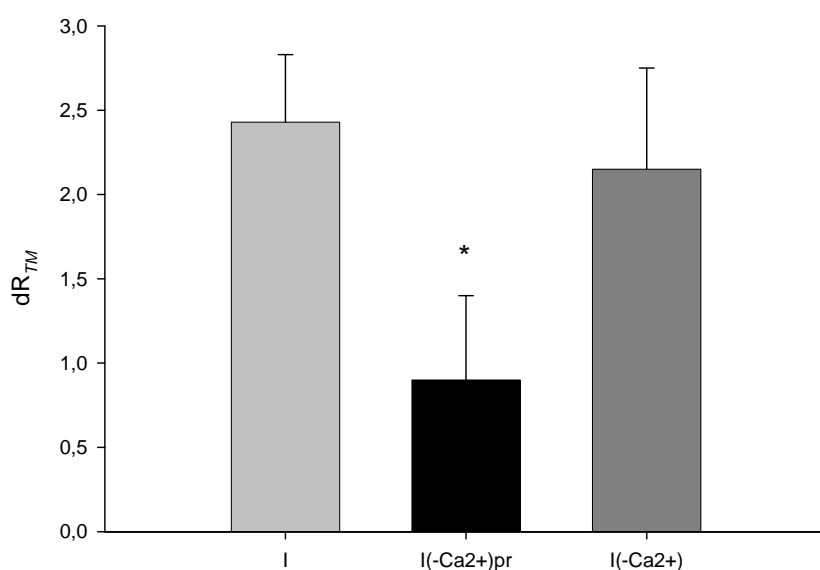


Διάγραμμα 24: Επίδραση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ (I) στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου και η μεταβολή αυτής μετά από προσθήκη διαλυμάτων Krebs χωρίς κάλιο, προσθήκη αμιλορίδης σύστοιχα και αντίθετα (op) από την προσθήκη της ινσουλίνης σε ιστό προετοιμασμένο (pr) και μη με ουαμπαΐνη, στο 1^ο λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με την αύξηση που προκάλεσε η ινσουλίνη.

Επίσης, καταφανές ήταν ότι στον υπεζωκότα η σημαντικότερη επιφάνεια που επηρεάζεται από την προσθήκη της ινσουλίνης ήταν η πλευρική (μεσοθηλιακή) παρά η εξωπλευρική (διάμεση). Έτσι, όταν η αμιλορίδη προστέθηκε στο μέσο που διαβρέχει την διάμεση επιφάνεια η ινσουλίνη επέδειξε σημαντική δράση ενώ όταν η αμιλορίδη προστέθηκε σύστοιχα με την ινσουλίνη η δράση αυτή εξαλήφθηκε. Βέβαια και στην πρώτη περίπτωση η δράση ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή που προκάλεσε η ινσουλίνη όταν προστέθηκε μόνη της που σημαίνει ότι απαιτείται διαμεσοθηλιακή μετακίνηση νατρίου προς τον ιστό με κύρια πηγή το νάτριο της

υπεζωκοτικής κοιλότητας. Η προφανής συνέχεια έγκειται σε ενεργοποίηση νέων αντλιών νατρίου – καλίου αλλά και διαύλων καλίου (πειράματα γλιβενκλαμίδης) ώστε να επαναϊσορροπήσουν οι μεταβολές που επήλθαν.

Η συμμετοχή του ασβεστίου στη δράση της ινσουλίνης μελετήθηκε επίσης με πειράματα κατά τα οποία το Krebs που διέβρεχε την επιφάνεια δράσης της ινσουλίνης δηλαδή την πλευρική επιφάνεια δεν περιείχε ασβέστιο (διάγραμμα 25).

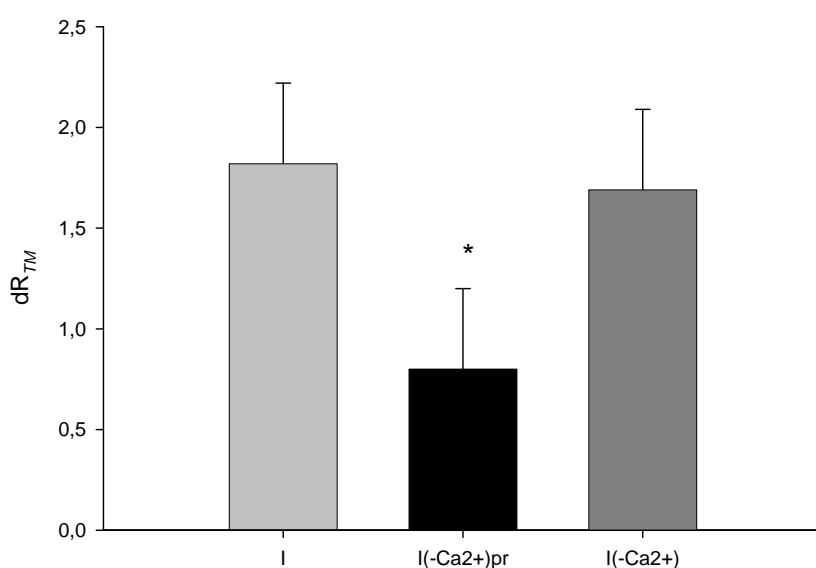


*Διάγραμμα 25: Επίδραση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ (I) στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου και η μεταβολή της από την απουσία ασβεστίου σε προετοιμασμένους με Krebs χωρίς ασβέστιο ιστούς (-Ca²⁺pr) και με φυσιολογικό Krebs (-Ca²⁺), στο 1^ο λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με την αύξηση της ινσουλίνης (I) μόνη της.*

Παρόμοιες μετρήσεις διενεργήθηκαν για ιστούς που προετοιμάστηκαν σε φυσιολογικό Krebs, που περιείχε δηλαδή ασβέστιο και σε Krebs που δεν περιείχε ασβέστιο για τουλάχιστο μια ώρα πριν την έναρξη των πειραμάτων. Η ινσουλίνη είχε την αναμενόμενη δράση της στα πειράματα που οι ιστοί προετοιμάστηκαν με

φυσιολογικό Krebs αλλά η δράση της ανεστάλη τμηματικά όταν οι ιστοί προετοιμάστηκαν με Krebs χωρίς ασβέστιο (η αύξηση της R_{TM} που προκάλεσε η προσθήκη ινσουλίνης ήτανε στατιστικά μεγαλύτερη από τα επίπεδα αναφοράς αλλά μικρότερη από την αύξηση της R_{TM} που θα αναμένετο από την προσθήκη της ινσουλίνης μόνη της).

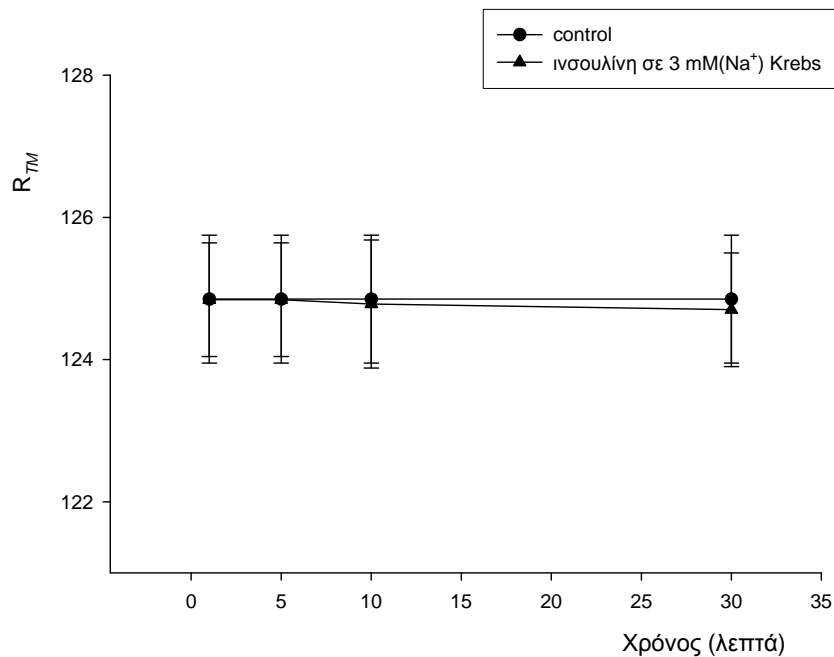
Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα (διάγραμμα 26).



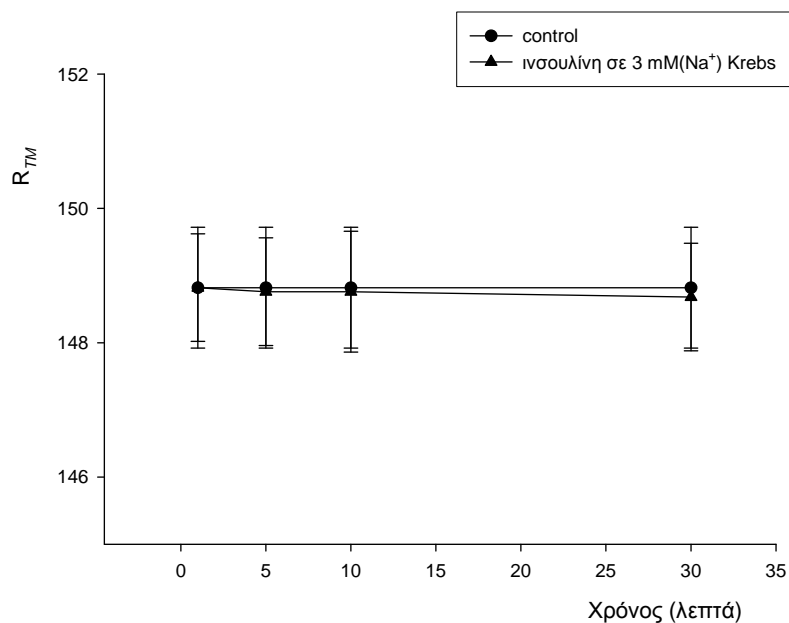
*Διάγραμμα 26: Επίδραση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ (I) στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου και η μεταβολή της από την απουσία ασβεστίου σε προετοιμασμένους με Krebs χωρίς ασβέστιο ιστούς (-Ca²⁺pr) και με φυσιολογικό Krebs (-Ca²⁺), στο 1^ο λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με την αύξηση της ινσουλίνης (I) μόνη της.*

Προκειμένου να αποσαφηνισθεί εάν η μετακίνηση του νατρίου είναι εκείνη που ενεργοποιείται πρωτίστως από την ινσουλίνη, πειράματα με ιστό που προετοιμάστηκε σε 3mM Na⁺ Krebs για τουλάχιστο μια ώρα προ της έναρξης των πειραμάτων διεξήχθησαν. Η ινσουλίνη ($10^{-5}M$) προστέθηκε προς την επιφάνεια

μέγιστης δράσης της (πλευρική επιφάνεια ή κορυφαία μεμβράνη) σε Krebs 3mM Na⁺, δηλαδή 0.15gr NaCl (διάγραμμα 27 και 28).



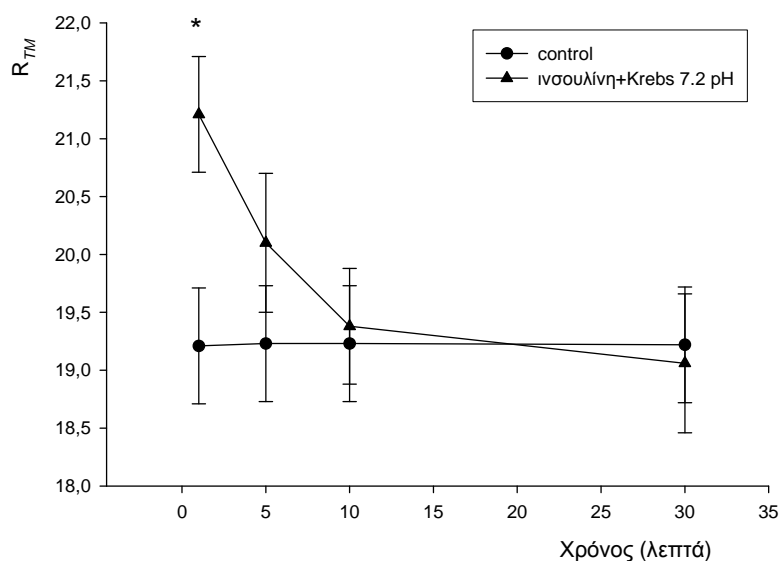
Διάγραμμα 27: Επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης νατρίου (3mM) στη δράση της ινσουλίνης στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου.



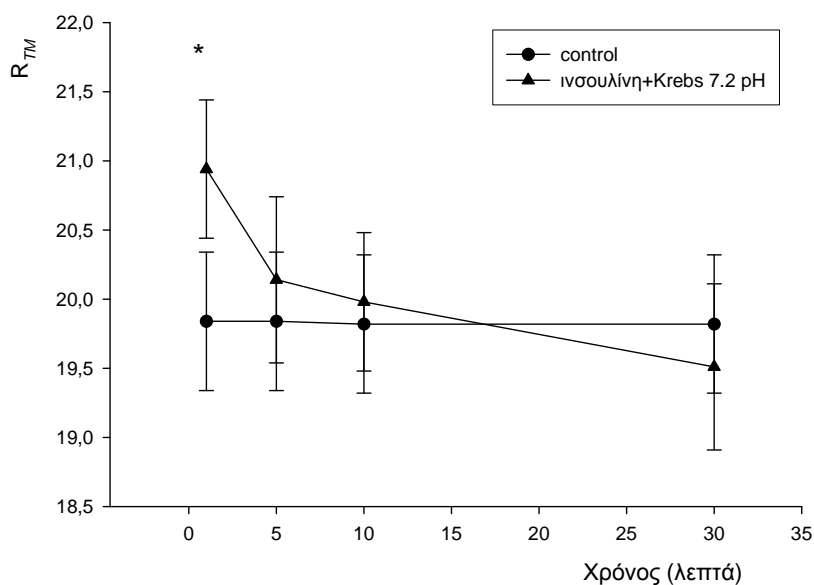
Διάγραμμα 28: Επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης νατρίου (3mM) στη δράση της ινσουλίνης στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η παρατηρηθείσα δράση της ινσουλίνης (διαγράμματα 1 και 2) ανεστάλη και μάλιστα δεν υπήρξε καμία μεταβολή στις ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις στον ιστό. Μία άλλη παρατήρηση από την ελάττωση της συγκέντρωσης του νατρίου στα χρησιμοποιηθέντα διαλύματα είναι ότι η αντίσταση των ιστών ήταν πολλαπλάσια για δεδομένη χορήγηση ρεύματος (όπως αυτή περιγράφηκε στην αρχή των αποτελεσμάτων). Έτσι, για τον σπλαχνικό υπεζωκότα η αντίσταση επιπέδου αναφοράς ήταν $19.80 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ και $20.40 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για τον τοιχωματικό ενώ μετά από προετοιμασία των ιστών με χαμηλό νάτριο οι τιμές της αντίστασης αναφοράς ήταν $124.85 \pm 0.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ και $148.82 \pm 0.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ώσμωση και στην μετακίνηση νερού ενδοκυττάρια. Βέβαια, εάν η ινσουλίνη δρούσε στην μετακίνηση νερού και μόνο τότε θα αύξανε περαιτέρω την αντίσταση κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε.

Όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, ένα χαρακτηριστικό των επιπλεγμένων ή καρκινικών ή ανοσολογικών υπεζωκοτικών συλλογών αποτελεί το χαμηλό pH που μετράται στα υγρά αυτά. Στα πλαίσια μιας πιθανής συμμετοχής ορμονών στην παθογένεια των συλλογών αυτών και δη της ινσουλίνης, πειράματα με χαμηλό pH των διαλυμάτων Krebs που προστέθηκαν προς την πλευρική επιφάνεια επίσης διεξήχθησαν. Το pH των διαλυμάτων αυτών ήταν 7.2. Στα ίδια διαλύματα προστέθηκε και ινσουλίνη σε συγκέντρωση 10^{-5}M , ώστε να αποσαφηνιστεί εάν το pH στην υπεζωκοτική κοιλότητα έχει κάποια επίδραση στη δράση της. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 29 και 30, η ελάττωση του pH δεν εξάλειψε τη δράση της ινσουλίνης.



Διάγραμμα 29: Επίδραση του pH 7.2 Krebs στη δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.



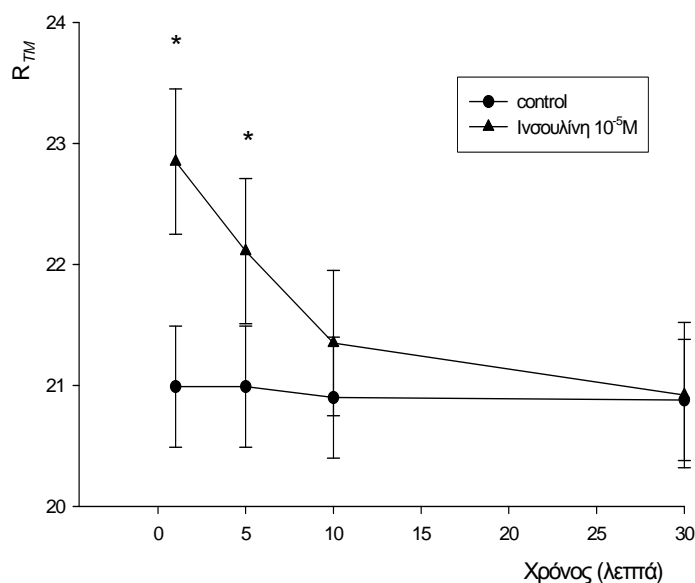
Διάγραμμα 30: Επίδραση του pH 7.2 Krebs στη δράση της ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

Επίσης, η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν μικρότερη από την αύξηση που παρατηρήθηκε όταν η ινσουλίνη χορηγήθηκε σε διάλυμα Krebs με pH 7.45 αλλά όχι στατιστικά σημαντικά μικρότερη. Οι παρατηρήσεις ήταν παρόμοιες για τον σπλαχνικό και τον τοιχωματικό υπεζωκότα.

ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΙΣΤΟΥ

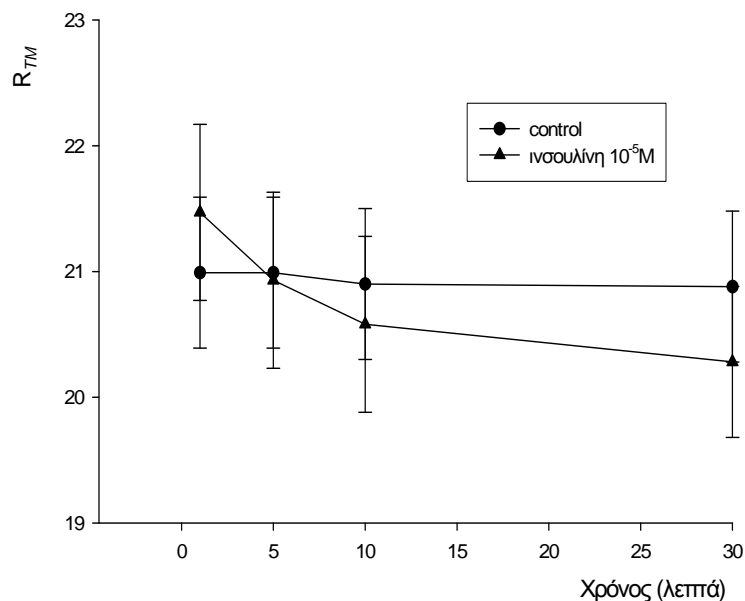
Τα επίπεδα αναφοράς – ιστού αναφοράς (control) για τα πειράματα που διενεργήθηκαν ήταν χαμηλά: $21.08 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για τον ανθρώπινο τοιχωματικό υπεζωκότα.

Η προσθήκη ινσουλίνης στην πλευρική επιφάνεια προκάλεσε αύξηση του R_{TM} και της R_{TM} ταχύτητα, μέσα στο 1^ο λεπτό από την προσθήκη, παρέμεινε αυξημένη έως τα 10 λεπτά από την προσθήκη και επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς (control) μετά από 30 λεπτά από την προσθήκη (διάγραμμα 31). Από τα πειράματα με διάφορες συγκεντρώσεις ινσουλίνης σε πρόβειο ιστό, η συγκέντρωση 10^{-5}M ήταν η μικρότερη συγκέντρωση που απέφερε τις μεγαλύτερες μεταβολές της R_{TM} .



Διάγραμμα 31: Επίδραση ινσουλίνης 10^{-5}M στην πλευρική επιφάνεια του ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα. $*p < 0.05$ σε σχέση με το control.

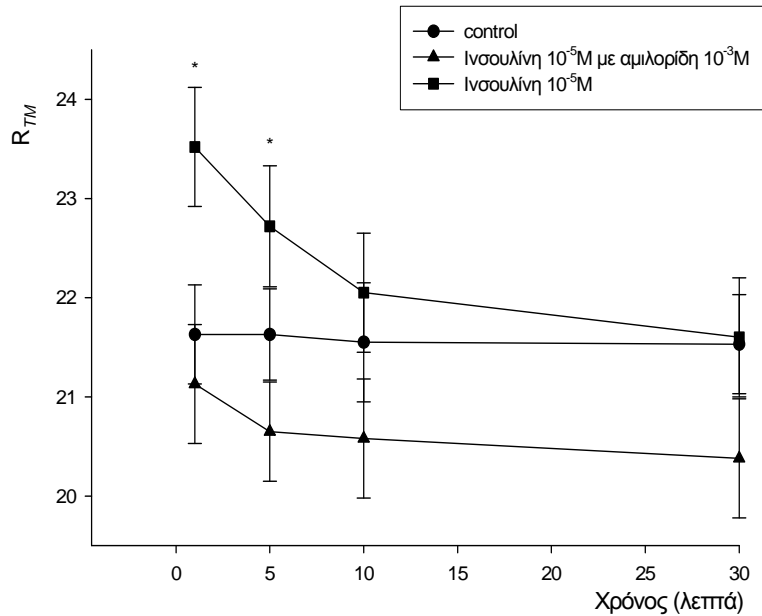
Η προσθήκη ινσουλίνης 10^{-5}M προς τη εξωπλευρική (διάμεση) επιφάνεια του ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα δεν μετέβαλε την R_{TM} (διάγραμμα 32). Αντίθετα παρατηρήθηκε πολύ μικρή μεταβολή μη στατιστικά σημαντική.



