

Λάρισα | 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Τομέας Βασικών Επιστημών, Εργαστήριο Φυσιολογίας
Διευθυντής: Καθηγητής Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς

Διερεύνηση της επίδρασης της Ενδοθηλίνης-1 και του NO στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων προβάτου

Αριστοτέλης Σ. Φιλιππίδης

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

*στην οικογένειά μου, που είναι πάντοτε κοντά
μου όσο μακριά και αν βρίσκομαι*

στους δασκάλους μου, που με δίδαξαν να τολμώ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Απρίλιο του 2007 έως και τον Οκτώβριο του 2010 υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά.

Καθώς το εγχείρημα αυτό φτάνει στο τέλος του μετά από 3½ χρόνια, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω δασκάλους, συναδέλφους και φίλους που η συμβολή τους στο δρόμο της επιστημονικής αναζήτησης και έρευνας υπήρξε ουσιαστική. Αισθάνομαι πλέον πως ένας καινούργιος εξερεύνητος κόσμος, ο κόσμος της έρευνας έχει ανοίξει μπρος μου και τα αισθήματα είναι πλέον περίεργα καθώς το τέλος της διατριβής μου, μου φανερώνει πως στο σύνολο της γνώσης, η γνώση που γεννάται με αυτό το πόνημα είναι απειροελάχιστη έχει όμως μια σημαντική διαφορά. Είναι η γνώση που γεννήθηκε από την δική μας επιστημονική αναζήτηση και όχι η γνώση που αποκτήθηκε από τη μελέτη. Γι' αυτή λοιπόν την πρωτόγνωρη εμπειρία σας ευχαριστώ βαθιά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για την ευκαιρία που μου εμπιστεύτηκε ώστε να ζήσω αυτό το ταξίδι καθώς και για τις πολύτιμες επιστημονικές του παρατηρήσεις και συμβουλές.

Τον Καθηγητή Νευροχειρουργικής κ. Χαράλαμπο Κουρτόπουλο για τις επιστημονικές του συμβουλές.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Χρυσή Χατζόγλου για τη βοήθεια της, την αμέριστη συμπαράστασή της στις όποιες δυσκολίες εκπόνησης της διατριβής αυτής καθώς και για τις επιστημονικές τις παρατηρήσεις.

Τον Καθηγητή και Πρύτανη του Π.Θ. κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για την παρότρυνσή του στα πρώτα βήματα αυτής της προσπάθειας και τη συνεχή υποστήριξή του.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Μαρία Ιωάννου για την πολύτιμη συμβολή της στο τμήμα της ανοσο-ιστοχημείας.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο και την υποψήφια διδάκτωρ κ. Μπεφάνη Χριστίνα για την καθοριστική συμβολή τους στο κομμάτι μελέτης του ΝΟ.

Τον κ. Ιωάννη Μακαντάση για τη συμβολή του στην ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου διαπερατότητας μεμβρανών, για τις μέρες που αυτό το εργαστήριο στήθηκε ξανά αλλά και για τη φιλία του και τη στήριξη του στις δύσκολες εργαστηριακές ώρες.

Την εταιρεία Σφαγεία Λάρισας Α.Ε. που υπήρξε και υπάρχει πάντοτε αρωγός του πανεπιστημίου στο δύσκολο έργο της συλλογής ιστού για τα πειράματά μας.

Τον αδελφικό μου φίλο, πολύτιμο και εξαιρετο συνεργάτη, Λέκτορα Φυσιολογίας κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη που πάντοτε ήταν και είναι κοντά σε όμορφες και δύσκολες στιγμές.

Τον συνεργάτη και φίλο πλέον κ. Σάκη Πουρνάρα ο οποίος με τη βοήθειά στην παροχή και συλλογή του ιστού πρόσφερε τα μέγιστα στην καλή ποιότητα του πειραματικού υλικού πάντοτε σκεπτόμενος την καλύτερη δυνατή λύση. Με τιμά με την φιλία του και χαίρομαι που σε αυτό το ταξίδι απέκτησα έναν ακόμη φίλο.

Τους φίλους Γεράσιμο Κωνσταντόπουλο, Δημήτρη Παπαδόπουλο, Αντώνη Φουνταρλή, Γεωργία Γκουντέλου, Σωτήρη Τερζούδη και Κωνσταντίνο Βογιατζήδη για την συμπαράσταση και την ανοχή τους.

Τους συνεργάτες κ. Ελένη Αποστολίδου, Ματίνα Τσαπουρνιώτη και Ροδόπη Σταματίου για τις εργαστηριακές ώρες που μοιραστήκαμε δουλεύοντας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ (Επιβλέπων)
Καθηγητής Φυσιολογίας Π.Θ.

ΚΟΥΡΤΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ
Καθηγητής Νευροχειρουργικής Π.Θ.

ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ
Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ (Επιβλέπων)

Καθηγητής Φυσιολογίας Π.Θ.

ΚΟΥΡΤΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

Καθηγητής Νευροχειρουργικής Π.Θ.

ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ ΧΡΥΣΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Π.Θ.

ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας,

Πρύτανης Π.Θ.

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Καθηγητής Νευρολογίας και Αισθητηρίων Οργάνων Π.Θ.

ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Π.Θ.

MATALON SADIS, Ph.D., Dr. Sc. (Honorary)

Alice McNeal Professor and Vice Chairman for Research,

Department of Anesthesiology

Professor of Cell Biology, Physiology and Biophysics & Microbiology

Director, Pulmonary Injury and Repair Center, School of Medicine

Professor of Environmental Health Sciences, School of Public Health

University of Alabama at Birmingham, USA

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Αριστοτέλης Σ. Φιλιππίδης

Ανθίμου Γαζή 25 • ΤΚ 41222 • Λάρισα
τηλ: +30-6944-153193 & +1(205)467-4472 • e-mail: afilep@med.uth.gr

Προσωπικά δεδομένα

Τόπος και ημερομηνία γέννησης: Λάρισα, 09.07.1979

Όνομα πατρός: Σταμάτης

Γλώσσες: Αγγλικά, άπταιστα (Proficiency of University of Michigan, USA)

Επάρκεια διδασκαλίας Αγγλικής γλώσσας

Γνώσεις Η/Υ

Microsoft Office (Word, Excel, Access, Powerpoint)

Προγραμματισμός σε Microsoft Access, Filemaker (Βάσεις δεδομένων)

Προγραμματισμός σε Microsoft Visual Basic 6.0

Προγραμματισμός σε Microsoft Visual .NET

Προγραμματισμός σε Palm OS και Microsoft Mobile Windows, iPhone (για PDA συσκευές)

Χρήση MathWorks MATLAB, Σχεδιασμός ιστοσελίδων

Εκπαίδευση

2007 – σήμερα, **Υποψήφιος Διδάκτωρ**, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

2010 Σεπτ – σήμερα, **Μεταπτυχιακός Φοιτητής στη Δημόσια Υγεία** (M.P.H), εξ' αποστάσεως εκπαίδευση-μερική απασχόληση, Πανεπιστήμιο του Manchester, Ηνωμένο Βασίλειο

1997 - 2003, **Πτυχίο Ιατρικής**, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Βαθμός 6,89/10

1997, **Προπτυχιακή εκπαίδευση**, αποφοίτηση από το 1^ο Λύκειο Λάρισας με άριστα

Συνεχιζόμενη εκπαίδευση – CME Credits

25-26 Νοεμβρίου 2005, Χειρουργικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας, Λάρισα
(9 μόρια συνεχιζόμενης ιατρικής εκπαίδευσης – Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία)

30 Ιουνίου – 1 Ιουλίου 2004, Νευροεγχειρητική1/υδροκέφαλος, διοργάνωση: Β' Νευροχειρουργική κλινική Α.Π.Θ. και εργαστήριο ανατομικής Α.Π.Θ.
(μοριοδότηση 16 μονάδων από την Ελληνική Νευροχειρουργική Εταιρεία)

31 Μαρτίου 2004 – 26 Μαΐου 2004, συμμετοχή στον κύκλο μαθημάτων «Κλινική και Λειτουργική ανατομική της Κεντρικής Βάσης Κρανίου», διδακτικές ώρες 26, διοργάνωση Α.Π.Θ και Β' Πανεπιστημιακή Νευροχειρουργική κλινική, Ιπποκράτειο νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

31 Αυγούστου- 3 Σεπτεμβρίου 2006, 3^η Συνάντηση Χειρουργικής Ογκολογίας, Κως,
(14 CME credits)

Εργασιακή εμπειρία

• **Επισκέπτης Ερευνητής**

Matalon Lab

School of Medicine, University of Alabama at Birmingham
Birmingham, AL, USA

Επιβλέπων: Δρ. Sadis Matalon PhD, Dr. Sc (Honorary)

26 Οκτ 2010 – **σήμερα**

• **Υπότροφος επισκέπτης ιατρός**

Νευροχειρουργική κλινική

Barrow Neurological Institute, Phoenix, AZ, USA

Επιβλέπων: Δρ. Harold L. Rekate MD

15 Ιαν – 25 Απρ 2010

• **Ειδικευόμενος Νευροχειρουργικής**

Νευροχειρουργική κλινική

Γενικό Νοσοκομείο Παπανικολάου Θεσ/νικης

Διευθυντής: Δρ. Μπαρούτας Σπυρίδων

27 Μαρ – 31 Οκτ 2007

- **Ειδικευόμενος Νευροχειρουργικής** 6 Οκτ 2006 – 21 Μαρ 2007
 Νευροχειρουργική κλινική,
 Νοσοκομείο Παιδων “Αγία Σοφία”, Αθήνα
 Διευθυντής: Δρ. Προδρόμου Νεόφυτος
- **Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής** 4 Μάϊος 2005 – 3 Αυγ 2006
 Χειρουργική κλινική,
 Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
 Διευθυντής: Δρ. Γεωργιάδης Γεώργιος
- **Αποσπασθέντας αγροτικός Ιατρός** 11 Ιαν – 2 Μάϊος 2005
 Νευροχειρουργική κλινική Ε.Σ.Υ.
 Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
 Διευθυντής: Δρ. Σλατινόπουλος Βασίλειος
- **Τρίμηνη εκπαίδευση στην Παθολογία,
 Γενική Χειρουργική και Καρδιολογία** 29 Απρ - 28 Ιουλ 2004
 Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας
- **Αγροτικός Ιατρός** Ιουλ 2004 – Μάϊος 2005
 Κέντρο Υγείας Αγίας Λάρισας
- **Επιστημονικός Ιατρικός Σύμβουλος** Φεβ - Ιουλ 2004
 “Medical Engineering Solutions”, εταιρεία βιοιατρικής
 τεχνολογίας με έδρα την Λάρισα, (www.mes-direct.com)

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- Filippidis A, Zarogiannis S, Ioannou M, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Hatzoglou C.
 Transmembrane resistance and histology of isolated sheep leptomeninges. *Neurol Res.*
 2010 Mar; 32(2): 205-8. Epub 2009 May 8.
- Kalani MYS, Filippidis AS, Kalani MA, Sanai N, Brachman D, McBride HL, Shetter A,
 Smith KA. Gamma Knife surgery combined with resection for treatment of a single
 brain metastasis: preliminary results.
J Neurosurg. 2010 Dec; 113 Suppl: 90-6.

- Filippidis AS, Papadopoulos DC, Kapsalaki E, Fountas KN. Role of the S100B serum biomarker in the treatment of children suffering from mild traumatic brain injury. *Neurosurg Focus*. 2010 Nov; 29(5):E2. Review.
- Filippidis A, Kalani Y, Rekate HL. Hydrocephalus and aquaporins: Lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst*. 2010 Jul 13. [Epub ahead of print]
- Filippidis A, Kalani Y, Theodore N, Rekate HL. Spinal cord traction, vascular compromise, hypoxia and metabolic derangements in the pathophysiology of tethered cord syndrome. *Neurosurgical Focus* 2010 Jul; 29(1): E9.
- Filippidis A, Kapsalaki E, Patramani G, Fountas KN. Cerebral Venous Sinus Thrombosis: a Review of the Demographics, Pathophysiology and Current Diagnosis and Treatment. *Neurosurgical Focus* 2009 Nov; 27(5):E3 *CME material for Neurosurgical Focus*
- Filippidis A, Fountas KN. Traumatic brain injury outcome. *Journal of Neurosurgery* 2010 Jan; 112(1):214-5; author reply 215-6.
- Filippidis A, Fountas KN. Nasal lymphatics as a novel invasion and dissemination route of bacterial meningitis. *Med Hypotheses*. 2009 Jun; 72(6):694-7. Epub 2009 Feb 24.

Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά επιστημονικά περιοδικά

- **Φιλίππιδης Α.**, Τσονίδης ΧΑ., Τσιτσόπουλος Φ. Μυελομηνιγγοκήλη και υδροκέφαλος. *Ελληνική Νευροχειρουργική* 2000; 7(3): 149-153
- Χριστοδούλου Β., Πέιος Δ., **Φιλίππιδης Α.**, Σκούλιος Ν., Αχουλιάς Ι., Μπαλτάς Ι. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αυχενικής δισκεκτομής και οστεοφυτεκτομής με τη χρήση του NDI score *Ελληνική Νευροχειρουργική* 2007; 14(3): 132-137

Άρθρα υπό κρίση

- Filippidis A, Zarogiannis S, Ioannou M, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Hatzoglou C. Permeability of the arachnoid and pia mater. The role of ion channels in the leptomeningeal physiology. Υπό κρίση
Child's Nervous System
- Filippidis A, Zarogiannis S, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Hatzoglou C. Surface area image analysis of subarachnoid space vasculature. Implications on brain surface dialysis. Υπό κρίση
American Society of Artificial Internal Organs Journal
- Filippidis A, Kalani MYS, Rekate HL. Hydrocephalus and Aquaporins. The role of Aquaporin-4. Υπό κρίση
Acta Neurochirurgica
- Kalani MYS, Filippidis A, Rekate HL. Hydrocephalus and Aquaporins. The role of Aquaporin-1. Υπό κρίση
Acta Neurochirurgica
- Kalani MYS, Filippidis A, Martirosyan N, Theodore N. Cerebral Herniation as a Complication of Chest Tube Drainage of Cerebrospinal Fluid Following Injury to the Spine-Case Report Υπό κρίση
World Neurosurgery
- Filippidis AS, Kalani MYS, Nakaji P, Rekate HL. Negative and low-pressure hydrocephalus: The role of CSF leaks resulting from surgical approaches to the cranial base. Υπό κρίση
Journal of Neurosurgery

Συγγραφή κεφαλαίων σε βιβλία

- Kalani MYS, Filippidis A, Theodore N. Cervical spine injuries. In: Principles of Neurosurgery, 3rd edition *προς εκτύπωση*
- Filippidis A, Tsonidis Ch. "Intraventricular brain tumors in children" In: Narenthiran G (ed): Textbook of Paediatric Neurosurgery. Sutton, UK, G Narenthiran, 2009.
© Annals of Neurosurgery

- Ευθυμιάδης Α., **Φιλίππιδης Α.** "Μεταβολικό Σύνδρομο. Σχέση με στεφανιαία νόσο και αθηροσκλήρωση. Θεραπευτικές προσεγγίσεις." στο Λευκός Ν., Ευθυμιάδης Α (Ed.) Μεταπτυχιακά Μαθήματα Καρδιολογίας 2002-2003, (σελ. 108-145) Θεσσαλονίκη: University Studio Press, 1st Έκδοση, 2003

Παρουσιάσεις σε διεθνή συνέδρια & Δημοσιευμένα Πρακτικά

- Filippidis A, Zarogiannis S, Ioannou M, Gourgoulisanis, K, Molyvdas PA, Hatzoglou C. Endothelin-1 Increases the Transmembrane Resistance of Isolated Sheep Leptomeninges. Poster #16.6 ET-11: American Physiological Society International Conference on Endothelin, Montreal 2009
- Filippidis A, Zarogiannis S, Ioannou M, Gourgoulisanis, K, Molyvdas PA, Hatzoglou C. Ouabain increases transmembrane resistance of isolated sheep leptomeninges. Mol. Biol. Cell 19 (suppl), abstract #1354/B569.(2008) (CD-ROM). Presented at the 48th American Society of Cell Biology conference, San Francisco 2008
- Filippidis A, Kalani MYS, ReKate HL. Negative-pressure hydrocephalus. The role of CSF leaks. 6th Annual International Neurosurgery Conference, 21-28 August 2010, ONLINE, <http://www.surgicalneurology.org/conf6/abstract.html>
- Filippidis A, Kalani MYS, ReKate HL. Hydrocephalus and Aquaporins. The role of Aquaporin-4. 5th International Hydrocephalus Workshop, 20-23 May 2010, Crete, Greece
- Kalani MYS, Filippidis A, ReKate HL. Hydrocephalus and Aquaporins. The role of Aquaporin-1. 5th International Hydrocephalus Workshop, 20-23 May 2010, Crete, Greece
- Filippidis A, Tsonidis C. A new insight in interpreting brain tumor edema: Aquaporin-4. 5th Annual International Neurosurgery Conference, 27-30 December 2009, ONLINE, <http://www.surgicalneurology.org/conf5/presentations/>
- Filippidis A, Tsonidis C, Andreadis S, Christodoulou M. Case report: Cystic meningioma. 3rd Annual International Neurosurgery Conference, 15-16 December 2007, ONLINE, <http://www.surgicalneurology.org/conf3/presentations/program.html>

- Zarogiannis S, Filippidis A. RESENBASE: a sophisticated and user-friendly, restriction endonuclease database compilation for handheld computers. Clinica Chimica Acta, 355: S 360, (2005)
- Filippidis A, Zarogiannis S, ILPBASE: a sophisticated and user-friendly, immunology laboratory protocols database compilation for handheld computers. Clinica Chimica Acta, 355: S 361-362, (2005)

Παρουσιάσεις σε ελληνικά συνέδρια & Δημοσιευμένα Πρακτικά

Προφορικές Ανακοινώσεις

Φιλίππιδης Α., Τσονίδης Χ., Ντ. Ντζάου Σ.

Η διάγνωση του θανάτου στους νευροχειρουργικούς ασθενείς. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, 28-30 Σεπτεμβρίου 2007, ΚΑΣΤΟΡΙΑ

Φιλίππιδης Α., Ντ. Ντζάου Σ., Τσονίδης Χ.

Η συμβολή της Ιατροδικαστικής στην νευροχειρουργική εκπαίδευση και έρευνα.

5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, 28-30 Σεπτεμβρίου 2007, ΚΑΣΤΟΡΙΑ

Φιλίππιδης Α., Τσονίδης Χ.

Προσδιορισμός του νευρολογικού επιπέδου στις εκφυλιστικές ή τραυματικές βλάβες της ΑΜΣΣ με υπολογιστή παλάμης. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Σπονδυλικής Στήλης, 20-23 Σεπτεμβρίου 2007, ΑΘΗΝΑ

Φιλίππιδης Α., Μπαϊραμίδης Ε., Μανωλάκος Η., Σακελλιάδης Ε., Σφακιανός Γ., Προδρόμου Ν. Υπερσκηνίδιοι και υποσκηνίδιοι ενδοκοιλιακοί όγκοι εγκεφάλου σε παιδιά. 21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 16-17 Μαΐου 2007, Ρόδος

Φιλίππιδης Α., Θεραπεία κατακλίσεων με εφαρμογή αρνητικής πίεσης, στα πλαίσια Στρογγυλής τράπεζας με θέμα: Αντιμετώπιση κατακλίσεων στους χρονίως πάσχοντες.

1ο Συνέδριο Επιστημόνων Φροντίδας Χρονίων Πασχόντων, 16-19 Νοεμβρίου 2006, Λάρισα

Φιλιππίδης Α., Καραθάνος Χ., Τσαματσούλης Μ., Αργυρούλης Α., Χασανίδης Γ., Γεωργιάδης Γ.

Θρομβοφλεβίτιδα ως παρανεοπλασματική εκδήλωση.

3η Συνάντηση Χειρουργικής Ογκολογίας, 31 Αυγούστου-3 Σεπτεμβρίου, 2006, Κως

Χασανίδης Γ, Γκουντής Κ, Τσαματσούλης Μ, Αργυρούλης Α., **Φιλιππίδης Α.**, Γεωργιάδης Γ. Ατραυματική ρήξη σπληνός σε έδαφος οξείας βρουκέλλωσης. Ένα σπάνιο περιστατικό.

21ο Βορειοελλαδικό Ιατρικό Συνέδριο, 30 Μαρτίου – 1 Απριλίου, Θεσσαλονίκη

Χατζηϊωάννου Π., Χατούρας Ν., Μηντελής Α., Καρακώστα Ε., **Φιλιππίδης Α.**

Ανατομική μελέτη για την αποφυγή τρώσης του μετωπιαίου κλάδου του προσωπικού νεύρου στις προσθιοπλάγιες κρανιακές προσπελάσεις.

19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 11-14 Μαΐου 2005, Αθήνα

Χατζηϊωάννου Π., Χατούρας Ν., **Φιλιππίδης Α.**

Αναδρομική μελέτη αντιμετώπισης ασθενών με καλοήγη ενδοκράνια υπέρταση (pseudotumor cerebri) με ταυτόχρονη διερεύνηση της δυναμικής ροής του ΕΝΥ.

19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 11-14 Μαΐου 2005, Αθήνα

Φιλιππίδης Α., Κουκούλης Γ., Ηλιάδης Χ., Σλατινόπουλος Β.

Cerebral Salt Wasting Syndrome 2 μήνες μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση, παρουσίαση περιστατικού – διαγνωστική προσέγγιση

19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 11-14 Μαΐου 2005, Αθήνα

Τσονίδης Χ., Τσαρούχας Α., **Φιλιππίδης Α.**, Γιακουστίδης Α., Πρατήλας Γ., Μαρής Φ., Τσιτσόπουλος Π., Σιδηρόπουλος Κ., Τσιτσόπουλος Φ. Αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία: Συντηρητική ή Χειρουργική αντιμετώπιση;

1ο Επιστημονικό Συνέδριο Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 2002. Θεσσαλονίκη

Τσονίδης Χ., Σιδηρόπουλος Κ., Γιακουστίδης Α., **Φιλιππίδης Α.**, Σύρμος Ν., Λεοντίδης Σ., Τσιτσόπουλος Π., Τσιτσόπουλος Φ. Χειρουργική προσπέλαση του σηραγγώδους κόλπου – μιας ανατομίας που αμφισβητείται.

1ο Επιστημονικό Συνέδριο Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 2002. Θεσσαλονίκη

Σταματόπουλος Χ., Τερζούδης Σ., **Φιλιππίδης Α.**, Χρηστίδης Γ., Σταματόπουλος Π., Τζιτζιμίκας Σ. Θερμική καταστροφή ενδομητρίου (thermal balloon ablation) για την αντιμετώπιση των μηνομητρορραγιών.

1ο Επιστημονικό Συνέδριο Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 2002. Θεσσαλονίκη

Φιλιππίδης Α., Ηθικά και δεοντολογικά προβλήματα, στα πλαίσια Στρογγυλής τράπεζας με θέμα: Η αποκρυπτογράφηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος και η ιατρική του μέλλοντος.

1ο Επιστημονικό Συνέδριο Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 2002. Θεσσαλονίκη

Τερζούδης Σ., Τσονίδης Χ., **Φιλιππίδης Α.**, Χρηστίδης Γ., Μαρινόπουλος Δ. Νευροενδοσκοπική 3η κοιλιοστομία: Ανάπτυξη της τεχνικής σε δείγματα εγκεφάλων.

8ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2002. Ιωάννινα

Φιλιππίδης Α., Τσονίδης Χ., Τερζούδης Σ., Χρηστίδης Γ., Μαρινόπουλος Δ. Χειρουργική αντιμετώπιση αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος με ενδοσκοπική τεχνική.

8ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2002. Ιωάννινα

Φιλιππίδης Α., Κουφογιάννης Δ. Ρομποτικές εφαρμογές στη Νευροχειρουργική,

7ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2001. Λάρισα

Φιλιππίδης Α., Τσονίδης Χ., Κοντογιαννίδης Κ., Πουρνή Π., Φαχουρίδης Α., Τσιτσόπουλος Π., Τσιτσόπουλος Φ. Μυελομηνιγγοκήλη και Υδροκέφαλος,

6ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2000. Θεσσαλονίκη

Φιλιππίδης Α., Γενετική και καρκίνος, στα πλαίσια Στρογγυλής τράπεζας Γενετικής με θέμα: Γενετική παρόν – παρελθόν - μέλλον.

6ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2000. Θεσσαλονίκη

Αναρτημένες Ανακοινώσεις

Φιλιππίδης Α., Ψαρρός Α., Προδρόμου Ν.

Επισκληρίδιο αιμάτωμα οπισθίου βόθρου σε παιδί. Παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπησης της βιβλιογραφίας.

21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 16-17 Μαΐου 2007, Ρόδος

Φιλιππίδης Α., Ψαρρός Α., Προδρόμου Ν.

Μετεγχειρητική εμφάνιση παρεγκεφαλιδικής αφωνίας (Cerebellar Mutism) σε παιδιά.

21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 16-17 Μαΐου 2007, Ρόδος

Φιλιππίδης Α., Καραθάνος Χ., Τσαματσούλης Μ., Αργυρούλης Α., Χασανίδης Γ., Γιαγλάρας Α., Γεωργιάδης Γ. Θρομβοφλεβίτιδα ως πρώτη εκδήλωση νεοπλασίας. Ο ρόλος της αξονικής τομογραφίας και των καρκινικών δεικτών. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Forum 2006, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα

Τσαματσούλης Μ., **Φιλιππίδης Α.**, Χασανίδης Γ., Μπουχλαριώτου Σ., Λουλάκης Ι., Αμάρι Μ., Γεωργιάδης Γ. Ευμεγέθης ενδοκοιλιακή χωροκατακτητική εξεργασία-λειομύωμα

μήτρας. 25ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Forum 2006, 22-26 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα

Φιλιππίδης Α., Χατζηϊωάννου Π., Χατούρας Ν., Τσονίδης Χ.

Πρότυπο λογιστικό αντιμετώπισης κακώσεων νωτιαίου μυελού για υπολογιστές παλάμης (PDAs) και Η/Υ

20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 8-11 Ιουνίου 2006, Porto Carras, Χαλκιδική

Χατζηϊωάννου Π., Χατούρας Ν., **Φιλιππίδης Α.**

Διαφοροδιάγνωση μετεγχειρητικής απεικόνισης ενδοεγκεφαλικού αποστήματος οδοντογενούς προέλευσης (αναφορά περιστατικού)

19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, 11-14 Μαΐου 2005, Αθήνα

Τσονίδης Χ., Μαρινόπουλος Δ., Ντζιάου Σ.Ν., **Φιλιππίδης Α.**, Σιτζόγλου Κ., Δημητρούλιας Α., Τσιτσόπουλος Φ. Κήλη του αγκίστρου και κώμα: αίτιο ή επιφαινόμενο;

2ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ψυχοφυσιολογίας. 2003. Θεσσαλονίκη

Τσονίδης Χ., Σιτζόγλου Κ., Τσίπτσιος Ι., Μαρινόπουλος Δ., Δημητρούλιας Α., **Φιλιππίδης Α.**, Τσιτσόπουλος Φ. Απόκλιση των ευρημάτων στην μαγνητική τομογραφία και τα σωματοαισθητικά προκλητά δυναμικά στην αυχενική σπονδύλωση.

2ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ψυχοφυσιολογίας. 2003. Θεσσαλονίκη

Τερζούδης Σ., **Φιλιππίδης Α.**, Μπαλογιάννης Σ. Parkinson, Νέες προσεγγίσεις και θεωρήσεις στη θεραπεία της νόσου,

7ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. 2001. Λάρισα

Δημοσιευμένα πρακτικά

Φιλιππίδης Α., Καραθάνος Χ., Τσαματσούλης Μ., Αργυρούλης Α., Χασανίδης Γ., Γιαγλάρας Α., Γεωργιάδης Γ. Θρομβοφλεβίτιδα ως πρώτη εκδήλωση νεοπλασίας. Ο ρόλος της αξονικής τομογραφίας και των καρκινικών δεικτών. Ελληνική Χειρουργική, Τόμος 78, Συμπληρωματικό τεύχος 6I, σελ 268, 2006

Τσαματσούλης Μ., **Φιλιππίδης Α.**, Χασανίδης Γ., Μπουχλαριώτου Σ., Λουλάκης Ι., Αμάρι Μ., Γεωργιάδης Γ. Ευμεγέθης ενδοκοιλιακή χωροκατακτητική εξεργασία-λειομύωμα μήτρας. Ελληνική Χειρουργική, Τόμος 78, Συμπληρωματικό τεύχος 6I, σελ 307, 2006

Χασανίδης Γ, Γκουντής Κ, Τσαματσούλης Μ, Αργυρούλης Α., **Φιλιππίδης Α.**, Γεωργιάδης Γ. Ατραυματική ρήξη σπληνός σε έδαφος οξείας βρουκέλλωσης. Ένα σπάνιο περιστατικό. Ελληνική Ιατρική, Τόμος 72, Συμπληρωματικό τεύχος 1, σελ 115, 2006

Ερευνητική χρηματοδότηση

- Codman educational grant #455007031077, ποσό \$10,000
στο Barrow Neurological Institute, Phoenix, AZ, USA
ως υπότροφος
επισκέπτης ιατρός
υπό τον Δρ. ReKate
Ιαν 15th - Απρ 25th 2010
- Συγγραφή ερευνητικής πρότασης:
"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΥ ΣΤΕΡΕΟΤΑΚΤΙΚΟΥ ΚΑΙ
ΕΝΤΟΠΙΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ M.I.N.D.S"
Εγκρίθηκε 16/6/2004
πρόγραμμα ΠΑΒΕΤ-ΝΕ 2004, Γενική Γραμματεία Έρευνας και
Τεχνολογίας -Υπουργείο Ανάπτυξης. Κωδικός: 04ΒΕΝ31,
Φορέας: «Λ. ΚΟΥΡΤΗΣ- Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ ΚΑΙ ΣΙΑ Ο.Ε.»
με διακριτικό τίτλο «Medical Engineering Solutions»,
Προϋπολογισμός: 145581 €, Χρηματοδότηση: 65512 €

Βραβεία

- Υποτροφία ΙΚΥ για την είσοδο στην Ιατρική Σχολή (6ος)
στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Σεπτ 1997

Κριτής σε διεθνή περιοδικά

- Bioinformatics (Oxford University Press) – κρίση άρθρου μετά από πρόσκληση
- Annals of Neurosurgery – κρίση άρθρου μετά από πρόσκληση

Μέλος επιστημονικών εταιρειών

- Society for NeuroOncology
2008-2009
- American Society of Cell Biology
2008-2010

Διοικητική εμπειρία

- 2002 Μέλος της οργανωτικής επιτροπής. Ιατρική ολυμπιάδα του 8^{ου} επιστημονικού συνεδρίου φοιτητών ιατρικής Ελλάδας. 19-21 Απριλίου 2002. Ιωάννινα
- 2000 Μέλος της οργανωτικής επιτροπής. Επικεφαλής χορηγών του 6^{ου} επιστημονικού συνεδρίου φοιτητών ιατρικής Ελλάδας. 12-14 Μαΐου 2000. Θεσσαλονίκη
- 2000 Μέλος της οργανωτικής επιτροπής. "Neurochirurgiki 2000", συνέδριο της Β' Πανεπιστημιακής Νευροχειρουργικής κλινικής Α.Π.Θ., 16-18 Ιουνίου 2000, Θεσσαλονίκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** ... σελίδα 22
- ΕΙΣΑΓΩΓΗ ... σελίδα 23
- ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΛΕΠΤΟΜΗΝΙΓΓΩΝ ... σελίδα 27
- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΙ ΛΕΠΤΟΜΗΝΙΓΓΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ... σελίδα 41
- ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ... σελίδα 47
- **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** ... σελίδα 57
- ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ... σελίδα 58
- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ... σελίδα 75
 - Πειράματα με τη διάταξη Ussing ... σελίδα 75
 - Πειράματα αναφοράς ... σελίδα 75
 - Πειράματα με προσθήκη ET-1 ... σελίδα 76
 - Προσθήκη ET-1 σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο ... σελίδα 82
 - Προσθήκη αναστολέων της ET-1 μαζί με ET-1 10^{-8} M ... σελίδα 85
 - Επίδραση Σαραφοτοξίνης S6c στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων ... σελίδα 90
 - Προσθήκη ουαμπαΐνης ... σελίδα 96
 - Προσθήκη αμιλορίδης ... σελίδα 98
 - Ανοσοϊστοχημεία λεπτομηνίγγων προβάτου ... σελίδα 99
- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ... σελίδα 106
 - Η δράση της ET-1 ... σελίδα 108
 - Η δράση της Σαραφοτοξίνης και του NO ... σελίδα 114
 - Η δράση της Ουαμπαΐνης και της Αμιλορίδης ... σελίδα 117
- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ... σελίδα 123
- ΠΕΡΙΛΗΨΗ ... σελίδα 126
- SUMMARY ... σελίδα 127
- **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** ... σελίδα 128

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οικογένεια των ενδοθηλινών στα θηλαστικά αποτελείται από τρεις ενδογενείς ισομορφές, την ενδοθηλίνη-1 (ET-1), την ενδοθηλίνη-2 (ET-2) και την ενδοθηλίνη-3 (ET-3).¹⁻⁷ Η ET-1 αποτελεί την κύρια ισομορφή στο ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα και παραμένει η ευρύτερα διαδεδομένη, ισχυρή και παρατεταμένης διάρκειας αγγειοσυσπαστική ουσία που έχει ανακαλυφθεί ως σήμερα.¹⁻⁷

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), η ET-1 φαίνεται πως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των αιμορραγιών,⁸⁻¹⁶ των ενδοεγκεφαλικών αιματώματων¹⁷⁻¹⁹ ή ισχαιμικών καταστάσεων που έρχονται σε επαφή με την αραχνοειδή ή/και τη χοριοειδή μήνιγγα, δηλαδή τις λεπτο μήνιγγες.^{20,21} Η ET -1 ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με υπαραχνοειδή αιμορραγία (στον υπαραχνοειδή χώρο μεταξύ της αραχνοειδούς και χοριοειδούς μήνιγγας).^{8,9,12-16} Υψηλά τοπικά επίπεδα ενδοθηλίνης-1 ανευρίσκονται επίσης σε ενδοεγκεφαλικά αιματώματα¹⁷⁻¹⁹ και συνεπώς και σε αιματώματα που μπορεί να εδράζουν σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ όπως μεταξύ σκληράς και αραχνοειδούς μήνιγγας στη περίπτωση του υποσκληρίδιου αιμάτωματος. Σε περιπτώσεις φλοιϊκής ισχαιμίας ή αιμορραγίας μεταξύ χοριοειδούς μήνιγγας και εγκεφαλικού φλοιού μπορεί να παρατηρηθούν αυξημένα τοπικά επίπεδα ET-1.²⁰

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της ET-1 και του NO ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για τον μεταβολή της διαμέτρου των εγκεφαλικών αγγείων και την εμφάνιση αγγειόσπασμου, που παρατηρείται σε

καταστάσεις υπαραχνοειδούς αιμορραγίας (ΥΑ).²²⁻³⁰ Το NO δρα αγγειοδιασταλτικά, αντίθετα με την ET-1 και επιτελεί ρυθμιστικό παράγοντα στην παραγωγή της, συντελώντας έτσι στη δημιουργία ενός ομοιοστατικού μηχανισμού.²²⁻³⁰

Η κλινική σημασία του αγγειόσπασμου είναι σημαντική. Η επιδείνωση της νευρολογικής εικόνας και η αυξημένη θνητότητα των ασθενών με υπαραχνοειδή αιμορραγία είναι συνδεδεμένη με την εμφάνιση του αγγειόσπασμου. Τα αγγεία που έρχονται σε άμεση επαφή με τα αιμορραγικά στοιχεία, είναι τα αγγεία που διελαύνουν τον υπαραχνοειδή χώρο και άρα τις λεπτομήνιγγες.^{10,25,26,31}

Πιθανόν η δράση της ET-1 και των ανταγωνιστών της να δύναται να μεταβάλλει την κλινική εικόνα της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας ή/και το βαθμό απορρόφησης – αποδόμησης εγκεφαλικών αιματωμάτων ή αιμορραγιών που έρχονται σε επαφή με τις λεπτομήνιγγες. Συνεπώς, η υπό φυσιολογικές συνθήκες, *ex vivo* διερεύνηση της δράσης της ET-1 και του μονοπατιού που συνδέει την ET-1 με το NO στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων είναι ουσιώδης.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να τέθει η βάση για τη μελέτη της φυσιολογίας της διαπερατότητας των λεπτομηνίγγων υπό το πρίσμα της επίδρασης ουσιών με σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία αιμορραγιών του εγκεφάλου, όπως η ET-1. Η μελέτη της διαπερατότητας των λεπτομηνίγγων υπό την επίδραση της ET-1 και ουσιών που δρουν στους υποδοχείς της ή ουσιών προκαλούν την αύξηση των επιπέδων του NO μέσω αυτών των υποδοχέων, διενεργήθηκε με μετρήσεις της

διαμεμβρανικής αντίστασης (transmembrane resistance - R_{TM}) των λεπτομηνίγγων προβάτου με τη χρήση της διάταξης Ussing.³²⁻³⁴ Στα πλαίσια της μελέτης αυτής διενεργήθηκε, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, ο εντοπισμός της ET-1, των υποδοχέων της ET_A και ET_B καθώς επίσης και ο εντοπισμός της α_1 υπομονάδας της αντλίας Νατρίου-Καλίου (A1ATP1) και των υπομονάδων β - και δ - των επιθηλιακών διαύλων Νατρίου (beta-ENaC, delta-ENaC) στις λεπτομηνίγγες προβάτου ώστε να αποκτηθούν δεδομένα για την κατανομή τους. Η μέτρηση της διαμεσοθηλιακής ή διαμεμβρανικής αντίστασης ιστών όπως ο υπεζωκότας,³⁵⁻⁴⁰ το περιτόναιο,⁴¹⁻⁴⁸ το περικάρδιο,⁴⁹ ή οι εμβρυϊκοί υμένες αποτελεί επιστημονικά τεκμηριωμένη μέθοδο μελέτης της ιοντικής διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών και του ρόλου τους στη διακίνηση βιολογικών υγρών.⁵⁰⁻⁵² Γι αυτό το σκοπό, διενεργήθηκαν επίσης πειράματα μελέτης της διαπερατότητας του λεπτομηνίγγικου ιστού με την επίδραση ουαμπαΐνης (αναστολέα της Na^+ - K^+ -ΑΤΡάσης) και αμιλοριδης (αναστολέα του επιθηλιακού διαύλου Na^+ , του ENaC). Οι παραπάνω ουσίες χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα διότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιοντική διαπερατότητα άλλων βιολογικών μεμβρανών όπως ο υπεζωκότας και το περιτόναιο και πιθανότατα να έχουν κάποιο αντίστοιχο ρόλο στις λεπτομηνίγγες.

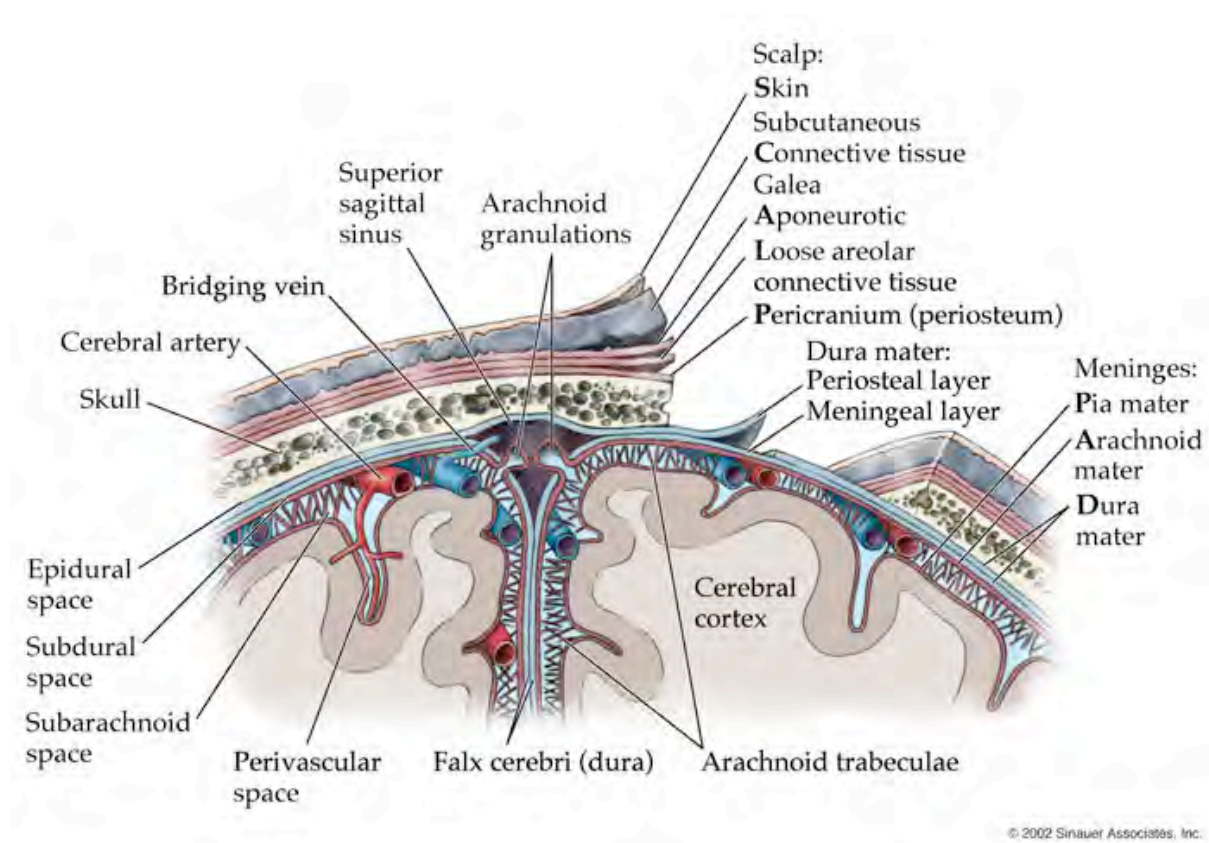
Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να επιτρέψει την ερμηνεία διαφόρων παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν τις παραπάνω παθολογικές οντότητες. Συνάμα θα μπορούσε να αναγνωρισθεί με την αποκτώμενη γνώση ένα σύνολο νέων δραστικών παραγόντων που θα μπορούσαν να

τροποποιήσουν κατά βούληση τη συμπεριφορά της φυσιολογίας των μηνίγγων.

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΛΕΠΤΟΜΗΝΙΓΓΩΝ

Ο όρος λεπτομήνιγγες αναφέρεται στα 2 εσωτερικά μεμβρανικά στρώματα που περικλείουν τον εγκέφαλο, την αραχνοειδή μήνιγγα και τη χοριοειδή μήνιγγα. Αντίστοιχα, η σκληρά μήνιγγα εξαιτίας της δομικής της φύσης αναφέρεται και ως «παχυμήνιγγα» (**Εικ. 1**).⁵³⁻⁶⁰

Αν και η σκληρά μήνιγγα μαζί με τη χοριοειδή συναντώνται σε περιγραφές των Αιγυπτίων εδώ και περίπου 3000 χρόνια, η αραχνοειδής μήνιγγα περιγράφηκε ως ξεχωριστό μηνιγγικό στρώμα μετά από τις εκτεταμένες περιγραφές του Ολλανδού ανατόμου Gerardus Blaes το 1666.⁶¹ Ο όρος *αραχνοειδής*, υιοθετήθηκε από τον Ολλανδό ανατόμο Frederick Ruysch (1638-1731), εξαιτίας της υφής και δομής του συγκεκριμένου μηνιγγικού στρώματος που προσομοίαζε με ιστό αράχνης.⁶² Οι Key και Retzius συνέβαλλαν καθοριστικά στην περιγραφή της ανατομίας των μηνίγγων με το πόνημά τους «Studien in der Anatomie des Nervensystem und des Bindegewebes» το 1875.⁶³ Η κατανόηση της λεπτής δομής και υφής των μηνιγγικών στρωμάτων εξελίχθηκε περαιτέρω με την ανάπτυξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και λοιπών σύγχρονων ερευνητικών μεθόδων.



Εικ. 1. Σχηματική αναπαράσταση της ανατομίας των μηνίγγων. Dura mater periosteal layer = περιοστικό στρώμα της σκληράς μήνιγγας, Dura mater meningeal layer = το αντίστοιχο μηνιγγικό στρώμα, Arachnoid = αραχνοειδής μήνιγγα, Pia mater = χοριοειδής μήνιγγα, Arachnoid granulations = αραχνοειδή σωματίδια, Subarachnoid space = υπαραχνοειδής χώρος, Arachnoid villus = αραχνοειδής λάχνη (απαγωγή ΕΝΥ), Superior sagittal sinus = άνω οβελιαίος κόλπος, Falx cerebri = δρέπανο του εγκεφάλου, Cerebral cortex = εγκεφαλικός φλοιός.

Εμβρυολογία Λεπτομηνίγγων

Οι λεπτομηνίγγες σχηματίζονται από μεσεγχυματικά κύτταρα και από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells) τα οποία περιβάλλουν τον νευρικό σωλήνα κατά την εμβρυογένεση. Αυτός ο σχηματισμός αρχίζει από την 22^η έως την 24^η ημέρα της ανάπτυξης καθώς

οι νευρικές πτυχές αρχίζουν να συνενώνονται ραχιαία για να σχηματίσουν μια σωληνοειδή δομή. Σε αυτό το χρονικό σημείο, μία λεπτή, μονή στοιβάδα κυττάρων που προέρχονται από την νευρική ακρολοφία, περιβάλλει τον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα. Μεταξύ της 24^{ης} και της 40^{ης} ημέρας της κύησης, μεσεγχυματικά κύτταρα μεταναστεύουν επί τα εντός ώστε να περιβάλλουν πρώτα τον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό και έπειτα τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Από την 40^η ημέρα της κύησης αυτά τα κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν ως στρώμα κυττάρων που σχηματίζουν την *αρχέγονη μήνιγγα* (meninx primitiva ή primary meninx).^{55,56,59,64}

Δύο συστατικά στοιχεία συμβάλλουν στο σχηματισμό της αρχέγονης μήνιγγας: *το εξωμεσέγγυμα*, το οποίο συνδέεται με στοιχεία της νευρικής ακρολοφίας για να δημιουργήσει την **ενδομήνιγγα** και *ένα εξωτερικό στρώμα του μεσεγγύματος* από το οποίο δημιουργείται η **εξωμήνιγγα**. Από την ενδομήνιγγα θα δημιουργηθούν οι λεπτομήνιγγες (αραχνοειδής και χοριοειδής μήνιγγα) ενώ η εξωμήνιγγα θα δώσει γένεση στη σκληρά μήνιγγα. Μεταξύ των ημερών 34-48, το έσω πέταλο της ενδομήνιγγας αποκτά πιο χαλαρή δομή ενώ το εξωτερικό τμήμα της εξωμήνιγγας γίνεται πιο συμπαγές.

Μεταξύ των ημερών 44 και 45 της κύησης η χαλαρή δομή της ενδομήνιγγας περιβάλλει και εσωκλείει τα αιμοφόρα αγγεία τα οποία σχηματίζονται στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Σε αυτό το στάδιο οι οδοντωτοί σύνδεσμοι στον νωτιαίο μυελό είναι καλά σχηματισμένοι. Επίσης, εσοχές εντός της εξωμήνιγγας

εμφανίζονται στο στάδιο αυτό, σηματοδοτώντας την έναρξη της διάπλασης του υπαραχνοειδούς χώρου. Μέχρι την 50^η ημέρα της κύησης οι χώροι αυτοί διευρύνονται ώστε να σχηματίσουν τις δεξαμενές του υπαραχνοειδούς χώρου και οι φλεβώδεις κόλποι της σκληράς μήνιγγας αρχίζουν να αναπτύσσονται στο στρώμα της εξωμήνιγγας. Η παραγωγή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) από το χοριοειδές ιστίο (tela choroidea) αρχίζει την 5^η εβδομάδα της κύησης. Η χοριοειδής και η σκληρά μήνιγγα μπορούν να αναγνωριστούν ως ξεχωριστά στρώματα περίπου την 50^η ημέρα της κύησης. Η αραχνοειδής μήνιγγα μπορεί να αναγνωριστεί ως ξεχωριστό στρώμα από το τέλος της εμβρυϊκής περιόδου ή από την πρώιμη μετεμβρυϊκή περίοδο.^{55,56,59,64}

Αδρή Ανατομική του Εγκεφαλικού Τμήματος των Λεπτομηνίγγων

Οι λεπτομηνίγγες της επιφάνειας του εγκεφάλου εμφανίζουν στερεή σύνδεση με το κρανίο μέσω της πρόσφυσής τους στη σκληρά μήνιγγα και εμφανίζουν ένα μεγάλο αριθμό δεξαμενών ENY στον υπαραχνοειδή χώρο όπως π.χ. η μεγάλη δεξαμενή της βάσης, η μεσοσκελιαία δεξαμενή και άλλες.^{55,56,58,59,64}

Λεπτή Δομή της Αραχνοειδούς Μήνιγγας

Η μικροσκοπική μελέτη της αραχνοειδούς μήνιγγας αποκάλυψε δύο ξεχωριστά ανατομικά δομικά στοιχεία που την απαρτίζουν: ένα εξωτερικό στρώμα, το οποίο συχνά αναφέρεται ως κυτταρικό στρώμα του αραχνοειδούς φραγμού (arachnoid barrier cell layer): και ένα εσωτερικό

στρώμα που αναφέρεται ως στρώμα των αραχνοειδών προσεκβολών (arachnoid trabeculae, **Εικ.** 2 και **Εικ.** 3).^{55,56,58,59,64}

Το κυτταρικό στρώμα του αραχνοειδούς φραγμού (arachnoid barrier cell layer) είναι ένα στρώμα από 2-3 επίπεδα πεπλατυσμένων, επίπεδων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μεγάλους, οβάλ, ατρακτοειδείς πυρήνες, πολλαπλές κυτταροπλασματικές προσεκβολές, ελάχιστα μιτοχόνδρια, περιορισμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και φτωχά αναπτυγμένη συσκευή Golgi. Βρίσκονται κάτωθεν των κυττάρων φραγμού της σκληράς μήνιγγας. Η βασική μεμβράνη βρίσκεται κάτωθεν του στρώματος των κυττάρων του αραχνοειδούς φραγμού και διαχωρίζει αυτό το στρώμα από τον υπαραχνοειδή χώρο.^{55,56,58,59,64}

Τοπικές εστίες κυττάρων αραχνοειδών κυττάρων (που αποκαλούνται και μηνιγγοθηλιακά κύτταρα) ανευρίσκονται διάσπαρτες κατά μήκος της αραχνοειδούς μήνιγγας και των αραχνοειδών λαχνών. Επίσης τοπικές εστίες αραχνοειδών κυττάρων ανευρίσκονται στις κοιλίες του εγκεφάλου και στον αγγειώδη συνδετικό ιστό του χοριοειδούς πλέγματος.

Η παρουσία κυτταρικών συνδέσεων είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του στρώματος του αραχνοειδούς φραγμού. Πολλαπλές στενές συνδέσεις (tight junctions), ενδιάμεσες συνδέσεις (zonulae adherens) και δεσμοσώματα συνδέουν τα κύτταρα αυτού του στρώματος μεταξύ τους.⁶⁵ Οι κυτταρικές συνδέσεις δρουν ως μηνιγγικός φραγμός, ο οποίος αποτρέπει πρωτεΐνες και άλλες μεγαλομοριακές ουσίες να εισέλθουν από το αίμα στο ΕΝΥ του υπαραχνοειδούς χώρου. Η λειτουργία του φραγμού μπορεί να καταδειχθεί με την ενδοαγγειακή

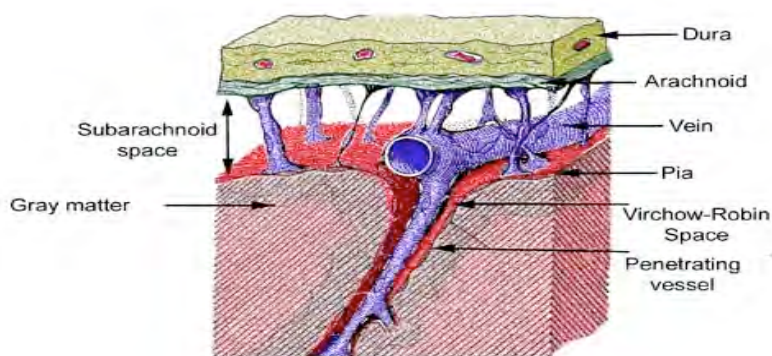
έγχυση ουσιών-χρωστικών: η χρωστική θα παραμείνει και θα χρωματίσει τη σκληρά μήνιγγα χωρίς να διαχυθεί στο κάτωθεν αραχνοειδές κυτταρικό στρώμα, το ΕΝΥ, τον υπαραχνοειδή χώρο ή το εγκεφαλικό παρέγχυμα.^{55,56,58,59,64}

Δεσμοσώματα ως κυτταρικές συνδέσεις εμφανίζονται μεταξύ των κυττάρων του στρώματος του αραχνοειδούς φραγμού του κρανίου και της υπερθεν σκληράς μήνιγγας. Σε αντίθεση, οι διακυττάρια συνδέσεις του στρώματος της σκληράς μήνιγγας δεν είναι πολλές. Η ύπαρξη του υποσκληρίδιου χώρου έχει αμφισβητηθεί στη βιβλιογραφία, ιδιαίτερα σε παλαιότερες μελέτες που βασίζονται σε νεκροανατομικές παρατηρήσεις,⁶⁶⁻⁶⁹ ωστόσο νεότερες μελέτες συνηγορούν υπέρ της ύπαρξής του.⁷⁰ Μάλιστα περιγράφεται και η ύπαρξη μικρής ποσότητας ορώδους υγρού στον υποσκληρίδιο χώρο,⁶⁴ ενώ είναι χαρακτηριστική η αναγνώριση του χώρου αυτού κατά τη διενέργεια κρανιοτομίας σε νευροχειρουργικές προσπελάσεις. Αξιοσημείωτη είναι η ύπαρξη συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του αραχνοειδούς φραγμού και των κυττάρων των αραχνοειδών προσεκβολών (arachnoid trabeculae) που βρίσκονται σε κατώτερο επίπεδο. Τα κύτταρα των αραχνοειδών προσεκβολών που βρίσκονται στον υπαραχνοειδή χώρο, διατιπράινουν τη βασική μεμβράνη και συνδέονται με τα κύτταρα του αραχνοειδούς φραγμού με δεσμοσώματα.^{60,71-74}

Τα κύτταρα των αραχνοειδών προσεκβολών βρίσκονται κάτωθεν των κυττάρων του αραχνοειδούς φραγμού και φέρονται εγκάρσια στον υπαραχνοειδή χώρο ως λεπτές χορδές δίκην ιστού αράχνης. Είναι περισσότερο χαλαρά τοποθετημένα στο χώρο και διαθέτουν πιο επίπεδη

επιφάνεια από τα κύτταρα του αραχνοειδούς φραγμού. Έχουν επίσης μικρότερους πυρήνες, πληθώρα μιτοχονδρίων, επαρκώς ανεπτυγμένη συσκευή Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Εξωκυτάρια ινίδια κολλαγόνου ανευρίσκονται στα κύτταρα αυτού του στρώματος.

Όπως αναφέρθηκε πριν, οι στενές διακυτταρικές συνδέσεις είναι συχνές μεταξύ των κυττάρων του αραχνοειδούς φραγμού και των αραχνοειδών προσεκβολών. Οι χασματοσυνδέσεις (gap junctions) συχνά συνδέουν τα κύτταρα των αραχνοειδών προσεκβολών μεταξύ τους. Το εκτεταμένο δίκτυο των χασματοσυνδέσεων επιτρέπει τη μεταφορά μικρομοριακών ουσιών από κύτταρο σε κύτταρο. Τα αραχνοειδή ή μηνιγγοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο, μια πρωτεΐνη που απαντάται σε διάφορα επιθήλια του οργανισμού φανερώνοντας έτσι τον επιθηλιακό χαρακτήρα του αραχνοειδούς κυττάρου.^{59,75}



Εικ. 2. Απεικονίζονται τα 3 στρώματα των μηνίγγων του εγκεφάλου, η σκληρά μήνιγγα (dura), η αραχνοειδής (arachnoid) και η χοριοειδής (pia) που περικλείουν τον υπαραχνοειδή χώρο με τα αγγεία. Στον υπαραχνοειδή χώρο οι κατακόρυφες δοκίδες εντός του αντιστοιχούν στις αραχνοειδείς προσεκβολές (arachnoid trabeculae).

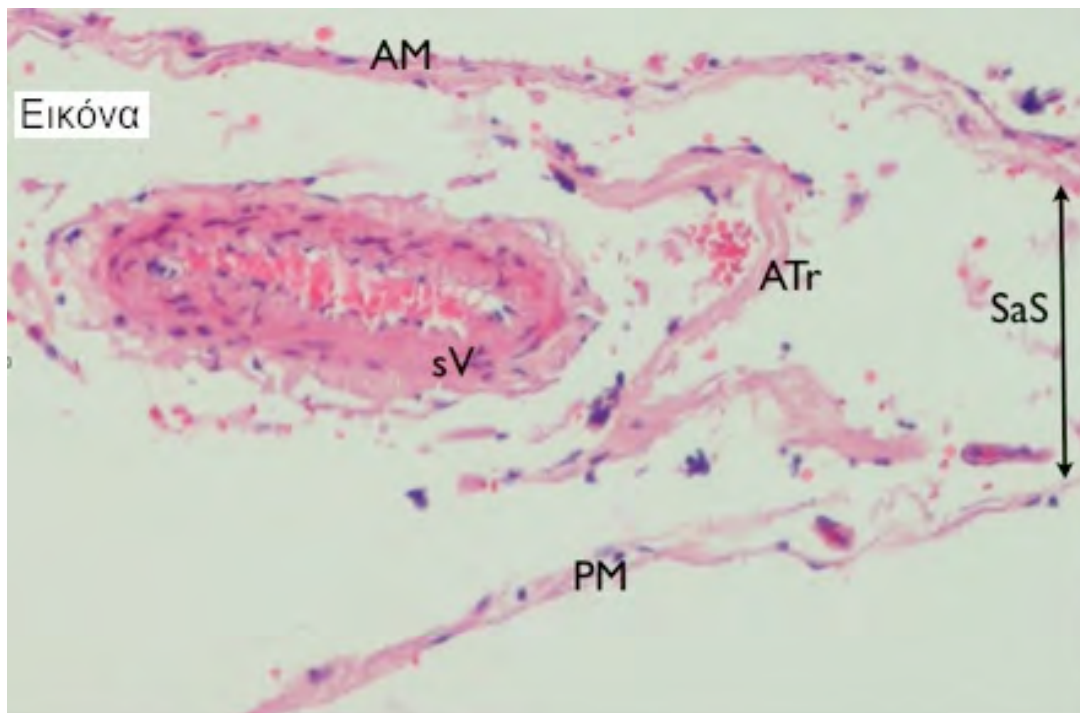
Λεπτή Δομή της Χοριοειδούς Μήνιγγας

Τα κύτταρα της χοριοειδούς μήνιγγας αποτελούνται από διαφοροποιημένους ινοβλάστες όμοιους με την αραχνοειδή μήνιγγα. Η μορφολογία τους είναι συχνά δύσκολο να ξεχωρίσει από την μορφολογία των αραχνοειδών κυττάρων. Το στρώμα της χοριοειδούς μήνιγγας εμφανίζει κατά τόπους πάχος 1-3 κυττάρων (**Εικ.** 2 και **Εικ.** 3). Στο μυελικό κώνο του νωτιαίου μυελού, η χοριοειδής μήνιγγα μπορεί να εμφανίζει θυριδωτή μορφή αφήνοντας έτσι τη βασική μεμβράνη της υποκείμενης μεθορίου γλοίας (glia limitans) του παρεγχύματος εκτεθειμένη στον υπαραχνοειδή χώρο.^{53,56,76-80}

Όσον αφορά τη χοριοειδή μήνιγγα του νωτιαίου μυελού, δύο στρώματα έχουν ανατομικά αναγνωριστεί από τους Key και Retzius (1875).⁶³ Αυτός ο διαχωρισμός έχει πρόσφατα υιοθετηθεί στη βιβλιογραφία. Το εξωτερικό στρώμα αποκαλείται *επιχοριοειδές* ή *ενδιάμεσο λεπτομήνιγγικό στρώμα*, το οποίο είναι ένα αγγειώδες στρώμα που ανευρίσκεται μόνο στον νωτιαίο μυελό. Καλύπτει τον μοίρα του οδοντωτού συνδέσμου που είναι πλούσια σε κολλαγόνο στα πλάγια, ενώ πρόσθια συνιστά την *linea splendens*. Το *έσω πέταλο της χοριοειδούς μήνιγγας* στερείται αγγείων κυρίως στο νωτιαίο μυελό και στον εγκέφαλο. Σε αντίθεση με το επιχοριοειδές στρώμα της χοριοειδούς μήνιγγας, προσκολλάται στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό κατά μήκος του περιβλήματος τους. Τα αιμοφόρα αγγεία διαπιτρώνουν το έσω πέταλο της χοριοειδούς μήνιγγας καθώς διελαύνουν προς τον εγκέφαλο και τον

νωτιαίο μυελό. Υποστηρίζεται ότι το αγγειώδες επιχοριοειδές στρώμα στον νωτιαίο μυελό αναπαριστά την συμμετοχή του μεσεγχύματος στη διάπλαση της χοριοειδούς μήνιγγας ενώ το έσω πέταλο, που στερείται αγγείων, αναπαριστά την συμμετοχή της νευρικής ακρολοφίας.^{53,56,76-80}

Ο υποχοριοειδής χώρος (subpial space) βρίσκεται μεταξύ της χοριοειδούς μήνιγγας και της βασικής μεμβράνης της μεθορίου γλοίας (glia limitans, το εξώτατο στρώμα γλοίας στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό), και έχει μεταβλητό πάχος. Ο χώρος αυτός περιέχει πολλά κολλαγόνα ινίδια. Συχνά τα κύτταρα της χοριοειδούς μήνιγγας συνδέονται με τις αραχνοειδείς προσεκβολές της αραχνοειδούς μήνιγγας με δεσμοσωμάτια.⁷⁹



Εικ. 3. Ιστολογική απεικόνιση λεπτομηνίγγων προβάτου. AM = αραχνοειδής μήνιγγα, ATr = αραχνοειδείς προσεκβολές, PM = χοριοειδής μήνιγγα, sV = αγγείο υπαραχνοειδούς χώρου, SaS = υπαραχνοειδής χώρος. Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση x20

Τα Αγγεία του Υπαραχνοειδούς Χώρου

Τα αγγεία του υπαραχνοειδούς χώρου πορεύονται κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας του χώρου αυτού. Συχνά, το υπερκείμενο στρώμα των αραχνοειδών προσεκβολών υποστηρίζει τις ανατομικές αγγειακές δομές.^{53,76,81} Παλαιότερα η βιβλιογραφία υποστήριζε πως η χοριοειδής μήνιγγα ακολουθεί για μικρή απόσταση τις αρτηρίες και τα αρτηριόλια, όπως αυτά καταδύονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Αρχικά, υπήρχε η αντίληψη ότι ο περιαγγειακός χώρος μεταξύ των καταδυόμενων αγγείων και της χοριοειδούς μήνιγγας, που αναφέρεται συχνά και ως χώρος Virchow-Robin, επικοινωνούσε με τον υπαραχνοειδή χώρο. Αντίθετα, μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανέδειξαν πως στην πραγματικότητα η χοριοειδής μήνιγγα περιβάλλει τα αγγεία καθώς πορεύονται στον υπαραχνοειδή χώρο αλλά δεν τα συνοδεύει καθώς αυτά καταδύονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα.^{53,76,80,82} Το τμήμα της χοριοειδούς μήνιγγας που περιβάλλει τα αγγεία, απλώνεται τελικά στο τμήμα της χοριοειδούς που καλύπτει την εγκεφαλική επιφάνεια, αποκλείοντας την επικοινωνία των περιαγγειακών χώρων (Virchow-Robin) με τον υπαραχνοειδή χώρο. Συνεπώς οι χώροι Virchow-Robin επικοινωνούν με τον εξωκυττάριο χώρο του εγκεφάλου και όχι με τον υπαραχνοειδή χώρο.^{53,76,80,82}

Ένα στρώμα λείων μυϊκών ινών και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία διαχωρίζει τη χοριοειδή μήνιγγα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε αναλογία με τα κύτταρα του αραχνοειδούς φραγμού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα διασυνδέονται με στενές συνδέσεις.^{53,56,76-80}

Επένδυμα

Τα επενδυματικά κύτταρα ανευρίσκονται ως μονοστοιβάδα που επενδύει την τρίτη και την τέταρτη κοιλία του εγκεφάλου καθώς και τον κεντρικό νευρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού.⁸³ Η κυτταρική τους μορφολογία ποικίλλει, από πλακώδη κύτταρα σε κυβοειδή ή σε κυλινδρικά. Ένα άλλο χαρακτηριστικό μορφολογικό τους στοιχείο είναι η ύπαρξη κροσσών. Οι κροσσοί συνδέονται σε ένα κεντριόλιο (basal body) και μικροσωληνίσκους που φέρουν την τυπική διάταξη «9+2» που συναντάται και σε άλλα κύτταρα του οργανισμού που φέρουν κροσσούς. Ο πυρήνας των κυττάρων είναι οβάλ με έκκεντρο πυρηνίσκο. Οργανίδια όπως η συσκευή Golgi και μιτοχόνδρια ανευρίσκονται συχνά στην κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου. Τα επενδυματικά κύτταρα διασυνδέονται με συμβολές προσκόλλησης (fascia adherens) και δεσμοσωμάτια.