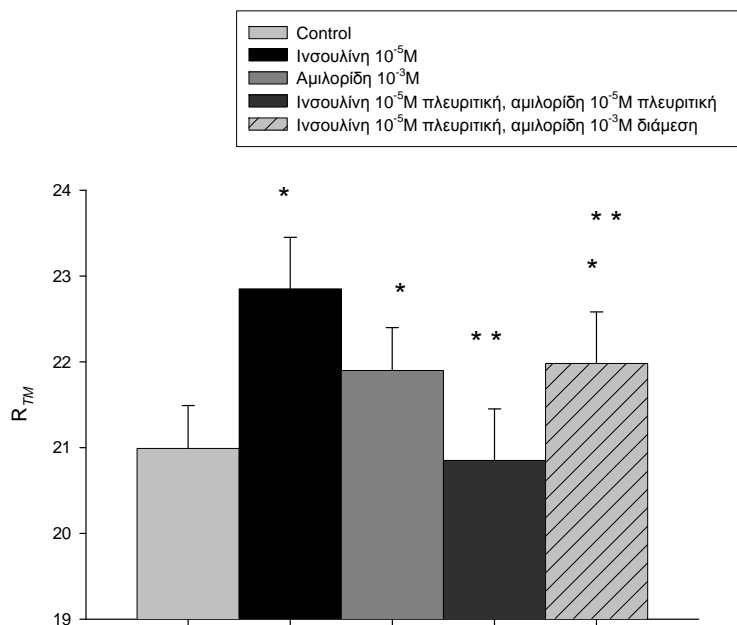
Διάγραμμα 32: Επίδραση ινσουλίνης $10^{-5}M$ στην εξωπλευρική επιφάνεια του ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα.

Η προσθήκη L-NAME στα διαλύματα ινσουλίνης κατά τα πειράματα που διενεργήθηκαν σε πρόβειο ιστό δεν επέφεραν μεταβολές στις παρατηρήσεις που προκλήθηκαν από την ινσουλίνη μόνη. Επομένως αντίστοιχα πειράματα σε ανθρώπινο ιστό δεν διενεργήθηκαν.

Η προσθήκη αμιλοριδής στα διαλύματα ινσουλίνης επέφερε παρόμοια αποτελέσματα όπως στα πειράματα σε πρόβειο ιστό. Η R_{TM} δεν αυξήθηκε αλλά ελαττώθηκε σε επίπεδο κάτω από το επίπεδο αναφοράς ωστόσο μη σημαντικά στατιστικά. Η πτώση ήταν μεγαλύτερη μετά από 10 λεπτά από τη χορήγηση και η μέγιστη πτώση επήλθε μισή ώρα από τη χορήγηση (διάγραμμα 33). Η προσθήκη αμιλοριδής στην εξωπλευρική και της ινσουλίνης στην πλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TM} η οποία όμως ήταν στατιστικά μικρότερη από την αύξηση που προκάλεσε η ινσουλίνη από μόνη της (διάγραμμα 34) αλλά και πάλι σημαντική σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς.

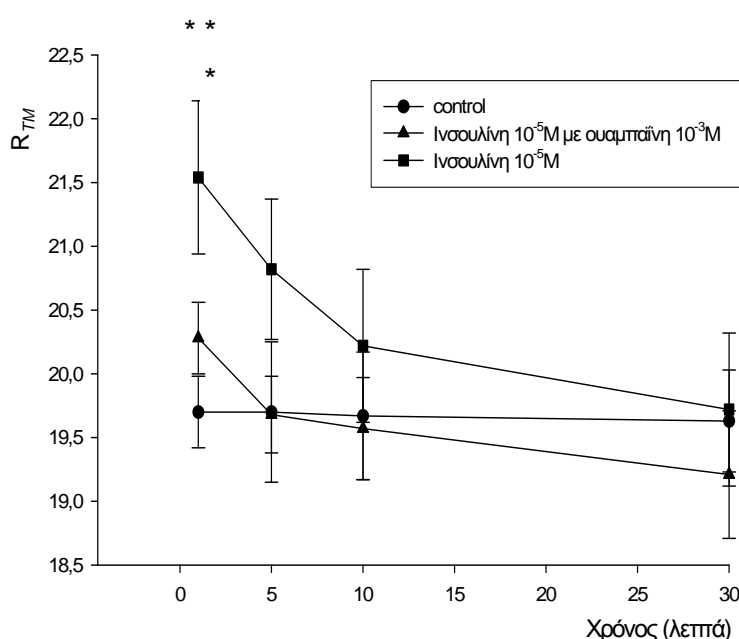


Διάγραμμα 33: Επίδραση αμιλορίδης στη δράση της ινσουλίνης προς την πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού ανθρώπινου υπεζωκότα. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.



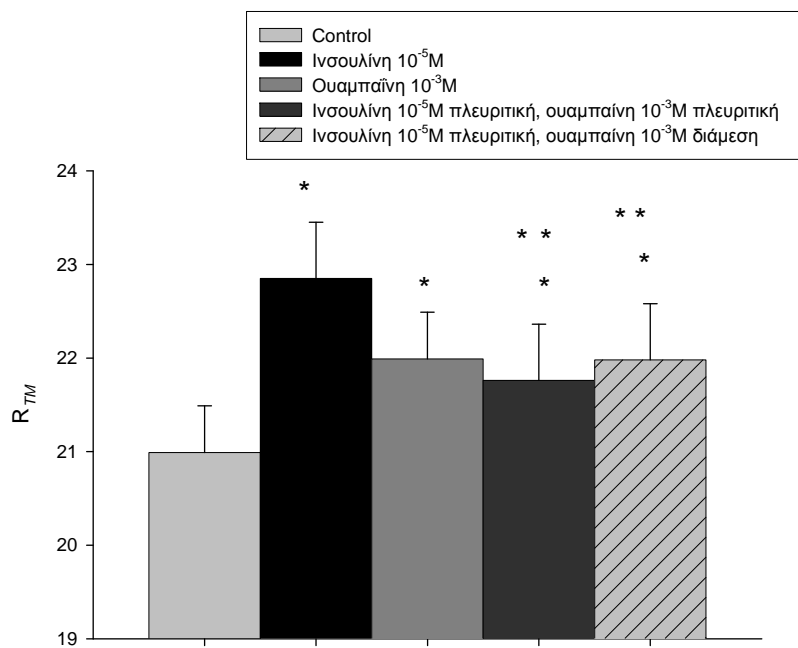
Διάγραμμα 34: Επίδραση αμιλορίδης στη δράση της ινσουλίνης όταν προστέθηκε στην ίδια επιφάνεια και στην αντίθετη από τη χορήγηση της ινσουλίνης, στο 1^ο λεπτό. Επίσης, φαίνεται και η επίδραση της αμιλορίδης όταν αυτή προστέθηκε μόνη της. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control, ** $p < 0.05$ σε σχέση με την ινσουλίνη 10⁻⁵M.

Η προσθήκη ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ μαζί με ινσουλίνη $10^{-5}M$ είχε ως αποτέλεσμα και πάλι την στατιστική αύξηση της R_{TM} . Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά μικρότερη από την αύξηση που προκλήθηκε από την ινσουλίνη μόνη της. Δέκα λεπτά από την χορήγηση η R_{TM} μειώθηκε κάτω από τα επίπεδα αναφοράς και παρέμεινε έτσι ως το τέλος των πειραμάτων (διαγράμμα 35).



Διάγραμμα 35: Επίδραση ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ στην μεταβολή της R_{TM} που προκλήθηκε από τη χορήγηση ινσουλίνης $10^{-5}M$ προς την πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού ανθρώπινου υπεζωκότα. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control, ** $p < 0.05$ σε σχέση με την ινσουλίνη.

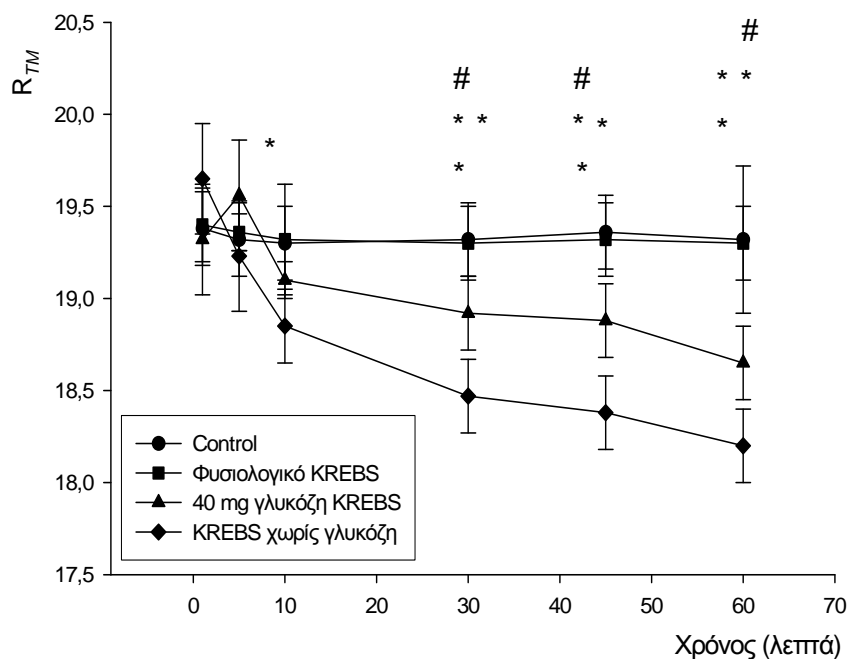
Η προσθήκη ουαμπαΐνης στην εξωπλευρική επιφάνεια και της ινσουλίνης στη πλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TM} η οποία όμως ήταν στατιστικά μικρότερη από την αύξηση που προκάλεσε η ινσουλίνη από μόνη της (διάγραμμα 36) αλλά και πάλι σημαντική σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς. Ήταν δηλαδή παρόμοια με το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε μετά από τη συγχορήγηση ινσουλίνης και ουαμπαΐνης προς την πλευρική επιφάνεια.



Διάγραμμα 36: Επίδραση ουαπαΐνης $10^{-3}M$ στην μεταβολή της R_{TM} από την ινσουλίνη όταν προστέθηκε στην ίδια επιφάνεια και στην αντίθετη από τη χορήγηση της ινσουλίνης. Επίσης, φαίνεται και η επίδραση της ουαπαΐνης όταν αυτή προστέθηκε μόνη της, στο 1° λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control, ** $p < 0.05$ σε σχέση με την ινσουλίνη $10^{-5}M$.

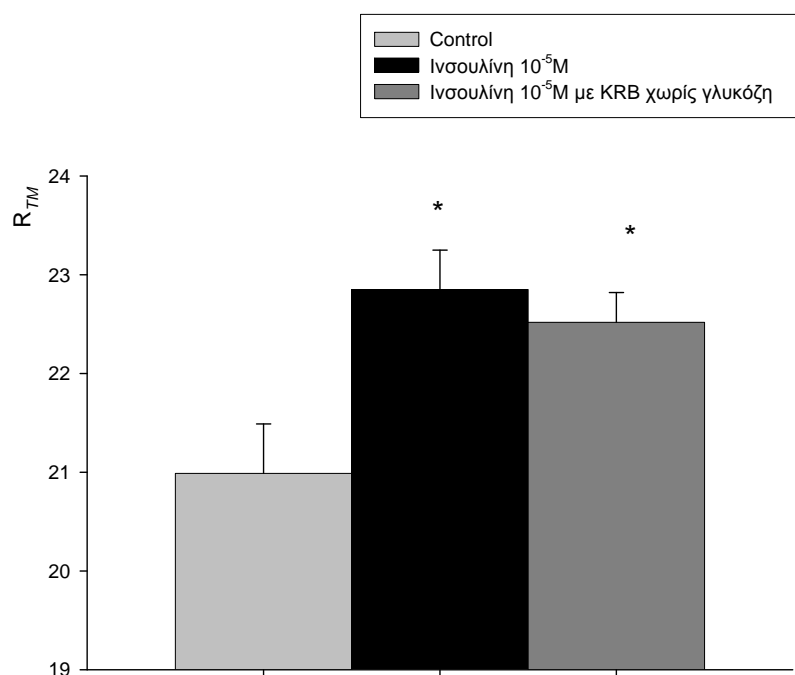
Η χορήγηση διαλυμάτων KREBS με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης ανέδειξαν μεταβολές της R_{TM} . Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη στην πλευρική επιφάνεια του υπεζωκότα διαλύματος KREBS 40mg γλυκόζης είχε ως αποτέλεσμα την πτώση της R_{TM} σταδιακά κάτω από τα επίπεδα αναφοράς (διάγραμμα 37). Η πτώση αυτή ξεκίνησε από το 5° λεπτό της χορήγησης ενώ στατιστικά σημαντική έγινε μετά από 30 λεπτά. Η χορήγηση διαλυμάτων KREBS χωρίς γλυκόζη είχε ως αποτέλεσμα πιο γρήγορη πτώση της R_{TM} , η οποία έγινε στατιστικά σημαντική πιο γρήγορα σε σχέση με τα πειράματα με 40mg KREBS και μάλιστα στο 10° λεπτό από τη χορήγηση. Η πτώση της R_{TM} μετά από 60 λεπτά ήταν στατιστικά πιο σημαντική

στα πειράματα με KREBS χωρίς γλυκόζη σε σχέση με τα πειράματα με 40mg γλυκόζη KREBS.



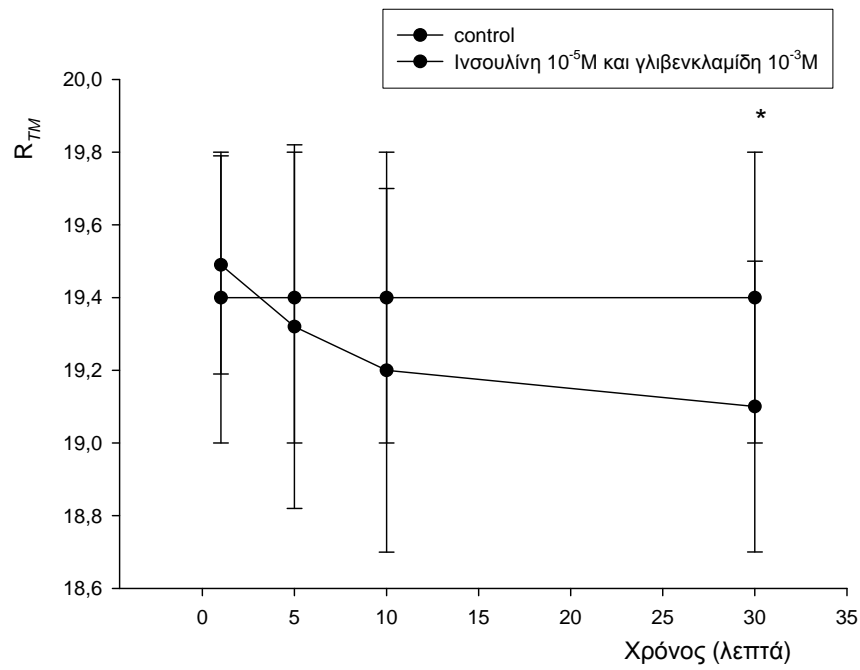
Διάγραμμα 37: Προσθήκη διαλυμάτων KREBS με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης στην πλευρική επιφάνεια του ανθρώπινου τοιχωματικού υπεζωκότα. * $p < 0.05$ των διαλυμάτων 40mg KREBS σε σχέση με το control, ** $p < 0.05$ μεταξύ των διαλυμάτων χωρίς γλυκόζη KREBS ομάδων, # $p < 0.05$ μεταξύ των ομάδων.

Η χορήγηση ινσουλίνης $10^{-5}M$ σε διάλυμα KREBS χωρίς γλυκόζη δεν ανέστειλε τη δράση που παρατηρήθηκε όταν αυτή χορηγήθηκε σε διάλυμα KREBS με φυσιολογική γλυκόζη. Η παρατηρηθείσα R_{TM} ήταν λίγο μικρότερη αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά μη σημαντική (διάγραμμα 38). Αντίθετα τα επίπεδα της R_{TM} ήταν παρόμοια με τα επίπεδα της R_{TM} όταν αυτή χορηγήθηκε σε φυσιολογικό διάλυμα KREBS και φυσικά στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από τα επίπεδα αναφοράς.



Διάγραμμα 38: Προσθήκη διαλύματος ινσουλίνης $10^{-5}M$ με KREBS φυσιολογικής περιεκτικότητας σε γλυκόζη και διαλύματος ινσουλίνης $10^{-5}M$ με KREBS χωρίς γλυκόζη, στο 1^ο λεπτό. * $p < 0.05$ σε σχέση με το control.

Η προσθήκη ινσουλίνης $10^{-5}M$ μαζί με γλιβενκλαμίδα $10^{-3}M$ είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της επίδρασης της ινσουλίνης στον ανθρώπινο τοιχωματικό υπεζωκότα, όταν αυτή προσετέθη μόνη της, όπως περιγράφηκε παραπάνω (διάγραμμα 39). Έτσι, η R_{TM} αυξήθηκε ελάχιστα στα πρώτα λεπτά της χορήγησης, αλλά μη στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα αναφοράς όπως έγινε όταν η ινσουλίνη προστέθηκε μόνη της. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μείωση της R_{TM} μέχρι και σε επίπεδα χαμηλότερα από τα επίπεδα αναφοράς. Η πτώση αυτή στο τέλος των πειραμάτων υπολογίστηκε και ως στατιστικά σημαντική. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε σύνδεση με τις παρατηρήσεις που έγιναν στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα του προβάτου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

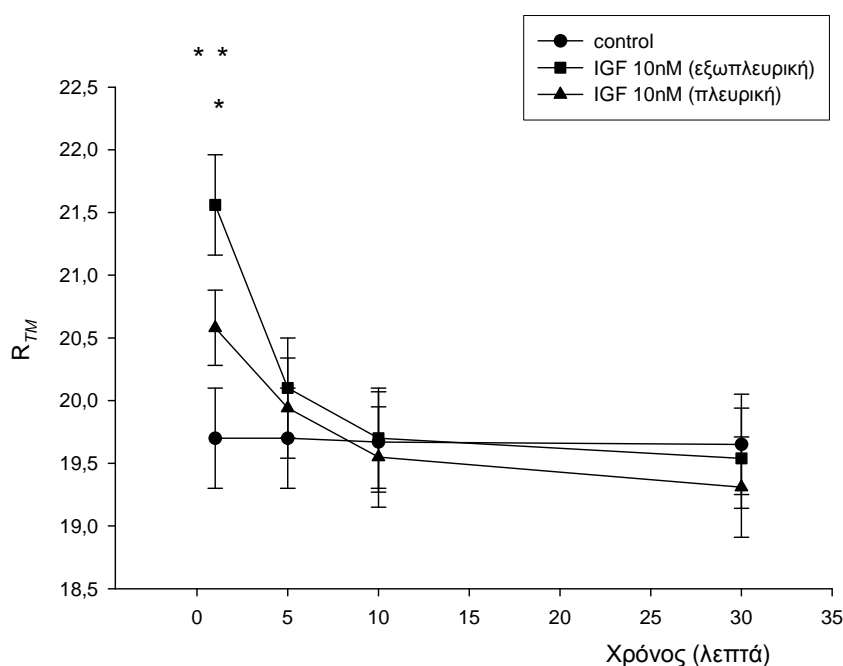


Διάγραμμα 39: Επίδραση ινσουλίνης 10⁻⁵M και γλιβενκλαμίδης 10⁻³M στην πλευρική επιφάνεια του ανθρώπινου υπεζωκότα. *p<0.05 σε σχέση με το control.

Β΄ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ IGF – 1

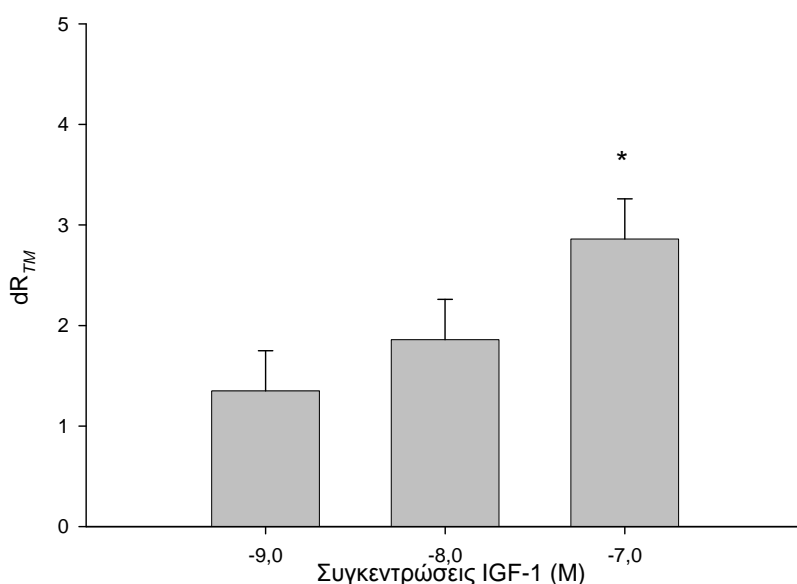
ΜΕΡΟΣ 1^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η προσθήκη του IGF – 1 στην εξωπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TM} σε επίπεδα στατιστικά σημαντικά πάνω από τα επίπεδα αναφοράς, εντός 1 έως 5 λεπτά από τη χορήγηση, για όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή για τις συγκεντρώσεις 1nM ($10^{-9}M$), 10nM ($10^{-8}M$) και 100nM ($10^{-7}M$). Η προσθήκη στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου είχε ως αποτέλεσμα και πάλι στατιστική αύξηση της R_{TM} εντός του 1^{ου} λεπτού της χορήγησης, η οποία όμως ήταν πιο ασθενής σε σχέση με την αύξηση για την εξωπλευρική επιφάνεια (διάγραμμα 40). Στο τέλος των πειραμάτων η R_{TM} επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς.



Διάγραμμα 40: Επίδραση IGF – 1 (10nM) στην πλευρική και εξωπλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς, ** $p < 0.05$ μεταξύ των δυο επιφανειών, # $p < 0.05$ της πλευρικής σε σχέση με το control.

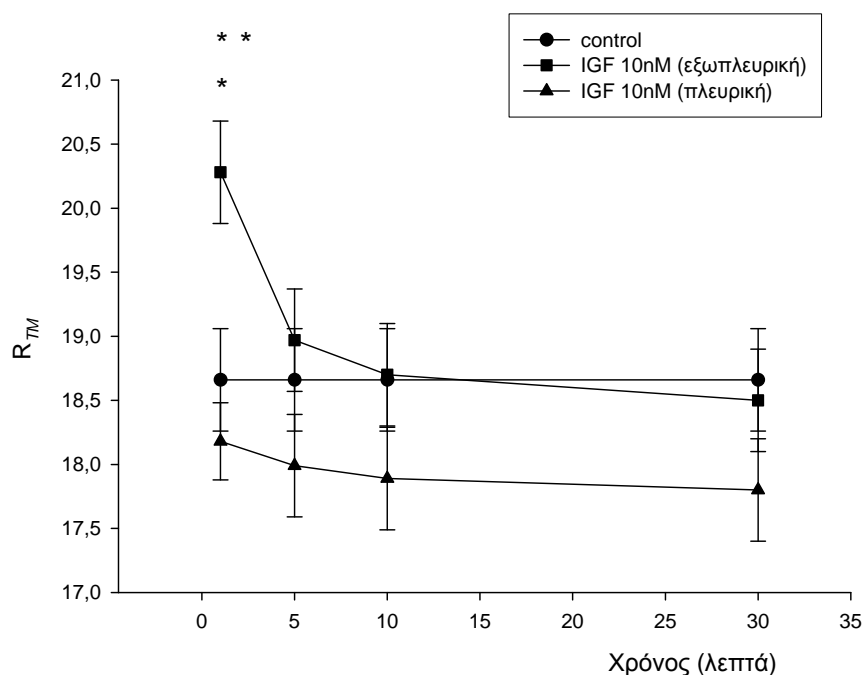
Η αύξηση που παρατηρήθηκε για την εξωπλευρική επιφάνεια (μέγιστη αντίδραση με αύξηση της R_{TM} κατά $2.86 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για συγκέντρωση IGF – 1 100nM) ήταν στατιστικά πιο έντονη από την αύξηση που παρατηρήθηκε για την πλευρική επιφάνεια (μέγιστη αντίδραση με αύξηση της R_{TM} κατά $0.56 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ για συγκέντρωση IGF – 1 100nM). Η αντίδραση του ιστού ήταν εκθετικά πιο έντονη με την χρησιμοποίηση πιο πυκνού διαλύματος IGF – 1, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 41.



*Διάγραμμα 41: Αύξηση της R_{TM} ανάλογα με τη συγκέντρωση διαλύματος IGF – 1 που προστέθηκε στην εξωπλευρική επιφάνεια σπλαχνικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ μόνο για την αύξηση της συγκέντρωσης $10^{-7} M$ (100nM) σε σχέση με τις δυο άλλες συγκεντρώσεις.*

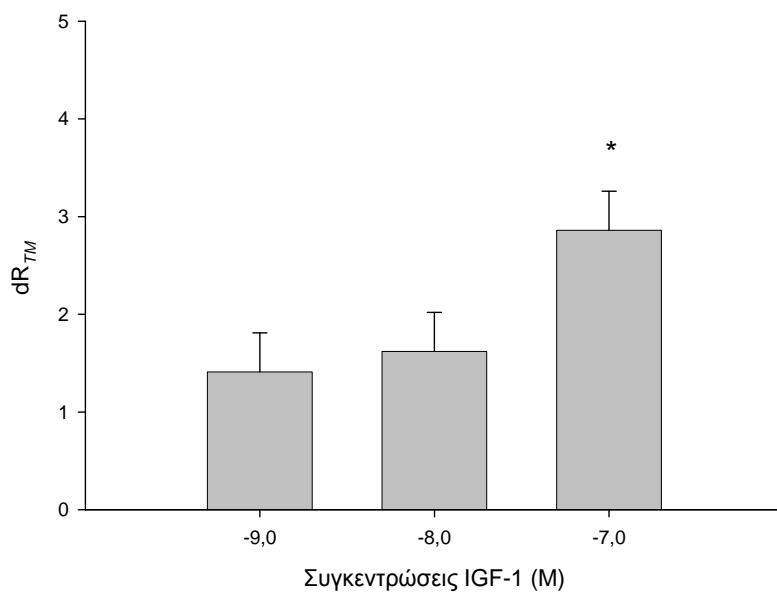
Η προσθήκη IGF – 1 στην εξωπλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της R_{TM} για όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (όπως για τον σπλαχνικό υπεζωκότα), εντός και πάλι 1 έως 5 λεπτά από τη χορήγηση. Στο τέλος των πειραμάτων η R_{TM} επανήλθε

σε επίπεδα αναφοράς. Μέγιστη αύξηση παρατηρήθηκε για τη συγκέντρωση 100nM οπότε η R_{TM} αυξήθηκε κατά $2.86 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Ωστόσο, για την πλευρική επιφάνεια, η R_{TM} ελαττώθηκε και μάλιστα σημαντικά (αν και οριακά, μέγιστη πτώση της R_{TM} στη συγκέντρωση 100nM κατά $0.48 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$) για όλες τις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις (διάγραμμα 42).



*Διάγραμμα 42: Προσθήκη του IGF – 1 (10nM) στην εξωπλευρική και πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. * $p < 0.05$ της εξωπλευρικής επιφάνειας σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς. ** $p < 0.05$ της πλευρικής επιφάνειας σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς.*

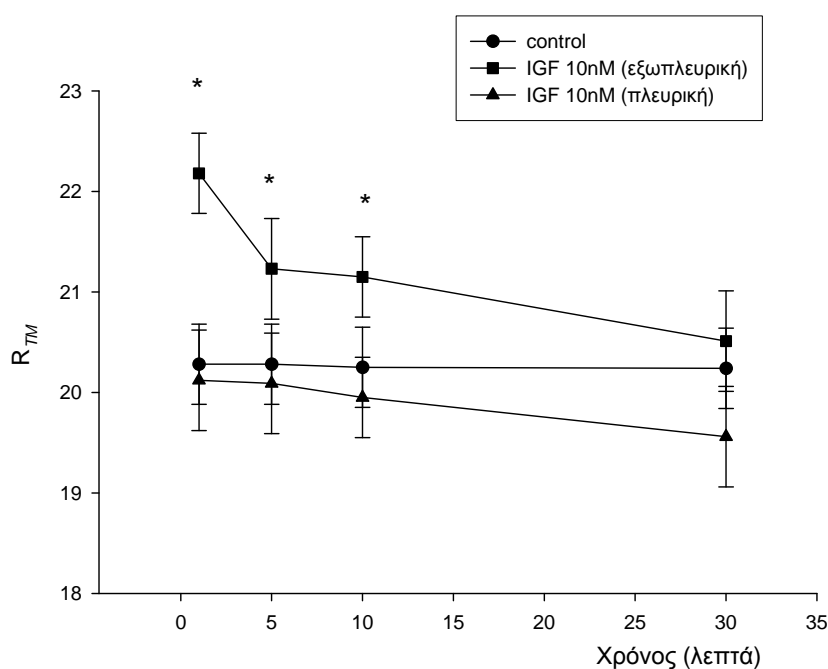
Παρόμοια με τον σπλαχνικό υπεζωκότα, η αύξηση της R_{TM} ήταν εκθετική με την χρησιμοποίηση πιο πυκνού διαλύματος IGF – 1 στον τοιχωματικό υπεζωκότα προβάτου όπως φαίνεται στο διάγραμμα 43. Για την πλευρική επιφάνεια η πτώση της R_{TM} δεν εμφάνισε ιδιαίτερες διακυμάνσεις ή σχέση με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε.



*Διάγραμμα 43: Αύξηση της R_{TM} ανάλογα με τη συγκέντρωση διαλύματος IGF – 1 που προστέθηκε στην εξωπλευρική επιφάνεια τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. *p<0.05 μόνο για την αύξηση της συγκέντρωσης 10⁻⁷ M (100nM) σε σχέση με τις δυο άλλες συγκεντρώσεις.*

ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η προσθήκη IGF – 1 έγινε σε μια μόνο συγκέντρωση 10nM (10^{-8} M) κατόπιν των πειραμάτων στο πρόβατο. Η προσθήκη στην εξωπλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TM} στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς (αύξηση κατά $1.9 \pm 0.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$) από το 1^ο λεπτό της χορήγησης (διάγραμμα 44). Η επίδραση της ουσίας παρέμεινε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα έως και δέκα λεπτά από τη χορήγηση. Στο τέλος των πειραμάτων η R_{TM} επανήλθε σε επίπεδα αναφοράς. Η χορήγηση του IGF – I στην πλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα όπως και στο πρόβατο την ελάττωση της R_{TM} , ωστόσο εδώ η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (ελάττωση κατά $0.16 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$).



Διάγραμμα 44: Προσθήκη του IGF – 1 (10nM) στην εξωπλευρική και πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα ανθρώπου. * $p < 0.05$ της εξωπλευρικής επιφάνειας σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ινσουλίνη ενεργοποιεί τον σπλαχνικό και τον τοιχωματικό υπεζωκότα του προβάτου, όταν αυτή βρεθεί στην πλευρική επιφάνειά του ενώ ασήμαντη είναι η ενεργοποίηση του υπεζωκότα όταν η ινσουλίνη βρεθεί στη εξωπλευρική επιφάνειά του. Παρόμοια δράση ανέπτυξε η ινσουλίνη και στον τοιχωματικό υπεζωκότα του ανθρώπου. Η δράση αυτή αντιστοιχεί σε αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης των ιστών μετά από έκθεση στην ινσουλίνη. Η αύξηση αυτή ήταν ταχύτατη και πραγματοποιήθηκε εντός 5 λεπτών από την χορήγηση. Από εκεί και έπειτα η αντίσταση παρέμεινε αυξημένη έως το 10^ο λεπτό από τη χορήγηση αλλά και έως το τέλος των πειραμάτων μετά από 30 λεπτά.

Η δράση της ινσουλίνης στον οργανισμό φαίνεται ότι σχετίζεται με επίδραση και στις δύο επιφάνειες των οργάνων στα οποία επιφέρει μεταβολές. Έτσι στην ουροδόχο κύστη των βατράχων οι Cox και Singer έδειξαν επίδραση της ινσουλίνης στη μεσοθηλιακή επιφάνεια των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν.[156] Ωστόσο, σε κύτταρα ουροφόρων σωληναρίων η δράση της ινσουλίνης επικεντρώθηκε σε μεταβολές της διαπερατότητας της διάμεσης επιφάνειας παρά την συνένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα της στην μεσοθηλιακή επιφάνεια.[158-161] Στα αναπνευστικά επιθήλια, η προσθήκη ινσουλίνης μετέβαλε την ηλεκτροφυσιολογία των χρησιμοποιηθέντων ιστών στην μεσοθηλιακή επιφάνεια όταν προστέθηκε σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II όπου η ινσουλίνη αύξησε την διεπιθηλιακή διαφορά δυναμικού.[173] Οι Ito et al δείξαν παρόμοια αύξηση της διεπιθηλιακής διαφοράς δυναμικού και σε κύτταρα αγκύλης του Henle σε ποντίκια.[212, 213] Στην ουροδόχο κύστη βατράχων παρουσιάστηκε και επίδραση της ινσουλίνης όταν αυτή χορηγήθηκε προς τη διάμεση επιφάνεια κάτι που αποδόθηκε σε διάχυση του μορίου της προς την

μεσοθηλιακή επιφάνεια και επομένως ανάπτυξη της προαναφερθείσας δράσης της ινσουλίνης.[156] Αυτή η εξήγηση δεν φαίνεται πολύ πιθανή καθώς αν και μικρό σχετικά μόριο που μπορεί να κινείται κατά μήκους των επιθηλίων μια τέτοια διάχυση απαιτεί περισσότερο χρόνο από μισή ώρα και είναι ένα φαινόμενο μικρό σε ένταση και μέγεθος ειδικά χωρίς την παρουσία ενισχυτών π.χ. NaCap (sodium caprate).[214] Στην έρευνα αυτών των συγγραφέων (Yamamoto et al) η ινσουλίνη χρειάστηκε τουλάχιστο δυο ώρες για να διαχυθεί στην άλλη επιφάνεια της πνευμονικής μεμβράνης του είδους Xenopus. Άλλοι ερευνητές σε παλαιότερες μελέτες τους έδειξαν ότι η ινσουλίνη μπορεί να επιδείξει δράση και στις δυο επιφάνειες των επιθηλίων.[155] Ωστόσο για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο φαίνεται ότι απαιτούνται πολύ πυκνές συγκεντρώσεις της ορμόνης. Πιο πιθανή φαίνεται η εξήγηση για τη δράση της ινσουλίνης στη διάμεση επιφάνεια η επίδρασή της σε υπολείμματα λιπώδους ιστού ή σε πήγματα από εναπομείνον αίμα ή ερυθροκύτταρα [171, 174, 176]. Κάτι τέτοιο φαίνεται πιθανό καθώς παρά την πολύ προσεκτική προετοιμασία των ιστών, η παρουσία υπολειμμάτων λιπώδους ιστού ή ερυθροκυττάρων από την συλλογή του ιστού δεν μπορεί να παραβλεφθεί. Όσον αφορά τα πειράματα σε τοιχωματικό υπεζωκότα ανθρώπου, αυτά έδειξαν ότι η ινσουλίνη παρουσιάζει μια παρόμοια δράση όπως αυτή προαναφέρθηκε και στο πρόβατο, με την περιοχή επίδρασής της να εντοπίζεται στην πλευρική (μεσοθηλιακή) επιφάνεια του ανθρώπινου υπεζωκότα ενώ ελάχιστη ή ασήμαντη ήταν η επίδρασή της στη διάμεση επιφάνειά του.

Η δράση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα φαίνεται ότι επιτυγχάνεται ταχύτατα και μάλιστα μέσα σε πέντε με δέκα λεπτά από την χορήγηση των διαλυμάτων επιτυγχάνεται η μέγιστη επίδρασή της. Αυτό ήταν άλλωστε κάτι που αναμένετο καθώς η ινσουλίνη όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος ενώνεται με τον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη και καθιστά τα κύτταρα διαπερατά σε ιόντα (π.χ. K^+)

και σε γλυκόζη εντός λίγων λεπτών ή ακόμη και δευτερολέπτων. Οι Cox και Singer έδειξαν ότι η ινσουλίνη επιδρά στην ουροδόχο κύστη βατράχων εντός πέντε λεπτών από τη χορήγηση διαλυμάτων 10^1 έως και 10^5 $\mu\text{U/ml}$. Η επίδραση που προκάλεσε η ινσουλίνη στα πειράματα αυτά παρέμεινε μέχρι και τριάντα λεπτά από την έναρξη αυτών των πειραμάτων.[156] Παρόμοια δράση της ινσουλίνης ανέδειξε η προσθήκη της σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II όπου επέφεραν γρήγορη αύξηση της διεπιθηλιακής διαφοράς δυναμικού.[173] Φαίνεται λοιπόν ότι η ινσουλίνη επιδρά με τρόπο παρόμοιο σε διάφορα όργανα διαφόρων έμβιων οργανισμών. Ταχύτατη, τέλος, ήταν η επίδραση της ινσουλίνης και στον ανθρώπινο τοιχωματικό υπεζωκότα με ανάπτυξη της μέγιστης δράσης της εντός πέντε λεπτών από τη χορήγηση των διαλυμάτων.

Ένα ακόμη σημείο της δράσης της ινσουλίνης είναι και η ισότιμη δράση της τόσο στον σπλαχνικό όσο και στον τοιχωματικό υπεζωκότα. Αυτό προτάθηκε για άλλες ορμόνες π.χ. τα οιστρογόνα [215] αλλά είναι άξιο αναφοράς μιας και τα δύο υπεζωκοτικά πέταλα εμφανίζουν τόσο ανατομικές διαφορές όσο και λειτουργικές και κυρίως εμφανίζονται ως με διαφορετική ικανότητα και συμμετοχή στη διαπερατότητα ηλεκτρολυτών και υγρών διαμέσου του μεσοθηλίου τους.[59] Πιο συγκεκριμένα, το υπεζωκοτικό υγρό φαίνεται ότι καθίσταται πιο πυκνό προς τις κατώτερες περιοχές της υπεζωκοτικής κοιλότητας [30] αλλά και η υπεζωκοτική πίεση καθίσταται μεγαλύτερη καθώς προχωρούμε προς τις κατώτερες περιοχές της υπεζωκοτικής κοιλότητας.[216, 217] Βέβαια, βασικές ανατομικές διαφορές έχουν ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία με σημαντικότερη την πυκνότητα των λεμφικών ανοιγμάτων ή 'στομάτων' τα οποία φαίνεται ότι είναι περισσότερα στον διαφραγματικό και κατώτερο τοιχωματικό υπεζωκότα παρά στον σπλαχνικό.[1, 22, 24] Διακυμάνσεις της ηλεκτροφυσιολογίας του υπεζωκότα φαίνεται ότι υφίστανται στον πρόβειο ιστό όπου οι διαφραγματικές

επιφάνειες είναι πιο ενεργές σε σχέση με τον υποπλευρίο υπεζωκότα (costal pleura) [218] αλλά και οι οπίσθιες διαφραγματικές και κατώτερες τοιχωματικές – υποπλευρίες περιοχές και όχι οι ανώτερες και σπλαχνικές ή μεσαυλιακές περιοχές.[219] Επομένως, αφόσον η ινσουλίνη δρα σε άλλους ιστούς διαμέσου διεπιθηλιακής μετακίνησης ηλεκτρολυτών και νερού (που στη μελέτη αυτή αναγνωρίζονται από τις μεταβολές στην ηλεκτροφυσιολογία) και ο υπεζωκότας εμφανίζει διαφορές της ηλεκτροφυσιολογίας του, είναι δίκαιο να μελετηθεί πιθανή διακύμανση στην δράση της ινσουλίνης σε ιστούς που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές του σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα προβάτου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι πιο σημαντική είναι η κατανομή του σημείου δράσης της ινσουλίνης στην υπεζωκοτική κοιλότητα και μάλιστα αυτό φαίνεται πως βρίσκεται στις κατώτερες περιοχές της και στα δύο πέταλα του υπεζωκότα, ακολουθώντας τις παραπάνω διακυμάνσεις της ηλεκτροφυσιολογίας του υπεζωκότα.

Η προσθήκη δαλυμάτων συγκεντρώσεων ινσουλίνης 10^{-6}M έως 10^{-4}M αύξησαν την διαμεσοθηλιακή αντίσταση του υπεζωκότα στατιστικά σημαντικά πάνω από το επίπεδο αναφοράς (control). Ωστόσο, για συγκεντρώσεις 10^{-8}M και 10^{-7}M η αύξηση της αντίστασης που παρατηρήθηκε ήταν μικρή και μη στατιστικά σημαντική σε σχέση με το επίπεδο αναφοράς. Μάλιστα η αύξηση της αντίστασης για τις συγκεντρώσεις πιο πυκνές του 10^{-6}M ήταν στατιστικά σημαντικότερες από τις αυξήσεις που προκάλεσαν τα διαλύματα ινσουλίνης κάτω από 10^{-6}M . Ενδιάμεσο σημείο αναγνωρίστηκε και ήταν το $5 \times 10^{-7}\text{M}$. Από εκεί και πέρα η αύξηση της αντίστασης δεν ήταν μεγαλύτερη όσο αυξανόταν η συγκέντρωση αλλά παρουσιάστηκε ένα πλατώ και οι αυξήσεις της αντίστασης που παρατηρήθηκαν για συγκεντρώσεις πάνω από 10^{-6}M δεν διέφεραν μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό οδηγεί

στο συμπέρασμα της σύνδεσης μορίου – υποδοχέα που πάνω από ένα σημείο συγκέντρωσης οδηγεί σε ενεργοποίηση και στις αντίστοιχες εκδηλώσεις της δράσης της ορμόνης ενώ συγκεντρώσεις πιο αραιές δεν ενεργοποιούν το σύμπλεγμα ορμόνης – υποδοχέα και επομένως δεν παρατηρούνται οι επιδράσεις που θα αναμένονταν. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει το γεγονός ότι η ινσουλίνη ως πρωτεϊνική ορμόνη παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά σε σχέση με άλλες ορμόνες πχ στεροειδούς σύστασης, όπως τα οιστρογόνα, όπου η αύξηση της αντίστασης ήταν άμεση συνάρτηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.[215]

Μια ακόμη παρατήρηση της παρούσας μελέτης ήταν η μη αντιστρεπτή διέγερση του υπεζωκοτικού ιστού από την ινσουλίνη. Έτσι, όταν χορηγήθηκε πυκνό διάλυμα ινσουλίνης $10^{-5}M$ καταγράφηκε η αντίδραση όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, αλλά όταν μετά από μισή ώρα ξαναπροστέθηκε πυκνό διάλυμα της ίδιας συγκέντρωσης, η αντίσταση δεν αυξήθηκε περαιτέρω, αλλά αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε καμία αντίδραση του ιστού. Όταν όμως αρχικά χορηγήθηκε αραιό διάλυμα ινσουλίνης $10^{-7}M$ παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της αντίστασης και όταν μετά από τριάντα λεπτά επαναχορηγήθηκε πυκνό διάλυμα ινσουλίνης $10^{-5}M$, η αντίσταση αυξήθηκε ξανά, ωστόσο όμως η αύξηση αυτή δεν ήταν όσο μεγάλη όσο παρατηρήθηκε μετά από τη χορήγηση διαλύματος ινσουλίνης $10^{-5}M$ από την αρχή. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει συγκεκριμένος αριθμός υποδοχέων ανά μονάδα επιφανείας ιστού. Έτσι, μετά από χορήγηση αραιού διαλύματος ένας αριθμός υποδοχέων καταλαμβάνεται από την αραιή περιεκτικότητα της ορμόνης αλλά παραμένουν ελεύθεροι υποδοχείς οι οποίοι καταλαμβάνονται κατά την δεύτερη προσθήκη διαλύματος ινσουλίνης. Αντίθετα, όταν χορηγήθηκε πυκνό διάλυμα ινσουλίνης, όλοι οι υποδοχείς καταλήφθηκαν από την ορμόνη εξ αρχής οπότε κατά τη δεύτερη χορήγηση δεν απέμεναν ελεύθεροι υποδοχείς ώστε να

ενωθούν με την περίσσεια της ορμόνης και να οδηγήσουν σε νέα αύξηση της αντίστασης.

Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου είναι γνωστή και εμφανίζεται στον υπεζωκότα. Οι Li YY και Li JC πρότειναν ότι η σπουδαιότητα του μονοξειδίου του αζώτου στον υπεζωκότα αναδεικνύεται στην πιθανότητα αύξησης της αποχέτευσης υπεζωκοτικού υγρού από τα στόματα των λεμφικών ανοιγμάτων.[220] Άλλοι ερευνητές εντόπισαν την αναγκαιότητα του NO στην ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού κύκλου ζωής των μεσοθηλιακών κυττάρων και της απόπτωσής τους.[221] Η παρουσία δε του μορίου αυτού στις φλεγμονώδεις διεργασίες που αναπτύσσονται επί παθολογίας στον υπεζωκότα είναι λογικά επόμενες.[222] Όσον αφορά στην ηλεκτροφυσιολογία του υπεζωκότα φαίνεται ότι παρουσιάζει μια ήπια αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης και της διαμεσοθηλιακής διαφοράς δυναμικού.[59] Επίσης, η ινσουλίνη φαίνεται ότι επιδρά στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών των προβάτων μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει την παραγωγή NO.[175] Στην παρούσα μελέτη η προσθήκη L-NAME που αναστέλει την παραγωγή NO δεν ανέστειλε την αύξηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης μετά από προσθήκη διαλυμάτων ινσουλίνης αλλά αντίθετα την αύξησε έστω και σε μικρό βαθμό ως θα αναμένετο από την συνδυαστική επίδραση του L-NAME και της ινσουλίνης. Επομένως, η επίδραση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα του προβάτου, τόσο τον σπλαχνικό όσο και τον τοιχωματικό, δεν φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω δρόμου παραγωγής NO όπως προαναφέρθηκε για άλλους ιστούς, αλλά και για άλλες ορμόνες.[59, 171, 175]

Η ταυτόχρονη χορήγηση ινσουλίνης και αμιλορίδης είχε ως γενικό αποτέλεσμα την εξάλειψη της παρατηρηθείσας δράσης της ινσουλίνης όταν αυτή χορηγήθηκε μόνη της. Μάλιστα, στα πρώτα λεπτά παρατηρήθηκε πτώση της

αντίστασης οριακά κάτω από τα επίπεδα αναφοράς και στη συνέχεια η πτωτική αυτή πορεία της αντίστασης συνεχίστηκε μέχρι και το τέλος των πειραμάτων. Όταν στη συνέχεια η αμιλορίδη χορηγήθηκε προς την εξωπλευρική (διάμεση) επιφάνεια του ιστού ενώ η ινσουλίνη προς την μεσοθηλιακή (πλευρική) επιφάνεια το αποτέλεσμα ήταν και πάλι αύξηση της αντίστασης σημαντική αλλά μικρότερη από την αύξηση που θα αναμέναμε όπως όταν η ινσουλίνη χορηγήθηκε από μόνη της. Μάλιστα η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική υποδηλώνοντας το γεγονός ότι η δράση της ινσουλίνης εκδηλώνεται τελικά με τη συμμετοχή διαμεσοθηλιακών μηχανισμών που συνδέουν τις δυο επιφάνειες του ιστού και όχι δράση μόνο στη μια επιφάνεια (πχ στην πλευρική επιφάνεια όπου και η ινσουλίνη εκδήλωσε τη δράση της ενώ προς τη εξωπλευρική όχι). Βεβαίως, η εξήγηση που θα μπορούσε να υποτεθεί είναι ότι ως μεσοθηλιακός ιστός ο υπεζωκότας δεν αποκλείει την ύπαρξη και ενεργοποίηση από την ινσουλίνη και άλλων διαύλων όπως επί παραδείγματι οι διάυλοι καλίου, ή τις αντλίες νατρίου – καλίου ή ακόμη και συμμετοχή των συμμεταφορέων νατρίου – γλυκόζης. Άλλη πιθανή εξήγηση η οποία υποστηρίζεται και από τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης είναι η εμφάνιση της δράσης της ινσουλίνης στην πλευρική επιφάνεια (με αύξηση του δυναμικού και της αντίστασης) αλλά αυτή η δράση να περιλαμβάνει ενεργοποίηση διαύλων νατρίου ευαίσθητων στην αμιλορίδη τόσο στην πλευρική όσο και στην εξωπλευρική επιφάνεια. Τέτοια δράση είναι γνωστή για την ινσουλίνη σε άλλους ιστούς όπως για παράδειγμα στους νεφρούς όπου η ορμόνη ενώνεται με τον υποδοχέα της στην κορυφαία επιφάνεια (basolateral) [126, 158-162] και προκαλεί νατριο-μεταφορά μέσω διαύλων νατρίου ευαίσθητα στην αμιλορίδη στην αντίθετη επιφάνεια δηλαδή στη βασική επιφάνεια (apical) των κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων και νεφρικών κυττάρων (επί παραδείγματι σειρές καλλιεργημένων κυττάρων A6). Οι Blazer – Yost et al σε μια σειρά από μελέτες [158,

159, 185, 186] κατέδειξαν την ένωση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της στην κορυφαία επιφάνεια (μεσοθηλιακή επιφάνεια) και μέσω μηχανισμών που πιθανώς συμπεριλαμβάνουν ενεργοποίηση της PI-3-kinase [157] και της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (SGK) [161, 223, 224] ενεργοποιεί τους ευαίσθητους σε αμιλορίδη διαύλους νατρίου (amiloride – sensitive Na⁺ channels) στην αντίθετη επιφάνεια από τη σύνδεση της ορμόνης δηλαδή στη βασική μεμβράνη (διάμεση επιφάνεια). Η συσχέτιση της δράσης της ινσουλίνης και της μεταφοράς νατρίου μέσω των διαύλων νατρίου ευαίσθητων στην αμιλορίδη αποδείχθηκε και μέσω μετρήσεων στον όγκο κυψελιδικών κυττάρων τύπου II [164] όπου η ινσουλίνη αύξησε τον όγκο των κυττάρων αυτών παρουσία ασβεστίου και η επίδραση αυτή εξαλείφθηκε με την προσθήκη αμιλορίδης. Απουσία ασβεστίου τα κύτταρα συρρικνώθηκαν μέσω διαύλων καλίου ευαίσθητων στην κινίνη. Φαίνεται επίσης ότι η ενεργοποίηση της μεταφοράς νατρίου από την βασική μεμβράνη των κυττάρων σχετίζεται και με την αύξηση της πυκνότητας των διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη [225, 226] αλλά και της πιθανότητας να παραμένουν αυτά ανοικτά.[163, 164] Δευτερογενώς δε, υπάρχει και συνεισφορά στην όλη διαπερατότητα του νατρίου και του παρακυττάριου δρόμου όταν χορηγηθεί ινσουλίνη ή/και αλδοστερόνη αλλά η συμβολή της μοιάζει μάλλον δευτερευούσης σημασίας καθώς η χορήγηση αμιλορίδης (δηλαδή η παρεμπόδιση του διακυττάριου δρόμου) εξάληψε σχεδόν πλήρως αυτήν την παρακυττάρια διαπερατότητα.[167] Οι Erlj et al μελετώντας την χωρητικότητα της μεμβράνης σε υποδοχείς (membrane capacitance) και άλλες ηλεκτροχημικές μεθόδους κατέλειξαν στο συμπέρασμα ότι εκτός της ενεργοποίησης των διαύλων νατρίου στη βασική μεμβράνη από την ινσουλίνη, αυτή προκάλεσε και αύξηση του αριθμού των μεταφορέων νατρίου άρα ενεργοποίησε την εξωκυττάρωση τέτοιων υποδοχέων προς τη βασική μεμβράνη.[227] Ένα άλλο σημείο της ίδιας μελέτης ήταν

η παρατήρηση ότι η περιεκτικότητα σε μεταφορείς νατρίου της κορυφαίας μεμβράνης ήταν μεγαλύτερη από τον αριθμό στην βασική μεμβράνη και η ινσουλίνη αύξησε τους αριθμούς των μεταφορέων και των δυο επιφανειών. Ωστόσο, η προσθήκη ινσουλίνης σε κύτταρα ουροφόρων σωληναρίων A6 δεν προκάλεσε μεταβολή του κυτταρικού όγκου σε σχέση με τις μεταβολές στην περιεκτικότητα σε νάτριο στην βασική μεμβράνη κάτι που ενισχύει την άποψη ότι στους επιθηλιακούς ιστούς υπάρχει στενή σύνδεση μεταξύ των κορυφαίων και βασικών μηχανισμών μεταφοράς ηλεκτρολυτών και νερού.[228]

Στην παρούσα μελέτη, η αύξηση του δυναμικού και της αντίστασης για τον υπεζωκότα υποδεικνύει το γεγονός ότι για λίγα λεπτά από τη χορήγηση της ινσουλίνης υπήρξε μετακίνηση ηλεκτρολυτών και νερού εντός των μεσοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα ο ιστός να περιέλθει σε νέα ισορροπία ηλεκτρολυτών και κυτταρικού όγκου. Η μετακίνηση αυτή φαίνεται ότι περιλαμβάνει ενεργοποίηση των διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη από την κορυφαία μεμβράνη (πλευρική ή μεσοθηλιακή επιφάνεια) των μεσοθηλιακών κυττάρων αλλά και ενεργοποίηση διαύλων ευαίσθητων σε αμιλορίδη στην βασική μεμβράνη των μεσοθηλιακών κυττάρων (εξωπλευρική ή διάμεση επιφάνεια). Η είσοδος αυτή του νατρίου και νερού στα μεσοθηλιακά κύτταρα εμποδίζει την απρόσκοπτη μετακίνηση ηλεκτρολυτών διαμεσοθηλιακά κατά τον ερεθισμό του ιστού με ρεύμα τουλάχιστο για τα πρώτα πέντε λεπτά από τη χορήγηση της ινσουλίνης. Στη συνέχεια και μετά από την αποκατάσταση μηχανισμών ομοιόστασης ο ιστός γίνεται πιο διαπερατός σε ερεθισμό με ρεύμα εντός της μισής ώρας από τη χορήγηση. Η παρατήρηση ότι ενώ η προσθήκη αμιλορίδης στην πλευρική επιφάνεια του ιστού ανέστειλε πλήρως την δράση της ινσουλίνης όταν αυτή προστέθηκε μόνη της στον ιστό ενώ η προσθήκη αμιλορίδης στην εξωπλευρική επιφάνεια μόνο τμηματικά την ανέστειλε, καταδεικνύει την

πρόταση ότι πιθανώς η πρώτη ενεργοποιείται πιο γρήγορα και πιο ενεργά κατά τη δράση της ινσουλίνης ενώ η μεταφορά από την εξωπλευρική επιφάνεια υπολλείπεται. Η πτώση της αντίστασης κάτω από τα επίπεδα αναφοράς μετά από τα δέκα λεπτά οδηγεί στην υπόθεση ότι άλλοι μηχανισμοί ή η ανακατανομή του νατρίου και νερού που έχει εισέλθει στα κύτταρα, που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί από την ινσουλίνη, οδηγούν σε αυξημένη διαπερατότητα πια του ιστού ώστε να επιτευχθεί η νέα ισορροπία. Βεβαίως, αυτή η παρατήρηση είναι κάπως διαφορετική από τα όσα προαναφέρθηκαν για τη δράση της ινσουλίνης στους νεφρούς επί παραδείγματι, όπου η δράση της ινσουλίνης μέσω των διαύλων νατρίου ευαίσθητων στην αμιλορίδη δρα προς την απόδοση νατρίου και νερού προς την κορυφαία επιφάνεια με πηγή την βασική επιφάνεια. Μια άλλη πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι ότι η ινσουλίνη ενεργοποιεί τους διαύλους νατρίου ευαίσθητους στην αμιλορίδη στην εξωπλευρική επιφάνεια, χωρίς όμως αυτός να είναι ο συνολικός μηχανισμός δράσης της. Έτσι, η μείωση της αντίστασης και του δυναμικού μετά από χορήγηση ινσουλίνης και αμιλορίδης μαζί, επιτρέπει την μετακίνηση ηλεκτρολυτών από την εξωπλευρική επιφάνεια τόσο μέσω των διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη όσο και μέσω του υπόλοιπου μηχανισμού και επομένως εξηγεί την περαιτέρω πτώση της αντίστασης. Όταν στη συνέχεια χορηγείται αμιλορίδη αντίθετα από την ινσουλίνη, η αντίσταση αυξάνει και πάλι αλλά λιγότερο σημαντικά δηλαδή επειτελείται η δράση της ινσουλίνης μόνο από τον υπόλοιπο μηχανισμό πλην των διαύλων ευαίσθητων σε αμιλορίδη από τη βασική επιφάνεια του ιστού. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι στο όλο σύστημα θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και η δράση της αμιλορίδης στα στόματα των λεμφικών αγγείων, που επικοινωνούν με την υπεζωκοτική κοιλότητα, αυξάνοντας την αποχέτευση μέσω των στομάτων.[24]

Τέλος, όσον αφορά τη συμμετοχή των διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη, η

επίδραση της ινσουλίνης φαίνεται ότι επιφέρει παρόμοιες μεταβολές και στον ανθρώπινο τοιχωματικό ιστό όπου οι παρατηρήσεις υπήρξαν παρόμοιες.[60]

Η προσθήκη ουαμπαΐνης στα διαλύματα ινσουλίνης που προστέθηκαν στην πλευρική (μεσοθηλιακή) επιφάνεια του ιστού είχε ως αποτέλεσμα την εξάλειψη της δράσης της τελευταίας όπως αυτή θα αναμένετο εάν χορηγούνταν μόνη της. Και πάλι όπως παρατηρήθηκε και για την αμιλορίδη, η αντίσταση στην αρχή των πειραμάτων ήταν στα επίπεδα αναφοράς ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε μείωσή της, μη στατιστικά σημαντική, κάτω από τα επίπεδα αναφοράς. Όταν η ουαμπαΐνη προσετέθη στην εξωπλευρική (διάμεση) επιφάνεια ενώ η ινσουλίνη στην πλευρική επιφάνεια, η αντίσταση αυξήθηκε αλλά σε επίπεδα στατιστικά μικρότερα από την αύξηση που παρατηρήθηκε όταν η ινσουλίνη προστέθηκε μόνη της. Στα πειράματα του ανθρώπινου ιστού παρατηρήθηκαν μεταβολές σε σχέση με τα πειράματα του προβάτου. Η διαφορά έγκειται στην παρατήρηση ότι όταν η ουαμπαΐνη προστέθηκε στην ίδια επιφάνεια με την ινσουλίνη (πλευρική) και πάλι η αντίσταση αυξήθηκε και μάλιστα στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα αναφοράς αλλά όχι σε επίπεδα που προκάλεσε η προσθήκη της ινσουλίνης μόνη της. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη διενέργεια πειραμάτων με μόνη την ουαμπαΐνη στα διαλύματα της πλευρικής επιφάνειας όπου και πάλι η αντίσταση αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα αναφοράς κάτι που αποδεικνύει την ύπαρξη αντλιών νατρίου καλίου και στον υπεζωκότα του ανθρώπου. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα αρχικά ότι η δράση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα περιλαμβάνει και τη συμμετοχή αντλιών νατρίου – καλίου. Φαίνεται ότι η ινσουλίνη ενεργοποιεί τις αντλίες στην πλευρική και στην εξωπλευρική επιφάνεια αλλά αυτή η επίδραση στις αντλίες φαίνεται ότι δεν είναι ικανή να αναστείλει πλήρως τη δράση της ινσουλίνης όπως έγινε με την περίπτωση της προσθήκης αμιλορίδης. Η παρουσία αντλιών στον

υπεξωκότα του προβάτου είναι γνωστή και φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της ισορροπίας του νατρίου, βγάζοντάς το από τα κύτταρα, ή στην ισορροπία καλίου, βάζοντάς το στα κύτταρα, όπως έχει περιγραφεί στο γενικό μέρος. Ωστόσο, η συμμετοχή της δράσης της ινσουλίνης ή της απόκρισης των αντλιών στην επίδραση της ινσουλίνης είναι λιγότερο γνωστή από την δράση στην αμιλορίδη. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η ουαμπαΐνη επιδρά στη μετακίνηση νατρίου που προκαλείται από την ινσουλίνη, και οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν τόσο σε ουροδόχο κύστη όσο και σε δέρμα βατράχων.[154] Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η αποσαφήνιση του ακριβούς τρόπου δράσης της ινσουλίνης στις αντλίες. Δηλαδή εάν εμφανίζεται απευθείας ενεργοποίηση των αντλιών από την ινσουλίνη ή η ενεργοποίηση των αντλιών είναι δευτερογενής και σχετίζεται με την αυξημένη πρόσληψη νατρίου στα κύτταρα. Οι Siegel & Civan [170] έδειξαν ότι η ινσουλίνη αυξάνει την έξοδο νατρίου προς την κορυφαία επιφάνεια της ουροδόχου κύστης του βατράχου μέσω ενεργητικής ενεργοποίησης αντλιών, αλλά η ολική μετακίνηση του νατρίου μόνο τμηματικά μπορεί να εξηγηθεί με αυτή την ενεργοποίηση. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη τους οι De Smet et al [229] υποστήριξαν τη θεωρία ότι είναι η αυξημένη είσοδος του νατρίου από την βασική μεμβράνη ως απόκριση στη δράση της ινσουλίνης η κινητήριος δύναμη που οδηγεί σε εκσεσημασμένη ενεργοποίηση των αντλιών ευαίσθητων στην ουαμπαΐνη παρά η αύξηση του αριθμού των αντλιών στην κορυφαία μεμβράνη των Α6 νεφρικών κυττάρων. Η διχογνωμία συνεχίστηκε με μελέτες των Feraille et al [230] κατά τους οποίους η ινσουλίνη ενεργοποιεί μεν τις αντλίες νατρίου – καλίου με δαπάνη ATP, οδηγώντας στην επαναρρόφηση νατρίου σε κύτταρα ουροφόρων σωληναρίων ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα των μέσων σε νάτριο. Στο ίδιο μήκος κύματος, η ινσουλίνη ενεργοποίησε τη λειτουργία των αντλιών νατρίου – καλίου σε κύτταρα μυών ποντικών χωρίς όμως να υποστραφεί

αυτή η δράση από την αμιλορίδη.[231] Οι Feraille et al [232, 233] έδειξαν ότι η ινσουλίνη ερέθισε την εισροή ραδιενεργού Rb μέσω ευαίσθητων σε ουαμπαΐνη αντλιών νατρίου – καλίου ακόμη και παρουσία αμιλορίδης ή χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο, αποσυνδέοντας στην ουσία το νάτριο ως την κινητήριο δύναμη του όλου συστήματος. Στον αντίποδα αυτών, πέραν των προαναφερθέντων, οι Shoen & Erlj [234] έδειξαν αύξηση της μετακίνησης νατρίου και στις δύο επιφάνειες του δέρματος βατράχου κατόπιν ερεθισμού από ινσουλίνη μέσω ευαίσθητων μεταφορέων σε ουαμπαΐνη. Σε άλλη τους μελέτη [235] είχαν δείξει ότι η ινσουλίνη αυξάνει την αγωγιμότητα σε νάτριο (conductance) κυρίως από τη βασική μεμβράνη των κυττάρων του δέρματος βατράχου, η οποία αναστέλετο από την ουαμπαΐνη. Οι Longo et al [236] επίσης έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των αντλιών ευαίσθητων σε ουαμπαΐνη σχετίζεται με το ενδοκυττάριο νάτριο άρα και με τις μεταβολές της συγκέντρωσής του αυξάνοντας τη λειτουργία των ήδη υπαρχόντων αντλιών σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών (και σε σκελετικούς μύες [237]) και όχι αυξάνοντας την μετατόπιση (translocation) αντλιών προς την κυτταρική μεμβράνη.[238, 239] Παρομοίως, φαίνεται ότι η ινσουλίνη ενεργοποίησε τη διεπιθηλιακή μετακίνηση νατρίου αυξάνοντας την ευαισθησία των αντλιών νατρίου – καλίου ευαίσθητων σε ουαμπαΐνη σύμφωνα με άλλη μελέτη των Sargeant et al.[240] Οι Lvonssi & Crabbé [241] έδειξαν ότι η ινσουλίνη δεν είχε κανένα αποτέλεσμα και καμία δράση στις αντλίες νατρίου – καλίου απουσία μετακίνησης νατρίου και μάλιστα πρότειναν ότι η βασική μεμβράνη και το στάδιο εισόδου νατρίου από την πλευρά αυτή είναι σημαντικότερο για τη λειτουργία των αντλιών. Ακόμη, η ουαμπαΐνη μπλόκαρε την ευαίσθητη στην ινσουλίνη μετακίνηση νατρίου σε κύτταρα αναπνευστικού επιθηλίου [242] ενώ η είσοδος νατρίου από τη βασική μεμβράνη κυττάρων δέρματος βατράχων επιτυγχάνεται με ενεργοποίηση από την ινσουλίνη

μεταφοράς καλίου από την κορυφαία μεμβράνη, προσδίδοντας έτσι ηλεκτρική οδηγό δύναμη για διεπιθηλιακή μετακίνηση νατρίου.[243] Τέλος, και στο ανθρώπινο περιτόναιο η ινσουλίνη αύξησε τη λειτουργία των αντλιών ευαίσθητων σε ουαμπαΐνη σε σχέση με το ενδοκυττάριο νάτριο.[244] Όλα τα παραπάνω καθιστούν εμφανές το γεγονός ότι δεν είναι απολύτως ξεκαθαρισμένη η δράση της ινσουλίνης στα επιθήλια καθώς αυτή μεταβάλλεται ανάλογα με τον ιστό και τη λειτουργία την οποία καλείται αυτός να επιτελέσει. Επίσης, καταφανές είναι το γεγονός ότι η ινσουλίνη ως ορμόνη επεισέρχεται σε πολλαπλούς μηχανισμούς του κυττάρου ταυτόχρονα και μέσω παράλληλων οδών, δημιουργώντας προφανώς ένα δίκτυο δράσεων και επιδράσεων που μάλλον είναι δύσκολο να μελετηθούν αποσπασματικά.

Όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, η ινσουλίνη από τις βασικές γνώσεις επεισέρχεται στη διακίνηση του καλίου μεταξύ του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου υγρού. Είναι επόμενο, η ομοιόσταση του καλίου να έχει εκτενώς μελετηθεί και κυρίως στους σκελετικούς μύες.[245, 246] Στα επιθήλια, η ινσουλίνη φαίνεται ότι προκαλεί έναν αριθμό διαφορετικών επιδράσεων και μέσω διαφορετικών μηχανισμών ανάλογα με το είδος του ιστού. Έτσι, στα κύτταρα του δέρματος βατράχου φαίνεται ότι προκαλείται εξοίδηση των κυττάρων μέσω απελευθέρωσης καλίου από την κορυφαία μεμβράνη κάτι που υπερπολώνει την βασική μεμβράνη και τελικά οδηγεί νάτριο εντός του κυττάρου από την αντίθετη μεμβράνη.[246] Στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, η ινσουλίνη αυξάνει τον όγκο των κυττάρων ενεργοποιώντας διαύλους ευαίσθητους σε κινίνη, απουσία ασβεστίου.[164] Σε άλλη μελέτη, η αναστολή των διαύλων καλίου από βάριο, επέφερε αύξηση του όγκου των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου.[228] Κατά την ίδια μελέτη, η ουαμπαΐνη μπλόκαρε ένα ρυθμιστικό μηχανισμό των ενδοκυττάρων ηλεκτρολυτικών μεταβολών, ενώ οι αναστολείς των διαύλων καλίου (βάριο – κινίνη) ανέστειλαν το

μηχανισμό μεταφοράς καλίου από την κορυφαία μεμβράνη, άρα και επέφεραν μεταβολές του κυτταρικού όγκου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η ινσουλίνη επέδειξε ολόκληρο το εύρος της δράσης της όταν προστέθηκε στην πλευρική επιφάνεια του υπεζωκότα απουσία καλίου από το μέσο που διέβρεχε την επιφάνεια αυτή. Αυτό σημαίνει ότι κατ' αρχήν όλες οι μεταβολές που επιτελούνται στον ιστό από τη δράση της δεν σχετίζονται με την συγκέντρωση άρα και τις μεταβολές του εξωκυττάριου καλίου. Επίσης, η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αντλίες νατρίου – καλίου ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση ή τις αλλαγές του εξωκυττάριου καλίου (δεδομένου ότι η συγχορήγηση ινσουλίνης – ουαμπαΐνης εξάλειψε τη δράση της πρώτης). Επομένως, η μετακίνηση ενός άλλου σημαντικού ηλεκτρολύτη και δη του νατρίου είναι προφανώς η κινητήριος δύναμη ενεργοποίησης και των αντλιών νατρίου – καλίου στον υπεζωκότα, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα. Η αναστολή της δράσης της ινσουλίνης από την γλιβενκλαμίδα (αναστολέας διαύλων καλίου) σχετίζεται προφανώς με τη διακίνηση του καλίου κατόπιν ενεργοποίησης των ευαίσθητων σε αμιλορίδη διαύλων νατρίου και των αντλιών νατρίου – καλίου που έπειτα από την εξισορρόπηση του ενδο- και εξωκυττάριου νατρίου επέφεραν μεταβολές και στις συγκεντρώσεις του καλίου δευτερογενώς, οι οποίες με τη σειρά τους θα πρέπει να επαναϊσορροπηθούν.

Στην προσπάθεια να αποσαφηνιστεί εάν τελικά είναι η μετακίνηση του νατρίου εκείνη που αποτελεί την κινητήριος δύναμη των όλων ηλεκτροχημικών φαινομένων που σχετίζονται με την προσθήκη ινσουλίνης, υπεζωκοτικοί ιστοί υπέστησαν προετοιμασία με ουαμπαΐνη, δηλαδή εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ουαμπαΐνης για τουλάχιστο μια ώρα προ της έναρξης των πειραμάτων. Η ινσουλίνη είχε παρόμοια δράση κατόπιν προσθήκης της αμιλορίδης, όπως και όταν οι ιστοί δεν

είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα ουαμπαΐνης. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση των αντλιών νατρίου – καλίου προφανώς έπεται των αλλαγών σε νάτριο στα κύτταρα του υπεζωκότα, ενεργοποιούνται δηλαδή δευτερογενώς. Μια άλλη παρατήρηση πολύ σημαντική ήταν ότι στους προετοιμασμένους με ουαμπαΐνη ιστούς, η προσθήκη της αμιλορίδης μαζί με την ινσουλίνη στην πλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη εξάλειψη της δράσης της δεύτερης, ενώ η χορήγηση της αμιλορίδης αντίθετα από τη χορήγηση της ινσουλίνης, δηλαδή στην εξωπλευρική επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα την μερική αναστολή της δράσης της ινσουλίνης. Επομένως, η κορυφαία μεμβράνη και η πλευρική επιφάνεια είναι εκείνη που σχετίζεται με τη μεγαλύτερη μετακίνηση νατρίου μέσω των διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη και σε δεύτερη μοίρα τίθεται η διακίνηση νατρίου μέσω διαύλων νατρίου ευαίσθητων σε αμιλορίδη από την βασική μεμβράνη και την εξωπλευρική επιφάνεια, η οποία όμως είναι ζωτικό να είναι πλήρως λειτουργική ως προς τη μετακίνηση νατρίου ώστε να μπορέσει η ινσουλίνη να επιδείξει την πλήρη δράση της. Αυτή η παρατήρηση βέβαια έρχεται σε αντίθεση με τα όσα έχουν ειπωθεί ως τώρα για τους νεφρούς, όπου η βασική μεμβράνη είναι εκείνη που τελικά φαίνεται πως σχετίζεται με την απαρχή της ανάπτυξης της δράσης της ινσουλίνης στο νεφρό. Βεβαίως θα πρέπει να αναλογισθούμε ότι ο ρόλος του νεφρού είναι τελείως διαφορετικός από τον ρόλο των μεσοθηλιακών κυττάρων και του υπεζωκότα: ο ρόλος των νεφρικών κυττάρων σχετίζεται με την επαναρρόφηση ή απέκκριση ηλεκτρολυτών και νερού ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στον οργανισμό ενώ για τον υπεζωκότα η διαταραχή ή έστω η μεταβολή στην μετακίνηση ηλεκτρολυτών και νερού όχι μόνο δεν είναι φυσιολογικός μηχανισμός του οργανισμού, αλλά μπορεί να οδηγήσει και σε νοσογόνους οντότητες όπως η ανάπτυξη υπεζωκοτικών συλλογών.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης, πειράματα με 3mM νατρίου Krebs διεξήχθησαν όπου φάνηκε η σπουδαιότητα του νατρίου στο όλο σύστημα. Η εξάλειψη του νατρίου είχε ως αποτέλεσμα τη μη μεταβολή της R_{TM} κατόπιν προσθήκης ινσουλίνης κάτι το οποίο μετά από όλα τα προαναφερθέντα καταδεικνύει το γεγονός ότι το νάτριο και η μετακίνησή του είναι το κύριο αποτέλεσμα της δράσης της ινσουλίνης στον υπεζωκότα και στη μετακίνηση αυτού ενεργοποιείται ο περαιτέρω μηχανισμός. Η χρήση διαλυμάτων Krebs με μόνο 3mM νατρίου βέβαια οδήγησε σε ωσμωτικές αλλαγές στο κύτταρο και μάλιστα διόγκωσή του με αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TM} στο επίπεδο αναφοράς πενταπλάσια ή εξαπλάσια της κανονικής μετρηθείσας σε διαλύματα Krebs με φυσιολογικό νάτριο. Αυτή η παρατήρηση καταδεικνύει και το γεγονός ότι η αύξηση της R_{TM} από την ινσουλίνη οφείλεται σε διακυτταρική διακίνηση ηλεκτρολυτών και νερού παρά σε απρόσκοπτη μετακίνηση νερού δια της παρακυττάρου οδού λόγω ώσμωσης ή από τη μετακίνηση γλυκόζης εντός των κυττάρων κάτι που είναι αναμενόμενο να συμβαίνει ταυτόχρονα με τις ηλεκτρολυτικές μεταβολές, διότι εαν απλώς επιδρούσε σε ωσμωτικές μεταβολές στο κύτταρο τότε παρά την εξάλειψη του νατρίου η R_{TM} θα αυξάνονταν περαιτέρω. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε.

Η εξάλειψη της γλυκόζης από τα διαλύματα Krebs δεν επέφεραν μεταβολή στη δράση της ινσουλίνης. Αντίθετα, η προσθήκη της σε διαλύματα χωρίς γλυκόζη αύξησε την αντίσταση όπως αυτό θα αναμένετο με τα κανονικά διαλύματα. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γλυκόζη δεν είναι απαραίτητη για την εκδίπλωση της ηλεκτροχημικής δράσης της ινσουλίνης στον υπεζωκότα. Βεβαίως, τίθεται ζήτημα ώσμωσης, ωστόσο σε τέτοια περίπτωση νερό θα έμπαινε στα κύτταρα για να αραιώσει την υπάρχουσα ενδοκυττάρια γλυκόζη οπότε και η αντίσταση θα αυξάνονταν (όπως για παράδειγμα συνέβει για τα πειράματα με χαμηλό

νάτριο). Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε όταν Krebs χωρίς γλυκόζη προστέθηκε στη πλευρική επιφάνεια ανθρώπινου ιστού, όπου η R_{TM} μειώθηκε και μάλιστα σημαντικά κυρίως δέκα λεπτά από την προσθήκη διαλυμάτων με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Επομένως, η ινσουλίνη επιφέρει άλλες μεταβολές και όχι μεταβολές ώσμωσης από την είσοδο γλυκόζης στα κύτταρα. Αδιευκρίνιστος ωστόσο παραμένει ο ρόλος των συμμεταφορέων νατρίου – γλυκόζης (SGLT). Ακόμη, το γεγονός ότι η ινσουλίνη μετέβαλλε τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του μεσοθηλιακού ιστού παρά τη χαμηλή γλυκόζη στο περιβάλλον, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι δύο μηχανισμοί είναι ξεχωριστοί και ικανοί να δρουν ανεξάρτητα από τη λειτουργικότητα του ενός από του άλλου. Έτσι, η ινσουλίνη μπορεί να μετακινεί γλυκόζη εντός των κυττάρων εξυπηρετώντας τη βασική της λειτουργία αλλά όταν βρεθεί εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας αναπτύσει και τη δράση της μετακίνησης ηλεκτρολυτών και νερού εντός των κυττάρων, μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα του υπεζωκότα.

Η χρησιμοποίηση διαλυμάτων Krebs χωρίς ασβέστιο, είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετικές επιδράσεις στη δράση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα. Έτσι, σε ιστούς που είχαν προετοιμασθεί με παρουσία ασβεστίου στο μέσο – περιβάλλον, η προσθήκη ινσουλίνης σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο δεν ανέστειλε τη δράση της, αλλά αυτή ήταν εμφανής τόσο για τον σπλαχνικό όσο και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα. Όταν οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν αφέθηκαν σε μέσο χωρίς ασβέστιο για τουλάχιστο μια ώρα, η δράση της ινσουλίνης ανεστάλη μερικώς. Το συμπέρασμα από αυτή την παρατήρηση είναι ότι προφανώς η εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου αλλά και οι οξειές μεταβολές του στο διάλυμα που διαβρέχει τον ιστό δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της δράσης της ινσουλίνης. Εκείνο που φαίνεται να είναι σημαντικό είναι το μέσο στο οποίο προετοιμάσθηκε ο ιστός, άρα και η παρουσία του ασβεστίου ενδοκυττάρια. Προφανώς η απουσία του

ασβεστίου από το μέσο προετοιμασίας οδηγεί σε έλλειψη ασβεστίου και στον ενδοκυττάριο χώρο κάτι το οποίο είναι σημαντικό για δύο προφανείς λόγους βάσει της βιβλιογραφίας: πρώτον είναι απαραίτητο για τη σταθερότητα της κυτταρικής μεμβράνης στην οποία βρίσκεται και ο υποδοχέας της ινσουλίνης [235, 248] και δεύτερον είναι απαραίτητο συστατικό του μηχανισμού των ενδοκυττάρων μεταβολών που επιφέρει η σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της.[249] Το ασβέστιο είναι γνωστό ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των κυττάρων του παγκρέατος προς απελευθέρωση ινσουλίνης.[250-252] Ωστόσο, το ασβέστιο φαίνεται ότι έχει σημαντική συμμετοχή και στην επίδραση της ινσουλίνης στη διεπιθηλιακή μετακίνηση ηλεκτρολυτών. Έτσι, η ινσουλίνη ενεργοποίησε διαύλους νατρίου ευαίσθητους σε αμιλορίδη μόνο παρουσία ασβεστίου στο κυττόπλασμα κυψελιδικών κυττάρων νεογνών [164, 253]. Οι Orser et al [254] έδειξαν ότι η ινσουλίνη ενεργοποίησε τη μετακίνηση νατρίου ευαίσθητη στην αμιλορίδη στη βασική μεμβράνη νεογνικών κυψελιδικών κυττάρων τύπου II η οποία ήταν ευαίσθητη στη συγκέντρωση ασβεστίου που προστέθηκε στα μπανάκια που διέβρεχαν τους ιστούς. Οι Ito et al [212, 213] έδειξαν ότι η απομάκρυνση του εξωκυττάρου ασβεστίου σε λεία μυϊκά κύτταρα αρτηριών δεν ανέστειλε τη δράση της ινσουλίνης στην διεπιθηλιακή αύξηση του δυναμικού κάτι το οποίο πέτυχε η μείωση των ενδοκυττάρων αποθηκών του ασβεστίου. Οι Kahn et al [255] δείχνανε συσχέτιση του ενδοκυττάρου ασβεστίου με την αύξηση της διεπιθηλιακής διαφοράς δυναμικού σε λείες μυϊκές ίνες από μηριαία αρτηρία σκύλων που σχετίζονταν με την ενεργοποίηση ευαίσθητων σε ουαμπαΐνη αντλιών νατρίου – καλίου. Σε νεογνικά κυψελιδικά κύτταρα τύπου II ποντικού φαίνεται ότι παρουσία ασβεστίου και μόνο η ινσουλίνη μπορούσε να ενεργοποιήσει διαύλους νατρίου ευαίσθητους σε αμιλορίδη, ενώ σε απουσία ασβεστίου η ινσουλίνη ενεργοποιούσε διαύλους καλίου ευαίσθητους

σε κινίνη. [164] Στο ίδιο άρθρο διαφαίνεται η στενή σχέση της ενεργοποίησης της τυροσινικής κινάσης και του κυττοσολικού ασβεστίου που υπεισέρχονται στην δράση της ινσουλίνης. Επομένως, στους ιστούς προετοιμασμένους με ασβέστιο, η ινσουλίνη έδρασε κανονικά ενεργοποιώντας την μετακίνηση νατρίου όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω μέσω ευαίσθητων σε αμιλορίδη διαύλων νατρίου, ενώ στην ένδεια του ασβεστίου πιθανότατα η ινσουλίνη ενεργοποίησε τμηματικά είτε διαύλους καλίου είτε μεταβλήθηκε η επίδρασή της στις αντλίες νατρίου – καλίου.[156]

Στην προσπάθεια της περαιτέρω αποσαφήνισης της δράσης της ινσουλίνης στον υπεζωκότα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με προσθήκη ινσουλίνης και γλιβενκλαμίδης. Η παρουσία της γλιβενκλαμίδης ανέστειλε τη δράση της ινσουλίνης στον σπλαχνικό και τοιχωματικό υπεζωκότα του προβάτου. Βέβαια, αύξηση της R_{TM} παρατηρήθηκε αλλά αυτή ήταν μη στατιστικά σημαντική. Όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, η γλιβενκλαμίδα αποτελεί μέλος της ομάδας των σουλφονυλουριών που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Η βασική της δράση έγκειται στην αναστολή διαύλων καλίου που απαιτούν ATP (K(ATP)) για τη λειτουργία τους με αποτέλεσμα την έκκριση ινσουλίνης ανάλογα με τη γλυκόζη στον οργανισμό. Τέτοια κανάλια έχουν αναγνωριστεί και σε άλλους ιστούς πέραν των β – κυττάρων των παγκρεατικών νησιδίων όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, όπου φαίνεται ότι επιδρούν και στη διακίνηση νερού και ηλεκτρολυτών. Πιο συγκεκριμένα, διάλυοι καλίου ευαίσθητοι σε γλιβενκλαμίδα είναι παρόντες στην κορυφαία μεμβράνη νεφρικών κυττάρων A6 και η λειτουργία τους σχετίζεται με μεταβολές στην ενδοκυττάρια περιεκτικότητα σε ATP [257] ενώ διάλυοι ευαίσθητοι σε γλιβενκλαμίδα είναι παρόντες και σε κύτταρα ουροδόχου κύστεως ποντικού.[258] Στα νεφρικά κύτταρα, η ενεργοποίηση των K(ATP) είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ενεργοποίηση των $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ ανιμεταφορέων (NKCC) σε

υπερωσμωτικές συνθήκες.[259] Αντίθετα, σε κύτταρα της αγκύλης του Henle η γλιβενκλαμίδη δεν μετέβαλε την επαναρρόφηση του νατρίου διότι δεν μεταβλήθηκε η λειτουργία της NKCC αλλά ούτε ελαττώθηκε η διακίνηση μέσω της παρακυττάριας οδού.[260] Τα K(ATP) στην βασική μεμβράνη των κυττάρων της αγκύλης του Henle και των συλλεκτικών σωληναρίων επεισέρχονται στην επαναρρόφηση του νατρίου και στην αποβολή του καλίου από τα νεφρά.[261, 262] Ωστόσο, η γλιβενκλαμίδη επεμβαίνει στην ισορροπία του ATP στο κύτταρο, και μάλιστα αρκετοί συγγραφείς προειδοποίησαν τη βλαπτική δράση της τόσο στα K(ATP) των επιθηλίων όσο και στα K(ATP) των μιτοχονδρίων κυττάρων και άλλων ιστών.[263] Στην παρούσα μελέτη με βάση τα όσα έχουν προαναφερθεί, η αναστολή της δράσης της ινσουλίνης από την γλιβενκλαμίδη μπορεί να εξηγηθεί ως: πρώτον, αναστολή των διαύλων καλίου που προφανώς είναι απαραίτητα για την νέα ισορροπία του καλίου μετά από τις μεταβολές στη μετακίνηση του νατρίου που κυρίως προκάλεσε η ινσουλίνη και δεύτερον, η αναστολή των K(ATP) που υπάρχουν και στον υπεζωκότα (όπως φαίνεται στα αποτελέσματα) οδηγεί σε ανωμαλία στην ισορροπία του ATP στο μεσοθηλιακό κύτταρο και επομένως αδυναμία επιτέλεσης της σύνδεσης της ορμόνης με τον υποδοχέα ή ολοκλήρωσης της ακολουθίας που ενεργοποιεί η σύνδεση ορμόνης – υποδοχέα καθώς, όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, το ATP είναι απαραίτητο συστατικό στις διεργασίες του μηχανισμού της σύνδεσης της ινσουλίνης. Βεβαίως, δεν μπορεί να αποκλεισθεί και η βλάβη των μεσοθηλιακών κυττάρων από την γλιβενκλαμίδη καθώς αυτή χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις ($10^{-3}M$) που μπορούν δυνητικά να καταστούν βλαπτικές.

Η ελάττωση του pH στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν είχαν κάποια ανασταλτική επίδραση στη δράση της ινσουλίνης. Έτσι, σε pH 7.2 (που μετράται στα περισσότερα υπεζωκοτικά υγρά που επιπλέκουν καρκίνους, ανοσολογικά νοσήματα ή

επιλεγμένα εξιδρώματα) η ινσουλίνη εμφάνισε κανονική δράση με αύξηση της R_{TM} . Επομένως, η δράση της ινσουλίνης δεν οδηγείται από τα επίπεδα του όξινου περιβάλλοντος στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Ωστόσο, είναι γνωστή η δράση της σε ανταλλάκτες νατρίου – υδρογόνου (sodium – hydrogen exchangers, NHE) σε άλλους ιστούς όπως επί παραδείγματι στα ερυθροκύτταρα [264] ή σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων [265] όπου φαίνεται ότι σχετίζεται με ενεργοποίησή τους και συμμετοχή στη ρύθμιση του ενδοκυττάρου pH αλλά και κατ' επέκταση στη μεταφορά και του νατρίου. Βέβαια, η συμμετοχή τέτοιων ανταλλακτών στους νεφρούς και ιδίως στην αγκύλη του Henle φαίνεται ότι είναι περιορισμένη [266] στην όλη διακίνηση των άλλων ηλεκτρολυτών τουλάχιστον σε κανονικές συνθήκες. Από πειράματα σε ανθρώπινους υπεζωκοτικούς ιστούς φαίνεται ότι η πτώση του pH στην υπεζωκοτική κοιλότητα οδηγεί σε δυσλειτουργία των μηχανισμών μετακίνησης ηλεκτρολυτών των μεσοθηλιακών κυττάρων και πτώση της R_{TM} αναλογικά με την πτώση του pH.[247] Στην παρούσα μελέτη, η αύξηση που παρατηρήθηκε από την προσθήκη ινσουλίνης σε διαλύματα pH 7.2 ήταν ελαφρώς μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε όταν η ινσουλίνη προστέθηκε σε διαλύματα με κανονικό pH 7.45. Αυτή η διαφορά και με βάση τα προαναφερθέντα θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή παρουσία NHE και στον υπεζωκότα, η δράση των οποίων προφανώς είναι περιορισμένη όπως προτείνεται από τα αποτελέσματα της μελέτης. Ωστόσο, η αποσαφήνιση πιθανού ρόλου τέτοιων αντιμεταφορέων στον υπεζωκότα παραμένει να διευκρινιστεί.