Η κύρια λειτουργία του επενδύματος πιθανότατα σχετίζεται με τη προώθηση της κυκλοφορίας του ENY με τη βοήθεια των κινήσεων των κροσσών του καθώς και με ένα μέρος της παραγωγής του ENY.⁸³⁻⁸⁸ Τα κύτταρα αυτά μπορεί επίσης να ευθύνονται για τη συλλογή και παγίδευση ξένων κυττάρων και μικροοργανισμών καθώς και για την αναγέννηση του ίδιου του επενδύματος. Τα επενδυματικά κύτταρα της τρίτης κοιλίας πιθανότατα συμμετέχουν στη μεταφορά μικρομοριακών ουσιών στην αδενοϋπόφυση.^{59,64,87,89}

Αραχνοειδή Σωματίδια και Λάχνες

Τα αραχνοειδή σωματίδια περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Vesalius, ο οποίος παρατήρησε το εντύπωμά τους στην έσω επιφάνεια του κρανίου. Ο Pacchioni περιέγραψε τις ανατομικές δομές, αλλά λανθασμένα θεώρησε πως αποτελούν λεμφαδενικά στοιχεία των μηνίγγων. Ο Faivre ήταν ο πρώτος που πρότεινε πως τα αραχνοειδή σωματίδια μετέχουν στην απαγωγή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY).⁶¹

Αυτές οι λεπτομηνιγγικές δομές, συχνά αντιμετωπίζονται ως μονόδρομες βαλβίδες μεταξύ του κρανιακού υπαραχνοειδούς χώρου στον οποίο κυκλοφορεί ENY και του συστήματος των φλεβωδών κόλπων της σκληράς μήνιγγας. Σε μικροσκοπική κλίμακα αναφέρονται ως αραχνοειδείς λάχνες ενώ σε μακροσκοπική ως αραχνοειδή σωματίδια. Ο όρος Πακχιόνια σωματίδια (Pacchionian granulations) χρησιμοποιείται συνήθως όταν αναφερόμαστε σε αραχνοειδή σωματίδια με μεγάλο μέγεθος όπως στο άλογο ή στον άνθρωπο.^{54,55,60,90-97}

Ο Harvey Cushing, το 1901, πρότεινε ότι οι αραχνοειδείς λάχνες λειτουργούν ως μονόδρομες βαλβίδες όμοιες με τις βαλβίδες του λεμφικού συστήματος («ανοικτό» σύστημα). Την ίδια χρονική περίοδο ο L.H. Weed, χρησιμοποιώντας μικροσκόπηση δεν μπόρεσε να ταυτοποιήσει δομές στις αραχνοειδείς λάχνες που να ομοιάζουν με βαλβίδες. Βρήκε μόνο μια αραγή μεμβράνη που επικαλύπτει τις λάχνες και πρότεινε ότι στα κύτταρα αυτά λαμβάνει χώρα διακυτταρική μεταφορά μέσω πινοκύτωσης («κλειστό» σύστημα).⁹⁸

Η εξέλιξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οδήγησε στην επανεξέταση της λειτουργικής ανατομίας των αραχνοειδών λαχνών και οδήγησε στην διαπίστωση πως η πινοκύτωση συμβάλει στη μονόδρομη μεταφορά του ENY.⁹⁹ Η παρουσία βαλβίδων μονής κατεύθυνσης έχει διαπιστωθεί στους πιθήκους και υπάρχουν δεδομένα που συνηγορούν στο ότι η παρουσία διευρυμένων διακυτταρικών χασμάτων συνεισφέρει στην εμφάνιση μονόδρομης ροής του ENY και στους ανθρώπους.¹⁰⁰ Παρόλα αυτά περισσότερες μελέτες και δεδομένα είναι απαραίτητα για να αποφανθούμε οριστικά για το εάν η απαγωγή του ENY ακολουθεί ένα «ανοικτό» ή «κλειστό» σύστημα. Ιδιαίτερα για τα αραχνοειδή σωματίδια του προβάτου, η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι ακολουθούν το «ανοικτό σύστημα» απαγωγής ENY.^{54,95}

Οι Χώροι Κυκλοφορίας του ENY στον Εγκέφαλο

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) κυκλοφορεί μεταξύ των κοιλιών του εγκεφάλου και ενός δικτύου δεξαμενών και χώρων εκτός του εγκεφάλου και του νωτιαίου μελού. Οι δεξαμενές αποτελούν διαπλατύνσεις του υπαραχνοειδούς χώρου και περιβάλλονται από αραχνοειδή και χοριοειδή κύτταρα. Ενώ οι κοιλίες επενδύονται με επενδυματικά κύτταρα, οι δεξαμενές και οι χώροι εκτός του εγκεφάλου επενδύονται με αραχνοειδή και χοριοειδή μηνιγγικά κύτταρα.^{73,101-104}

Οι πλάγιες κοιλίες συχνά διαιρούνται σε πέντε τμήματα. Σε πρόσθια προς οπίσθια ανατομική περιγραφή τα τμήματα αυτά είναι: 1) το πρόσθιο

κέρας, 2) το σώμα της κοιλίας, 3) το τρίγωνο, 4) το ινιακό κέρασ και 5) το κροταφικό κέρασ. Στο έσω τοίχωμα των πλάγιων κοιλιών υπάρχει το χοριοειδές πλέγμα που παράγει το ΕΝΥ. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα φιλοξενεί περί τα 140 ml ΕΝΥ, μόνο 23 ml περίπου εμπεριέχονται στις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου, 30 ml στον υπαραχνοειδή χώρο του νωτιαίου μυελού και το υπόλοιπο στις δεξαμενές και στον υπαραχνοειδή χώρο του εγκεφάλου.^{59,64,105}

Η τρίτη κοιλία διαθέτει μικρό όγκο, είναι μια κοιλότητα του εγκεφάλου στη μέση γραμμή που στην οροφή της υπάρχει το χοριοειδές πλέγμα της τρίτης κοιλίας. Με τη βοήθεια των γειτονικών ανατομικών δομών και των επιφανειών της τρίτης κοιλίας σχηματίζονται τα κολπώματα της τρίτης κοιλίας. Χαρακτηριστικά κολπώματα είναι το οπτικό κόλπωμα, το κόλπωμα της χοάνης, του κωναρίου και το υπερκωνάριο.^{59,64}

Η τετάρτη κοιλία του εγκεφάλου βρίσκεται μεταξύ της παρεγκεφαλίδας, της γέφυρας και του προμήκους. Έχει το σχήμα ρόμβου με τα πλάγια κολπώματα να βρίσκονται στο πλατύτερο σημείο. Το κατώτερο ήμισυ της οροφής της τετάρτης κοιλίας ονομάζεται κάτω μυέλινο ιστίο και επενδύεται με χοριοειδές πλέγμα.^{59,64}

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΙ ΛΕΠΤΟΜΗΝΙΓΓΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η Παραγωγή και η Σύσταση του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού

Ο Walter Dandy, το 1919, πρώτος αναγνώρισε το χοριοειδές πλέγμα ως την εστία παραγωγής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και θεώρησε πως μόνο το χοριοειδές πλέγμα παράγει ENY.¹⁰⁶ Η σύγχρονη βιβλιογραφία αναγνωρίζει το χοριοειδές πλέγμα ως σημαντική πηγή παραγωγής ENY αλλά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι και άλλες πηγές παραγωγής ENY υπάρχουν όπως το επένδυμα και εγκεφαλικό παρέγχυμα. Περίπου το 30% του ENY παράγεται από το επένδυμα.⁸³⁻⁸⁸

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό δεν αποτελεί απλώς ένα διήθημα του πλάσματος που στερείται πρωτεϊνών και κυττάρων αλλά αποτελεί έκκριμα που απαιτεί τη χρησιμοποίηση ενέργειας για την παραγωγή του.^{107,108} Η έκκριση του ENY εξαρτάται από την ενεργητική μεταφορά του νατρίου που διενεργείται από την αντλία Νατρίου-Καλίου-ΑΤΡάσης των επιθηλιακών κυττάρων του χοριοειδούς πλέγματος.^{107,108} Η *in vivo* αναστολή της παραγωγής του ENY από το χοριοειδές πλέγμα μετά από την χορήγηση ουαμπαΐνης, ενός αναστολέα της Νατρίου-Καλίου-ΑΤΡάσης, υποστηρίζει την ιδέα της ενεργητικής παραγωγής.¹⁰⁹ Σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του ENY από το χοριοειδές πλέγμα φαίνεται να διαδραματίζει και η υδατοπορίνη-1 (aquaporin-1, AQP1) που μαζί με την υδατοπορίνη-4 είναι δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούν σημαντικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς διακίνησης νερού στο ΚΝΣ.^{107,108} Μικρές ποσότητες πρωτεΐνης

μεταφέρονται στο ENY κυρίως με πινοκύτωση.¹¹⁰ Το γεγονός ότι το ENY είναι ισοωσμωτικό σε σύγκριση με το πλάσμα σημαίνει ότι η διακίνηση του νερού μεταξύ των δύο διαμερισμάτων εμφανίζει ισορροπία.

Η Κυκλοφορία του ENY κατά Ωσεις

Το ENY το οποίο παράγεται (περίπου 0,35ml/λεπτό) στο μεγαλύτερο ποσοστό του όγκου του από τις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου, ρέει στην 3^η κοιλία διαμέσου των τρημάτων του Monro. Στη συνέχεια το υγρό από την 3^η κοιλία ρέει στην 4^η μέσω του υδραγωγού του Sylvius. Ο επόμενος σταθμός είναι η μεγάλη δεξαμενή (cisterna magna) μέσω των πλάγιων τρημάτων (του Luschka) και του μέσου τρήματος (του Magendie).^{59,64,85}

Πολλές διαφορετικές διαδρομές είναι δυνατές εφόσον το ENY φθάσει στη μεγάλη δεξαμενή. Το υγρό μπορεί να ωθηθεί: 1) άνωθεν προς τα παρεγκεφαλιδικά ημισφαίρια στην αμφιμηνοειδή δεξαμενή (ambient cistern), 2) άνω και πρόσθια προς την μεσοσκελιαία και μεσοχιασματική δεξαμενή, 3) πρόσθια προς την προ-προμηκική, προγεφυρική και παρεγκεφαλοπρομηκική δεξαμενή, ή 4) κάτω προς τον νωτιαίο υπαραχνοειδή χώρο. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό στον νωτιαίο υπαραχνοειδή χώρο, όπισθεν του νωτιαίου μυελού και των οδοντωτών συνδέσμων κατευθύνεται ουραία (caudal). Το ENY μπορεί να φθάσει ουραία ως τον νωτιαίο οσφυϊκό σάκο πριν να αλλάξει κατεύθυνση και να συνεχίσει την πορεία του πρόσθια, στον κοιλιακό (ventral) νωτιαίο υπαραχνοειδή χώρο. Η πορεία του ENY στον κοιλιακό (ventral) νωτιαίο υπαραχνοειδή χώρο είναι

προς το κρανίο για να επιστρέψει τελικά στις δεξαμενές ENY της βάσης του εγκεφάλου.^{59,64}

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί όσον αφορά την κυκλοφορία του ENY. Πιθανότατα η μικρότερη συνεισφορά επιτυγχάνεται με στην δημιουργία νέου ENY και τις προωθητικές κινήσεις των κροσσών των επενδυματικών κυττάρων. Η διαφορά πίεσης κατά μήκος των αραχνοειδών λαχνών συνεισφέρει επίσης στην αδρή ροή του ENY. Η μέση πίεση του ENY στον εγκέφαλο είναι περίπου 100-120 mm στήλης H₂O ενώ η πίεση στον άνω οβελιαίο φλεβώδη κόλπο της σκληράς μήνιγγας είναι περίπου 90 mm.^{59,64} Η κυκλοφορία του ENY διευκολύνεται επίσης από τις αγγειακούς παλμούς κατά την διάρκεια του καρδιακού κύκλου.¹⁰⁶ Οι παλμικές ώσεις του αρτηριακού συστήματος μεταδίδονται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, το χοριοειδές πλέγμα και τις μεγάλες αρτηρίες της βάσης του κρανίου. Η προώθηση ποσότητας του ENY αυξάνεται όταν η συστολική και η διαστολική πίεση είναι χαμηλές.

Η ένταση των παλμικών ώσεων του ENY εξαρτάται επίσης: 1) από τον αναπνευστικό κύκλο, 2) την αντίσταση παροχέτευσής στο επίπεδο των αραχνοειδών λαχνών, 3) την μέση ενδοκράνια πίεση και 4) την ευενδοτότητα (compliance) της κρανιακής και της νωτιαίας κοιλότητας. Παλμικές ώσεις της τάξης των 10-30 mm H₂O και των 20-30 mm H₂O σε ένταση παρατηρούνται σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία του αναπνευστικού και καρδιακού κύκλου αντίστοιχα. Η ένταση των ώσεων ελαττώνεται καθώς προχωρούμε ουραία κατά το μήκος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στη μεγάλη δεξαμενή της βάσης του κρανίου π.χ. η ένταση είναι της τάξης

των 50 mm H₂O ενώ στην οσφυϊκή, νωτιαία χώρα ανέρχεται στα 30 mm H₂O.^{59,64}

Οι παλμικές κινήσεις της τρίτης κοιλίας θεωρήθηκαν αρχικά πως αποτελούν ένα είδος αντλίας για την προώθηση του ENY. Αντίθετα, πρόσφατες νευροαπεικονιστικές μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν πως οι παλμικές κινήσεις κατά μήκος *όλου του νευράξονα* αποτελούν την προωθητική δύναμη για την κυκλοφορία του ENY με τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό να συνεισφέρουν σε διαφορετικό βαθμό. Ο Duboulay και συν. έδειξαν πως κατά μέσο όρο 0,1 mL ENY εκτοπίζεται από την τρίτη κοιλία με κάθε συστολή, σε σύγκριση με 1 mL στις βασικές δεξαμενές και 0,64 mL στην μεγάλη δεξαμενή της βάσης του κρανίου.¹⁰⁶

Η Παροχέτευση του ENY

Το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου ENY φαίνεται πως παροχετεύεται διαμέσω των αραχνοειδών λαχνών στη φλεβική κυκλοφορία (φλεβώδεις κόλποι της σκληράς μήνιγγας).^{54,60,90-94,96,97} Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες οδοί παροχέτευσης του ENY όπως το επένδυμα, οι λεπτομήνιγγες, και η λεμφική κυκλοφορία του νωτιαίου μυελού (της τάξης του 15-20%).¹¹¹⁻¹²⁰ Στο πρόβατο ιδιαίτερα, η λεμφική απαγωγή του ENY είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη και εμφανίζεται στον πρόσθιο κρανιακό βόθρο κατά μήκος των περινευρίων των οσφρητικών νεύρων απάγοντας τμήμα του ENY στα λεμφαγγεία του τραχήλου.^{84,111,114,119-121} Η κλίση (gradient) της υδροστατικής και της κολλοειδωσμοωτικής πίεσης μεταξύ των

αραχνοειδών λαχνών και των φλεβωδών κόλπων αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις για την παροχέτευση του ENY. Εάν η παροχέτευση του ENY διενεργείται διαμέσω μιας αραγούς μεμβράνης στις αραχνοειδείς λάχνες, δηλαδή εάν ακολουθεί το μοντέλου «κλειστού τύπου» τότε η συνεισφορά της κολλοειδωσμοτικής πίεσης στη ροή του ENY διαμέσω των αραχνοειδών λαχνών είναι λιγότερο πιθανή.

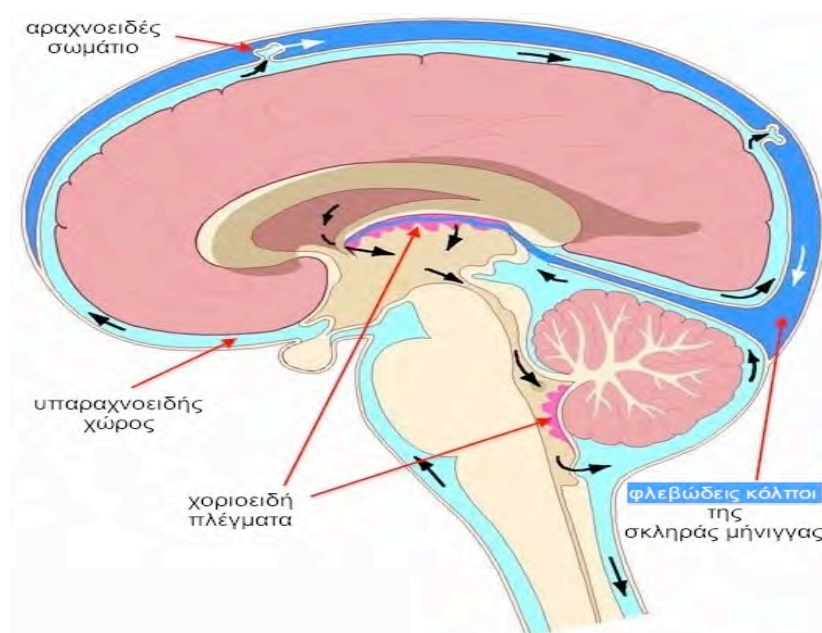
Η Δράση του ENY

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περιβάλλοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αποτελεί ένα είδος ανάρτησης που συνεισφέρει στην απόσβεση κραδασμών και κινήσεων που θα μπορούσαν να βλάψουν το ΚΝΣ. Η διαφορά του ειδικού βάρους μεταξύ του εγκεφάλου (Ε.Β. 1,040) και του ENY (Ε.Β. 1,007) αποδεικνύει πως το ENY δρα ώστε να μειώσει το φαινομενικό βάρος του εγκεφάλου κατά το 4% της μάζας του.^{59,64,122}

Η κυκλοφορία, η παραγωγή και η παροχέτευση του ENY διενεργούνται με βάση την ύπαρξη σύνθετων μηχανισμών του οργανισμού και καταδεικνύουν ότι το ENY δεν μπορεί απλώς και μόνο να έχει το ρόλο τη ανάρτησης του ΚΝΣ. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό φαίνεται κατά κάποιο τρόπο να έχει ανάλογη λειτουργία με τη λειτουργία με αυτή της λέμφου σε άλλα συστήματα. Δηλαδή, έχει επιφορτιστεί με την απομάκρυνση λιποδιαλυτών και τοξικών ουσιών από το εγκεφαλικό εξωκυττάριο υγρό (ECF). Πολλά μη λιποδιαλυτά μόρια απομακρύνονται επίσης με την

κυκλοφορία του ΕΝΥ, όπως η ουρία, η αλβουμίνη, το ομοβανιλικό οξύ και η νοραδρεναλίνη.¹⁰⁰

Το εξωκυττάριο υγρό του εγκεφάλου (ECF) στηρίζει μέρος της ομοιόστασής του στη δράση του ΕΝΥ. Η ομοιόσταση του ECF διατηρείται καθώς μεγάλα και πολικά μόρια αποκλείονται με τη βοήθεια του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΕΕΦ) από το ΕΝΥ, ενώ συμπλέγματα τριχοειδών και νευρογλοίας, επιθήλια και νευρώνες διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης του ΕΝΥ και του ECF.^{107,123-127} Τέλος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό φέρεται να λειτουργεί ως ένας μηχανισμός ενδοεγκεφαλικής μεταφοράς βιογενών αμινών οι οποίες μετέχουν στην έκκριση των υποφυσιακών ορμονών.¹⁰⁰



Εικ. 4. Σχηματική αναπαράσταση της κυκλοφορίας του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. **Λευκά βέλη** = κυκλοφορία στους φλεβώδεις κόλπους της σκληράς μήνιγγας, **Μαύρα βέλη** = κυκλοφορία στις κοιλίες του εγκεφάλου και στον κρανιακό και νωτιαίο υπαραραχνοειδή χώρο.

ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

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

Καθημερινά απορροφούνται περίπου 180 λίτρα υγρού από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, 9 λίτρα την ημέρα από το επιθήλιο του λεπτού εντέρου και περισσότερα από 700 mL την ημέρα από τον τοιχωματικό υπεζωκότα, αλλά υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τους μηχανισμούς.¹²⁸ Περισσότερα από 100 χρόνια πριν, ανακαλύφθηκε ότι η απορρόφηση υγρού από το έντερο απαιτεί ακέραιο επιθήλιο και ότι η διακίνηση υγρού διαμέσου της μεμβράνης γίνεται χωρίς να υπάρχει κάποια οσμωτική δύναμη.¹²⁹ Έκτοτε πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μας έδωσαν τη δυνατότητα σήμερα να γνωρίζουμε τους βασικούς μηχανισμούς που διέπουν τη διαμεμβρανική μεταφορά ύδατος και ουσιών. Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η μεταφορά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, είτε αυτή αφορά στη μετακίνηση μέσα από τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα, είτε μέσα από τις πρωτεΐνες της μεμβράνης, είναι η διάχυση και η ενεργητική μεταφορά.

Διάχυση

Διάχυση είναι η τυχαία διακίνηση ουσιών, μόριο με μόριο, μέσα από χώρους που παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων στη μεμβράνη, είτε σε

συνδυασμό με πρωτεΐνη φορέα. Η διάχυση επιτελείται με τη συνήθη κινητική ενέργεια της ύλης. Τα ιόντα διαχέονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα μόρια, καθώς επίσης και τα αιωρούμενα κολλοειδή σωματίδια, με τη διαφορά ότι τα κολλοειδή κινούνται με πολύ μικρότερη ταχύτητα εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους.¹³⁰

Ενεργητική Μεταφορά

Η ενεργητική μεταφορά συνίσταται σε μετακίνηση ιόντων ή άλλων ουσιών, διαμέσου της μεμβράνης, με τη συμμετοχή μιας πρωτεΐνης φορέα. Επιπλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πρηνές, όπως από χαμηλή συγκέντρωση προς υψηλή συγκέντρωση, διεργασία για την οποία απαιτείται επιπρόσθετη ενέργεια εκτός από την κινητική για την πραγματοποίηση της μετακίνησης.¹³⁰

Μεταφορά Διαμέσου Επιθηλίων

Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολικότητα στις μεταφορικές ιδιότητες τους. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταφορικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης που βλέπει προς τη μια πλευρά της στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων διαφέρουν από εκείνες της μεμβράνης που βλέπει προς την άλλη πλευρά.¹³¹

Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου των νεφρών αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της πολικότητας. Το συμπλήρωμα των μεταφορικών πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ψηκτροειδή παρυφή που βλέπει προς τον

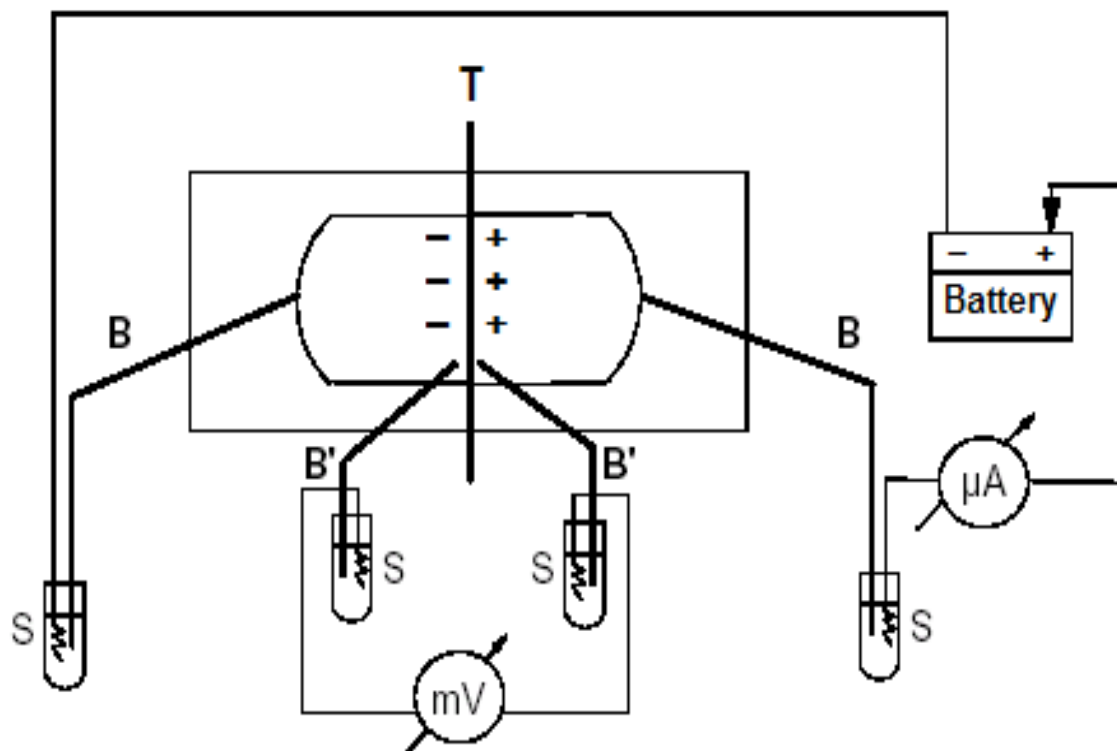
αυλό του λεπτού εντέρου ή του ουροφόρου σωληναρίου διαφέρει ως προς τη σύσταση των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας της μεμβράνης του κυττάρου. Οι στενές συνδέσεις που ενώνουν τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επιτρέπουν τη μίξη των μεταφορικών πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών με εκείνες της κορυφαίας, 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 τύποι οδών μεταφοράς διαμέσου των επιθηλίων: (α) διακυτταρικές οδοί, μέσα από τα κύτταρα, και (β) παρακυττάρια οδοί, μεταξύ των κυττάρων.^{131,132}

Η μεταφορά υγρών και ουσιών μέσα από τα κύτταρα γίνεται με τους βασικούς μηχανισμούς που αναφέρθηκαν. Η διακίνηση μέσω των παρακυτταρίων οδών περιορίζεται από τις στενές συνδέσεις, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων.^{133,134} Η μεταφορά στις παρακυττάρια οδούς θεωρούνταν παθητική, κυρίως ως αποτέλεσμα υδροστατικών ή οσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων, που δημιουργούνται από την ενεργητική διακυττάρια μεταφορά ιόντων.^{135,136} Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παρακυττάρια μεταφορά μπορεί να ρυθμίζεται ενεργά.¹³⁷⁻¹⁴⁰

Μελέτη Διαπερατότητας Βιολογικών Μεμβρανών – Μέθοδος Ussing

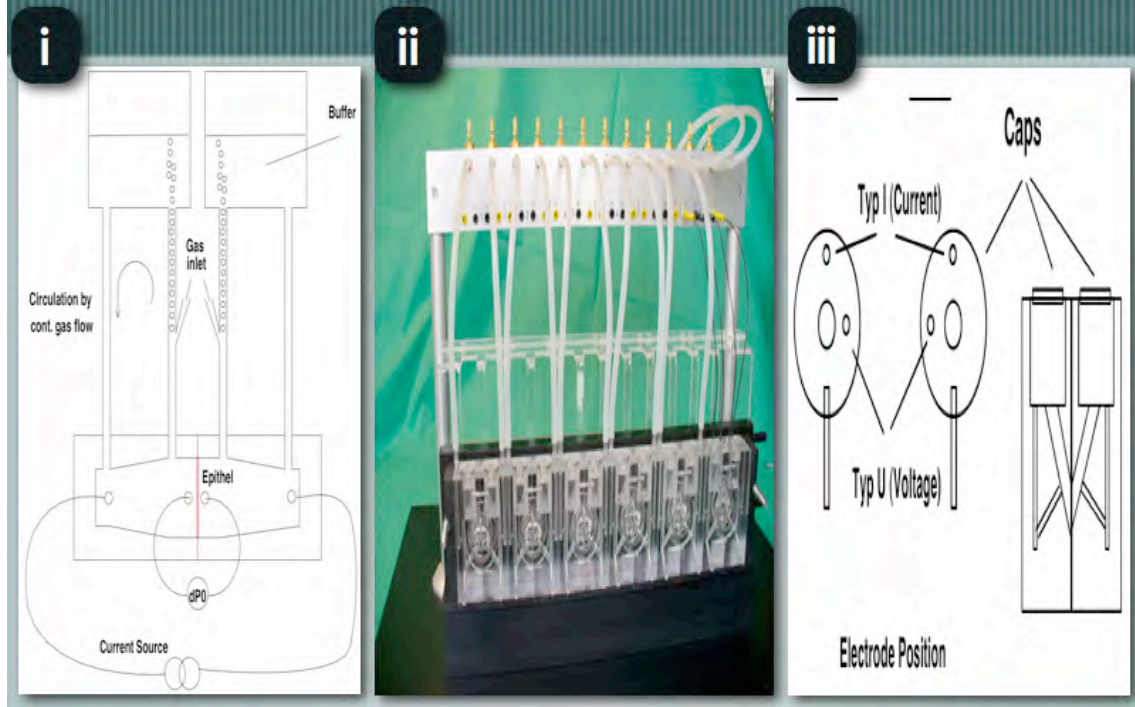
Η μέθοδος Ussing System αποτελεί μια κλασσική μέθοδο μελέτης διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών.³²⁻³⁴ Όταν ο Hans Ussing

επινόησε τη συσκευή που αργότερα πήρε το όνομά του, δεν θα μπορούσε να γνωρίζει την ευρύτητα των εφαρμογών για την οποία θα χρησιμοποιούταν.³²⁻³⁴ Ο θάλαμος αρχικά σχεδιάστηκε προκειμένου να μελετηθεί η ενεργητική μεταφορά ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχου. Σήμερα η μέθοδος χρησιμοποιείται για ποικιλία εφαρμογών που κυμαίνονται από την μελέτη της ακεραιότητας κυτταρικών στρωμάτων έως και τη μελέτη της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και σε μελέτες απορρόφησης φαρμάκων.^{33,141} Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου διαφαίνεται στην **Εικόνα 5** και **Εικόνα 6**.⁴⁵ Ο ιστός (**T**) είναι τοποθετημένος σαν επίπεδο στρώμα σε μια αντλία και εκατέρωθεν αυτού υπάρχει διάλυμα Krebs-Ringer. Η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος του ιστού μετράται από ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (**B'**, **B''**) που το καθένα απέχει 3mm από την επιφάνεια του ιστού. Το δυναμικό καταγράφεται σε ένα βολτόμετρο (mV). Με τη βοήθεια μιας μπαταρίας (battery) και ενός διαιρέτη τάσης, ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B**, **B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm έκαστο από την επιφάνεια του ιστού.



Εικ. 5 Διάγραμμα της συσκευής Ussing System. **B**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (S) για την χορήγηση ρεύματος. **B'**: Γέφυρες άγαρ που περιέχουν τα ηλεκτρόδια αργύρου / χλωριούχου αργύρου (S) για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. mV: μιλιβολτόμετρο. **μA**: μικροαμπερόμετρο. Battery: Μπαταρία. **T**: Ιστός.⁴⁵

Μέθοδος



Εικ. 6 i,ii,iii. Η πειραματική διάταξη Ussing. i) Σχηματική διάταξη των συνδέσεων των ηλεκτροδίων και των θαλάμων, ii) Φωτογραφία της διάταξης που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο φυσιολογίας του Π.Θ., iii) Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου στήριξης και τοποθέτησης των ηλεκτροδίων στους ημιθαλάμους.

Το Ussing System στην βασική του μορφή αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη. Το ένα από αυτά είναι ο θάλαμος, ενώ το δεύτερο είναι το ηλεκτρικό κύκλωμα που προσαρμόζεται επάνω του. Η ποικιλία των εφαρμογών της διάταξης οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στη μεγάλη ποικιλία των μετατροπών που έχουν υποστεί τα δύο αυτά μέρη προκειμένου να προσαρμόζεται κατά περίπτωση στις ανάγκες των πειραμάτων. Με την πάροδο του χρόνου έχουν αναπτυχθεί αρκετές

παραλλαγές του συστήματος του Ussing ούτως ώστε σήμερα να είναι δυνατή πέραν της μέτρησης της διαφοράς δυναμικού, της έντασης του ρεύματος και της αντίστασης του δείγματος, και η μέτρηση παραμέτρων όπως η χωρητικότητα και η εμπέδιση του συστήματος.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Η αρχική σχεδίαση της διάταξης του Ussing επέτρεπε στον εφευρέτη του να προσαρμόζει και να μελετά το δέρμα του βατράχου. Αυτό ήταν σχετικά εύκολο δεδομένης της αντοχής και της ελαστικότητας του συγκεκριμένου ιστού. Αν ο θάλαμος είχε περιοριστεί στο αρχικό του σχήμα, δεν θα είχε επεκταθεί με τόση επιτυχία στα ανά τον κόσμο ερευνητικά κέντρα. Ωστόσο, η ανάπτυξη θαλάμων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ακόμη και τα μικρότερα κομμάτια ζωντανού ιστού μέσω εφαρμογής μικροχειρουργικών τεχνικών, καθώς και η δυνατότητα ορισμένων οργάνων να μελετούν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες κυτταρικών σειρών που έχουν αναπτυχθεί πάνω σε ειδικά σχεδιασμένους θαλάμους, έχουν αναδείξει το σύστημα του Ussing σε ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα και ακριβή συστήματα μελέτης της συμπεριφοράς ζωντανών επιθηλίων.

Σήμερα οι διάφοροι θάλαμοι του Ussing, κατηγοριοποιούνται στους κυκλοφορούντες θαλάμους (Circulating Chambers) και στους συνεχώς διηθούμενους θαλάμους (Continuously Perfused Chambers). Οι δύο αυτοί βασικοί τύποι θαλάμων έχουν αρκετές διαφορές στη δομή και τη λειτουργία τους. Ο κυκλοφορούντες θάλαμοι, είναι αυτοί που έχουν επικρατήσει σαν πρότυπο στα περισσότερα εργαστήρια λόγω της απλότητας στην κατασκευή, λειτουργία, χρήση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι συνεχώς διηθούμενοι θάλαμοι ωστόσο προσφέρουν αρκετές εναλλακτικές

λειτουργίες και μετρήσεις μη διαθέσιμες στα μοντέλα των κυκλοφορούντων θαλάμων.

Μετρήσεις με τους θαλάμους του Ussing, η Αντίσταση R

Οι επιθηλιακές μεμβράνες εμφανίζουν δύο χαρακτηριστικά που τις διαχωρίζουν από τους υπόλοιπους ιστούς: την πολικότητα και την ιστική συνοχή. Με τον όρο πολικότητα αναφερόμαστε στη μετρούμενη διαφορά δυναμικού που δημιουργείται λόγω της ασύμμετρης κατανομής των πρωτεϊνών μεταξύ της κορυφιαίας (apical) και βασικής (basolateral) επιφάνειας του επιθηλίου. Με τον όρο συνοχή του ιστού αναφερόμαστε στο μέτρο της ακεραιότητας και της αντίστασης του ιστού τόσο σε ηλεκτρικές όσο και μηχανικές καταπονήσεις όπως αυτό προκύπτει από το σχηματισμό πρωτεϊνικών διασυνδέσεων με το όνομα Tight Junctions (Στενές Συνδέσεις). Οι σύνδεσμοι αυτοί διαχωρίζουν τις δύο επιθηλιακές επιφάνειες και η πυκνότητα τους καθορίζει την συνοχή του ιστού ως μετρήσιμο μέγεθος.

Η συνοχή ενός ιστού μπορεί να προσδιορισθεί με τη βοήθεια του μετρήσιμου μεγέθους της ηλεκτρικής αντίστασής του. Την αρχή αυτή διατύπωσε ο ίδιος ο εφευρέτης του συστήματος, ο Hans Ussing.³⁴ Όπως είναι γνωστό η αντίσταση ενός υλικού δίνεται από την εξίσωση:

$$R = \rho \cdot l/A$$

Όπου R η ωμική αντίσταση του υλικού, ρ η ειδική αντίσταση του υλικού που οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, l το πάχος του

υλικού κατά τη φορά του ρεύματος και A το εμβαδόν της περιοχής που μετράται.

Είναι σαφές από τα παραπάνω πως όταν διατηρούνται σταθερά τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του υλικού I και A , η αντίσταση που εμφανίζει οφείλεται αποκλειστικά στη μοριακή του δομή, που ως εκ' τούτου αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής.

Προκειμένου να μετρηθεί η συνολική αντίσταση της μεμβράνης με τη χρήση του συστήματος του Ussing, είναι αναγκαίο να εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος σε αυτή. Καθώς δημιουργείται το ηλεκτρικό πεδίο, οι ηλεκτρολύτες και τα διάφορα ιοντικά στοιχεία των μεμβρανικών κυττάρων συμμετέχουν στην παραγωγή του ρεύματος που διατρέχει τη μεμβράνη καθώς και στην εμφάνιση της αντίστασης στη ροή του ρεύματος κατά τη φορά που καθορίζει το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Σύνδεση Δυναμικού (Voltage Clamp).³³

Το μειονέκτημα της σύνδεσης δυναμικού, είναι η μετακίνηση ηλεκτρολυτών διαλυμένων στο κυτταρόπλασμα κατά τη φορά της εφαρμοζόμενης διαφοράς τάσης. Το φαινόμενο αυτό της ιοντικής μετανάστευσης μπορεί να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα καθώς δεν ανταποκρίνεται στην φυσιολογική κατάσταση που επικρατεί στο κύτταρο, υπό κανονικές συνθήκες. Επίσης, η ένταση του ρεύματος που διαπερνά τη μεμβράνη μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής συνοχής ή απλά την βλάβη στις πρωτεΐνες που είναι πιο ευαίσθητες στις μεταβολές της κυτταρικής ιοντικής ισορροπίας, με αποτέλεσμα οι μετρήσεις

που προκύπτουν να μην αντιστοιχούν σε αυτές ενός ζωντανού επιθηλιακού κυττάρου in vivo.³³

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, προτάθηκε και χρησιμοποιείται η μέτρηση με Σύνδεση Ρεύματος (Current Clamp). Αντίθετα με την τεχνική του Voltage Clamp, τον ιστό διαπερνούν παλμοί συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος μικρής διάρκειας και καθορισμένης έντασης. Παρ' όλο που αρχικά δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στις δύο μεθόδους, με την τεχνική αυτή αποφεύγεται το φαινόμενο της ιοντικής ενδοκυττάριας μετανάστευσης. Επίσης, σημαντική είναι και η διαφορά στον τρόπο μέτρησης. Με τη σύνδεση τάσης, η μέτρηση γίνεται με τη βοήθεια ενός βολτομέτρου μεγάλης εμπέδισης που μετρά τις αλλαγές στην εφαρμοζόμενη τάση. Αντίθετα στη σύνδεση ρεύματος η γεννήτρια ηλεκτρικών παλμών είναι συνδεδεμένη με αμπερόμετρο που μεταφράζει την μεταβαλλόμενη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος σε διαφορά δυναμικού.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση τύπου Ανοικτού Κυκλώματος (Open Circuit mode) ώστε να προσδιορίζουμε τη διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) του ιστού ανά λεπτό. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στην μικρότερη δυνατή καταπόνηση του ιστού όταν εφαρμόζονται συνθήκες ανοικτού κυκλώματος και στον έμμεσο προσδιορισμό της ιοντικής διαπερατότητας της μεμβράνης όταν η διαμεμβρανική αντίσταση είναι γνωστή, σύμφωνα με τον νόμο του Ohm. Αυξημένη διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) σημαίνει μειωμένη ιοντική διαπερατότητα της μεμβράνης και αντίστροφα.³³

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλογή και Προετοιμασία Ιστού

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα κρανιακού λεπτομηνιγγικού ιστού από 108 ενήλικα πρόβατα, θηλυκά και αρσενικά. Η συλλογή των δειγμάτων διενεργήθηκε στο χώρο σφαγής αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου. Μέριμνα ελήφθη ώστε η εφαρμογή μηχανικής τάσης στο κάθε δείγμα του ιστού καθώς και ο χειρισμός του να είναι ο ελάχιστος. Δείγματα ιστού που έφεραν οπές ή προσκολλημένα ιστικά τεμάχια από γειτονικούς ιστούς αφαιρέθηκαν από την μελέτη. Η κλειστή κρανιακή κοιλότητα του προβάτου καθώς και το στρώμα της σκληράς μήνιγγας που περιβάλλουν τον λεπτομηνιγγικό ιστό εξωτερικά διασφαλίζουν την ελάχιστη έκθεση του ιστού στον αέρα κατά την απομόνωσή του μετά από τη θανάτωση του ζώου. Ο ιστός αμέσως μετά την απομόνωσή του τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany), στους 4 °C και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών από το θάνατο του ζώου.

Η λήψη των τμημάτων του λεπτομηνιγγικού ιστού έγινε από την βρεγματική επιφάνεια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Τα τεμάχια του ιστού που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν από σημεία της επιφάνειας των εγκεφαλικών ημισφαιρίων απομακρυσμένα από το εμπρόσθια και κάτω τμήματα του μετωπιαίου λοβού. Τα συγκεκριμένα τμήματα του μετωπιαίου

λοβού των προβάτων, σύμφωνα με ανατομικές μελέτες, διαθέτουν λεμφική απαγωγή και λεμφαγγειακές δομές κατά μήκος των περινευρίων των οσφρητικών ν. εύρων που διέρχονται του τετριμένου πετάλου και καταλήγουν στα λεμφαγγεία του τραχήλου.^{114,118,120,145}

ΧΡΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΚΑΙ ΤΟΥ ΝΟ ΣΤΙΣ ΛΕΠΤΟΜΗΝΙΓΓΕΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), των υποδοχέων της ή ουσιών προκαλούν την αύξηση των επιπέδων του ΝΟ μέσω αυτών των υποδοχέων στη διαπερατότητα των λεπτομηνιγγων προβάτου, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες στην πειραματική διάταξη Ussing:

Ενδοθηλίνη-1 (ET-1)

Στα θηλαστικά η οικογένεια των ενδοθηλινών αποτελείται από τρεις ενδογενείς ισομορφές, τις ET-1, ET-2, και ET-3. Η ET-1 αποτελεί την κύρια ισομορφή στο ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα και παραμένει η ευρύτερη διαδεδομένη, ισχυρή, παρατεταμένης διάρκειας αγγειοσυσπαστική ουσία των ανθρώπινων αγγείων που έχει ανακαλυφθεί ως σήμερα. Η ET-1 διαθέτει ιδιαίτερη κλινική σημασία για το ΚΝΣ καθώς

φαίνεται να μετέχει στην εμφάνιση αγγειόσπασμου σε περιπτώσεις υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.^{1,4,28,146}

Η ET -1 απελευθερώνεται μέσω μιας διπλής εκκρινικής οδού. Το πεπτίδιο απελευθερώνεται διαρκώς από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, προξενώντας ισχυρή αγγειοσυστολή του υποκείμενου λείου μυϊκού ιστού, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση του ενδογενούς αγγειακού τόνου. Το πεπτίδιο επίσης απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα από συγκεκριμένα αποθηκευτικά κοκκία (Weil-Palade bodies) ως απάντηση σε εξωγενή και πιθανόν παθολογικά ερεθίσματα. Η ET-1 δρα με την απελευθέρωση της τοπικά παρά με τη συστηματική κυκλοφορία εμφανίζοντας έτσι παρακρινή δράση και οι συγκεντρώσεις της είναι συγκριτικά χαμηλές στο πλάσμα και στους λοιπούς ιστούς.^{1,4,28,146}

Δύο υποδοχείς ενδοθηλίνης έχουν ανιχνευτεί. Ο ET_A και ο ET_B. Ο ET_A ανευρίσκεται κυρίως στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων και στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με την ET-1 και η ενεργοποίησή του οδηγεί στην ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C και στην αύξηση του ενδοκυττάρου Ca⁺² που προκαλεί αγγειοσύσπασση. Η διέγερσή του προκαλεί αγγειοσύσπασση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο ET_B ανευρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα κυρίως του νεφρικού ιστού και σε ιστούς μη αγγειοβριθείς. Δρα επίσης αγγειοσυσπαστικά. Η σύνδεση της ET-3 μπορεί να προκαλέσει παροδική αγγειοδιαστολή μέσω της αύξησης του NO και της ενεργοποίησης διαύλων K⁺. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη της νευρικής ακολουθίας και μπορεί να επάγει την παραγωγή αστροκυττάρων.^{1,4,28,146}

Η ET-1 χρησιμοποιείται συνήθως σε μελέτες μεταβολής της αγγειακής διαμέτρου. Η χρήση της ET-1 σε μελέτες διαπερατότητας μεμβρανών απαντάται σε διάφορους ιστούς χωρίς να είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Απαντάται κυρίως σε μελέτες διαπερατότητας του εντερικού επιθηλίου,¹⁴⁷⁻¹⁵² του βρογχικού ή τραχειακού επιθηλίου,¹⁵³⁻¹⁵⁵ του επιθηλίου της χοληδόχου κύστης,¹⁵⁶ του περιτοναίου⁴¹ και των εμβρυϊκών υμένων.⁵¹ Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών υποδεικνύουν πως η ET-1 μεταβάλλει την ιοντική διαπερατότητα των επιθηλίων αυτών και φαίνεται να συσχετίζεται με την επαγωγή της έκκρισης Cl⁻ στο εντερικό και αναπνευστικό επιθήλιο, των επιθηλιακών διαύλων Na⁺ στο περιτόναιο ή με την αναστολή της cAMP εξαρτώμενης έκκρισης ανιόντων στο επιθήλιο της χοληδόχου κύστεως.

BQ123

Το BQ123 αποτελεί συνθετικό παράγωγο και προέρχεται από το κυκλικό πενταπεπτίδιο BE-18257B που λαμβάνεται από καλλιέργειες του *Streptomyces misakiensis*.¹⁵⁷⁻¹⁶² Είναι εκλεκτικός, ισχυρός, συναγωνιστικός αναστολέας της ενδοθηλίνης για τον τύπου A (ET_A) υποδοχέα της. Προσδένεται στους υποδοχείς, χωρίς να ηυροδοτεί μέσω αυτών τις συνήθεις ενδοκυττάριας δράσεις, εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους από την ενδοθηλίνη. Δεν διαθέτει κλινική χρήση εάν και αρχικά χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες αντιμετώπισης της υπέρτασης ή του αγγειόσπασμου σε υπαραχνοειδή αιμορραγία. Το BQ123 χρησιμοποιείται

συχνά σε μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση της δράσης της ενδοθηλίνης σε διάφορους ιστούς ή κυτταρικές σειρές, προκειμένου να αναδείξει το ρόλο των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου A (ET_A) στο φαινόμενο που μελετάται.¹⁵⁷⁻¹⁶²

BQ788

Το BQ788 είναι ένα συνθετικό τριπεπτίδιο με δράση εκλεκτικού, ισχυρού, συναγωνιστικού αναστολέα της ενδοθηλίνης για τον τύπου B (ET_B) υποδοχέα της.^{153,163-165} Προσδένεται στους υποδοχείς χωρίς να εμφανίζει ιδιότητες αγωνιστή και χωρίς να πυροδοτεί μέσω αυτών τις συνήθεις ενδοκυττάρια δράσεις, εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους από την ενδοθηλίνη. Δεν διαθέτει κλινική χρήση. Η εκλεκτική δράση του BQ788 χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση της δράσης της ενδοθηλίνης σε διάφορους ιστούς ή κυτταρικές σειρές, προκειμένου να αναδείξει το ρόλο των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B) στο φαινόμενο που μελετάται.^{153,163-165}

Σαραφοτοξίνη S6c

Οι σαραφοτοξίνες αποτελούν μια ομάδα καρδιοτοξικών πεπτιδίων που απαντώνται στο δηλητήριο φιδιών και προκαλούν αγγειοσυστολή των στεφανιαίων. Εμφανίζουν ισχυρή ικανότητα σύνδεσης σε ιστούς όπως οι κόλποι της καρδιάς και ο εγκέφαλος των αρουραίων. Κύρια δράση τους αποτελεί η ενεργοποίηση της υδρόλυσης των φωσφοϊνοσιτιδίων.^{29,157,166-174}

Η σαραφοτοξίνη S6c συγκεκριμένα αποτελεί έναν ισχυρό, εκλεκτικό αγωνιστή των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B). Συλλέγεται από το δηλητήριο του φιδιού *Atractaspis engaddensis* και εμφανίζει ισχυρή σύνδεση σε τμήματα του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος και η παρεγκεφαλίδα που διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις υποδοχέων ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B). Η εκλεκτική δράση της σαραφοτοξίνης S6c χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση της δράσης των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B) στο φαινόμενο που μελετάται.^{29,157,166-174}

Στην παρούσα μελέτη η σαραφοτοξίνη S6c χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικός αγωνιστής για τη διερεύνηση της δράσης των υποδοχέων ET_B στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων. Επίσης η διέγερση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B) έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των επιπέδων του NO στα εγκεφαλικά τριχοειδή.²⁴ Μελέτες αναφέρουν πώς το NO προκαλεί αγγειοδιαστολή και εμφανίζει αντίθετη η δράση από ET-1 ενώ υπάρχει ρυθμιστική οδός μεταξύ τους που εξασφαλίζει ομοιόσταση στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Το NO και η προστακυκλίνη αναστέλλουν την παραγωγή της ET-1 μέσω κοινού μηχανισμού που συμπεριλαμβάνει την γένεση κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης και συνεπώς αλληλεπιδρά με την ET-1 ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο στους ανθρώπους.²²⁻³⁰ Βάση των παραπάνω δεδομένων, η σαραφοτοξίνη S6c χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα με την υπόθεση ότι θα μπορούσε να δράσει ως εν δυνάμει επαγωγέας του NO στον λεπτομηνιγγικό ιστό ώστε να μελετήσουμε την δράση του.

Οουαμπαΐνη

Η ουαμπαΐνη αποτελεί μία καρδιοτονωτική γλυκοσίδη που συνδέεται ισχυρά με την αντλία Νατρίου-Καλίου στις κυτταρικές μεμβράνες αναστέλλοντας τη δράση της. Παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί κλινικά όμως σύντομα αντικαταστάθηκε από την διγοξίνη.¹⁷⁵ Σύγχρονες μελέτες αναγνωρίζουν πλέον πως η ουαμπαΐνη αποτελεί ενδογενή ορμόνη του ανθρώπινου οργανισμού που παράγεται στα επινεφρίδια.^{109,176,177} Η ουαμπαΐνη φαίνεται επίσης να διαδραματίζει ρόλο στην διακυτταρική μεταφορά ιόντων σε διάφορα επιθήλια όπως στο αναπνευστικό και ουροποιητικό επιθήλιο καθώς επίσης και σε μεσοθηλιακούς ιστούς όπως ο υπεζωκότας και το περιτόναιο.^{36,47,178,179} Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η ουαμπαΐνη αναστέλλει την παραγωγή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού έως και 70% όταν επιδρά στην κορυφαία επιφάνεια του χοριοειδούς πλέγματος. Η δράση αυτή συσχετίζεται με την αναστολή της αντλίας Νατρίου-Καλίου που βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια.^{87,109}

Στην παρούσα μελέτη η ουαμπαΐνη χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η επίδρασή της στη διαπερατότητα του λεπτομηνιγγικού ιστού και να αποσαφηνιστεί ο ηλεκτροφυσιολογικός ρόλος της αντλίας Νατρίου-Καλίου στην αραχνοειδή και χοριοειδή μήνιγγα.

Αμιλορίδη

Η αμιλορίδη είναι ένα ευρέως διαδεδομένο κάλιο-συντηρητικό διουρητικό και ανήκει στην οικογένεια των πυραζινοκαρβοξυμιδίων. Δρα

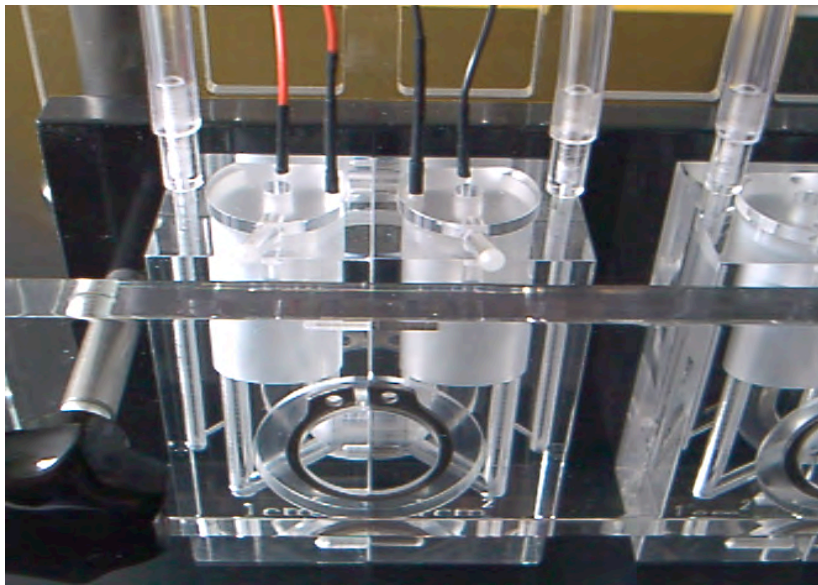
κυρίως ως αναστολέας των επιθηλιακών διαύλων Νατρίου (ENaC) και του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η διακυτταρική μεταφορά νατρίου σε επιθήλια που φέρουν διαύλους ευαίσθητους στην αμιλορίδη.¹⁸⁰⁻¹⁸³ Ευαίσθητοι στην αμιλορίδη διαύλοι Νατρίου έχουν ανευρεθεί στον υπεζωκότα προβάτου, ανθρώπου και επίμυος, στο περιτόναιο του προβάτου καθώς και στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II.^{36,38,44,46,181-184} Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας των επιθηλιακών διαύλων νατρίου στις λεπτομήνιγγες προβάτου και του πιθανού ρόλου τους στην ιοντική τους διαπερατότητα.

Πειραματική διαδικασία με τη διάταξη Ussing

Ο λεπτομηνιγγικός ιστός τοποθετήθηκε ως επίπεδο στρώμα μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) οι οποίοι περιείχαν υγρό διάλυμα Krebs-Ringer (**Εικ.** 7.). Κατά την τοποθέτηση του ιστού ελήφθη μέριμνα για την ελάχιστη καταπόνηση του ιστού κατά τη διαδικασία. Κάθε ημιθάλαμος περιείχε 4 ml υγρού διαλύματος Krebs (ή διαλύματος Krebs χωρίς ασβέστιο σε συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων) εξασφαλίζοντας την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, ενώ συνεχώς διοχετευόταν στο κάθε ημιθάλαμο αέριο σύστασης 95% O_2 - 5% CO_2 . Η σύνθεση του διαλύματος Krebs-Ringer's-Bicarbonate ήταν: 117,5

mmol/L NaCl, 1,15 mmol/L NaH₂PO₄, 24,99 mmol/L NaHCO₃, 5,65 mmol/L KCl, 1,18 mmol/L MgSO₄, 2,52 mmol/L CaCl₂, και 5,55 mmol/L γλυκόζη. Η σύνθεση του διαλύματος Krebs χωρίς ασβέστιο (Ca⁺² free Krebs) για την ομάδα των πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 117,5 mmol/L NaCl, 5,65 mmol/L KCl, 1,18 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 1,15 mmol/L NaH₂PO₄·H₂O, 24,99 mmol/L NaHCO₃, 5,55 mmol/L γλυκόζη και 0,42 mmol/L EGTA χρησιμοποιώντας τα δεδομένα μελέτων σε Ussing ή άλλες εφαρμογές του διαλύματος αυτού.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Η επιφάνεια του εκτεθειμένου στο υγρό ιστού, ήταν 1 cm². Λόγω του ότι η ενεργητική μεταφορά ιόντων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, οι μετρήσεις της διαμεμβρανικής αντίστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C.

Η διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}; Transmembrane resistance) δια μέσου των λεπτομηνίγγων εκφραζόμενη σε Ω·cm², μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl το καθένα εκ των οποίων ήταν τοποθετημένο σε απόσταση 3 mm εκατέρωθεν της μεμβράνης, σε συνθήκες **ανοικτού κυκλώματος**. Σε συνθήκες **ανοικτού κυκλώματος** διοχετεύεται ένας παλμός ρεύματος έντασης 50 μΑ και διάρκειας 200 ms κατά μήκος των ηλεκτροδίων με αποτέλεσμα η διάταξη να υπολογίζει αυτόματα τη διαφορά δυναμικού κατά μήκος του λεπτομηνιγγικού ιστού χρησιμοποιώντας τον νόμο του Ohm. Η αντίσταση του διαλύματος Krebs-Ringer's-Bicarbonate είχε μετρηθεί κατά την περίοδο της βαθμονόμησης του οργάνου και είχε αυτόματα αφαιρεθεί από το λογισμικό συλλογής και καταγραφής δεδομένων. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, γινόταν νέα μέτρηση της R_{TM} κάθε ένα λεπτό.



Εικ. 7. Αντλία τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Πραγματοποιούνταν παράλληλα 6 πειράματα κάθε φορά σε αντίστοιχους θαλάμους και η καταγραφή γινόταν μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (**Εικ. 8.**). Μετά την τοποθέτηση του ιστού ακολουθούσε στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, μια περίοδος ηρεμίας plateau του ιστού διάρκειας 10-30 λεπτών για την καταγραφή της διαμεμβρανικής αντίστασης μάρτυρα.³³



Εικ. 8. Καταγραφή μέσω λογισμικού (Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Το πειραματικό διάλυμα που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια της αραχνοειδούς μήνιγγας που *in vivo* βρίσκεται σε επαφή με τη σκληρά μήνιγγα στο εξής θα αναφέρεται ως *αραχνοειδές διάλυμα*. Το διάλυμα που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια της χοριοειδούς μήνιγγας που *in vivo* βρισκόταν σε επαφή με το εγκεφαλικό παρέγχυμα και τον υποχοριοειδή χώρο (subriaal space), θα αναφέρεται ως *χοριοειδές διάλυμα*. Αντίστοιχα οι επιφάνειες του λεπτομηνιγγικού ιστού που έρχονται σε επαφή με το διάλυμα των ημιθαλάμων στη διάταξη Ussing ορίζονται ως *αραχνοειδής* και *χοριοειδής*.

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν αμέσως πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, θερμαινότουσαν στους 37 °C και ακολουθούσε συνεχής οξυγόνωση με μείγμα αερίων 95% O₂-5% CO₂.

Διεξήχθησαν 94 πειράματα αναφοράς στον λεπτομηνιγγικό ιστό, μόνο με διάλυμα Krebs-Ringer's-Bicarbonate εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν 10-30 λεπτά μετά την τοποθέτηση της κάθε μεμβράνης αφότου είχε επιτευχθεί plateau στην τιμή της διαμεμβρανικής αντίστασης και είχαν διάρκεια 30 λεπτών.

Στην πρώτη ομάδα πειραμάτων, προστέθηκε ενδοθηλίνη-1 (10^{-9}M) στην αραχνοειδή επιφάνεια των λεπτομηνιγγων προβάτου ($n=6$) καθώς και στη χοριοειδή επιφάνεια ($n=6$) σε διαφορετικά ιστικά τεμάχια. Επίσης διενεργήθηκαν πειράματα με ET-1 10^{-8}M στην αραχνοειδή ($n=6$) και στη χοριοειδή επιφάνεια ($n=6$).

Σε κάποια πειράματα προστέθηκε ET-1 (10^{-8}M) και ο ειδικός αναστολέας των υποδοχέων A της ενδοθηλίνης, ο BQ123 σε συγκέντρωση 10^{-6}M στην αραχνοειδή ($n=6$) και στην χοριοειδή επιφάνεια ($n=7$). Ο ειδικός αναστολέας των υποδοχέων B της ενδοθηλίνης, ο BQ788, χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10^{-6}M μαζί με ET-1 (10^{-8}M) στην αραχνοειδή ($n=5$) και στην χοριοειδή επιφάνεια ($n=6$). Ο ειδικός αγωνιστής των υποδοχέων τύπου B της ενδοθηλίνης, Σαραφοτοξίνη S6c χρησιμοποιήθηκε στην αραχνοειδή ($n=3$) και στη χοριοειδή επιφάνεια ($n=3$).