Συνοψίζοντας λοιπόν τη δράση της ινσουλίνης στον υπεζωκότα ανθρώπου και προβάτου, φαίνεται ότι αυτή η ορμόνη τον ενεργοποιεί απευθείας όσον αφορά την ηλεκτροχημεία του το οποίο αρχικά επιπροσθέτει και συνηγορεί υπέρ του γεγονότος και υπέρ της θεωρίας ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι 'ενεργά' και όχι παθητικά κύτταρα που απλώς επικαλύπτουν τον πνεύμονα ή περιβάλλουν το θωρακικό κλωβό.

Μάλιστα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν και στόχο δράσης της ινσουλίνης μιας βασικής ορμόνης του οργανισμού με πλείστες δράσεις. Στη συνέχεια, η εμφάνιση της ινσουλίνης στην υπεζωκοτική κοιλότητα οδηγεί σε αύξηση της αντίστασης και μείωση επομένως της διαπερατότητας του υπεζωκότα. Αυτό φαίνεται ότι προκαλείται από αθρόα εισροή νατρίου εντός των μεσοθηλιακών κυττάρων κυρίως από την πλευρά της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Ταυτοχρόνως η ινσουλίνη εξασκεί τη βασική της λειτουργία δηλαδή εισάγει γλυκόζη στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Η μείωση της γλυκόζης αυξάνει τη διαπερατότητα οδηγώντας σε είσοδο υγρού προς την υπεζωκοτική κοιλότητα επιτείνοντας έτσι την ανάπτυξη της υπεζωκοτικής συλλογής. Με τους δύο αυτούς βασικούς μηχανισμούς η ύπαρξη της ινσουλίνης στην υπεζωκοτική κοιλότητα θα μπορούσε θεωρητικά να εξηγήσει τη χαμηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη υπεζωκοτικών συλλογών που επιπλέκουν συστηματικά νοσήματα (πχ ρευματοειδής αρθρίτις, σαρκοείδωση ή ερυθριματώδης λύκος όπου ανευρέθησαν διαταραχές των επιπέδων ινσουλίνης αλλά και της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα αλλά και σε βιολογικά υγρά όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος), καρκίνους (πχ μεσοθηλιώματα με έκτοπη παραγωγή ινσουλίνης και άλλων παραγόντων), παραπνευμονικές συλλογές (χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης) ή ακόμη την ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής κατά την ινσουλινοθεραπεία (σύνδρομο οιδήματος ινσουλίνης) και την ανάπτυξη και επίταση της ίδιας της υπεζωκοτικής συλλογής μέσω μηχανισμών μετακίνησης ηλεκτρολυτών και υγρού όπως αυτό επισυμβαίνει για παράδειγμα στο νεφρό αφού επεμβαίνει στον καθορισμό της διαπερατότητας του υπεζωκότα. Ακόμη, σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι από όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν, διαφαίνεται μια παρόμοια δράση της ινσουλίνης σε διάφορα σημεία του οργανισμού όπως για παράδειγμα με τους νεφρούς για τους οποίους ο βασικός ρόλος στον οργανισμό είναι η απέκκριση και

επαναρρόφηση ηλεκτρολυτών και υγρού. Επομένως, η ινσουλίνη επιφέρει παρόμοιες επιδράσεις τόσο σε επιθηλιακούς όσο και σε μεσοθηλιακούς ιστούς εμφανίζοντας μεταξύ τους αρκετές ομοιότητες. Τέλος, φαίνεται ότι πλην ελαχίστων διαφορών η ινσουλίνη επιδρά με τον ίδιο τρόπο τόσο στον υπεζωκοτικό ιστό του προβάτου όσο και του ανθρώπου.

Η χρήση διαλυμάτων IGF – 1 επέφερε ηλεκτροχημικές μεταβολές στους ιστούς υπεζωκότα προβάτου και ανθρώπου. Από τα αποτελέσματα γίνεται καταφανές ότι η κύρια δράση του επικεντρώνεται στην εξωπλευρική (διάμεση) επιφάνεια του υπεζωκότα ή βασική μεμβράνη των μεσοθηλιακών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η R_{TM} αυξήθηκε κατά τη χορήγηση των διαλυμάτων IGF – 1 στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα αναφοράς. Η αύξηση της R_{TM} για την εξωπλευρική επιφάνεια οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο IGF – 1 προκαλεί μικρότερη διαπερότητα του υπεζωκότα όταν προέρχεται από την κυκλοφορία. Παρόμοια παρατήρηση πραγματοποιήθηκε και για τον τοιχωματικό υπεζωκότα και επομένως σε περιπτώσεις όγκων που εκκρίνουν IGF που επιπλέκονται από υπεζωκοτικές συλλογές μέρος της εξήγησης θα μπορούσε να αναζητηθεί στην προαναφερθείσα επίδραση του IGF – 1 στον υπεζωκότα που οδηγεί σε αύξηση της R_{TM} , ελάττωση της διαπερατότητας και εγκλωβισμό υγρού ή ελάττωση της αποχέτευσής του μέσω τουλάχιστο της ενεργητικής οδού που οδηγεί στο σχηματισμό υπεζωκοτικής συλλογής. Δεδομένου ότι οι ινσουλινοειδείς παράγοντες εμφανίζουν όπως φαίνεται και από το όνομά τους ιδιότητες αντίστοιχες της ινσουλίνης δηλαδή κατανάλωσης γλυκόζης από τα κύτταρα, η επίδραση του IGF – 1 θα μπορούσε να εξηγήσει, όπως και η ινσουλίνη, τόσο την ανάπτυξη υπεζωκοτικής συλλογής όσο και τη διαπίστωση χαμηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη αλλά και υπογλυκαιμία στην κυκλοφορία. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές περιπτώσεις όγκων του υπεζωκότα οι οποίοι φαίνεται ότι εκκρίνουν IGFs και

οδηγούν σε περιφερική υπογλυκαιμία στους ασθενείς η οποία υποχωρεί με την αφαίρεση του όγκου.[106-110] Σε όλες αυτές τις αναφορές, επιχειρείται σύνδεση της υπογλυκαιμίας στο αίμα με διάφορες ορμονικές μετρήσεις οι οποίες στην ουσία δεν είναι πάντα σύμφωνες: έτσι μετράται υψηλή συγκέντρωση IGF – 2 στο αίμα των ασθενών αυτών, χαμηλή συγκέντρωση ινσουλίνης, πεπτιδίου – C και IGF – 1, ενώ σε κάποιες άλλες αναφορές οι τιμές του IGF – 1 φαίνονται αυξημένες στην κυκλοφορία των ασθενών αυτών πιθανότατα λόγω παραγωγής από τον όγκο. Όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι υποστρέφουν με την αφαίρεση του όγκου, ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις αποτελείται από μεσεγχυματωγενή στοιχεία. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο IGF – 1 μπορεί να μετρηθεί και στα υπεζωκοτικά υγρά ασθενών με φυματιώδη και κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή.[205] Στη μελέτη αυτή, η μέτρηση του IGF – 1 ήταν παρόμοια με αυτή της κυκλοφορίας σε ασθενείς με φυματιώδη και καρκινωματώδη υπεζωκοτική συλλογή, ωστόσο η συγκέντρωση που μετρήθηκε ήταν μικρότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις σε υγιή δείγματα ασθενών. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα των IGFBP – 1 και 2 ήταν αυξημένα κάτι που σημαίνει ότι η βιοδιαθεσιμότητα και βιοενεργότητα των IGFs μπορεί να σχετίζεται και να ρυθμίζεται βάσει της συγκέντρωσης των υποδοχέων τους και όχι βάσει απλώς της απολύτου συγκεντρώσεώς τους. Βεβαίως, σε όλα τα άρθρα που αναφέρουν χαμηλές συγκεντρώσεις σε IGFs η εξήγηση θα μπορούσε να περιλαμβάνει το γεγονός ότι αυτοί οι παράγοντες μειώνονται ως αποτέλεσμα είτε της λοίμωξης, είτε της διαταραχής της διατροφής των ασθενών και διαταραχή των επιπέδων αυξητικής ορμόνης στο αίμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μακροφάγα και μονοκύτταρα ή T – λεμφοκύτταρα παράγουν και άλλους μεσολαβητές φλεγμονής και παράγοντες όπως ο TNF – a (tumor necrosis factor) ο οποίος έχει βρεθεί να ενεργοποιεί την παραγωγή από τα φλεγμονώδη κύτταρα του

IGF – 1.[267] Βέβαια, το τοπίο όσον αφορά τον IGF – 1 παραμένει σκοτεινό καθώς με βάση τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε και παραπάνω, σε άλλες αναφορές ο IGF – 1 φέρεται ως αυξημένης συγκέντρωσης στην κυκλοφορία των ασθενών [109] αλλά και στα υπεζωκοτικά υγρά ασθενών με καρκινωμάτωσης υπεζωκοτικές συλλογές.[206] Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα φαίνεται ότι η συγκέντρωση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είναι μικρότερο από τους υγιείς και κυρίως σε περιπτώσεις απομακρυσμένων μεταστάσεων.[268] Πάντως, ο ρόλος του IGF – 1 στην καρκινωμάτωση υπεζωκοτική συλλογή φαίνεται ότι παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος.

Για τον σπλαχνικό υπεζωκότα, η χορήγηση των διαλυμάτων IGF – 1 στην πλευρική επιφάνεια είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση και πάλι της R_{TM} αλλά στατιστικά μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε για τα πειράματα της εξωπλευρικής επιφάνειας. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όγκοι που εκκρίνουν IGF – 1 μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα μπορούν να προκαλέσουν υπεζωκοτική συλλογή και με έναν πρόσθετο μηχανισμό από αυτόν που προαναφέρθηκε: δηλαδή απευθείας επίδραση του IGF – 1 στον υπεζωκότα και παγίδευση υγρού με ελάττωση της διαπερατότητας και από το εσωτερικό της υπεζωκοτικής κοιλότητας και όχι μόνο μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Βεβαίως, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η προκληθείσα αύξηση της R_{TM} οφείλεται σε σύνδεση του IGF – 1 με τον υποδοχέα της ινσουλίνης, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, κάτι που όμως είναι λιγότερο συνηθισμένο.[269] Για τον τοιχωματικό υπεζωκότα του ανθρώπου, ο IGF – 1 δεν είχε επίδραση στην πλευρική επιφάνεια ενώ για τον πρόβιο τοιχωματικό υπεζωκότα παρατηρήθηκε μείωση της R_{TM} , στην πιο πυκνή συγκέντρωση (100nM) αλλά χωρίς η μείωση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική, όπως φαίνεται και στα διαγράμματα. Μια πιθανή εξήγηση της παρατήρησης αυτής θα μπορούσε να είναι επίδραση του

IGF – 1 στα στόματα των λεμφαγγείων που υπάρχουν στον τοιχωματικό υπεζωκότα και όχι στον σπλαχνικό, όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος.

Η αύξηση της R_{TM} που προκάλεσε η χορήγηση διαλυμάτων IGF – 1 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο IGF – 1 επεισέρχεται στη μετακίνηση ηλεκτρολυτών και υγρού στον υπεζωκότα, όπως συμβαίνει και επί παραδείγματι στους νεφρούς ή και σε άλλους ιστούς και μάλιστα η δράση του φαίνεται ότι επιτυγχάνεται στο ίδιο σημείο δηλαδή στην βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (158, 159, 270). Η μεταφορά ηλεκτρολυτών ενεργητικά διαμέσου κυτταρικών μεταφορέων, όπως αναφέρθηκε και για την ινσουλίνη, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν επιπλέον μηχανισμό παραγωγής ή επιδείνωσης υπεζωκοτικών συλλογών π.χ. σε φλεγμονές ή σε καρκίνους όπου τα επίπεδα του IGF – 1 τόσο στην κυκλοφορία όσο και στα υπεζωκοτικά υγρά μεταβάλλονται. Από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης γίνεται εμφανές ότι η διαταραχή της συγκέντρωσης του κυκλοφορούντος IGF – 1 μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της διαπερατότητας του υπεζωκότα και επομένως διαταραχή στην ομαλή αποχέτευση ή και παραγωγή του υπεζωκοτικού υγρού. Από την άλλη μεριά, ακόμη και φλεγμονή ή όγκοι ή εξεργασίες γενικότερα που αφορούν τοπικά τον υπεζωκότα θα μπορούσαν να παράγουν είτε απευθείας (πχ παραγωγή από κύτταρα μεσεγχυματικών όγκων ή φλεγμονώδη κύτταρα) είτε έμμεσα (πχ ενεργοποίηση από άλλους μεσολαβητές της φλεγμονής) IGF – 1 η παρουσία του οποίου στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της διαπερατότητας του υπεζωκότα και του μεσοθηλίου προς την κατεύθυνση της παρεμπόδισης της ανακύκλωσης του υπεζωκοτικού υγρού και επομένως να αποτελέσει δυνητικό παράγοντα ανάπτυξης υπεζωκοτικής συλλογής.

Σχετικά με τις δύο ουσίες γίνεται εμφανές ότι ο IGF – 1 ενεργοποιεί τον υπεζωκότα με ανάλογο μηχανισμό δηλαδή αύξησης της αντίστασης και ελάττωσης της διαπερατότητας με την ινσουλίνη. Ωστόσο, φαίνεται ότι το πεδίο δράσης τους διαφέρει καθώς για τον IGF – 1 η κύρια επιφάνεια δράσης είναι η εξωπλευρική αλλά και η πλευρική, ενώ για την ινσουλίνη η πλευρική. Άλλωστε, η ινσουλίνη αποτελεί ένα πιο «συνηθισμένο» μόριο για τον οργανισμό, ενώ οι IGFs παρουσιάζονται κυρίως σε καταστάσεις εκτροπής από το φυσιολογικό πχ σε καρκίνους. Τέλος, σημαντική πληροφορία της παρούσης μελέτης είναι η ομοιότητα απόκρισης του υπεζωκότα προβάτου και ανθρώπου στις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κάτι που καθιστά τον πρόβειο ιστό σχετικά συγγενή με τον ανθρώπινο.

Τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης επίσης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ενεργητική μετακίνηση υγρού και ηλεκτρολυτών μέσω κυτταρικών μεταφορέων και μάλιστα ότι αυτή ενεργοποιείται από διάφορες ουσίες όπως επί παραδείγματι ορμόνες που είτε παράγονται τοπικά είτε φθάνουν στον υπεζωκότα μέσω της κυκλοφορίας χωρίς αυτές να χάνουν τον βασικό τους ρόλο και μηχανισμό (πχ η πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα ως αποτέλεσμα της δράσης της ινσουλίνης). Η ανταπόκρισή τους στην ινσουλίνη και στον IGF – 1 και ο τρόπος που αυτή επιτυγχάνεται δίδει πληροφορίες χρήσιμες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κατόπιν ερευνών και σε κλινικό επίπεδο όπως για παράδειγμα η εμφάνιση υπεζωκοτικών συλλογών σε ινσουλινοθεραπεία ή χορήγηση ανταγωνιστών των IGF σε μεσοθηλιώματα ή σε περιφερικούς καρκίνους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνηγορούν υπέρ των ακόλουθων συμπερασμάτων:

1. Η ινσουλίνη προκαλεί μεταβολή της ηλεκτροφυσιολογίας του σπλαχνικού και τοιχωματικού υπεζωκότα με τα εξής χαρακτηριστικά:

- αύξηση της διαμεσοθηλιακής διαφοράς δυναμικού και αντίστασης
- άμεση επίδραση με ταχύτατη αύξηση εντός 5 λεπτών από τη χορήγηση αλλά με μικρή διάρκεια καθώς επανέρχεται εντός μισής ώρας
- κύρια δράση στην πλευρική (μεσοθηλιακή) επιφάνεια και καμία δράση στην εξωπλευρική επιφάνεια
- η δράση της εμφάνισε χαρακτηριστικά σύνδεσης ορμόνης – υποδοχέα.

2. Η επίδραση της ινσουλίνης επιτυγχάνεται μέσω ιοντικών κυτταρικών μεταφορέων που κυρίως βρίσκονται στην πλευρική επιφάνεια:

- η αμιλορίδη ανέστειλε τη δράση της όταν προστέθηκε μαζί με την ινσουλίνη αλλά μερικώς όταν προστέθηκε αντίθετα
- η ουαμπαΐνη επίσης ανέστειλε τη δράση της όταν προστέθηκε μαζί με την ινσουλίνη αλλά μερικώς όταν προστέθηκε αντίθετα
- η γλιβενκλαμίδα ανέστειλε τη δράση της.

3. Η δράση δεν επιτυγχάνεται μέσω παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου καθώς το L – NAME δεν ανέστειλε τη δράση της.

4. Ο κύριος ηλεκτρολύτης που εμπλέκεται στην δράση της ινσουλίνης είναι το νάτριο διότι:

- η εξάλησή του ανέστειλε πλήρως τη δράση της
- η εξάληψη του καλίου δεν είχε επίδραση στη δράση της.

5. Οι συνθήκες στην υπεζωκοτική κοιλότητα δεν επηρεάζουν τη δράση της:
 - Η χαμηλή γλυκόζη δεν ανέστειλε τη δράση της
 - Το χαμηλό pH επίσης δεν ανέστειλε τη δράση της.
6. Η ινσουλίνη επέφερε πιο σημαντικές μεταβολές στους ιστούς που προήλθαν από τις κατώτερες περιοχές της υπεζωκοτικής κοιλότητας.
7. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο είναι πολύ σημαντικό για τη δράση της καθώς η εξάλησή του σε ιστούς προετοιμασμένους χωρίς ασβέστιο ανέστειλε τη δράση της.
8. Ο σπλαχνικός και ο τοιχωματικός υπεζωκότας του προβάτου είχαν παρόμοια αντίδραση στην ινσουλίνη. Για τον ανθρώπινο υπεζωκότα η μόνη διαφορά υπήρξε η απόκριση του ιστού στην χορήγηση ινσουλίνης με ουαμπαΐνη.
9. Ο IGF – 1 είχε παρόμοια με την ινσουλίνη επίδραση στον υπεζωκότα προβάτου και ανθρώπου με τις εξής διαφορές:
 - η δράση του εντοπίστηκε κυρίως στην εξωπλευρική επιφάνεια
 - στην πλευρική επιφάνεια του σπλαχνικού υπεζωκότα η αντίσταση αυξήθηκε ενώ του τοιχωματικού μειώθηκε
 - δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της αντίστασης στην πλευρική επιφάνεια του ανθρώπινου υπεζωκότα
 - η αύξηση της αντίστασης ήταν εκθετική με την αύξηση της συγκέντρωσης
10. Και οι δύο ορμόνες φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των υπεζωκοτικών συλλογών και κυρίως σε αυτές που χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, εύρημα που θα μπορούσε να εξηγηθεί τμηματικά από τη δράση τους.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Η ανακύκλωση του υπεζωκοτικού υγρού προέρχεται από το συνδυασμό πιέσεων, λεμφαγγειακής αποχέτευσης και διακίνησης ουσιών από το μεσοθήλιο. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η συμβολή της ινσουλίνης και του IGF-1 στις υπεζωκοτικές συλλογές με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Ιστοί προβάτου και ανθρώπου τοποθετήθηκαν σε θαλάμους Ussing. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις ινσουλίνης και IGF-1, αναστολείς ιοντικών μεταφορέων (αμιλορίδη, ουαμπαΐνη, L-NAME, γλιβενκλαμίδη), χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , χαμηλό pH. Μελετήθηκε η διαφορά δυναμικού και η διαμεσοθηλιακή αντίσταση.

Η ινσουλίνη αύξησε την αντίσταση στην πλευρική επιφάνεια, κυρίως των κατώτερων περιοχών, στα πρώτα 5 λεπτά για συγκεντρώσεις $\geq 10^{-6}M$. Η αμιλορίδη και η ουαμπαΐνη εξάλησαν την επίδραση αυτή όταν προστέθηκαν μαζί με την ινσουλίνη, αλλά μερικώς όταν χορηγήθηκαν αντίθετα. Το L-NAME, το χαμηλό pH, η χαμηλή γλυκόζη και το χαμηλό K^+ δεν ανέστειλαν τη δράση της ινσουλίνης ενώ η ελάττωση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , η χαμηλή συγκέντρωση Na^+ την ανέστειλαν. Η χαμηλή γλυκόζη ελάττωσε την αντίσταση. Ο IGF-1 στην εξωπλευρική επιφάνεια αύξησε την αντίσταση, δοσοεξαρτώμενα, εντός 5 λεπτών. Στην πλευρική επιφάνεια του τοιχωματικού υπεζωκότα μείωσε την αντίσταση ενώ στην πλευρική του σπλαχνικού την αύξησε.

Συμπερασματικά, ο υπεζωκότας ενεργοποιείται άμεσα από την ινσουλίνη και τον IGF-1 που πιθανότατα εμπλέκονται στην παραγωγή και εξέλιξη των χαμηλών σε γλυκόζη υπεζωκοτικών συλλογών.

SUMMARY

The modern theory of pleural fluid recycling recognizes the role of pressures, lymphatic stomata and active transference across the pleural mesothelium. In the present study the interference of insulin and IGF-1 in the generation of low glucose pleural effusions was investigated, in sheep and human specimens, which were mounted in Ussing-type chambers. Changes of the potential difference and the trans-mesothelial resistance (R_{TM}) were determined after addition of: insulin and IGF-1 with ion transporters inhibitors (amiloride, ouabain, L-NAME, glibenclamide) or solutions with low K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , pH and glucose concentration.

Insulin (concentrations $\geq 10^{-6}M$) increased R_{TM} within 5 minutes towards the pleural surface (mainly for lower parts). Amiloride and ouabain completely abolished this increase when added on the same surface but partially when added on the opposite surface. L-NAME, low K^+ , low glucose and low pH had no inhibitory effect on R_{TM} increase which was abolished by low Na^+ , low intracellular Ca^{2+} and glibenclamide. IGF-1 increased R_{TM} , in a dose-dependent manner, within 5 minutes towards the interstitial and pleural surface for visceral but decreased it for pleural surface of parietal pleura.