Η δράση της ET-1 (10^{-8}M) σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο μελετήθηκε στην αραχνοειδή ($n=7$) και στην χοριοειδή επιφάνεια ($n=6$). Στην τελευταία σειρά πειραμάτων διενεργήθηκαν πειράματα με ουαμπαΐνη σε Krebs, σε συγκέντρωση 10^{-3}M στην αραχνοειδή ($n=7$) και στη χοριοειδή

επιφάνεια (n=6) και με αμιλορίδη 10^{-5} M στην αραχνοειδή (n=6) και στην χοριοειδή επιφάνεια (n=7).

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GraphPad 5.0 για Microsoft Windows. Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων εκφράστηκαν σαν μέσοι όροι του ποσοστού μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από την αντίσταση του μάρτυρα \pm τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) (Standard Error of the Mean), του δηλωμένου αριθμού διαφορετικών πειραμάτων σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μέσων όρων 2 πειραματικών ομάδων έγινε με paired t-test. Σε περίπτωση που οι συγκρινόμενες πειραματικές ομάδες ήταν περισσότερες από 2, τότε χρησιμοποιήθηκαν ANOVA tests όταν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή ή Friedman's test για μη κανονικές κατανομές. Τιμές που ανταποκρίθηκαν σε $p < 0,05$ έγιναν αποδεκτές ως στατιστικά σημαντικές. Το στατιστικό πακέτο GraphPrism 5.0 χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των διαγραμμάτων.

Προσδιορισμός μεταβολιτών του NO στο διάλυμα των ημιθαλάμων του Ussing (μέθοδος Griess)

Μετρήθηκε η συγκέντρωση του νιτρώδους (NO^{-2}) και του νιτρικού (NO^{-3}) σε σύνολο ως μεταβολίτες του NO στο διάλυμα των ημιθαλάμων του Ussing όταν επιδρούσε Σαραφοτοξίνη S6c συγκέντρωση 10^{-7} M στην αραχνοειδή ή στην χοριοειδή επιφάνεια.

Η μεθοδολογία της μέτρησης βασίστηκε στην αντίδραση Griess. Η αντίδραση Griess αποτελεί μια ασφαλή μέθοδο για τον προσδιορισμό των νιτρωδών και νιτρικών σε διαλύματα και συνεπώς έμμεσα του NO.^{188,189}

Η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα που λάβαμε από τους ημιθαλάμους Ussing, αφότου τα νιτρικά είχαν μετατραπεί ενζυματικά σε νιτρώδη. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα που λήφθηκαν επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37 °C με nitrate reductase (10 mU) και nicotinamide adenine dinucleotide phosphohydrogenase (100 μM). Το αντιδραστήριο Griess (100 μL; 5% v/v H₃PO₄ with 1% w/v sulphanic acid and 0,1% w/v N-1-naphthylethylenediamine) προστέθηκε σε δείγματα όγκου 80 μL και τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 37 °C. Η προσθήκη του αντιδραστήριου μετέτρεψε τα νιτρικά σε ένα βαθύ πορφυρό αζίδιο του οποίου η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540 nm με ένα σπεκτροφωτόμετρο (Biotek-Instruments INC, Highland Park, NY, USA).

Η συγκέντρωση του συνόλου των νιτρωδών και νιτρικών (NO) σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη σύγκριση της απορρόφησης του δείγματος με μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που βασίστηκε σε γνωστές συγκεντρώσεις NaNO₂. Το χαμηλότερο όριο εντόπισης της μεθόδου ήταν τα 0,2 μM. Κάθε δείγμα αναλύθηκε είς τριπλούν.

Είκοσι-τέσσερα δείγματα (n=24) λήφθηκαν συνολικά από τους ημιθαλάμους Ussing στους οποίους είχε τοποθετηθεί λεπτομηνιγγικός ιστός σε διάλυμα Krebs πριν και μετά από την επίδραση Σαραφοτοξίνης S6c. Σε κάθε πείραμα (σύνολο πειραμάτων 6) λαμβανόταν τα εξής δείγματα προς ανάλυση NO (4 δείγματα ανά πείραμα): 1 δείγμα από τον ημιθάλαμο Krebs

που εμβάπτιζε την αραχνοειδή επιφάνεια τη χρονική στιγμή μηδέν (που οριζόταν ως η στιγμή μέτρησης της διαμεμβρανικής αντίστασης του μάρτυρα), 1 δείγμα από το διάλυμα Krebs που εμβάπτιζε την χοριοειδή επιφάνεια στην οριζόμενη χρονική στιγμή μηδέν, 1 δείγμα από το Krebs της αραχνοειδούς επιφάνειας το 3^ο λεπτό μετά την επίδραση της Sarafotoxin S6c και 1 δείγμα την ίδια χρονική στιγμή από το διάλυμα Krebs της χοριοειδούς επιφάνειας. Σε τρία πειράματα η επίδραση της Σαραφοτοξίνης S6c $10^{-7}M$ γινόταν στην αραχνοειδή επιφάνεια και σε 3 πειράματα στην χοριοειδή.

Ανοσοϊστοχημική μέθοδος για ET-1, ET_A, ET_B, A1ATP1, ENaC

Στα πλαίσια της μελέτης διενεργήθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός σε τομές λεπτομηνιγγικού ιστού σε παραφίνη της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), των υποδοχέων της ET_A, ET_B, της α_1 υπομονάδας της αντλίας Νατρίου-Καλίου (A1ATP1) και των β - και δ - υπομονάδων του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC).

Λεπτομηνιγγικά δείγματα προβάτου λήφθησαν από την βρεγματική περιοχή των εγκεφαλικών ημισφαιρίων από τρία ενήλικα πρόβατα. Για να μπορεί εύκολα να αναγνωρισθεί ο προσανατολισμός της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς μήνιγγας στο χώρο κατά την μικροσκόπηση, μερικά δείγματα ιστού εμπεριείχαν προσκολλημένα τμήματα εγκεφαλικής ουσίας. Έτσι, ως χοριοειδής μήνιγγα αναγνωριζόταν το στρώμα της μήνιγγας που βρισκόταν σε γειτνίαση με το εγκεφαλικό παρέγχυμα. Τα δείγματα των

ιστών που περιείχαν τμήματα εγκεφαλικής ουσίας δεν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα Ussing διότι αυτό μπορούσε να μεταβάλλει το ηλεκτροφυσιολογικό τους profile. Τα δείγματα απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4%. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φορμαλίνης 10% για την μονιμοποίησή τους και διενεργήθηκε η συνήθης επεξεργασία για την εμφάνισή τους σε παραφίνη. Τομές 3 μm διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροτόμο Leica TP1020 και αφέθηκαν να στεγνώσουν μία ημέρα στους 60°C. Μετά από την απο- παραφινολοποίηση σε xylene, διενεργήθηκε επανυδάτωση των τομών σε διαλύματα αιθανόλης με διαρκώς μειούμενη περιεκτικότητα.

Η ανάκτηση του αντιγόνου επιτεύχθηκε με τη χρήση μικροκυμάτων στις ιστικές τομές σε διάλυμα 0,01 M buffer κιτρικού οξέως (pH 6) για 20 λεπτά (LG WAVEDOM, 850 Watt). Μετά την ανάκτηση του, οι ιστικές τομές αφέθηκαν να κρυσώσουν και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα phosphate-buffered-saline (PBS) για το ξέπλυμά τους εις τριπλούν. Υπεροξειδίο του υδρογόνου 3% για 10 λεπτά χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Δεκατέσσερις (14) διαφορετικές τομές χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική επεξεργασία που περιγράφεται με λεπτομέρεια παρακάτω, με τα κατ'επιλογήν αντισώματα έναντι των αντιγόνων της ET-1, των υποδοχέων ET_A και ET_B, της α₁ υπομονάδας της αντλίας Νατρίου-Καλίου (A1ATP1) και των β - και δ - υπομονάδων του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC).

Τα δείγματα του λεπτομηνιγγικού ιστού επωάστηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το συγκεκριμένο προς μελέτη αντίσωμα για την

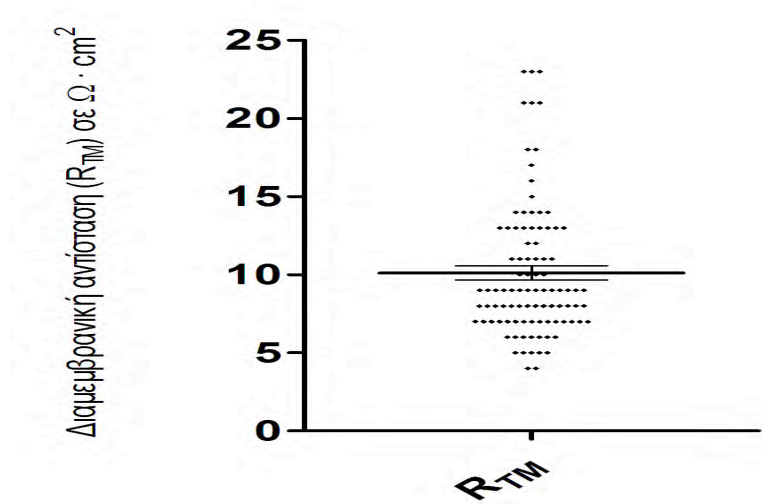
κάθε περίπτωση (ET-1 mouse monoclonal, IgG1 isotype SIGMA, sigma-aldrich, USA, διάλυση 1:200, επώαση 1h; Anti-Endothelin A Receptor and Anti-Endothelin B Receptor goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, διάλυση 1:50, επώαση 1h; Alpha 1 Sodium Potassium ATPase monoclonal, clone M8-P1-A3, isotype IgG1, abcam, UK, διάλυση 1:1000; beta-ENaC rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, διάλυση 1:200; delta-ENaC rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, διάλυση 1:200). Στη συνέχεια τα δείγματα πλύθηκαν με PBS και προστέθηκε διάλυμα EnVision (polymer-peroxidase method, EnVision+ /HRP, DAKO Carpinteria, CA, USA) με επώαση για 30 λεπτά. Για την εμφάνιση των συνδεδεμένων αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DAKO Carpinteria, CA, USA). Τελικά στις τομές διενεργήθηκε και χρώση με αιματοξυλίνη και μονιμοποιήθηκαν σε DPX (BDH, UK). Έλεγχος ειδικότητας των αντισωμάτων διενεργήθηκε με την αντικατάσταση των κύριων αντισωμάτων με μη-άνοσο ορό με αποτέλεσμα την εμφάνιση αρνητικών μαρτύρων για τη χρώση. Οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των κεχρωσμένων τομών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πειράματα με τη διάταξη Ussing

Πειράματα αναφοράς

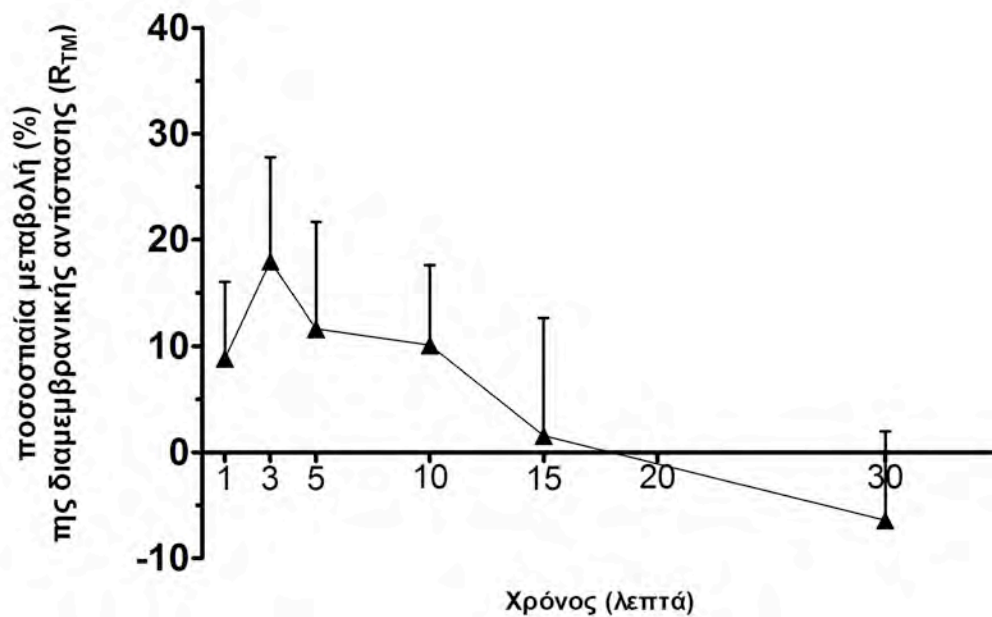
Διενεργήθηκαν πειράματα αναφοράς για την εύρεση της μέσης διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) σε 94 ιστούς μάρτυρες. Η μέση (\pm Τυπικό Σφάλμα) διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων ανέρχεται στα $10,12 \pm 0,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 9,26-11,27 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (**Διάγρ.** 1)



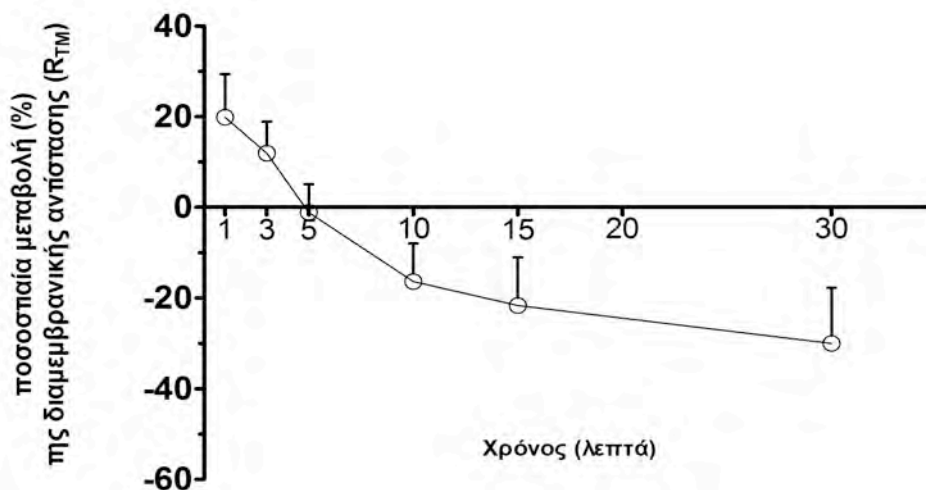
Διάγρ. 1. Διάγραμμα κατανομής των μετρηθέντων διαμεμβρανικών αντιστάσεων των λεπτομηνίγγικων ιστών μαρτύρων. Μέσος όρος $10,12 \pm 0,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή 9,217-11,02 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. $n=94$

Διενεργήθηκαν πειράματα με την προσθήκη ET-1 στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή επιφάνεια δείγματος λεπτομηνιγγικού ιστού σε διάταξη Ussing σε συγκεντρώσεις $10^{-9}M$ και $10^{-8}M$.

Συγκέντρωση $10^{-9}M$. Η προσθήκη ET-1 $10^{-9}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια εμφάνισε αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης από το 1° - 10° λεπτό, στο 15° λεπτό δεν παρατηρήθηκε μεταβολή από την τιμή μάρτυρα ενώ στο 30° λεπτό παρατηρήθηκε μικρή μείωση. Καμία μεταβολή δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική (**Διάγρ.** 2). Στη χοριοειδή επιφάνεια εμφανίζεται πρόσκαιρη αύξηση από το 1° - 3° λεπτό, καμία μεταβολή στο 5° ενώ στο 10° - 30° λεπτό παρατηρείται μείωση της διαμεμβρανικής αντίστασης. Επίσης καμία μεταβολή δεν εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα από την τιμή του αντίστοιχου μάρτυρα (**Διάγρ.** 3).

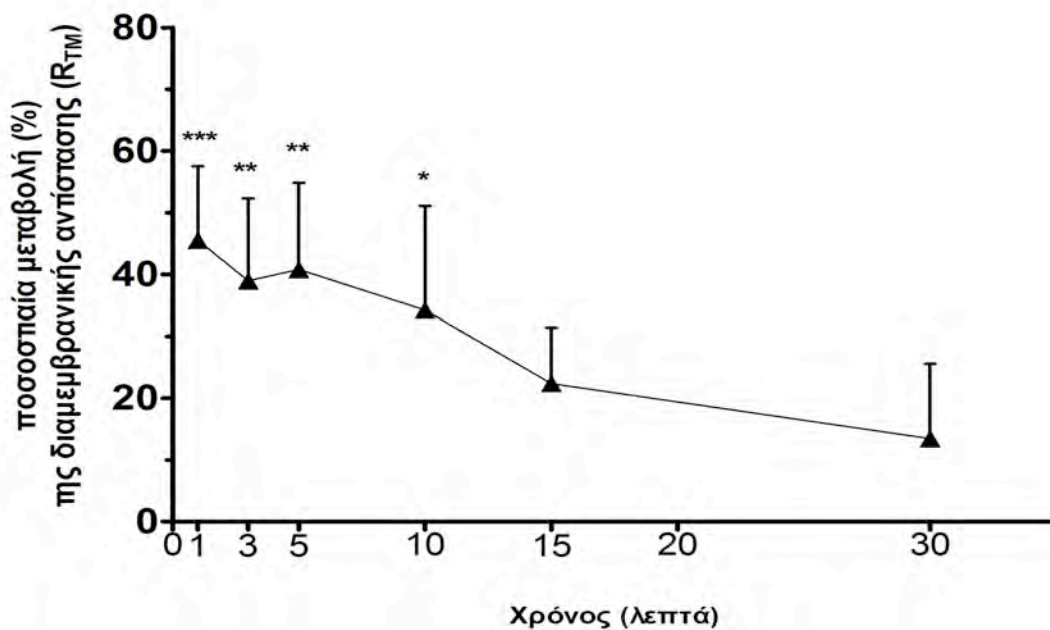


Διάγρ. 2. Επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) σε συγκέντρωση $10^{-9}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. Πειράματα ET-1 $n=6$. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε.

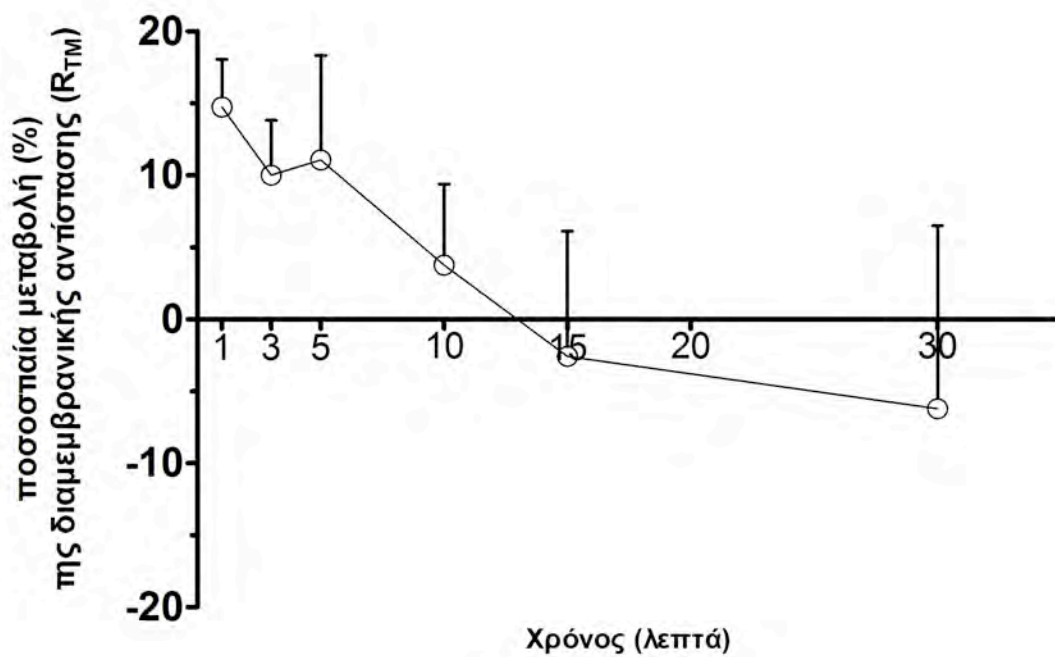


Διάγρ. 3. Επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) σε συγκέντρωση $10^{-9}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. Πειράματα ET-1 $n=6$. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε.

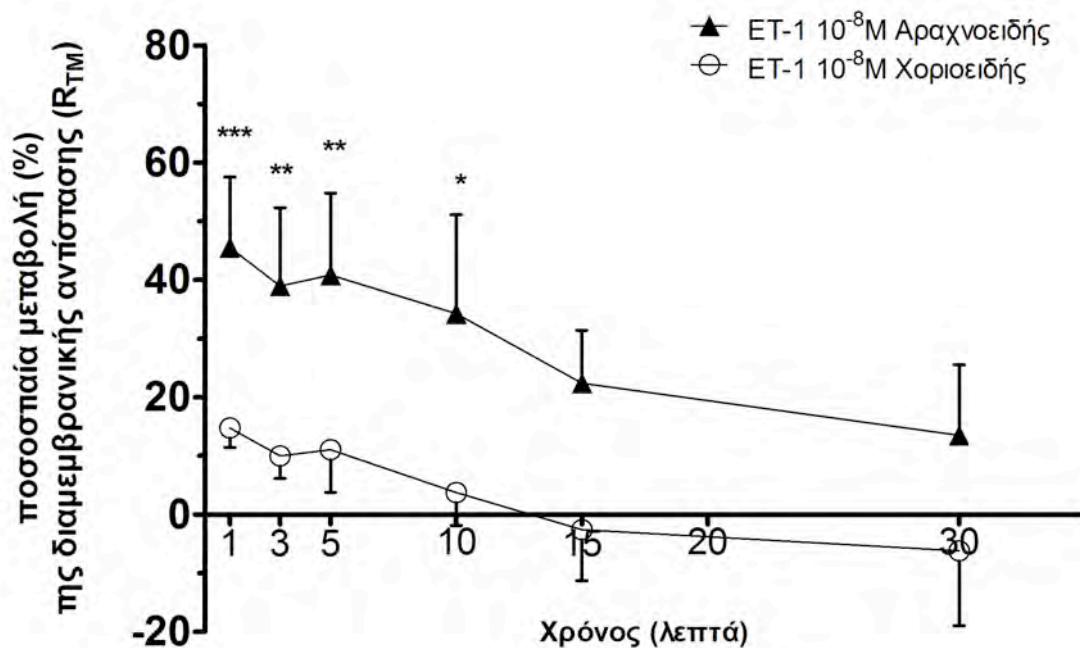
Συγκέντρωση $10^{-8}M$. Η επίδραση ET-1 $10^{-8}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια εμφάνισε αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό (45,53%) ενώ στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) εμφανίζεται για το 1^ο-10^ο λεπτό (**Διάγρ.** 4). Η επίδραση ET-1 $10^{-8}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια αυξάνει τη διαμεμβρανική αντίσταση από το 1^ο-10^ο λεπτό ενώ την μειώνει ελάχιστα από το 15^ο-30^ο λεπτό. Οι παραπάνω επιδράσεις δεν εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα (**Διάγρ.** 5). Συγκεντρωτικά η επίδραση της ET-1 στην αραχνοειδή και χοριοειδή επιφάνεια, η οποία είναι ισχυρότερη στην αραχνοειδή επιφάνεια, διαφαίνεται στο **Διάγραμμα 6**.



Διάγρ. 4. Επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) σε συγκέντρωση $10^{-8}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. Πειράματα ET-1 $n=6$. ***Στατιστικά σημαντική μεταβολή στο 1^ο λεπτό ($p < 0,001$), **Στατιστικά σημαντική μεταβολή στο 3^ο και 5^ο λεπτό ($0,01 > p > 0,001$), *Στατιστικά σημαντική μεταβολή στο 10^ο λεπτό ($p < 0,05$)



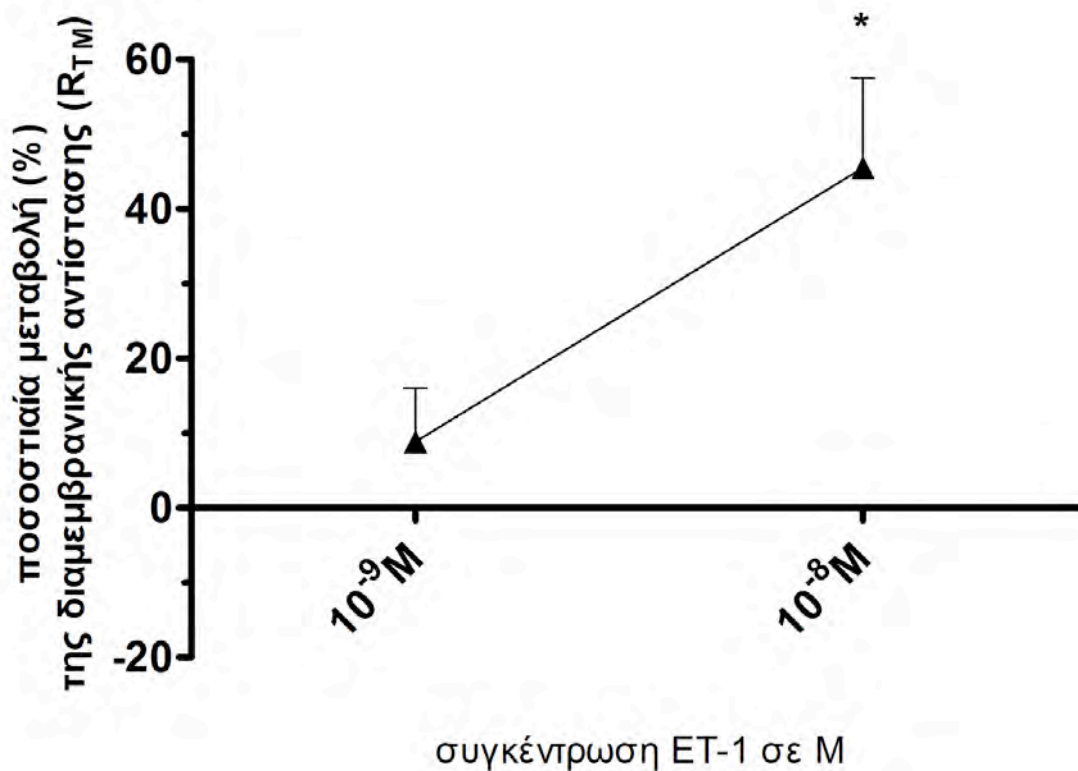
Διάγρ. 5. Επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) σε συγκέντρωση $10^{-8}M$ στην χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. Πειράματα ET-1 $n=6$. Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε.



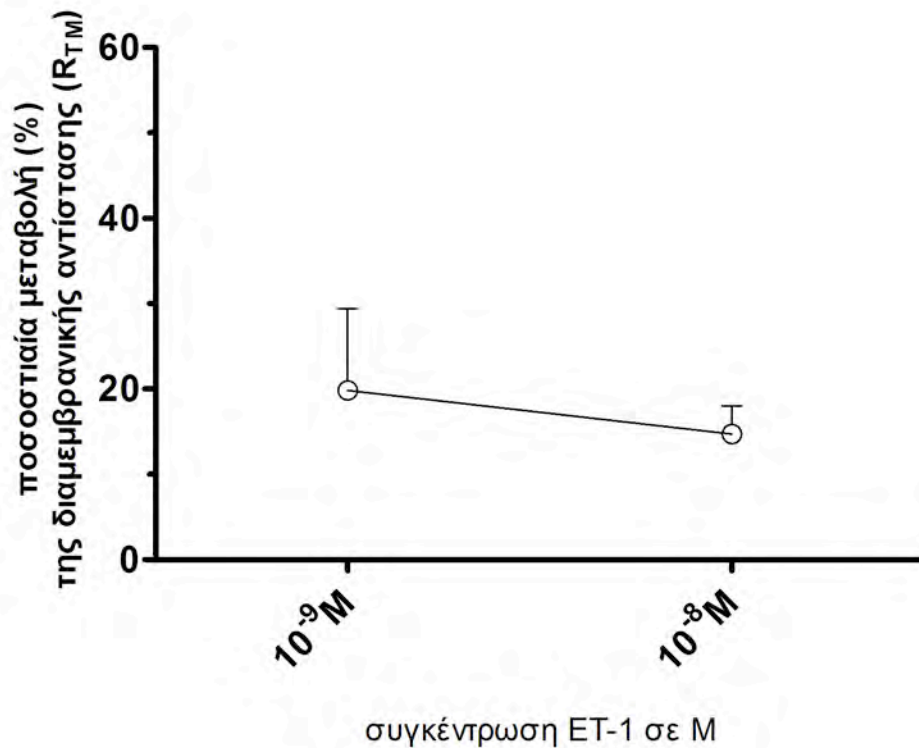
Διάγρ. 6. Επίδραση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) σε συγκέντρωση $10^{-8}M$ στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. ***Στατιστικά σημ. αντική μεταβολή στο 1^o λεπτό ($p < 0,001$), **Στατιστικά σημαντική μεταβολή στο 3^o και 5^o λεπτό ($0,01 > p > 0,001$), *Στατιστικά σημαντική μεταβολή στο 10^o λεπτό ($p < 0,05$) έναντι των μαρτύρων. Η δράση της ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια φαίνεται να είναι ισχυρότερη από τη δράση της στην χοριοειδή.

Καμπύλες δόσης-απάντησης. Με τη συλλογή των πειραματικών δεδομένων κατασκευάσαμε τις καμπύλες δόσης-απάντησης της ET-1 για τη δράση της στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή επιφάνεια στο πρώτο λεπτό. Η επιλογή του 1^{ou} λεπτού έγινε στα πλαίσια της ανάγκης αποσαφήνισης της άμεσης και ταχείας δράσης της ET-1 στον λεπτομηνιγγικό ιστό. Έτσι στο πρώτο λεπτό έχουμε στην αραχνοειδή μήνιγγα απάντηση (% μεταβολή της

αντίστασης του μάρτυρα) +8,87% για δόση ET-1 10^{-9} M και +45,53% για δόση 10^{-8} M (**Διάγρ.** 7). Για την χοριοειδή επιφάνεια, έχουμε απάντηση +19,83% για δόση ET-1 10^{-9} M και +14,73% για δόση 10^{-8} M, η οποία είναι διαρκώς μειούμενη (**Διάγρ.** 8).



Διάγρ. 7. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ET -1 στην αραχνοειδή επιφάνεια για συγκεντρώσεις 10^{-9} M, 10^{-8} M. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες \pm Τυπικό Σφάλμα. *Στο πρώτο λεπτό, για συγκέντρωση 10^{-8} M, η μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (+45,53%) είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

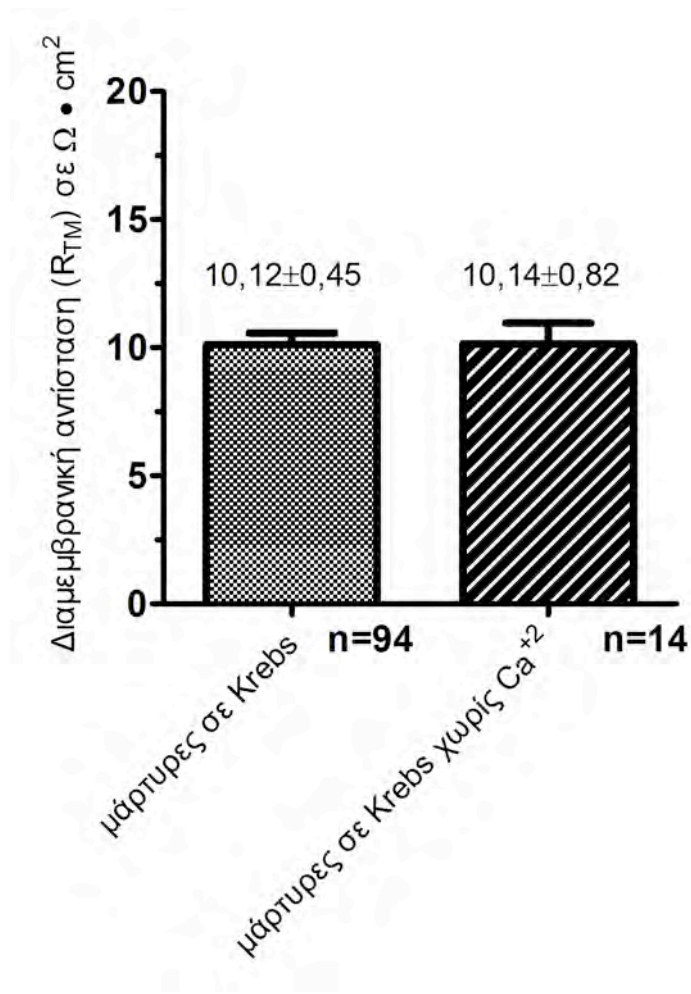


Διάγρ. 8. Καμπύλη δόσης-απάντησης της ET -1 στη χοριοειδή επιφάνεια για συγκεντρώσεις 10⁻⁹M, 10⁻⁸M. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες ± Τυπικό Σφάλμα.

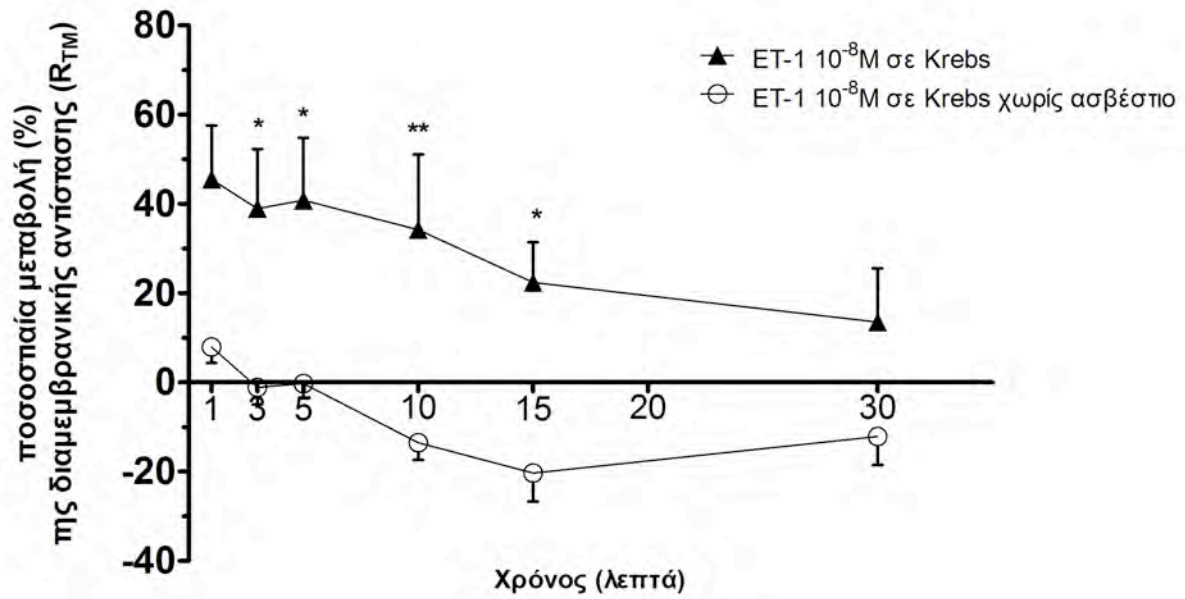
Προσθήκη ET-1 σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο

Οι τιμές των μαρτύρων δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαλυμάτων Krebs-Ringer's-Bicarbonate (n=94) και Krebs χωρίς ασβέστιο (n=14) (**Διάγρ.** 9). Διενεργήθηκαν 14 πειράματα με Krebs χωρίς ασβέστιο και προσθήκη ET-1 10⁻⁸M στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή επιφάνεια. Η επίδραση της ET-1 10⁻⁸M στην αραχνοειδή επιφάνεια εξαλείφθηκε όταν δεν υπήρχε ασβέστιο στο Krebs και αυτή η επίδραση

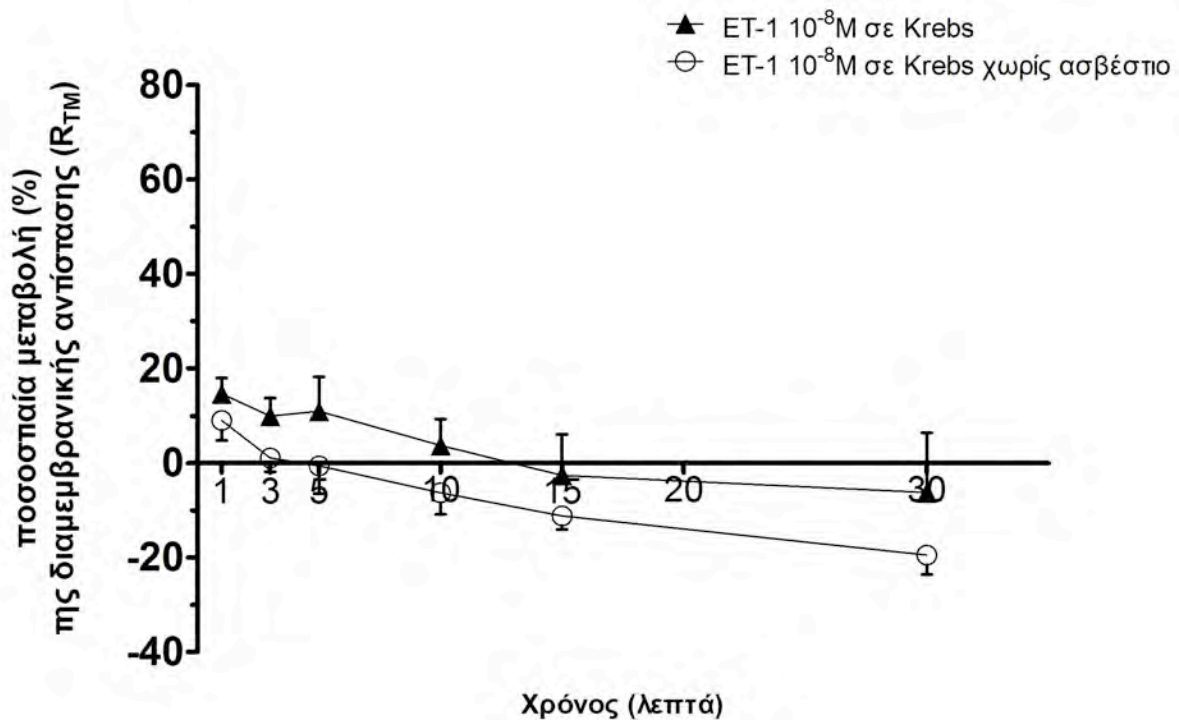
ήταν στατιστικά σημαντική από το 3^ο έως και το 15^ο λεπτό (**Διάγρ.** 10). Στην χοριοειδή επιφάνεια η επίδραση της ET-1 10⁻⁸M όταν δεν υπήρχε ασβέστιο εξαλειφόταν χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά (**Διάγρ.** 11).



Διαγρ. 9. Σύγκριση της διαμεμβρανικής αντίστασης των μαρτύρων σε διάλυμα με Krebs και σε διάλυμα με Krebs χωρίς ασβέστιο. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. **Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.**



Διάγρ. 10. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 στη διαμεμβρανική αντίσταση της αραχνοειδούς επιφάνειας σε διάλυμα με Krebs και σε διάλυμα με Krebs χωρίς ασβέστιο. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στο 3^ο έως και το 15^ο λεπτό μεταξύ των δύο υπό εξέταση ομάδων. Πειράματα ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια σε Krebs χωρίς ασβέστιο n=7, πειράματα ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια σε Krebs n=6.

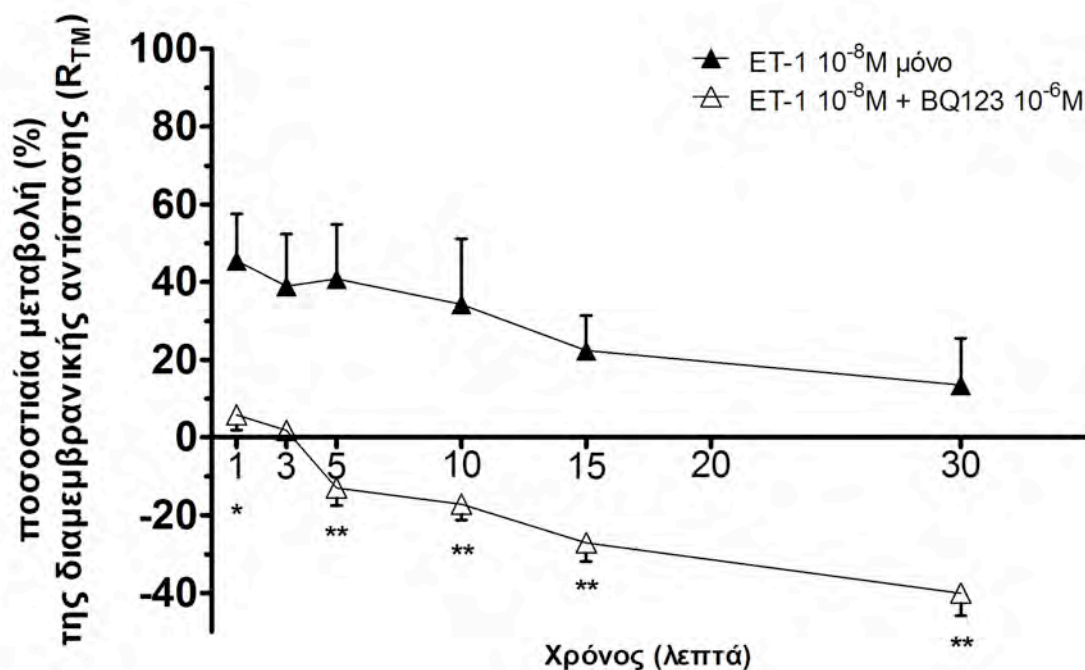


Διάγρ. 11. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 στη διαμεμβρανική αντίσταση της χοριοειδούς επιφάνειας σε διάλυμα με Krebs και σε διάλυμα με Krebs χωρίς ασβέστιο. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπό εξέταση ομάδων. Πειράματα ET-1 στη χοριοειδή επιφάνεια σε Krebs χωρίς ασβέστιο $n=6$, πειράματα ET-1 στη χοριοειδή επιφάνεια σε Krebs $n=6$.

Προσθήκη αναστολέων της ET-1 μαζί με ET-1 10⁻⁸M

Προσθήκη BQ123 10⁻⁶M μαζί με ET-1 10⁻⁸M. Με την προσθήκη του εκλεκτικού, μη συναγωνιστικού αναστολέα των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου A (BQ123) στην αραχνοειδή επιφάνεια παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της δράσης της ET-1 στο 1^ο, 5^ο-30^ο λεπτό. Η

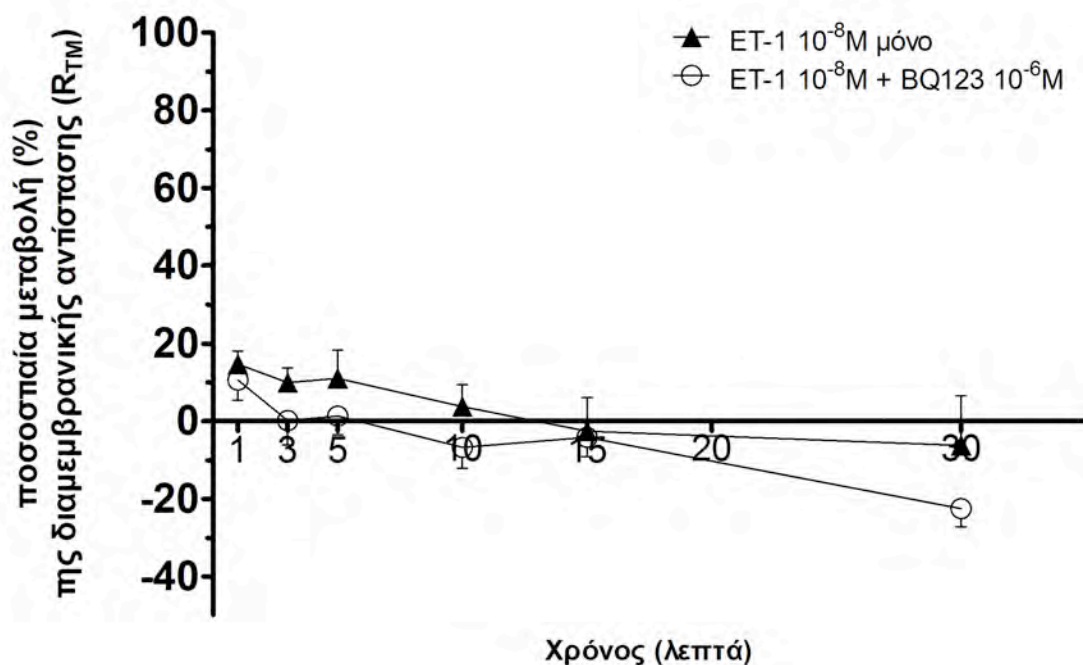
μείωση της δράσης της ET-1 κυμαίνεται από το ελάχιστο 37,1% έως το μέγιστο 53,79% που παρατηρείται το 5^ο λεπτό (**Διάγρ.** 12).



Διάγρ. 12. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 10⁻⁸M στη διαμεμβρανική αντίσταση της αραχνοειδούς επιφάνειας μετά από επίδραση με τον εκλεκτικό αναστολέα των υποδοχέων A της ET-1, τον BQ123 σε συγκέντρωση 10⁻⁶M. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) ± Τυπικό Σφάλμα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υπό εξέταση ομάδων στις χρονικές στιγμές 1^ο, 5^ο-30^ο λεπτό. Πειράματα ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια n=6, πειράματα ET-1 + BQ123 στην αραχνοειδή επιφάνεια n=6.

Με την προσθήκη του BQ123 στη χοριοειδή επιφάνεια παρατηρείται μείωση της δράσης της ET-1 στην χοριοειδή μήνιγγα η οποία όμως δεν είναι

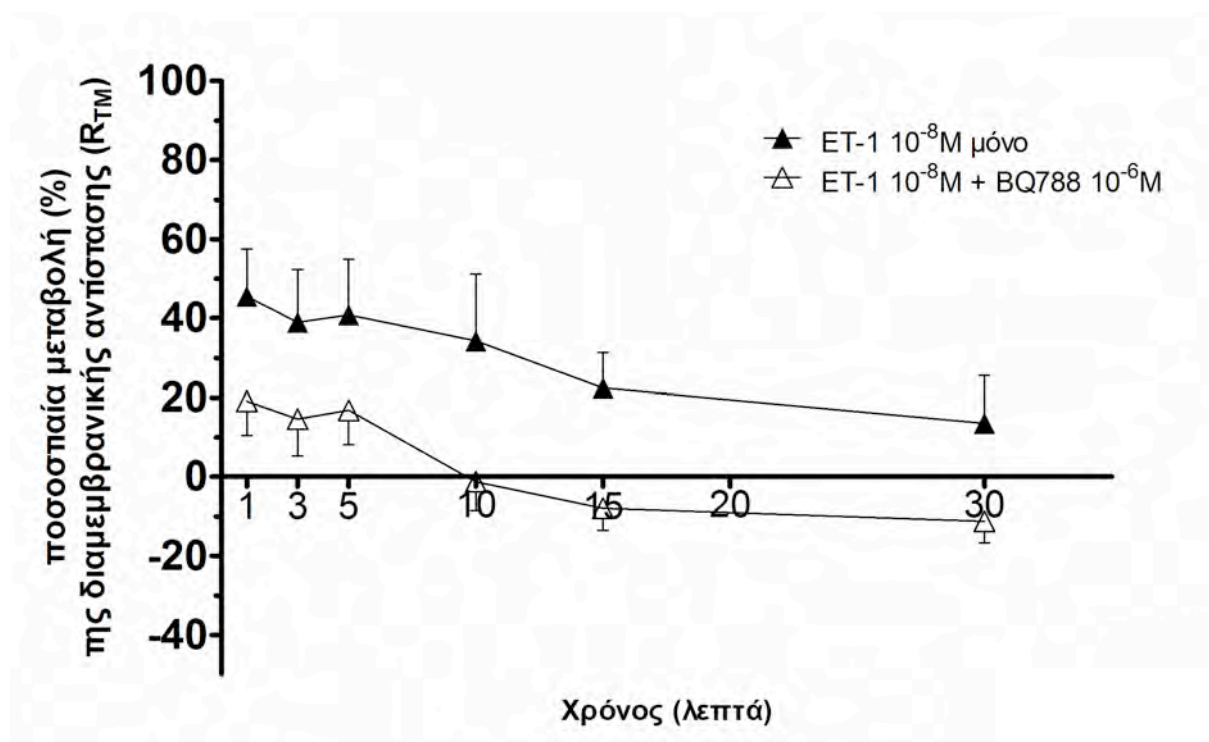
στατιστικά σημαντική. Η μείωση που παρατηρείται είναι μικρότερης ισχύος καθώς κυμαίνεται από 1,6-16,3% (**Διάγρ.** 13).



Διάγρ. 13. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 $10^{-8}M$ στη διαμεμβρανική αντίσταση της χοριοειδούς επιφάνειας μετά από επίδραση με τον εκλεκτικό αναστολέα των υποδοχέων A της ET-1, τον BQ123 σε συγκέντρωση $10^{-6}M$. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Πειράματα ET-1 στη χοριοειδή επιφάνεια n=6, πειράματα ET-1 + BQ123 στη χοριοειδή επιφάνεια n=7.

Προσθήκη BQ788 $10^{-6}M$ μαζί με ET-1 $10^{-8}M$. Με την προσθήκη του εκλεκτικού, μη συναγωνιστικού αναστολέα των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (BQ788) στην αραχνοειδή επιφάνεια παρατηρείται μείωση της δράσης της ET-1 $10^{-8}M$ καθόλη τη χρονική διάρκεια των πειραμάτων που κυμαίνεται από 24,4%-35,5%. Διενεργήθηκαν 6

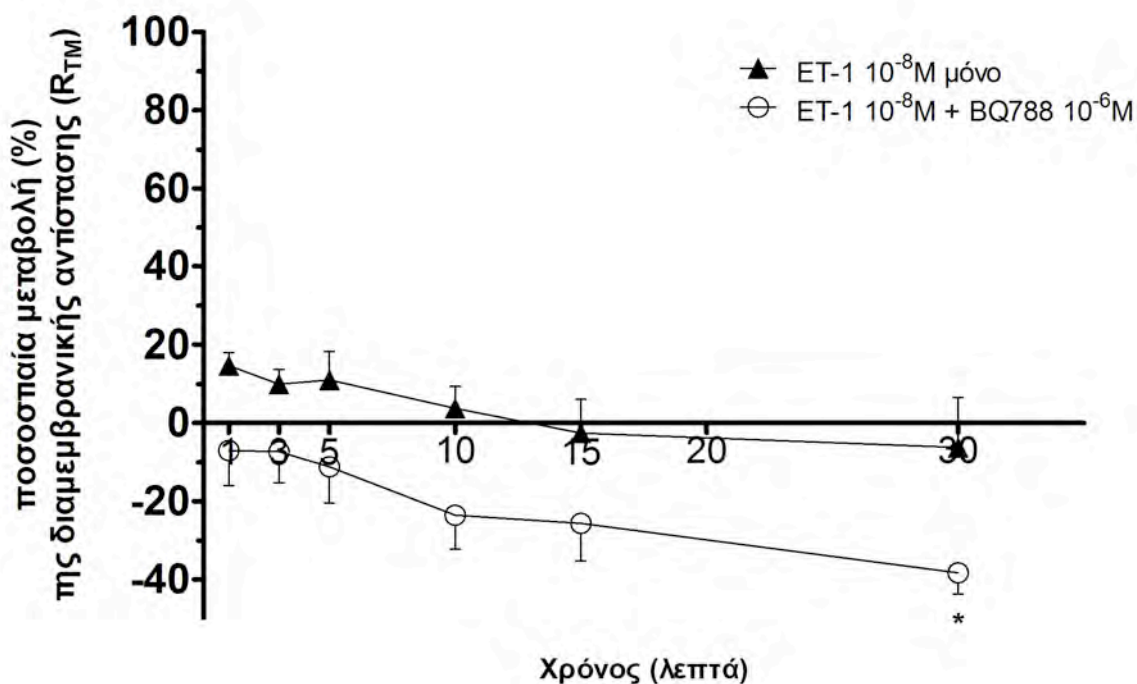
πειράματα με ταυτόχρονη επίδραση του BQ788 $10^{-6}M$ και ET-1 $10^{-8}M$ τα οποία συγκρίθηκαν στατιστικά με 6 πειράματα επίδρασης μόνο ET-1 $10^{-8}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια. Τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά στις επιμέρους χρονικές ομάδες (**Διάγρ.** 14).



Διάγρ. 14. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 $10^{-8}M$ στη διαμεμβρανική αντίσταση της αραχνοειδούς επιφάνειας μετά από επίδραση με τον εκλεκτικό αναστολέα των υποδοχέων B της ET-1, τον BQ788 σε συγκέντρωση $10^{-6}M$. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (two-way ANOVA test).

Με την προσθήκη του BQ788 $10^{-6}M$ με ET-1 $10^{-8}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια παρατηρήθηκε ξανά μείωση της επίδρασης της ET-1 σε σύγκριση με πειράματα όπου η ET-1 επιδρούσε μόνη της. Η μείωση παρατηρείται

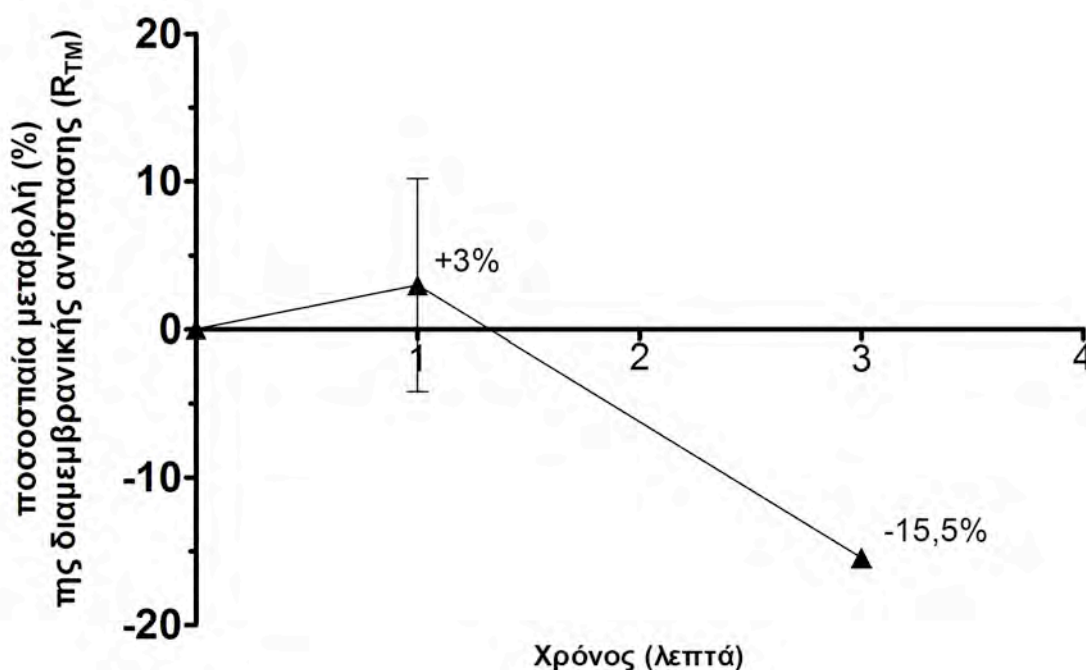
καθόλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος κυμαίνεται από 17,3% έως και 32,6% και είναι στατιστικά σημαντική μόνο για το 30^ο λεπτό μετά την επίδραση των ουσιών (**Διάγρ.** 15).



Διάγρ. 15. Σύγκριση της επίδρασης της ET-1 10⁻⁸M στη διαμεμβρανική αντίσταση της χοριοειδούς επιφάνειας μετά από επίδραση με τον εκλεκτικό αναστολέα των υποδοχέων B της ET-1, τον BQ788 σε συγκέντρωση 10⁻⁶M. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) ± Τυπικό Σφάλμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο για το 30^ο λεπτό.

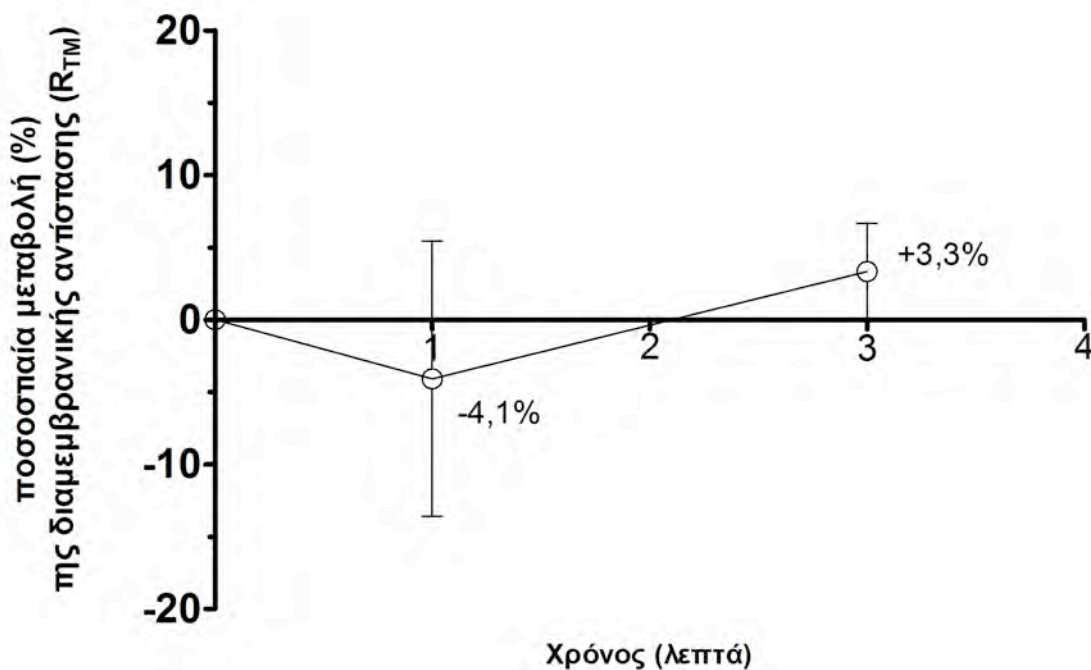
Επίδραση Σαραφοτοξίνης S6c στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων.

Επίδραση Σαραφοτοξίνης S6c $10^{-7}M$. Η χρήση του εκλεκτικού αγωνιστή των υποδοχέων τύπου B της ενδοθηλίνης (ET_B) στην αραχνοειδή επιφάνεια εμφάνισε μέση ποσοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης +3% στον πρώτο λεπτό και -15% στο 3^ο λεπτό. Καμία μεταβολή δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική έναντι των μαρτύρων (**Διάγρ.** 16).



Διάγρ. 16. Επίδραση σαραφοτοξίνης S6c σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες ± Τυπικό Σφάλμα. n=3. Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε.

Με την επίδραση στη χοριοειδή επιφάνεια ο εκλεκτικός αγωνιστής των ET_B, Σαραφοτοξίνη S6c προκάλεσε μέση ποσοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης -4.1% στον πρώτο λεπτό και +3,3% στο 3^ο λεπτό εμφανίζοντας αντίθετες μεταβολές από την παρατηρούμενη δράση στην αραχνοειδή επιφάνεια. Παρόλα αυτά, καμία μεταβολή δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική έναντι των μαρτύρων (**Διάγρ.** 17).

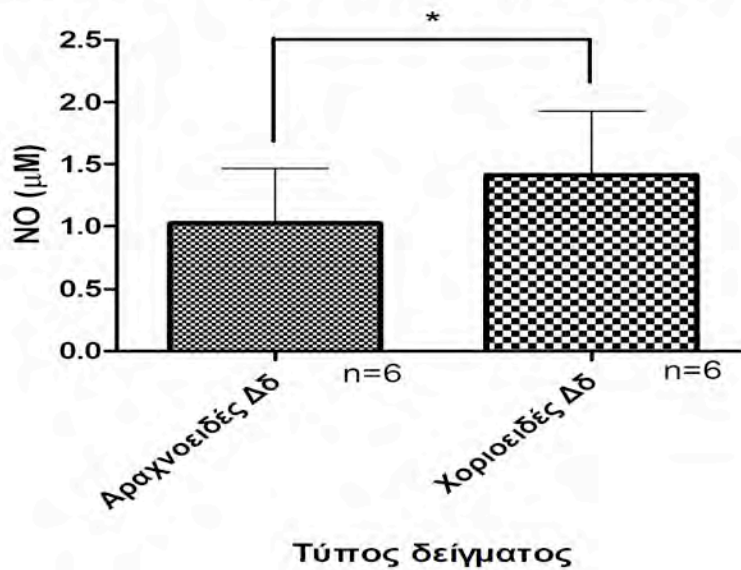


Διάγρ. 17. Επίδραση σαραφοτοξίνης S6c σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) από τους αντίστοιχους μάρτυρες ± Τυπικό Σφάλμα. n=3. Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε.