In conclusion pleura is stimulated by insulin and IGF-1 which may interfere with production and development of low glucose pleural effusions.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wang NS. The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110: 623 – 633.
2. Zocchi L, Raffaini A, Agostoni E, Cremaschi D. Diffusional permeability of rabbit mesothelium. *J Appl Physiol* 1998; 85: 471 – 477.
3. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Equivalent radius of paracellular “pores” of the mesothelium. *J Appl Physiol* 1999; 87: 538 – 544.
4. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Macromolecule transfer through mesothelium and connective tissue. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2165 – 2173.
5. Bodega F, Zocchi L, Cremaschi D, Agostoni E. Electrical resistance and ion diffusion through mesothelium. *Respir Physiol Neurobiol* 2001; 124: 231 – 241.
6. McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. A study of the subgross pulmonary anatomy of various mammals. *Am J Anat* 1961; 108: 149 – 159.
7. Albertine KH, Wiener – Kronish JP, Staub NC. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. *Am J Anat* 1984; 208: 401 – 409.
8. Albertine KH, Wiener – Kronish JP, Roos PJ, Staub NC. Structure, blood supply and lymphatic vessels of the sheep’s visceral pleura. *Am J Anat* 1982; 165: 277 – 294.
9. Wang NS. Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19: 229 – 240.
10. Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, Didio LJA. Comparative electron – microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium as materials for cardiac valve bioprostheses. *J Submicrosc Cytol* 1986; 18: 53 – 56.

11. Thomas NW. Embriology and structure of the mesothelium. In: Jones JS, ed. Pathology of the mesothelium. New York, Springer – Verlag, 1987; pp. 1 – 13.
12. Agostoni E, Zocchi L. Solute coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol Neurobiol* 1990; 81: 19 – 27.
13. Gil J. Morphological basis of exchanges across the pleura. In: Chretien J, Bignon J, Hirsch A, eds. The pleura in health and disease. New York, Dekker, 1985; pp. 88 – 99.
14. Engelberg J, Radin J. Tracheal – vascular and vascular – pleural potential in rat lung. *Respir Physiol Neurobiol* 1977; 30: 253 – 263.
15. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. Electrolyte transport across the pleura of rabbits. *Respir Physiol Neurobiol* 1991; 86: 125 – 138.
16. Zocchi L, Cremaschi D, Agostoni E. Liquid volume, Na⁺ and mannitol concentration in a hypertonic mannitol – Ringer hydrothorax. *Respir Physiol Neurobiol* 1992; 89: 341 – 351.
17. Agostoni E, Zocchi L. Active Na⁺ transport and coupled liquid outflow from hydrothoraces of various size. *Respir Physiol Neurobiol*. 1993; 92: 101 – 123.
18. Zocchi L, Agostoni E, Cremaschi D. β – agonist activation of an amiloride insensitive transport mechanism in rabbit pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 1995; 100: 7 – 13.
19. Zocchi L, Agostoni E, Raffaini A. Effect of phloridzin on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits. *Exp Physiol* 1997; 81: 957 – 967.
20. Andrew PM, Porter KR. The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *Anat Rec* 1973; 177: 409 – 426.
21. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 463 – 481.

22. Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 12 – 20.
23. Staub NC, Wiener – Kronish JP, Albertine KH. Transport through pleura. In: Chretien J, Bignon J, Hirsch A, eds. *The pleura in health and disease*. New York, Dekker, 1985; pp. 169 – 193.
24. Negrini D, Mukenge S, Del fabbro M, Gonano C, Miserocchi G. Distribution of diaphragmatic lymphatic stomata. *J Appl Physiol* 1991; 90: 1544 – 1549.
25. Shinohara H. Distribution of lymphatic stomata on the pleural surface of the thoracic cavity and surface topography of the pleural mesothelium in the golden hamster. *Anat Rec* 1997; 249: 16 – 23.
26. Li YY, Li JC. Ultrastructure and three – dimensional study of the lymphatic stomata in the costal pleura of the rabbit. *Microsc Res Techniq* 2003; 62: 240 – 246.
27. Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C. Pleural liquid and solute exchange. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 825 – 847.
28. Lai – Fook SJ. Mechanics of the pleural space: fundamental concepts. *Lung* 1987 165: 249 – 267.
29. Lai – Fook SJ, Brown Lv, Maudgalya VS, Knapp CF, Ganesan S. Effect of increased acceleration on regional pleural pressure in dogs. *J Appl Physiol* 1991; 71: 611 – 619.
30. Lai – Fook SJ, Price DC, Staub NC. Liquid thickness vs vertical pressure gradient in a model of the pleural space. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1747 – 1754.
31. Lai – Fook SJ, Rodarte JR. Pleural pressure distribution and its relationship to lung volume and interstitial pressure. *J Appl Physiol* 1991; 70: 967 – 978.

32. Lai – Fook SJ, Wang PM. Dynamics of pleural liquid: mechanical factors affecting its formation and regional distribution. In: Lung biology in health and disease. Complexities in structure and function of the lung. Hlastala MP, Robertson, eds. New York, Dekker; 1998, pp. 123 – 149.
33. Weinaker A. Pleural disease. *Pulm Pathophysiol* 1999; 11: 239 – 267.
34. Miserocchi G, Venturoli D, Negrini D. Model of pleura fluid turnover. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1798 – 1806.
35. Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 1997; 10: 219 – 225.
36. Agostoni E, D'Angelo E. Pleural liquid pressure. *J Appl Physiol* 1991; 71: 393 – 403.
37. Negrini D, Del Fabbro M, Venturoli D. Fluid exchanges across the parietal peritoneal and pleural mesothelia. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1779 – 1784.
38. Lai – Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev* 2004; 84: 385 – 410.
39. Miserocchi G, Negrini D. Pleural space: pressure and fluid dynamics. *Lung* 1997; 88: 1217 – 1225.
40. Bhattacharya J, Gropper MA, Staub NC. Interstitial fluid pressure gradient measured by micropuncture in excised dog lung. *J Appl Physiol* 1984; 56: 271 – 277.
41. Kim KJ, McElroy – Critz A, Crandall ED. Transport of water and solutes across sheep visceral pleura. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 883 – 892.
42. Negrini D, Townsley MI, Taylor AE. Hydraulic conductivity of the canine parietal pleura in vivo. *J Appl Physiol* 1990; 69: 438 – 442.

43. Payne DK, Kinasewitz GT, Gonzales E. Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2558 – 2564.
44. Rolf LL, Travis DM. Pleural fluid plasma bicarbonate gradients in oxygen toxic and normal rats. *Am J Physiol* 1973; 224: 857 – 861.
45. Broaddus VC, Araya M. Liquid and protein dynamics using a new minimally invasive pleural catheter in rabbits. *J Appl Physiol* 1992; 72: 851 – 857.
46. Wiener – Kronish JP, Albertine KH, Licko V, Staub NC. Protein egress and entry rates in pleural fluid and plasma in sheep. *J Appl Physiol* 1984; 56: 459 – 463.
47. Broaddus VC, Araya M, Carlton DP, Bland RD. Developmental changes in pleural liquid protein concentration in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 38 - 41.
48. Broaddus VC, Wiener – Kronish JP, Berthiaume Y, Staub NC. Removal of pleural liquid and protein by lymphatics in awake sheep. *J Appl Physiol* 1988; 64: 384 – 390.
49. Miserocchi G, Kelly S, Negrini D. Pleural and extrapleural interstitial liquid pressure measured by cannulas and micropipettes. *J Appl Physiol* 1988; 65: 555 – 562.
50. Miserocchi G, Negrini D, Gonano C. Direct measurement of interstitial pulmonary pressure in *in situ* lung with intact pleural space. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2168 – 2174.
51. Michel CC. fluid movements through capillary walls. In: Renkin EM, Michel CC, eds. *Handbook of physiology: the cardiovascular system, microcirculation*. Baltimore, American Physiological Society, 1984, pp. 375 – 409.

52. Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability. *J Appl Physiol* 1951; 167: 13 – 46.
53. Renkin EM. Transport of large molecules across capillary wall. *Physiologist* 1964; 7: 13 – 28.
54. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir Mon* 2002; 22: 28 – 49.
55. Agostoni E, Agostoni PG, Zocchi L. Pleural liquid pressure in the zone of opposition and in the lung zone. *Respir Physiol Neurobiol* 1989; 75: 357 – 370.
56. Benos DJ. Introduction to physiology: cellular membranes and transmembrane transport of solutes and water. *Am J Physiol* 1996; 271: S2 – S9.
57. D' Angelo E, Heisler N, Agostoni E. Acid – base balance of pleural liquid in dogs. *Respir Physiol Neurobiol* 1979; 37: 137 – 149.
58. Liaw YS, Yang PC, Yu CJ, Kuo SH, Luh KT, Lin YJ, Wu ML. PKC activation is required by EGF stimulated $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger in human pleural mesothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: 665 – 672.
59. Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1565 – 1569.
60. Sarkos S, Hatzoglou CH, Dahabre J, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 132: 233 – 7.
61. Kinasewitz GT, Groome LJ, Marshall RP, Leslie WK, Diania JD. Effect of hypoxia on permeability of pulmonary endothelium of canine visceral pleura. *J Appl Physiol* 1986; 61: 554 – 560.

62. Butler JP, Huang SH, Lai – Fook SJ, Wang PM, Wilson TA. Model for a pump that drives circulation of pleural fluid. *J Appl Physiol* 1995; 78: 23 – 29.
63. Conhaim RB, McGrath AM, Harms BA. Does plasma protein depletion increase lung liquid conductance? *Am Respir Crit Care Med* 1996; 153: 677 – 683.
64. Agostoni E, Zocchi L. Starling forces and lymphatic drainage in pleural liquid and protein exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 1977; 86: 271 – 281.
65. Bodega F, Zocchi L, Agostoni E. Albumin transcytosis in mesothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L3 – L11.
66. Agostoni E, Bodega F, Zocchi L. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Apply Physiol* 2002; 93: 1806 – 1812.
67. Wang PM, Lai – Fook SJ. Regional pleural filtration and absorption measured by fluorescent tracers in rabbits. *Lung* 1999; 177: 289 – 309.
68. Gourgoulianis KI. Diagnostic value of adenosine deaminase activity in tuberculus effusions. *Eur Respir J* 1990; 3: 1098.
69. Broaddus VC, Light RW. General principles and diagnostic approach. In: Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushley HA Jr, eds. *Textbook of respiratory medicine*. Philadelphia, WB Saunders, 2000; pp. 1995 – 2112.
70. Miserocchi G, Negrini D, Mukenge S, Turconi P, Del Fabbro M. Liquid drainage through the peritoneal diaphragmatic surface. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1579 – 1585.
71. Miserocchi G, Venturoli D, Negrini D, Del Fabbro M. Model of pleural fluid turnover. *J Appl Physiol* 1993; 75: 1798 – 1806.
72. Negrini D, Fabbro MD. Subatmospheric pressure in the rabbit pleura lymphatic networks. 1999; 520: 761 – 769.

73. Schmid – Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990; 70: 987 – 1028.
74. Agostoni E, Zocchi L. Starling forces and lymphatic drainage in pleural liquid and protein exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 1991; 86: 271 – 281.
75. Townsley MI, Negrini D, Ardell JL. Regional blood flow to canine parietal pleura and internal intercostal muscle. *J Appl Physiol* 1991; 70: 97 – 102.
76. Drake R, Giesler M, Laine G, Gabel J, Hansen T. Effect of outflow pressure on lung lymph flow in unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1985; 58: 70 – 76.
77. Lai – Fook SJ, Kaplowitz MR. Pleural protein concentration and liquid volume in spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* 1987; 35: 101 – 108.
78. Miserocchi G, Agostoni E. contents of the pleural space. *J Appl Physiol* 1971; 30: 208 – 213.
79. Sahn SA, Willcox ML, Good JT Jr, Potts DE, Filley GF. Characteristics of normal rabbit pleural fluid: physiologic and biochemical implications. *Lung* 1979; 156: 63 – 69.
80. Noppen M, DeWaele M, Li R et al. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1023 – 1026.
81. Bowden FP, Tabor D. Friction and lubrication. London: Methuen, 1967.
82. Albertine KH, Wiener – Kronish JP, Bastacky J, Staub NC. No evidence of mesothelial cell contact across the costal pleural space in sheep. *J Appl Physiol* 1991; 70: 123 – 134.
83. Lai – Fook SJ, Kaplowitz MR. Pleural space thickness in situ by light microscopy in five mammalian species. *J Appl Physiol* 1985; 59: 603 – 610.

84. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 1980; 69: 507 – 511.
85. Chapman SJ, Davies RJO. Recent advances in parapneumonic effusion and empyema. *Curr Op Pulm Med* 2004; 10: 299 – 304.
86. Sahn SA. Management of complicated parapneumonic effusions. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 813 – 817.
87. Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Clin Chest Med* 1985; 6: 55 – 62.
88. Alfageme I, Munoz F, Pena N, Umbria S. Empyema of the thorax in adults. Etiology, microbiologic findings and management. *Chest* 1993; 64: 591 – 596.
89. Light RW, McGregor MI, Ball WCJ, Luchsinger PC. Diagnostic significance of pleural fluid pH and PCO₂. *Chest* 1973; 64: 591 – 596.
90. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 1980; 69: 507 – 512.
91. Potts DE, Taryle DA, Sahn SA. The glucose – pH relationship in parapneumonic effusions. *Arch Intern Med* 1978; 138: 1378 – 1380.
92. Heffner JE, Brown LK, Barbieri C, DeLeo JM. Pleural fluid chemical analysis in parapneumonic effusions. A meta – analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1700 – 1708.
93. Idell S, Girard W, Koenig KB, McLarty J, Fair DS. Abnormalities of pathways of fibrin turnover in the human pleural space. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 187 – 194.
94. Chapman SJ, Davies RJO. The management of pleural space infections. *Respirology* 2004; 9: 4 – 11.

95. Shields T. General Thoracic Surgery. 4th Edition. Williams and Wilkins. Philadelphia.
96. Meyer PC. Metastatic carcinoma of the pleura. *Thorax* 1966; 21: 437 – 443.
97. Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura: an analysis of 96 patients. *Am J Med* 1977; 63: 695 – 702.
98. Xaubet A. Characteristics and prognostic value of pleural effusions in non – Hodgkin’s lymphomas. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 135 – 140.
99. Chretien J, Jauber F. Pleural responses in malignant metastatic tumors. In: Chretien J, Bignon J, Hirsch A, eds. *The pleura in health and disease*. New York, Dekker, 1985; pp. 489 -.
100. Yam LT. Diagnostic significance of lymphocytes in pleural effusions. *Ann Intern Med* 1967; 66: 972 – 982.
101. Derenski SC. Eosinophiles, pleural effusions and malignancy. *Ann Intern Med* 1978; 89: 424 – 430.
102. Good JT Jr, Taryle DA, Sahn SA. The diagnostic value of pleural fluid pH. *Chest* 1980; 78: 55 – 59.
103. Good JT Jr, Taryle DA, Sahn SA. The pathogenesis of low glucose, low pH malignant effusions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 737 – 741.
104. Limthongkul S. The pathogenesis of low pleural fluid glucose in acidotic malignant pleural effusions. *J Med Assoc Thai* 1989; 72: 492 – 497.
105. Sahn SA, Good JT Jr. Pleural fluid pH in malignant pleural effusion: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988; 108: 345 – 349.

106. Chaugle H, Parchment C, Grotte GJ, Keenan DJ. Hypoglycemia associated with a solitary fibrous tumour of the pleura. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 15: 84 – 86.
107. Fukasawa Y, Takada A, Tatenno M, Sato H, Koizumi M, Tanaka A, Sato T. Solitary fibrous tumor of the pleura causing recurrent hypoglycemia by secretion of insulin – like growth factor II. *Pathol Int* 1998; 48: 47 – 52.
108. Sari R, Altunbas H, Ozdogan M, Gurer EI, Karayalcin U. Severe and prolonged hypoglycemia triggered by long – acting octreotide in a patient with malignant mesenchymal tumor: case report. *J Chemotherap* 2003; 15: 85 – 88.
109. Strom EH, Skjorten F, Aarseth LB, Haug E. Solitary fibrous tumor of the pleura. An immunohistochemical, electron microscopic and tissue culture study of a tumor producing insulin – like growth factor I in a patient with hypoglycemia. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 109 – 113.
110. Chang ED, Lee EH, Won YS, Kim JM, Suh KS, Kim BK. Malignant solitary fibrous tumor of the pleura causing recurrent hypoglycemia: immunohistochemical stain of insulin – like growth factor I receptor in three cases. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 220 – 224.
111. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix A, Botha AS, Moomal Z. The acute phase response does not fully predict the presence of insulin resistance and dyslipidemia in inflammatory arthritis. *J Reumatol* 2002; 24: 462 – 466.
112. Rouabhia S, Ramanoelina J, Godmer P, Reach G, Dutel JL, Guillevin L. Insulin autoimmune syndrome revealing systemic lupus erythematosus. *Ann Med Interne (Paris)* 2003; 154: 59 – 60.

113. Kalambokis GN, Tsatsoulis AA, Tsianos EV. The edematogenic properties of insulin. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 575 – 590.
114. Chelliah A, Burge MR. Insulin edema in the twenty-first century: review of the existing literature. *J Investig Med* 2004; 52: 104 – 108.
115. Djrolo F, Gervaise N, Vaillant L, Yvon P, Lecomte P. Post-partum recurrent sarcoidosis associated with type I diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2003; 29: 82 – 85.
116. Voloshyn IaM. Exudative pleurisy in patients with diabetes mellitus. *Klin Khir* 2001; 12: 24 – 28.
117. Cuman RK, Bersani-Amado CA, Fortes ZB. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rat. *Inflamm Res* 2001; 50: 460 – 465.
118. Spring KR. Epithelial fluid transport. A century of investigation. *News Physiol Sci* 1999; 14: 92 – 100.
119. Balabann RS, Mandel LJ, Benos DJ. On the cross – reactivity of amiloride and 2,4,6 triaminopyrimidine (TAP) for the cellular entry and tight junctional cation permeation pathways in epithelia. *J Membrane Biol* 1979; 49: 363 – 390.
120. Gumbiner BM. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987; 253: C749 – C758.
121. Harris BJ, Chatton JY, Tran PH, Bungay PM, Spring KR. pH, morphology and diffusion in lateral intercellular spaces of the epithelial cell monolayers. *Am J Physiol* 1994; 266: C73 – C80.
122. Gorodeski GI, Goldfarb J. Extracellular ATP regulate transcervical permeability by modulating two distinct paracellular pathways. *Am J Physiol* 1997; 272: C1602 – C1610.

123. Gorodeski GI, Desantis BJ, Goldfarb J, Utian WH, Hopfer U. Osmolar changes regulate the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol* 1995; 269: C870 – C877.
124. Wright EM, Pietras RJ. Routes of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J Membrane Biol* 1974; 17: 293 – 312.
125. Twchugguel W, Zhegu Z, Gajdzik L, Maier M, Binder BR, Graf J. High precision measurement of electrical resistance across endothelial cell monolayers. *Pflugers Arch* 1995; 430: 145 – 147.
126. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in short – circuit isolated frog skin. *Acta Physiol Scandinav* 1951; 23: 110 – 127.
127. Armstrong W. The cell membrane and biological transport. *Physiology* 1985; 1: 1 – 37.
128. Manalis RS, Hastings L. Electrical gradients across an ion – exchange membrane in student’s artificial cell. *J Appl Physiol* 1974; 36: 769 – 770.
129. Kelley TJ, Cotton CU, Drumm ML. Regulation of amiloride – sensitive sodium absorption in murine airway epithelium by C – type natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1998; 274: L990 – L996.
130. Palmer LG. Sodium transport by epithelial cells. *Mol Biol Membrane Transp Dis* 1996; 22: 447 – 468.
131. Garty H, Benos DJ. Characteristics and regulatory mechanisms of amiloride – blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev* 1988; 68: 309 – 373.
132. Li KX, Sperelakis N. Electrogenic Na⁺/K⁺ pump current in rat skeletal myoballs. *J Cell Physiol* 1994; 159: 181 – 186.

133. Sperelakis N. Origin of resting membrane potentials. Cell Physiology Source Book 1995; 6: 67 – 90.
134. Urbach V, Kerkhove E, Maguire D, Harvey BJ. Cross – talk between ATP – regulated K⁺ channels and Na⁺ transport via cellular metabolism in frog skin principal cells. J Physiol 1996; 491: 99 – 109.
135. Barajas – Lopez C, Huizinga JD. Ouabain – induced excitation of colonic smooth muscle due to block of K⁺ conductance by intracellular Na⁺ ions. Eur J Pharmacol 1992; 221: 51 – 58.
136. Moncada S, Palmer RMG, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109 – 142.
137. Mehta S, Boudreau J, Lilly CM, Drazen JM. Endogenous pulmonary nitric oxide in regulation of airway microvascular leak. Am J Physiol 1998; 275: L968 – L998.
138. Takahashi N, Kawai Y, Ohhashi T. Effects of vasoconstrictive and vasodilative agents on lymphatic smooth muscles in isolated canine thoracic ducts. 1990; J Pharmacol 254: 165 – 170.
139. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium – derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci 1987; 84: 9265 – 9269.
140. Galiotta LJ, Musante L, Romio L, Caruso U, Fantasia A, Gazzolo A, Romano L, Sacco O, Rossi GA, Varesio L, Zegarra- Moran O. An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. Am J Physiol 1998; 275: L917 – L923.