Έμμεση μέτρηση επιπέδων NO με τη μέθοδο Griess. Εκτός από τη χρήση της διάταξης Ussing για τη μελέτη πιθανής μεταβολής της

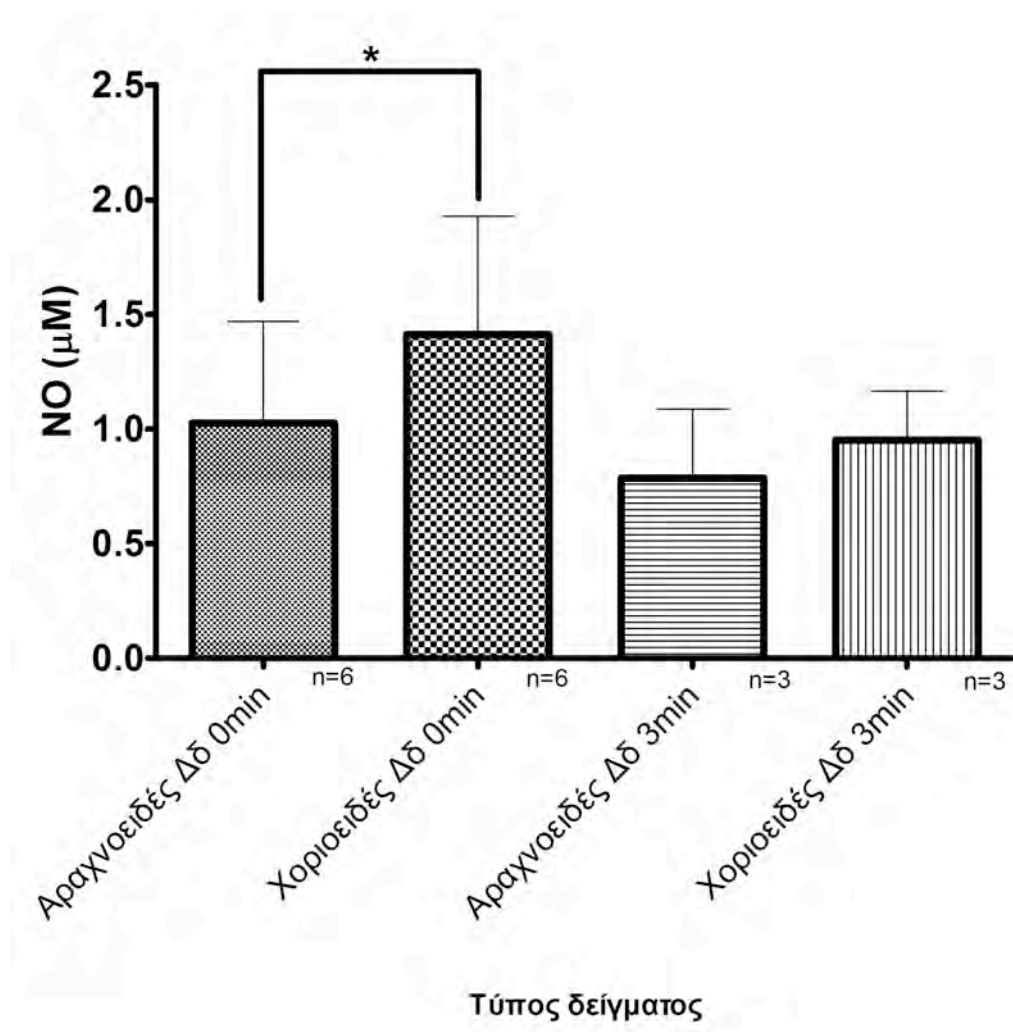
διαμεμβρανικής αντίστασης των λεπτομηνίγγων με την επίδραση της σαραφοτοξίνης S6c (εκλεκτικού αγωνιστή των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B) σε κάθε πείραμα λαμβάναμε δείγματα από το αραχνοειδές και χοριοειδές διάλυμα Krebs πριν και μετά τη δράση της Σαραφοτοξίνης στην αραχνοειδή ή στην χοριοειδή επιφάνεια. Στα λαμβανόμενα δείγματα, γινόταν ο προσδιορισμός των επιπέδων των νιτροδών και νιτρικών στο διάλυμα, τα οποία έμμεσα αποτελούσαν εκτίμηση των επιπέδων του NO που διαλύθηκαν στο Krebs μετά από την απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα του λεπτομηνιγγικού ιστού. Ως «οριζόμενη χρονική στιγμή 0» ορίστηκε η χρονική στιγμή στην οποία γινόταν λήψη δειγμάτων από το αραχνοειδές και χοριοειδές διάλυμα αφότου είχε επέλθει plateau στην διαμεμβρανική αντίσταση του λεπτομηνιγγικού ιστού τουλάχιστον μετά από 10 λεπτά τοποθέτησης στη διάταξη Ussing και πριν τη χρήση σαραφοτοξίνης. Τα επίπεδα του NO (**Διάγρ.** 18) την οριζόμενη χρονική στιγμή 0 στο αραχνοειδές διάλυμα ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερα από το χοριοειδές διάλυμα ($p=0,0086$). Αξίζει να σημειωθεί ότι στο Krebs που δεν έχει προστεθεί ιστός δεν ανιχνεύονται επίπεδα νιτροδών ή νιτρικών ως έμμεσοι δείκτες παρουσίας NO.

Επίπεδα NO την οριζόμενη χρονική στιγμή 0



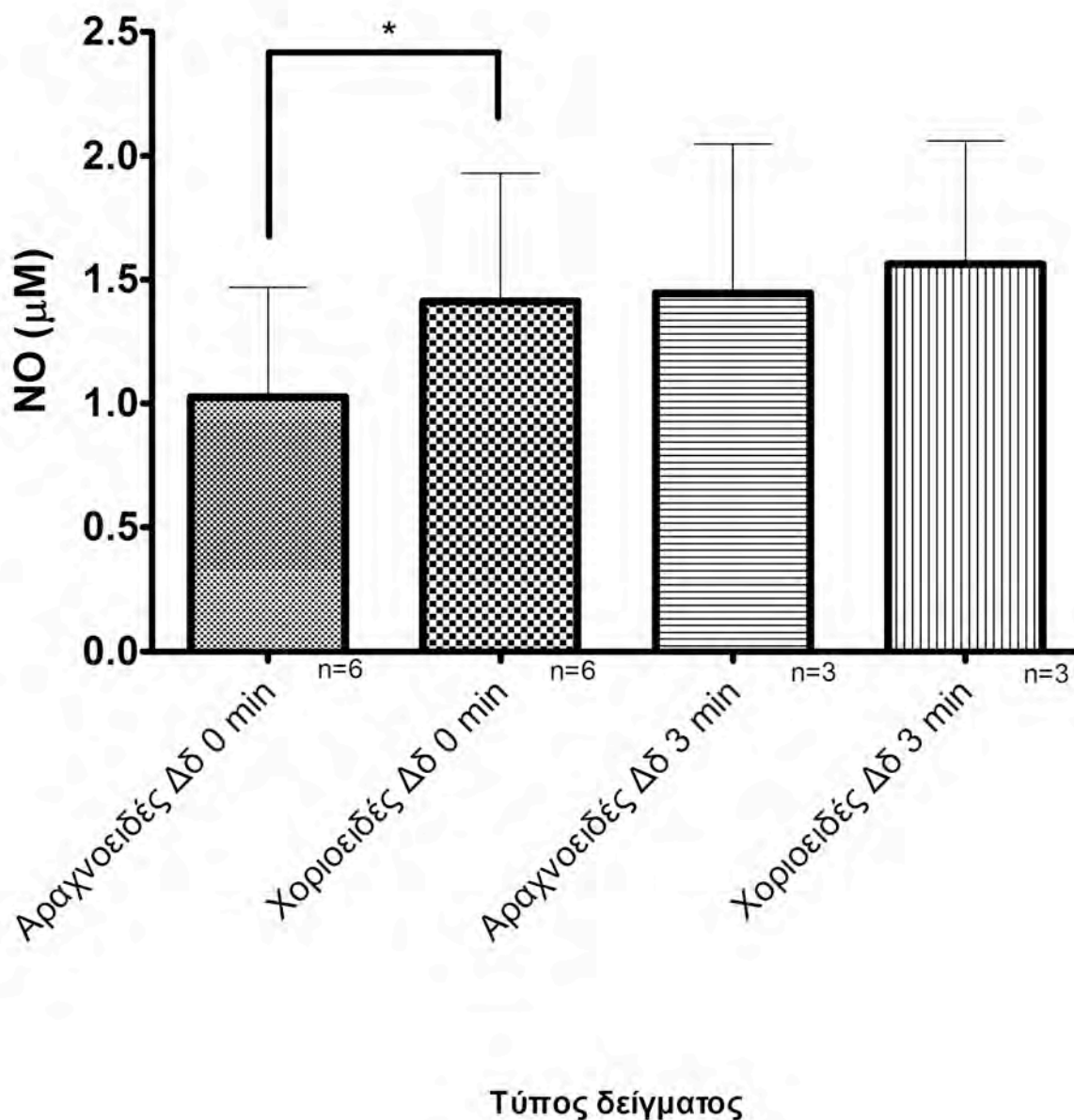
Διάγρ. 18. Επίπεδα NO την οριζόμενη χρονική στιγμή 0. Ο άξονας των Y αναπαριστά τα Μέσα μετρούμενα επίπεδα NO ± Τυπική Απόκλιση. Αραχνοειδές Δδ = 1,025 ± 0,44 μM. Χοριοειδές Δδ = 1,41 ± 0,52 μM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,0086)

Έμμεση μέτρηση των επιπέδων του NO στο διάλυμα του Krebs μετά από την επίδραση Σαραφοτοξίνη για 3 λεπτά. Με την επίδραση σαραφοτοξίνης S6c (εκλεκτικού αγωνιστή των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B) 10^{-7} M στην αραχνοειδή επιφάνεια τα μετρούμενα επίπεδα του NO στο αραχνοειδές και χοριοειδές διάλυμα μειώνονται στο 3^ο λεπτό σε σχέση με την οριζόμενη χρονική στιγμή μηδέν. Στο 3^ο λεπτό, τα επίπεδα στο αραχνοειδές και στο χοριοειδές διάλυμα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, συνεπώς είναι μειωμένα σε σχέση με τη στιγμή 0 αλλά εμφανίζουν εξισορρόπηση μεταξύ τους (**Διάγρ.** 19).



Διάγρ. 19. Επίπεδα NO την οριζόμενη χρονική στιγμή 0 και στο 3^ο λεπτό μετά από την επίδραση Σαραφοτοξίνης $S6c$ $10^{-7}M$ στην Αραχνοειδή επιφάνεια. Ο άξονας των Y αναπαριστά τα Μέσα μετρούμενα επίπεδα NO \pm Τυπική Απόκλιση.

Με την επίδραση σαραφοτοξίνης $S6c$ $10^{-7}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια τα μετρούμενα επίπεδα του NO στο αραχνοειδές και χοριοειδές διάλυμα στο 3^ο λεπτό αυξάνονται σε σχέση με την οριζόμενη χρονική στιγμή μηδέν. Στο 3^ο λεπτό, τα επίπεδα στο αραχνοειδές και στο χοριοειδές διάλυμα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, συνεπώς είναι αυξημένα σε σχέση με τη στιγμή 0 αλλά εμφανίζουν εξισορρόπηση μεταξύ τους (**Διάγρ.** 20).

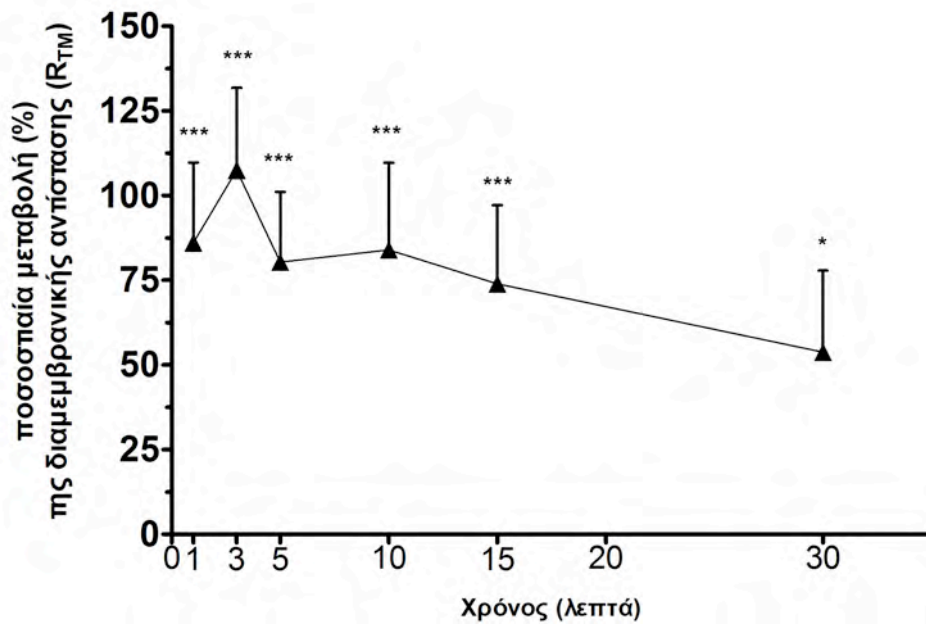


Διάγρ. 20. Επίπεδα NO την οριζόμενη χρονική στιγμή 0 και στο 3^ο λεπτό μετά από την επίδραση Σαραφοτοξίνης $S6c$ $10^{-7}M$ στη Χοριοειδή επιφάνεια. Ο άξονας των Y αναπαριστά τα Μέσα μετρούμενα επίπεδα NO \pm Τυπική Απόκλιση.

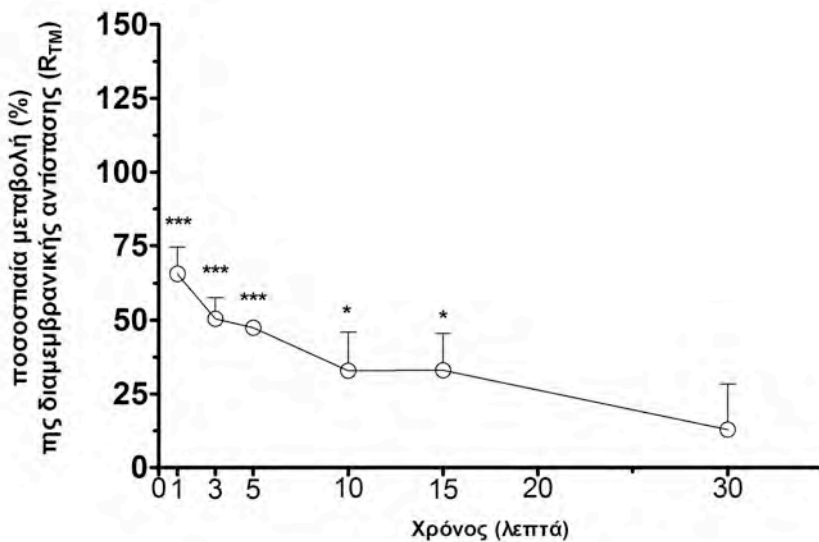
Η πιθανότητα της παρουσίας της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης και η δράση της διερευνήθηκαν με την προσθήκη ουαμπαΐνης (αναστολέας της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης) σε συγκέντρωση 10^{-3}M στην αραχνοειδή και χοριοειδή πλευρά της λεπτομήνιγγας σε διάταξη Ussing.

Η προσθήκη ουαμπαΐνης 10^{-3}M στην αραχνοειδή επιφάνεια αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$) την διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων καθόλο το χρονικό διάστημα των πειραμάτων (30 λεπτά). Η μεγαλύτερη μέση αύξηση παρατηρήθηκε στο 3^ο λεπτό μετά την προσθήκη της ουσίας με μέσο ποσοστό αύξησης 107,5% (**Διάγρ.** 21).

Η προσθήκη ουαμπαΐνης 10^{-3}M στη χοριοειδή επιφάνεια (**Διάγρ.** 22) αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$) την διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων καθόλο το χρονικό διάστημα των πειραμάτων (30mins) σε μικρότερο ποσοστό όμως από την αντίστοιχη αύξηση που παρατηρήθηκε με την επίδραση στην αραχνοειδή επιφάνεια. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό (65,57%) όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα** 22.



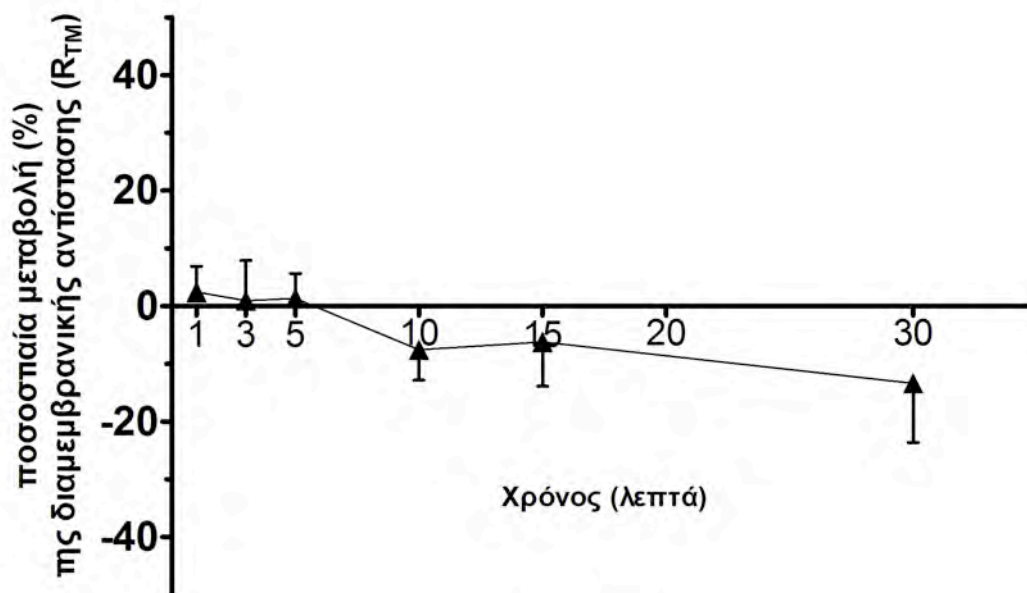
Διάγρ. 21. Επίδραση Οουαπαΐνης $10^{-3}M$ στην Αραχνοειδή επιφάνεια. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των μαρτύρων καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ταχεία και παρατεταμένη δράση της ουαπαΐνης.



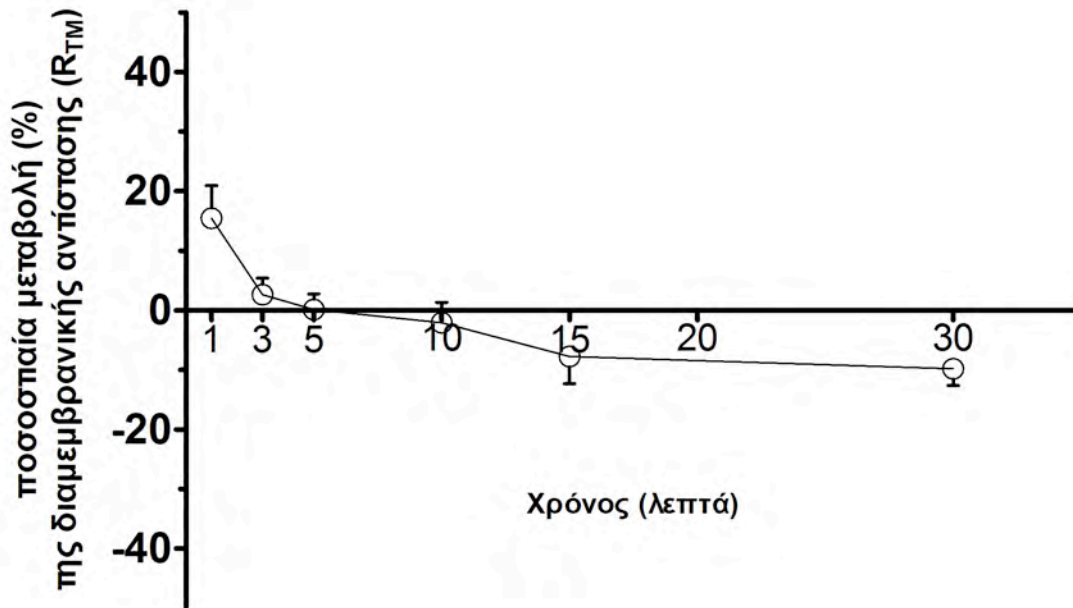
Διάγρ. 22. Επίδραση Οουαπαΐνης $10^{-3}M$ στη Χοριοειδή επιφάνεια. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των μαρτύρων μόνο μέχρι και το 15^ο λεπτό. Μικρότερη η δράση της ουαπαΐνης στην χοριοειδή επιφάνεια σε σχέση με την αραχνοειδή.

Προσθήκη αμιλορίδης

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης του ENaC στις λεπτομήνιγγες χρησιμοποιήθηκε αμιλορίδη (αναστολέας του ENaC) σε συγκέντρωση $10^{-5}M$. Δεν αναδείχτηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης με την προσθήκη αμιλορίδης σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ στην αραχνοειδή και στην χοριοειδή επιφάνεια. Στην χοριοειδή επιφάνεια και μόνο για το 1^ο λεπτό εμφανίζεται αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης (15,42%) που δεν είναι όμως στατιστικά σημαντική (**Διάγρ. 23 και Διάγρ. 24**).



Διάγρ. 23. Επίδραση Α μιλορίδης $10^{-5}M$ στην αραχνοειδή επιφάνεια. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπό εξέταση ομάδων.



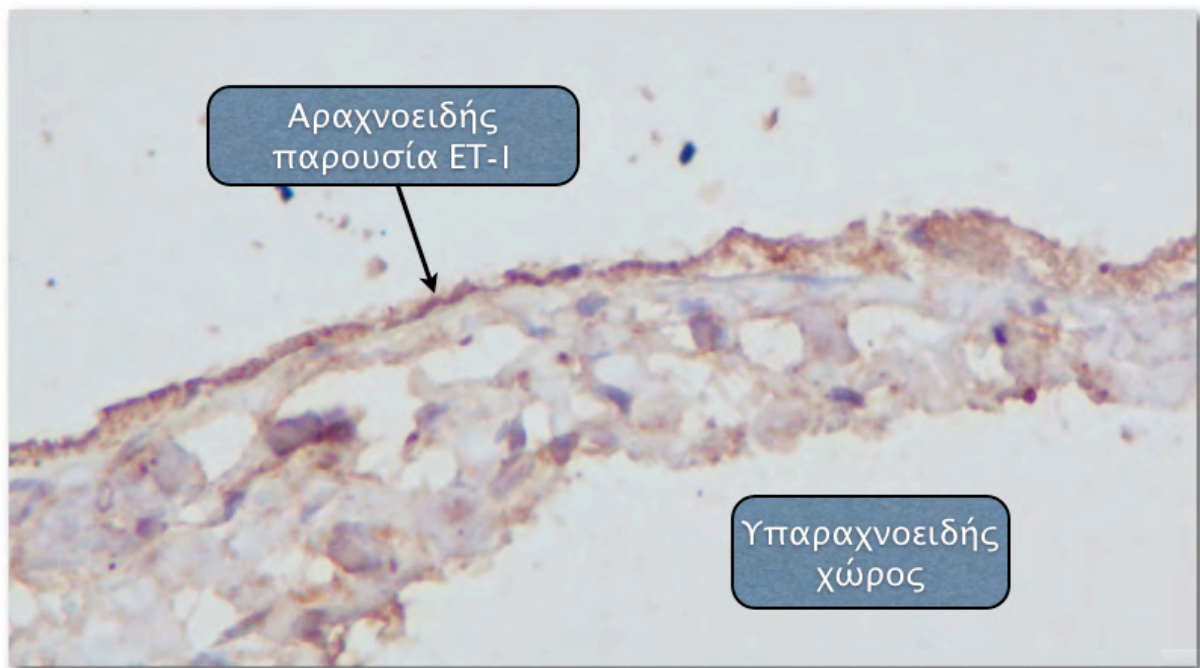
Διάγρ. 24. Επίδραση Αμιλοριδης $10^{-5}M$ στη χοριοειδή επιφάνεια. Οι τιμές στον άξονα των Y, είναι μέσοι όροι της % μεταβολής της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) \pm Τυπικό Σφάλμα. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των μαρτύρων αν και παρατηρείται αύξηση 15,42% στο 1^ο λεπτό.

Ανοσοϊστοχημεία λεπτομηνιγγων προβάτου

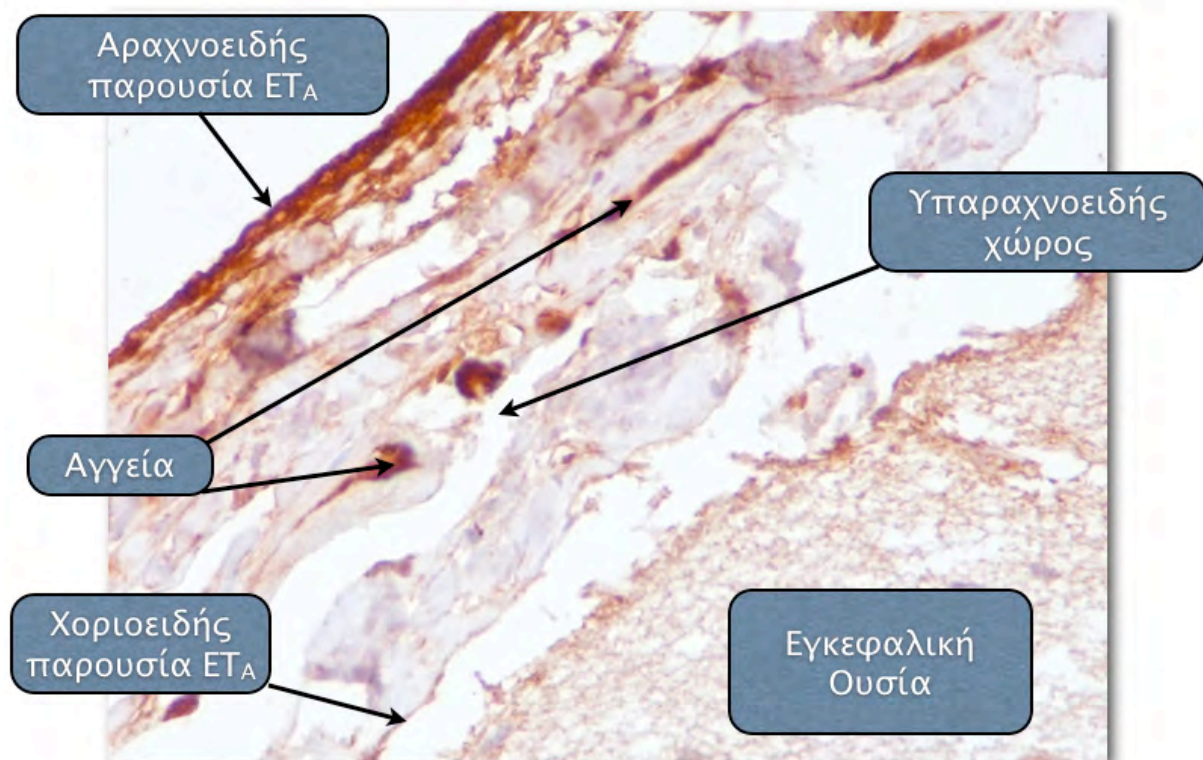
Με τη συμβολή του εργαστηρίου παθολογοανατομίας της Ιατρικής σχολής μελετήθηκαν ιστολογικές τομές από λεπτομηνιγγες προβάτου στις οποίες διαπιστώθηκε η ομοιότητα που εμφανίζουν σύμφωνα με τις αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπινο ιστό^{72,73}.

Παράλληλα με τις ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες της επίδρασης της ET-1 στις λεπτομηνιγγες με την εφαρμογή των συγκεντρώσεων $10^{-9}M$ και

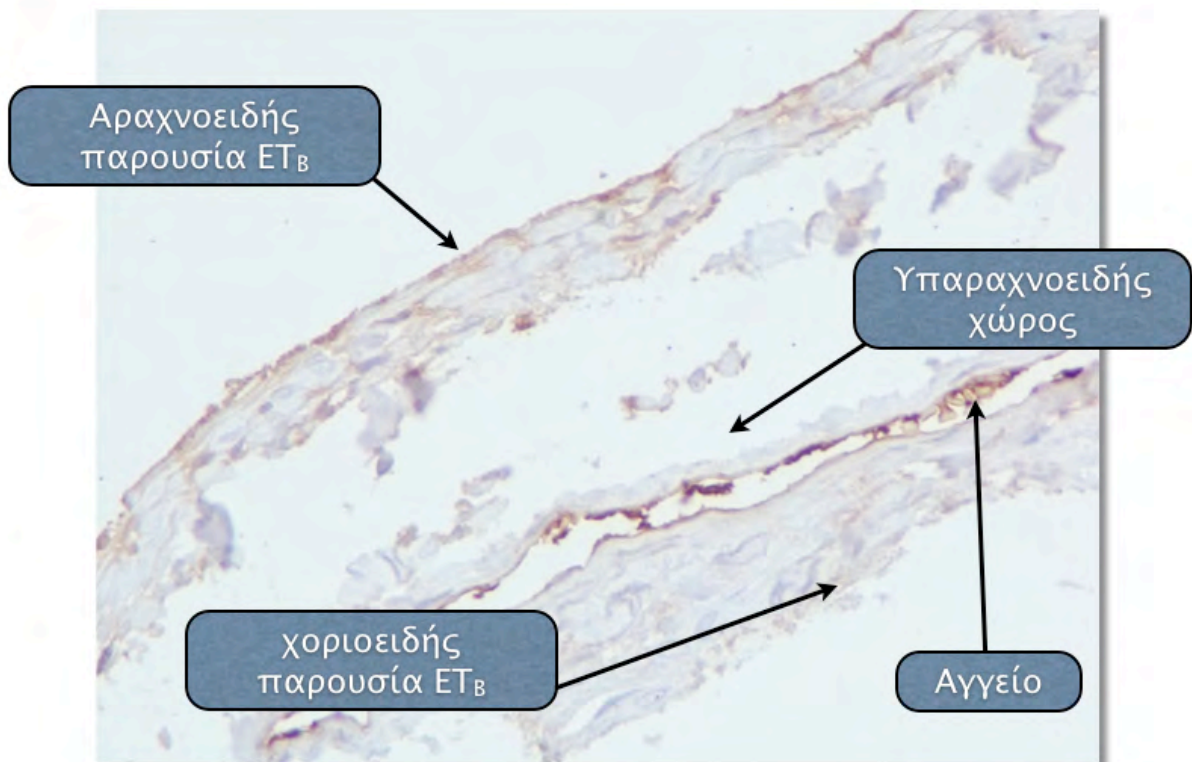
$10^{-8}M$, διενεργήθηκαν και ιστοχημικές μελέτες που ανέδειξαν την παρουσία ενδοθηλίνης-1 (**Εικ.** 9), των υποδοχέων ET_A (**Εικ.** 10) και των υποδοχέων ET_B (**Εικ.** 11) στα κύτταρα της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς μήνιγγας προβάτου.



Εικ. 9. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι της ενδοθηλίνης-1 (ET-1). Διαφαίνεται η χρώση έντονα στην αραχνοειδή μήνιγγα.



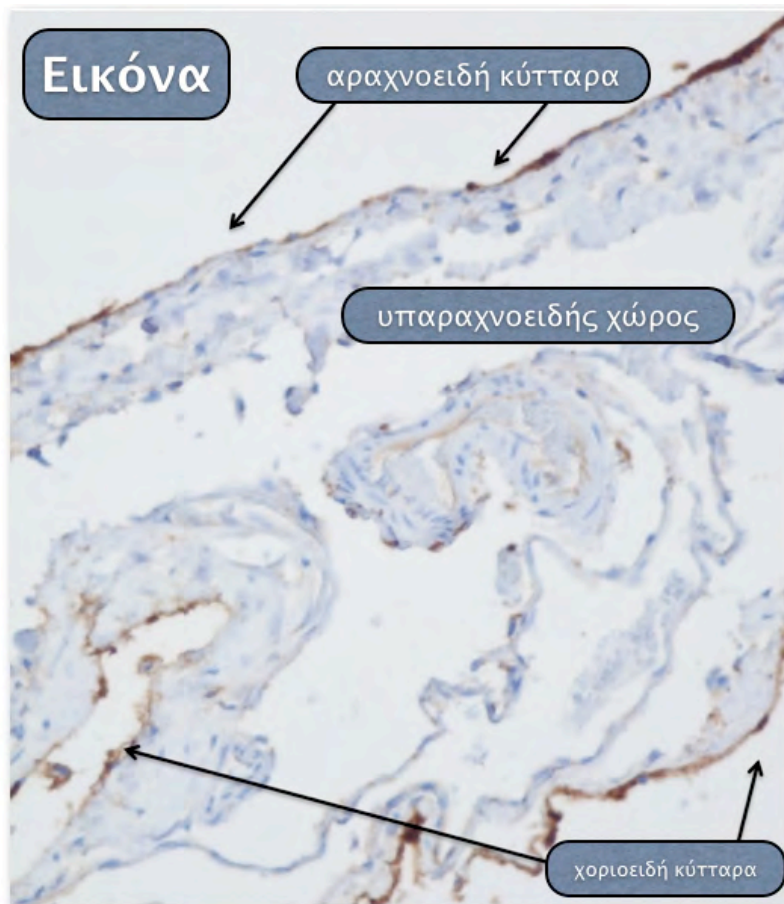
Εικ. 10. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι του υποδοχέα A της ενδοθηλίνης-1 (ET_A). Διαφαίνεται η χρώση έντονα στην αραχνοειδή μήνιγγα, στη χοριοειδή και στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η ταυτόχρονη χρώση του αγγειακού ενδοθηλίου που περιέχει ET_A υποδοχείς και λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας και της αραχνοειδούς μήνιγγας με το αντίσωμα για τον υποδοχέα ET_A επιβεβαιώνει την ύπαρξη του στην αραχνοειδή και χοριοειδή μήνιγγα.