141. Panten U, Schwanstecher M, Schwanstecher C. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 1–9.
142. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 1999; 20: 101–135.
143. Huopio H, Jääskeläinen J, Komulainen J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Laakso M, Tapanainen P, Voutilainen R, Otonkoski T. Acute insulin response tests for the differential diagnosis of congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 4802 – 4807.
144. Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar – Bryan L, Bryan J. Reconstituted human cardiac K(ATP) channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* 1998; 83: 1132 – 1143.
145. Seino H, Yamaguchi H, Misaki A, Sakata Y, Kitagawa M, Yamazaki T, Kikuchi H, Abe R. Clinical effect of combination therapy of pioglitazone and an alpha-glucosidase inhibitor. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 675 – 682.
146. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 2000; 525: 587 – 592.
147. Brochiero E, Wallendorf B, Gagnon D, Laprade R, Lapointe JY. Cloning of rabbit Kir6.1, SUR2A, and SUR2B: possible candidates for a renal K(ATP) channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F289 – 300.
148. Quast U. ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996; 354: 213 – 25.
149. Oldenburg O, Qin Q, Sharma AR, Cohen MV, Downey JM, Benoit JN. Acetylcholine leads to free radical production dependent on K(ATP) channels,

- G(i) proteins, phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 544 – 52.
150. Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1606: 1 – 21.
 151. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83: 1113 – 51.
 152. Engbersen R, Moons MM, Wouterse AC, Dijkman HB, Kramers C, Smits P, Russel FG. Sulphonylurea drugs reduce hypoxic damage in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol.* 2000; 130:1678 – 84.
 153. Kosior-Korzecka U, Bobwiec R, Lipecka C. Fasting induced changes in ovulation rate, plasma leptin, gonadotrophins, GH, IGF-I and insulin concentrations during oestrus in ewes. *J Vet Med Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53: 5 – 11.
 154. Crabbe J. Insulin, glucagons and active transport: from man to amphibia and back. In: *Transport mechanics in epithelia*. Ussing HH, Thorn NA, eds. New York, Academic 1973, pp 173 – 184.
 155. Herrera FC. Effect of insulin on short circuit current and sodium transport across toad urinary bladder. *Am J Physiol* 1965; 209: 819 – 824.
 156. Cox M, Singer I. Insulin mediated Na⁺ transport in the toad urinary bladder. *Am J Physiol* 1977; 232: F270 – F277.
 157. Record RD, Johnson M, Lee SY, Blazer – Yost BL. Aldosterone and insulin stimulate amiloride-sensitive sodium transport in A6 cells by additive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271: C1079 – C1084.

158. Blazer – Yost BL, Cox M, Furlanetto R. Insulin and IGF – I receptor mediated Na⁺ transport in toad urinary bladders. *Am J Physiol Cell Physiol* 1989; 257: C612 – C620.
159. Blazer – Yost BL, Shah N, Jarett L, Cox M, Smith RM. Insulin and IGF – I receptors in a model renal epithelium: receptor localization and characterization. *Biochem Int* 1992; 28: 143 – 153.
160. Fidelman ML, May JM, Biber TUL, Watlington CO. Insulin stimulation of Na⁺ transport and glucose metabolism in cultured kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1982; 242: C121 – C123.
161. Record RD, Froelich L, Vlahos CJ, Blazer – Yost BL. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulated sodium transport in A6 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 274: E611 – E617.
162. Shane MA, Nofziger C, Blazer-Yost BL. Hormonal regulation of the epithelial Na⁺ channel: from amphibians to mammals. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 147: 85 – 92.
163. Marunaka Y, Hagiwara N, Tohda H. Insulin activates single amiloride blockable Na⁺ channels in a distal nephron cell line (A6). *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1991; 263: F392 – F400.
164. Marunaka Y, Niisato N, O' Brodovich H, Post M, Tanswell AK. Role of Ca²⁺ and protein tyrosine kinase on insulin action on cell volume via Na⁺ and K⁺ channels and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in fetal rat alveolar type II pneumocyte. *J Memb Biol* 1999; 168: 91 – 101.
165. De Smet P, Simaels J, Van Driessche W. Regulatory volume decrease in a renal distal tubular cell line (A6). II. Effect of Na⁺ transport rate. *Pflugers Arch* 1995; 430: 945 – 53.

166. Erlij D, De Smet P, Van Driessche W. Effect of insulin on area and Na⁺ channel density of apical membrane of cultured toad kidney cells. *Am J Physiol* 1994; 481: 533 – 542.
167. Fidelman ML, Watlington CO. Effect of aldosterone and insulin on mannitol, Na⁺ and Cl⁻ fluxes in cultured epithelia of renal origin (A6): evidence for increased permeability in the paracellular pathway. *Biochim Biophys Acta* 1987; 931: 205 – 214.
168. West A, Blazer – Yost BL. Modulation of basal and peptide hormone stimulated Na⁺ transport by membrane cholesterol content in the A6 epithelial cell line. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 263 – 270.
169. Smet PD, Erlij D, Van Driessche W. Insulin effects on ouabain binding in A6 renal cells. *Pflugers Arch* 1997; 434: 11 – 18.
170. Siegel B, Civan MM. Aldosterone and insulin effects on driving force of Na⁺ pump on toad bladder. *Am J Physiol* 1976; 230: 1603 – 1608.
171. Kahn A, Seidel C, 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.
172. Tack CJ, 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.
173. Sugahara K, Freidenberg GR, Mason RJ. Insulin binding and effects on glucose and transepithelial transport by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1984; 247: 472 – 477.

174. Carstens S, Danielsen G, Guldhammer B, Frederiksen O. Transport of insulin across rabbit nasal mucosa in vitro induced by didecanoyl-L- α -P-tidylcholine. *Diabetes* 1993; 42: 1032 – 1040.
175. Papayianni M, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Insulin NO-dependent action on airway smooth muscles. *Nitric oxide* 2001; 5: 72 – 76.
176. Ribiere C, Jaubert AM, Sabourault D, Lacasa D, Giudicelli Y. Insulin stimulates nitric oxide production in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 394 – 399.
177. Aschenbach JR, Wehning H, Kurze M, Schaberg E, Nieper H, Burckhardt G, Gäbel G. Functional and molecular biological evidence of SGLT-1 in the ruminal epithelium of sheep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G20 – 7.
178. Hemlin M, Huang X. Na⁺/glucose cotransport in the colonic adenocarcinoma cell line HT29 cl.19A: effect of cAMP. *Acta Physiol Scand* 1997; 160: 185 – 94.
179. Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 2004; 447: 510 – 518.
180. DeBosch BJ, Deo BK, Kumagai AK. Insulin-like growth factor-1 effects on bovine retinal endothelial cell glucose transport: role of MAP kinase. *J Neurochem* 2002; 81: 728 – 734.
181. Dørup I, Flyvbjerg A. Effects of IGF-I infusion on growth and muscle Na(+)-K(+) pump concentration in K(+)-deficient rats. *Am J Physiol* 1993; 264: E810 – E815.

182. Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER. Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 2868 – 72.
183. Hirschberg R, Kopple JD. Evidence that insulin-like growth factor I increases renal plasma flow and glomerular filtration rate in fasted rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 326 – 30.
184. Jones JI and Clemmns DR. Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological action. *Endocr Rev* 1995; 15: 3 – 34.
185. Blazer-Yost BL, Record RD, Oberleithner H. Characterization of hormone-stimulated Na⁺ transport in a high-resistance clone of the MDCK cell line. *Pflugers Arch* 1996; 432: 685 – 91.
186. Blazer-Yost BL, Cox M. Insulin-like growth factor 1 stimulates renal epithelial Na⁺ transport. *Am J Physiol* 1988; 255: C413 – 7.
187. Staruschenko A, Pochynyuk O, Vandewalle A, Bugaj V, Stockand JD. Acute regulation of the epithelial Na⁺ channel by phosphatidylinositide 3-OH kinase signaling in native collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1652 – 61.
188. Johnson DW, Brew BK, Poronnik P, Cook DI, Field MJ, Györy AZ, Pollock CA. Insulin-like growth factor I stimulates apical sodium/hydrogen exchange in human proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1997; 272: F484 – 90.
189. Yuan W, Yu-Jung C, Dimin L, Ruimin G, Wen-Hui W. Dual effect of insulin-like growth factor on the apical 70-pS K channel in the thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1258 – C1263.

190. Kojima I, Matsunaga H, Kurokawa K, Ogata E, Nishimoto I. Calcium influx: an intracellular message of the mitogenic action of insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 1988; 263: 16561 – 7.
191. Xing C, Yin Y, He X, Xie Z. Effects of insulin-like growth factor 1 on voltage-gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 2006; 1072: 30 – 32.
192. von Lewinski D, Voss K, Hülsmann S, Kögler H, Pieske B. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca^{2+} -dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circ Res* 2003; 92: 169 – 176.
193. Freestone NS, Ribaric S, Mason WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol Cell Biochem* 1996; 163: 223-229.
194. Matsuda T, Murata Y, Tanaka K, Hosoi R, Hayashi M, Tamada K, Takuma K, Baba A. Involvement of Na^+ , K^+ ATPase in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1996; 66: 511 – 516.
195. Simmons DA, Winegrad AI. Insulin does not regulate vascular smooth muscle Na^+ , K^+ -ATPase activity in rabbit aorta. *Diabetologia* 1993; 36: 212 – 217.
196. Henke G, Setiawan I, Böhmer C, Lang F. Activation of Na^+ , K^+ -ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase isoforms. *Kidney Blood Pres Res* 2002; 25: 370 – 374.
197. Sakuta H. Potentiation by insulin and insulin-like growth factor-1 of glibenclamide-sensitive K^+ currents in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 375 – 380.
198. McRoberts JA, Riley NE. Regulation of T84 cell monolayer permeability by insulin-like growth factors. *Am J Physiol* 1992; 262: C207 – 213.

199. Paye JM, Akers RM, Huckle WR, Forsten-Williams K. Autocrine production of insulin-like growth factor-I (IGF-I) affects paracellular transport across epithelial cells in vitro. *Cell Commun Adhes* 2007; 14: 85 – 98.
200. Chin E, Zhou J, Bondy C. Anatomical relationships in the patterns of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-1, and IGF receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinology* 1992; 130: 3237 – 3245.
201. Chokkalingam AP, Pollak M, Fillmore CM, Gao YT, Stanczyk FZ, Deng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Fears TR, Madigan MP, Ziegler RG, Fraumeni JF Jr, Hsing AW. Insulin-like growth factors and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 421 – 7.
202. Berrahmoune H, Herbeth B, Lamont JV, Lambert D, Blankenberg S, Tiret L, FitzGerald PS, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of classical and related inflammatory markers with high-sensitivity C-reactive protein in healthy individuals: results from the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1339 – 46.
203. Kooijman R, Himpe E, Potikanond S, Coppens A. Regulation of interleukin-8 expression in human prostate cancer cells by insulin-like growth factor-I and inflammatory cytokines. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 383 – 91.
204. Han JY, Choi BG, Choi JY, Lee SY, Ju SY. The prognostic significance of pretreatment plasma levels of insulin-like growth factor IGF-1, IGF-2, and IGF binding protein-3 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 54: 227 – 34.

205. LeBouc Y, Bellocq A, Philippe C, Perin L, Garabedian M, Fouqueray B, Zacharias C, Cadranel J, Baud L. Insulin like growth factors and their binding proteins in pleural fluid. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 467 – 473.
206. Olchovsky D, Shimon I, Goldberg I, Shulimzon T, Lubetsky A, Yellin A, Pariente C, Karasik A, Kanety H. Elevated insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-2 in malignant pleural effusion. *Acta Oncol* 2002; 41: 182 – 7.
207. Kaplan SA, Cohen P. The somatomedin hypothesis 2007: 50 years later. *J Clin Endocrinol Metabol* 2007; 92: 4529 – 4535.
208. Negrini D, Reed RK, Miserocchi G. Permeability surface area product and reflection coefficient of the parietal pleura in dogs. *J Appl Physiol* 1991; 71: 2543 – 2547.
209. Payne DK, Kinasewitz GT, Gonzalez E. Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2558 – 2564.
210. Parameswaran S, Brown LV, Ibbott GS, Lai – Fook SJ. Hydraulic conductivity, albumin reflection and diffusion coefficients of pig mediastinal pleura. *Microvasc Res* 1999; 58: 114 – 127.
211. Lewis SA, Diamond JM. Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membrane Biol* 1976; 28: 1 – 40.
212. Ito O, Kondo Y, Oba M, Takahashi N, Omata K, Abe K. Tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C regulate insulin-stimulated NaCl absorption in the thick ascending limb. *Kidney Int* 1997; 51: 1037-41.
213. Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Kudo K, Igarashi Y, Omata K, Imai Y, Abe K. Insulin stimulates NaCl transport in isolated perfused MTAL of Henle's loop of rabbit kidney. *Am J Physiol* 1994; 267: F265 – 70.

214. Yamamoto A, Tanaka H, Okumura S, Shinsako K, Ito M, Yamashita M, Okada N, Fujita T, Muranishi S: Evaluation of insulin permeability and effects of absorption enhancers on its permeability by an in vitro pulmonary epithelial system using *Xenopus* pulmonary membrane. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 385 – 389.
215. Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Hatzoglou A, Castanas E, Molyvdas PA. Rapid effects of 17 β -estradiol and progesterone on sheep visceral and parietal pleurae via a nitric oxide pathway. *J Appl Physiol* 2002; 93: 752 – 758.
216. Hoppin FG Jr, Green ID, Mead J. Distribution of pleural pressure surface in dogs. *J Appl Physiol* 1969; 27: 863 – 873.
217. Hubmayr RD, Walters BJ, Chevalier PA, Rodarte JR, Olson LE. Topographic distribution of regional lung volume in anesthetized dogs. *J Appl Physiol* 1983; 54: 1048 – 1056.
218. Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, Ioannou M, Paraskeva E, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Comparison of the electrophysiological properties of the sheep isolated costal and diaphragmatic pleura. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 129 – 131.
219. Kouritas VK, Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Variations of the electrophysiological function of the sheep pleural membrane according to location within pleural cavity. *Exp Lung Res* 2007; (article under review).
220. Li YY, Li JC. Ultrastructural study of pleural lymphatic drainage unit and effect of nitric oxide on the drainage capacity of pleural lymphatic stomata in the rat. *Ann Anat* 2004; 186: 25 – 31.
221. Janssen YM, Soultanakis R, Steece K, Heerdt E, Singh RJ, Joseph J, Kalyanaraman B. Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations,

- apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am J Physiol* 1998; 275: L1100 – 1109.
222. Owens MW, Grisham MB. Nitric oxide synthesis by rat pleural mesothelial cells: induction by cytokines and lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1993; 265: L110 – 116.
223. de la Rosa DA, Canessa CM. Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 284: C404 – C414.
224. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL, Pearce D. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F303 – 13.
225. Blazer-Yost BL, Liu X, Helman SI. Insulin stimulated Na^+ transport is mediated by increase of apical Na^+ channels and not open probability in control and aldosterone prestimulated A6 epithelia (Abstract). *FASEB J* 1996; 10: A78.
226. Baxendale LM. Insulin increases apical sodium channel density in A6 epithelia (Abstract). *FASEB J* 1988; 2: A748.
227. Erlij D, De Smet P, VanDriessche W. Effect of insulin on area and Na^+ channel density of apical membrane of cultured toad kidney cells. *J Physiol (Lond.)* 1994; 481: 533 – 542.
228. De Smet P, Simaels J, Van Driessche W. Regulatory volume decrease in a renal distal tubular cell line (A6). II. Effect of Na^+ transport rate. *Pflugers Arch* 1995; 430: 945 – 53.

229. De Smet P, Erljij D, Van Driessche W. Insulin effects on ouabain binding in A6 renal cells. *Pflugers Arch* 1997; 434: 11 – 18.
230. Féraille E, Rousselot M, Rajerison R, Favre H. Effect of insulin on Na(+),K(+)-ATPase in rat collecting duct. *J Physiol* 1995; 488: 171 – 80.
231. Clausen T, Flatman JA. Effects of insulin and epinephrine on Na⁺-K⁺ and glucose transport in soleus muscle. *Am J Physiol* 1987; 252: E492 – 9.
232. Féraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H. Modulation of Na(+),K(+)-ATPase activity by a tyrosine phosphorylation process in rat proximal convoluted tubule. *J Physiol* 1997; 498: 99 – 108.
233. Féraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H. Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. *Am J Physiol* 1994; 267: F55 – 62.
234. Schoen HF, Erljij D. Insulin action on electrophysiological properties of apical and basolateral membranes of frog skin. *Am J Physiol* 1987; 252: C411 – 7.
235. Schoen HF, Erljij D. Basolateral membrane responses to transport modifiers in the frog skin epithelium. *Pflugers Arch* 1985; 405: S33 – 8.
236. Longo N, Scaglia F, Wang Y. Insulin increases the turnover rate of Na⁺-K⁺-ATPase in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C912 – C919.
237. Clausen T, Hansen O. Active Na-K transport and the rate of ouabain binding. The effect of insulin and other stimuli on skeletal muscle and adipocytes. *J Physiol* 1977; 270: 415 – 30.
238. Marette A, Krischer J, Lavoie L, Ackerley C, Carpentier JL, Klip A. Insulin increases the Na⁺, K⁺-ATPase α -2 subunit in the surface of rat skeletal muscle: morphological evidence. *Am J Physiol* 1993; 265: C1716 – C1722.

239. Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramlal R, Blostein R, Klip A. Insulin induces translocation of the α -2 and β -1 subunits of the Na^+ , K^+ -ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 1992; 267: 5040 – 5043.
240. Sargeant RB, Liu Z, Klip A. Action of insulin on Na^+ - K^+ ATPase and the Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 1995; 269: C217 – C225.
241. Lyoussi B, Crabbé J. Effects of dexamethasone on (Na^+/K^+)-ATPase and other parameters related to transepithelial Na^+ transport by amphibian renal distal cells (A6) in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 59: 333 – 8.
242. Marunaka Y. The sensitivity of insulin-stimulated and basal Na^+ efflux to ouabain in frog skeletal muscle cells. *Gen Pharmacol* 1991; 22: 949 – 54.
243. Tang CS, Peterson-Yantorno K, Civan MM. Coupling of volume and Na^+ transport in frog skin epithelium. *Biol Cell* 1989; 66: 183 – 90.
244. Witowski J, Breborowicz A, Topley N, Martis L, Knapowski J, Oreopoulos DG. Insulin stimulates the activity of $\text{Na}(+)/\text{K}(+)$ -ATPase in human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1997; 17: 186 – 93.
245. Walker TC, Fidelman ML, Watlington CO, Biber TU. Insulin decreases apical membrane resistance in cultured kidney cells (A₆). *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 124: 614 – 618.
246. Deachapunya C, Palmer-Densmore M, O'Grady SM. Insulin Stimulates Transepithelial Sodium Transport by Activation of a Protein Phosphatase that Increases Na-K ATPase Activity in Endometrial Epithelial Cells. *JGP* 1999; 114: 561 – 574.

247. Kouritas VK, Hatzoglou C, Foroulis CN, Hevas A, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Low glucose level and low pH alter the electrochemical function of human parietal pleura. *Eur Respir J* 2007; 30: 354 – 357.
248. Best L. A role for calcium in the breakdown of inositol phospholipids in intact and digitonin-permeabilized pancreatic islets. *Biochem J* 1986; 238: 773 – 9.
249. Quintanilla RA, Porras OH, Castro J, Barros LF. Cytosolic Ca²⁺ modulates basal GLUT1 activity and plays a permissive role in its activation by metabolic stress and insulin in rat epithelial cells. *Cell Calcium* 2000; 28: 97 – 106.
250. Kozak JA, Logothetis DE. A calcium-dependent chloride current in insulin-secreting beta TC-3 cells. *Pflugers Arch* 1997; 433: 679 – 90.
251. Lang J, Ushkaryov Y, Grasso A, Wollheim CB. Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J* 1998; 17: 648 – 57.
252. Boyd AE 3rd. The role of ion channels in insulin secretion. *J Cell Biochem* 1992; 48: 235 – 41.
253. Marunaka Y. Amiloride-blockable Ca²⁺-activated Na⁺-permeant channels in the fetal distal lung epithelium. *Pflugers Arch* 1996; 431: 748 – 56.
254. Orser BA, Bertlik M, Fedorko L, O'Brodovich H. Cation selective channel in fetal alveolar type II epithelium. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094: 19 – 26.
255. Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Song T. Insulin inhibits serotonin-induced Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle. *Circulation* 1994; 90: 384 – 90.
256. McKenna MJ, Gissel H, Clausen T. Effects of electrical stimulation and insulin on Na⁺-K⁺-ATPase ([³H]ouabain binding) in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2003; 547: 567 – 580.

257. Broillet MC, Horisberger JD. Tolbutamide-sensitive potassium conductance in the basolateral membrane of A6 cells. *J Membrane Biol* 1993; 134: 181-8.
258. Bonev AD, Nelson MT. ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol* 1993; 264: C1190 – 200.
259. Gosmanov AR, Fan Z, Mi X, Schneider EG, Thomason DB. ATP-sensitive potassium channels mediate hyperosmotic stimulation of NKCC in slow-twitch muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C586 – 95.
260. Huang DY, Osswald H, Vallon V. Sodium reabsorption in thick ascending limb of Henle's loop: effect of potassium channel blockade in vivo. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1255 – 62.
261. Wang T. The Effects of the Potassium Channel Opener Minoxidil on Renal Electrolytes Transport in the Loop of Henle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 833 – 840.
262. Clark MA, Humphrey SJ, Smith MP, Ludens JH. Unique natriuretic properties of the ATP-sensitive K⁺-channel blocker glyburide in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 933 – 937.
263. Engbersen R, Masereeuw R, van Gestel MA, van der Logt E, Smits P, Russel FGM. Glibenclamide depletes ATP in renal proximal tubular cells by interfering with mitochondrial metabolism. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 1069 – 1075.
264. Kaloyianni M, Bourikas D, Koliakos G. The effect of insulin on Na⁺-H⁺ antiport activity of obese and normal subjects' erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 253 – 8.

265. Gesek FA, Schoolwerth AC. Insulin increases $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange activity in proximal tubules from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 1991; 260: F695 – 703.
266. Shirley DG, Walter SJ, Folkerd EJ, Unwin RJ, Bailey MA. Transepithelial electrochemical gradients in the proximal convoluted tubule during potassium depletion in the rat. *J Physiol* 1998; 513: 551 – 7.
267. Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DW. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest* 1993; 91: 2368 – 77.
268. Unsal E, Köksal D, Yurdakul AS, Atikcan S, Cinaz P. Analysis of insulin like growth factor 1 and insulin like growth factor binding protein 3 levels in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with lung cancer. *Respir Med* 2005; 99: 559 – 65.
269. Auernhammer CJ, Fottner C, Engelhardt D, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Weber MM. Differential regulation of insulin-like growth factor-(IGF) I and IGF-binding protein (IGFBP) secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Horm Res* 2002; 57: 15 – 21.
270. Johnson DW, Brew BK, Poronnik P, Cook DI, Field MJ, Györy AZ, Pollock CA. Insulin-like growth factor I stimulates apical sodium/hydrogen exchange in human proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1997; 272: F484 – 90.
271. Nofziger C, Chen L, Shane MA, Smith CD, Brown KK, Blazer-Yost BL. PPARgamma agonists do not directly enhance basal or insulin-stimulated Na^+ transport via the epithelial Na^+ channel. *Pflugers Arch* 2005; 451: 445 – 453.