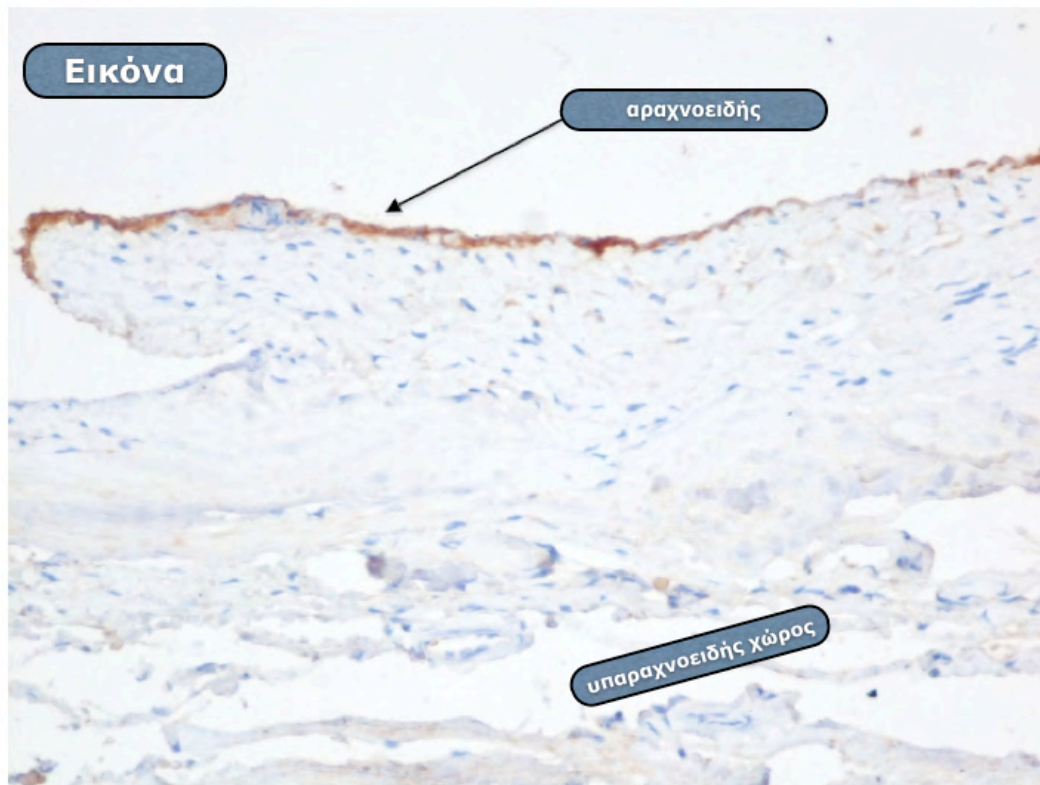
Εικ. 11. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι του υποδοχέα Β της ενδοθηλίνης-1 (ET_B). Διαφαίνεται η χρώση έντονα στην αραχνοειδή μήνιγγα και στο αγγειακό ενδοθήλιο ενώ μικρής έντασης χρώση ανευρίσκεται στη χοριοειδή μήνιγγα. Η ταυτόχρονη χρώση του αγγειακού ενδοθηλίου που περιέχει ET_B υποδοχείς και λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας και της αραχνοειδούς μήνιγγας με το αντίσωμα για τον υποδοχέα ET_B επιβεβαιώνει την ύπαρξη του στην αραχνοειδή και χοριοειδή μήνιγγα.

Διενεργήθηκαν επίσης ανοσο-ιστοχημικές μελέτες που ανέδειξαν την παρουσία της α₁ υπομονάδας της αντλίας Νατρίου-Καλίου (A1ATP1) (**Εικ. 12**) και της β- (**Εικ. 13**) και δ- υπομονάδας (**Εικ. 14**) του επιθηλιακού

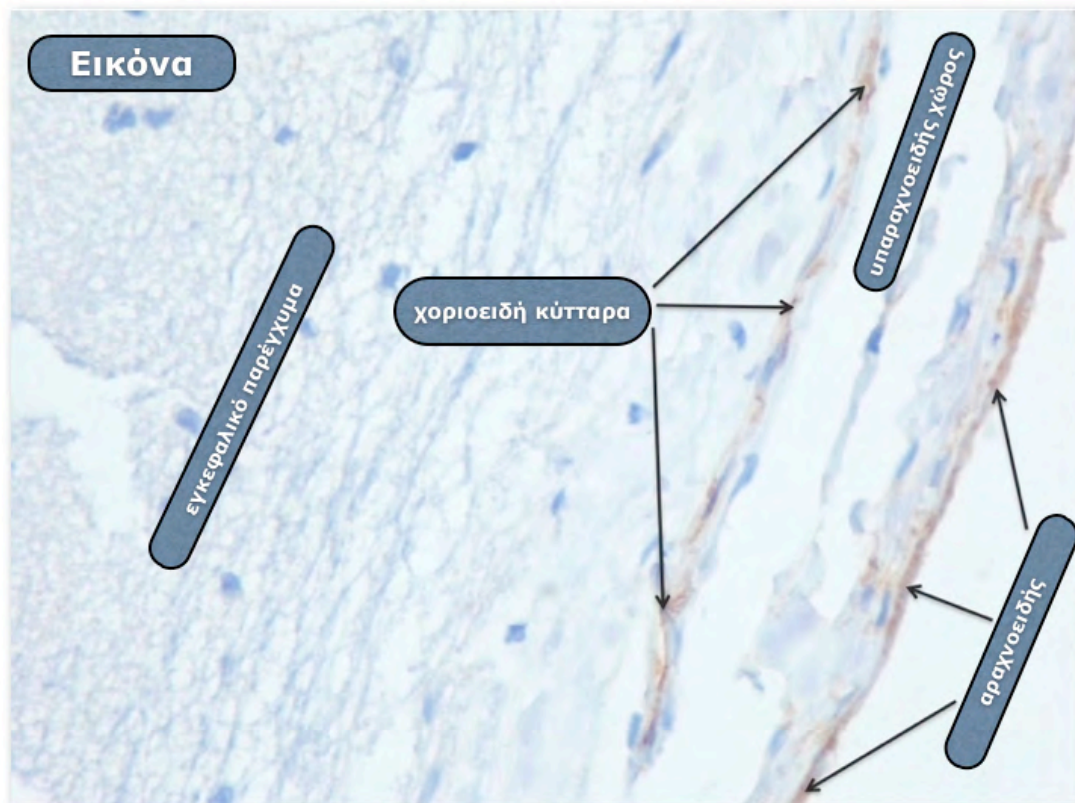
διαύλου Νατρίου (ENaC) στα κύτταρα της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς μήνιγγας προβάτου.



Εικ. 12. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι της α_1 υπομονάδας της αντλίας Νατρίου-Καλίου ($A1ATP1$). Διαφαίνεται η χρώση έντονα στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή μήνιγγα (μεγέθυνση X40). Η χρώση συγκεντρώνεται περισσότερο στα εξώτατα κυτταρικά στρώματα των μηνιγγοθηλιακών κυττάρων.



Εικ. 13. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι της β -υπομονάδας του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC) στα κύτταρα της αραχνοειδούς μήνιγγας προβάτου. Διαφαίνεται η χρώση έντονα στην αραχνοειδή μήνιγγα.



Εικ. 14. Ανοσο-ιστοχημεία. Χρήση αντισώματος έναντι της δ -υπομονάδας του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC) στα κύτταρα της αραχνοειδούς και χοριοειδούς μήνιγγας προβάτου. Η εγκεφαλική επιφάνεια βρίσκεται στα αριστερά της εικόνας ενώ το στρώμα των κεχρωσμένων κυττάρων που εφάπτεται της επιφάνειας αυτής ανήκει στα χοριοειδή. Η χρώση ξεχωρίζει έντονα στην αραχνοειδή μήνιγγα ενώ είναι λιγότερο έντονη στη χοριοειδή (μεγέθυνση X40).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αναδεικνύουν την ύπαρξη ιοντικής μεταφοράς διαμέσω του λεπτομηνιγγικού ιστού. Η διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) αποτελεί μέτρο της ιοντικής διαπερατότητας μιας βιολογικής μεμβράνης καθώς ηλεκτρικά ρεύματα δημιουργούνται με την μετακίνηση ιόντων σε υδατικά διαλύματα. Η διάταξη Ussing^{33,34} έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την μελέτη του ηλεκτροφυσιολογικού προφίλ ορογόνων μεμβρανών όπως ο υπεζωκότας,³⁵⁻⁴⁰ το περικάρδιο,⁴⁹ ορογόνων μεμβρανών με πυκνό αγγειακό δίκτυο όπως το περιτόναιο,⁴¹⁻⁴⁸ και πολύπλοκων μεμβρανών με πολλά δομικά στρώματα όπως οι εμβρυϊκοί υμένες και αποτελεί επιστημονικά τεκμηριωμένη μέθοδο μελέτης της ιοντικής διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών και του ρόλου τους στη διακίνηση βιολογικών υγρών.⁵⁰⁻⁵² Η παρουσία μετρήσιμης διαμεμβρανικής αντίστασης αποτελεί απόδειξη ότι ιοντική μεταφορά λαμβάνει χώρα στο σύστημα λεπτομηνιγγες-υπαραχνοειδής χώρος. Η ύπαρξη ιοντικής μεταφοράς υποδεικνύει την ύπαρξη ιοντικών διαύλων στα λεπτομηνιγγικά κύτταρα.

Η κυκλοφορία βιολογικών υγρών σε προσχηματισμένους χώρους που ορίζονται από βιολογικές μεμβράνες σχετίζεται με την παρουσία ιοντικής μεταφοράς και τη δραστηριότητα των ιοντικών διαύλων. Αυτές οι ιδιότητες έχουν τεκμηριωθεί ηλεκτροφυσιολογικά σε βιολογικές μεμβράνες.³⁵⁻⁵² Συνεπώς, η παρουσία ιοντικής μεταφοράς όπως τεκμηριώνει η μετρήσιμη

διαμεμβρανική αντίσταση στα πειράματα αναφοράς σε μάρτυρες θα μπορούσε να υποδεικνύει κάποιο ρόλο των λεπτομηνίγγων στην κυκλοφορία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) διότι αυτό το υγρό είναι το περιεχόμενο του υπαραχνοειδούς χώρου που αφορίζεται από την αραχνοειδή και την χοριοειδή μήνιγγα.

Η μέση διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων στα πειράματα αναφοράς με Ussing ($10,12 \pm 0,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ με όρια εμπιστοσύνης 95% την τιμή $9,26-11,27 \Omega \cdot \text{cm}^2$) είναι χαμηλή σε σχέση με τις αντιστάσεις που συναντούμε σε άλλους ιστούς-επιθήλια.¹³¹ Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα ευρήματα επιθηλιακών ιστών που χαρακτηρίζονται ως «διαρρέοντα» («leaky» epithelia) σύμφωνα με την ταξινόμηση που εισήγαγαν οι Frömter και Diamond το 1972.¹³¹ Η μέση διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων στους μάρτυρες ομοιάζει με την αντίσταση που συναντάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, στην χοληδόχο κύστη κονίκλου,¹³¹ στο περικάρδιο,⁴⁹ στους εμβρυϊκούς υμένες,⁵² και σε πλευρικά τμήματα του τοιχωματικού υπεζωκότα.³⁹

Οι Key και Retzius πρώτοι,⁶³ το 1876, ανέφεραν πως τα αραχνοειδή και τα χοριοειδή κύτταρα είναι στην ουσία μεσοθηλιακά κύτταρα. Ο Sternberg, θεωρεί πως τα αραχνοειδή κύτταρα στον άνθρωπο αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία κυττάρων, τα μηνιγγοθηλιακά, τα οποία εκφράζουν το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο (EMA) εμφανίζοντας έτσι μια ιδιότητα των επιθηλιακών κυττάρων.⁷⁵ Ο Jayatilaka αναφέρει την παρουσία αραχνοειδών επιθηλιακών κυττάρων στο πρόβατο ως τμήμα του αραχνοειδούς στρώματος καθώς και μεσοθηλιακών κυττάρων που

αποτελούν τα δομικά συστατικά των αραχνοειδών σωμάτων του.⁹⁵ Πρόσφατες αναφορές υποστηρίζουν ότι τα αραχνοειδή και τα χοριοειδή κύτταρα είναι μεσοθηλιακά κύτταρα.⁵⁹ Τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη διακίνηση βιολογικών υγρών κατά μήκος βιολογικών μεμβρανών όπως π.χ. ο υπεζωκότας.¹⁹⁰ Τα μεσοθηλιακά κύτταρα που έχουν μελετηθεί στον υπεζωκότα, στο περιτόναιο και στο περικάρδιο προβάτου, εμφανίζουν ιοντική μεταφορά η οποία αναδεικνύεται από τις μετρήσεις διαμεσοθηλιακής αντίστασης.^{39,44,49} Συνεπώς η διαμεμβρανική αντίσταση που μετράται στα πειράματα μας μπορεί να αντικατοπτρίζει την ιοντική μεταφορά που λαμβάνει χώρα στα πλαίσια μιας δραστηριότητας **μεσοθηλιακού τύπου** από τα λεπτομηνιγγικά κύτταρα.

Η δράση της ET-1

Η μελέτη της επίδρασης της ET-1 στην ιοντική διαπερατότητα των λεπτομηνιγγων, διενεργήθηκε με τη χρήση δύο συγκεντρώσεων διαφορετικής τάξης μεγέθους (10^{-9}M και 10^{-8}M). Από αυτές τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο η συγκέντρωση ET-1 10^{-8}M στην *αραχνοειδή επιφάνεια*, από το 1^ο έως και το 10^ο λεπτό μετέβαλλε στατιστικά σημαντικά την διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνιγγων με διαφορετικό όμως τρόπο. Η επίδραση 10^{-8}M στην αραχνοειδή επιφάνεια αύξησε τη διαμεμβρανική αντίσταση και άρα μείωσε την ιοντική της διαπερατότητα ταχέως αφού η έναρξη της επίδρασης άρχισε από το πρώτο λεπτό. Συνεπώς διαφορετικές συγκεντρώσεις ET-1 έχουν διαφορετική δράση όσον αφορά την επιφάνεια δράσης. Η διαφορετική ιστική και

χρονική δράση της ET-1 πιθανότατα οφείλεται σε διαφορετική περιεκτικότητα της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς επιφάνειας στους υποδοχείς ET_A, ET_B ή σε μια διαφορετική δοσοεξαρτώμενη απάντηση του λεπτομηνιγγικού ιστού στην ET-1.

Ανοσο-ιστοχημικά οι **εικόνες** 13 και 14 αναδεικνύουν πως η χρώση για τους υποδοχείς ET_A και ET_B είναι περισσότερο έντονη για την αραχνοειδή επιφάνεια έναντι της χοριοειδούς υποστηρίζοντας την προηγούμενη ερμηνεία. Επίσης η χρήση του εκλεκτικού αναστολέα των υποδοχέων τύπου A της ET-1 (BQ123) στην αραχνοειδή επιφάνεια μαζί με ET-1 είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση της δράσης της ET-1 από 37,1%-53,8% σχεδόν για όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Η μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης της αραχνοειδούς μήνιγγας από την ET-1 οφείλεται πιθανότατα σε σημαντικό βαθμό στην ενεργοποίηση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου A οι οποίοι μεταβάλλουν τελικά την ιοντική διαπερατότητα της λεπτομήνιγγας. Αντίθετα η χρήση του εκλεκτικού αναστολέα των υποδοχέων τύπου B της ET-1 (BQ788) μαζί με ET-1 10⁻⁸M στην αραχνοειδή επιφάνεια εμφάνισε μείωση της δράσης της ET-1 η οποία δεν ήταν όμως στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν είτε ότι η περιεκτικότητα της αραχνοειδούς μήνιγγας σε ET_B είναι μικρή έναντι των ET_A είτε ότι η αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης και άρα η μείωση της ιοντικής διαπερατότητας της με επίδραση της ET-1 δεν διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης των ET_B. Η ταχεία αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης, ήδη από το 1^ο λεπτό με την επίδραση της ET-1 10⁻⁸M στην αραχνοειδή μήνιγγα υποδεικνύει ότι

πιθανότατα διενεργείται μείωση της διακίνησης ιόντων και άρα αναστολή της δράσης ιοντικών διαύλων ή μεταβολή ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων ιόντων. Η παρατηρούμενη αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης έρχεται σε συμφωνία με τη δράση της ET-1 σε άλλους ιστούς, όπως το περιτόναιο, όπου επίσης η αντίσταση αυξάνεται στα πρώτα 10 λεπτά.⁴¹

Ο πιθανός ρόλος των διαύλων K(V) και KATP

Η επίδραση της ενδοθηλίνης σε ιοντικούς διαύλους λεπτομηνίγγων δεν έχει μελετηθεί, όμως στοιχεία για τη δράση της και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης μπορούν να αντληθούν από τα αποτελέσματα της επίδρασης της στους ιοντικούς διαύλους των αγγείων και του ενδοθηλίου όπου η βιβλιογραφία είναι εκτεταμένη. Η ET-1 φαίνεται να αναστέλλει τη δράση των τάσεοεξαρτώμενων διαύλων Καλίου (voltage-gated potassium channels ή K(V)) και των διαύλων Καλίου ευαίσθητων στο ATP (ή αλλιώς διαύλοι KATP) στους ιστούς αυτούς.¹⁹¹⁻¹⁹⁹ Επίσης, η αναστολή των διαύλων K(V) και KATP από την ET-1 διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης της PKC.^{191-193,196-201} Δείξαμε ότι η μείωση της διαμεμβρανικής αντίστασης (R_{TM}) που προκαλεί η επίδραση ET-1 σε συγκέντρωση $10^{-8}M$ στην αραχνοειδή μήνιγγα οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στο ρόλο των υποδοχέων τύπου A της ενδοθηλίνης που διαθέτει (**Διάγρ.** 4 και **Διάγρ.** 12). Η διέγερση των ET_A υποδοχέων από την ενδοθηλίνη, οι οποίοι είναι υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες, οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) συντελώντας στη δημιουργία διακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3)

μέσω της διάσπασης του PIP2. Η DAG συνδέεται και ενεργοποιεί τελικά την πρωτεϊνική κινάση C (PKC).²⁰²⁻²⁰⁴ Συνεπώς, ως πιθανό μοντέλο δράσης της ET-1 στην αραχνοειδή μήνιγγα, μπορεί να θεωρηθεί η διέγερση των υποδοχέων ET_A, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKC, η οποία αναστέλλει τελικά τους ιοντικούς διαύλους K(V) και KATP. Η διακίνηση ιόντων αναστέλλεται, μειώνεται η ιοντική διαπερατότητα της μεμβράνης και συνεπώς αυξάνεται η διαμεμβρανική αντίσταση των λεπτομηνίγγων.

Ο ρόλος των ιόντων ασβεστίου

Δείξαμε πως η αύξηση την διαμεμβρανικής αντίστασης των λεπτομηνίγγων με δράση της ET-1 10^{-8} M στην αραχνοειδή μήνιγγα μειώνεται και ακόμη εξαλείφεται όταν από το διάλυμα Krebs των ημιθαλάμων της διάταξης Ussing αφαιρέσουμε τα ιόντα ασβεστίου (**Διάγρ. 10**). Η βιωσιμότητα των κυττάρων του λεπτομηνιγγικού ιστού που βρισκόταν στη διάταξη Ussing δεν φαίνεται να επηρεάστηκε από την εξάλειψη του ασβεστίου από το διάλυμα Krebs καθώς η διαμεμβρανική αντίσταση των μαρτύρων σε Krebs με ασβέστιο ή χωρίς δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά (**Διάγρ. 9**). Εάν η βιωσιμότητα των κυττάρων είχε επηρεαστεί τότε η διαμεμβρανική αντίσταση θα άγγιζε το $1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ καθώς θα δημιουργούνταν βραχυκύκλωμα διαμέσω του λεπτομηνιγγικού ιστού.

Η ET-1 σε συγκέντρωση 10^{-8} M στην αραχνοειδή μήνιγγα δεν μπορεί να μεταβάλλει τη διαμεμβρανική αντίσταση του λεπτομηνιγγικού ιστού όταν στο διάλυμα Krebs που εμβαπτίζει τον ιστό αυτό λείπει το ασβέστιο,

μια κατάσταση που ισοδυναμεί με έλλειψη ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο.

Δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα για τη σχέση του εξωκυττάριου ασβεστίου και της δράσης της ET-1 στον λεπτομηνιγγικό ιστό. Δεδομένα από μελέτες της αγγειακής κυρίως βιολογίας μαρτυρούν πως η είσοδος ασβεστίου στο κύτταρο από τον εξωκυττάριο χώρο είναι ουσιώδους σημασίας για την πρόκληση συστολής από τη δράση της ET-1.^{202,203,205} Η ET-1 διεγείρει την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της IP3 και επιπλέον διεγείρει την είσοδο εξωκυττάριου ασβεστίου μέσω διαφόρων διαύλων όπως οι διαμεμβρανικοί δίαυλοι ασβεστίου τύπου L (L-type voltage dependent calcium channels), οι store-operated δίαυλοι ασβεστίου (SOCCs) και οι μη εκλεκτικοί δίαυλοι κατιόντων (NSCCs).^{202,203,205} Στην περίπτωση που οι συγκεντρώσεις του εξωκυττάριου ασβεστίου είναι χαμηλές ή κοντά στο μηδέν όπως με τη χρήση Krebs χωρίς ασβέστιο πιθανότατα η δράση της ET-1 στον λεπτομηνιγγικό ιστό να μεταβάλλεται καθώς δεν εισέρχεται ασβέστιο στο κύτταρο ή οι προαναφερόμενοι δίαυλοι που μεταφέρουν το εξωκυττάριο ασβέστιο εντός του κυττάρου να υπολειτουργούν.^{202,203,206-217} Υπολειτουργία επίσης των διαύλων μπορεί πιθανότατα υπό αυτές τις συνθήκες να παρατηρηθεί και για τους διαύλους που σχετίζονται με τη δράση της ET-1 και υψηλές ενδοκυττάριες συγκεντρώσεις ασβεστίου όπως οι δίαυλοι καλίου ή χλωρίου που ενεργοποιούνται από το ασβέστιο (Ca^{+2} -activated K^+ channels και Ca^{+2} -activated Cl^- channels).^{202,203,218-220}

Συνεπώς η έλλειψη ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο μειώνει τη δράση της ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια και πιθανότατα οφείλεται σε αδυναμία αποτελεσματικής δράσης των διαμεμβρανικών κυτταρικών διαύλων που μετέχουν στην είσοδο ασβεστίου στα λεπτομηνιγγικά κύτταρα ή λειτουργούν βασιζόμενοι στη συγκέντρωση του ασβεστίου.

Η κλινική σημασία των ευρημάτων

Η δράση της ενδοθηλίνης στην αραχνοειδή μήνιγγα φαίνεται να συνδέεται με τη διέγερση των υποδοχέων ET_A, που με τη σειρά τους πιθανόν να αναστέλλουν τους διαύλους K(V) και KATP μέσω της PKC. Επίσης η δράση αυτή της ET-1 σχετίζεται και με τη συγκέντρωση του εξωκυττάριου ασβεστίου και τη λειτουργία των διαύλων που διακινούν τα ιόντα ασβεστίου ή των διαύλων που εξαρτώνται από τις ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις του.

Η ET-1 φαίνεται πως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στις αιμορραγίες του κεντρικού νευρικού συστήματος,⁸⁻¹⁶ και των ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων^{18,19}. Η ET-1 ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με υπαραχνοειδή αιμορραγία (στον υπαραχνοειδή χώρο μεταξύ της αραχνοειδούς και χοριοειδούς μήνιγγας).^{8,9,12-16} Υψηλά τοπικά επίπεδα ενδοθηλίνης-1 ανευρίσκονται επίσης σε ενδοεγκεφαλικά αιματώματα^{17,19} και συνεπώς και σε αιματώματα που μπορεί να εδράζουν σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ όπως μεταξύ σκληράς και αραχνοειδούς μήνιγγας στην περίπτωση του υποσκληρίδιου αιμάτωματος.

Στην παρούσα μελέτη, το εύρημα της αύξησης της διαμεμβρανικής αντίστασης και συνεπώς της μείωσης της ιοντικής διαπερατότητας των λεπτομηνίγγων που διενεργείται με την επίδραση της ET-1 στην αραχνοειδή μήνιγγα μέσω των διαύλων ET_A και της παρουσίας εξωκυττάριου ασβεστίου μπορεί να αποτελεί μέρος της παθοφυσιολογίας της εξέλιξης ή της κλινικής εμφάνισης της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας ή του υποσκληριδίου αιματώματος, δηλαδή αιμορραγικών καταστάσεων που σχετίζονται ανατομικά με την αραχνοειδή μήνιγγα. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο φαινόμενο του αγγειόσπασμου που προκαλεί επιδείνωση της κλινικής εικόνας και αύξηση της θνητότητας. Δεδομένα από τη βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι ο αγγειόσπασμος των αγγείων του υπαραχνοειδούς χώρου που παρατηρείται στην υπαραχνοειδή αιμορραγία εξαρτάται από τη δράση των ιοντικών διαύλων K(V), KATP, SOCCs, τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, NSCCs^{211,212,221-228} και από την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της ET-1 και του NO.²²⁻³⁰ Επίσης, η παρουσία οξυαιμοσφαιρίνης που παρατηρείται σε υποσκληρίδια αιματώματα αλλά και σε άλλου είδους αιματώματα μπορεί να επηρεάσει τη δράση των ιοντικών διαύλων μέσω των οποίων η ET-1 επιτυγχάνει τη μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης των λεπτομηνίγγων.²²⁹⁻²³¹

Η δράση της Σαραφοτοξίνης και του NO

Η σαραφοτοξίνη S6c συγκεκριμένα αποτελεί έναν ισχυρό, εκλεκτικό αγωνιστή των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B) και εμφανίζει

ισχυρή σύνδεση σε τμήματα του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος και η παρεγκεφαλίδα που διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις υποδοχέων ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B).^{29,157,166-174}

Στην παρούσα μελέτη η σαραφοτοξίνη S6c χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της δράσης των υποδοχέων ET_B στη διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων. Επίσης η διέγερση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τύπου B (ET_B) έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των επιπέδων του NO στα εγκεφαλικά τριχοειδή.²⁴ Το NO συντίθεται από το αμινοξύ L-αργινίνη με τη βοήθεια μιας οικογένεια ενζύμων, τις NO συνθετάσες και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες. Ο σχηματισμός του διενεργείται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα σε απάντηση σε χημικά ερεθίσματα και σε μηχανικά ερεθίσματα όπως οι διατμητικές δυνάμεις (shear stress) διατηρώντας ένα αγγειοδιασταλτικό τόνο, ουσιώδη για τον έλεγχο της αιματικής ροής και πίεσης. Συντίθεται από το ενδοθήλιο, από τα αιμοπετάλια, καθώς επίσης και από περιφερικές νευρικές απολήξεις. Επίσης απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αντιδράσεων και άμυνας από μακροφάγα κύτταρα κυρίως.²³² Βάση των παραπάνω δεδομένων, η σαραφοτοξίνη S6c χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα με την υπόθεση ότι θα μπορούσε να δράσει ως εν δυνάμει επαγωγέας του NO στον λεπτομηνιγγικό ιστό ώστε να μελετήσουμε την δράση του.

Η δράση της Σαραφοτοξίνης S6c σε συγκέντρωση 10⁻⁷M στην αραχνοειδή ή στη χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων δεν είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μεταβολή της διαμεμβρανικής τους αντίστασης στο χρονικό ορίζοντα των 3^{ωv} λεπτών. Συνεπώς με τις

συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες η μεταβολή της ιοντικής διαπερατότητας των λεπτομηνίγγων δεν ήταν εφικτή με τη χρήση ενός εκλεκτικού αγωνιστή των ET_B κάτι που πιθανότατα ήταν αναμενόμενο καθώς δείξαμε με τα πειράματα που αφορούσαν την $ET-1$ και το $BQ123$ πως ότι η μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης των λεπτομηνίγγων οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην ενεργοποίηση των ET_A . Ο χρονικός αυτός ορίζοντας χρησιμοποιήθηκε λόγω της μικρής ημίσειας ζωής του NO , που εξαιτίας της αέριας μορφής του είναι εξαιρετικά δύσκολο να ανιχνευθεί άμεσα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού, όπως η μέθοδος Griess.^{188,189}

Ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι την οριζόμενη χρονική στιγμή 0, δηλαδή την στιγμή που έχει επέλθει plateau στη διαμεμβρανική αντίσταση του λεπτομηνιγγικού ιστού και συνεπώς ιοντική ισορροπία, τα εμμέσως μετρούμενα επίπεδα NO στο αραχνοειδές διάλυμα είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερα από το χοριοειδές. Καθώς το Krebs χωρίς ιστό δεν διαθέτει ανιχνεύσιμα επίπεδα NO , συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα εκείνη τη χρονική στιγμή ανταποκρίνονται σε απελευθέρωση NO από τα κύτταρα των λεπτομηνίγγων. Σε συνθήκες λοιπόν ιοντικής ισορροπίας, η χοριοειδής μήνιγγα απελευθερώνει περισσότερο NO από την αραχνοειδή. Η φυσιολογική σημασία της παρατήρησης είναι άγνωστη. Πιθανόν, επειδή η χοριοειδής μήνιγγα έρχεται σε επαφή *in vivo* με τη μεθόριο γλοία (glia limitans) και τα φλοιϊκά τριχοειδή αγγεία του εγκεφάλου να διαθέτει ένα εξελιγμένο μηχανισμό ρύθμισης του αγγειακού τόνου των φλοιϊκών αγγείων μέσω της διακίνησης ποσοτήτων NO τα οποία προκαλούν τοπικά

αγγειοδιαστολή. Η ισορροπία του NO με την ET-1 τοπικά, ρυθμίζει τοπικά το βασικό αγγειακό τόνο.

Με την διέγερση των ET_B μέσω σαραφοτοξίνης στην αραχνοειδή μήνιγγα, στα 3 λεπτά, παρατηρούμε μείωση των επιπέδων του NO και στα δύο διαλύματα και εξισορρόπηση τους. Υποθέτουμε πως η διέγερση αυτή στην αραχνοειδή μήνιγγα σηματοδοτεί την πρόσληψη του NO από τα διαλύματα πίσω στον λεπτομηνιγγικό ιστό με σκοπό την χρησιμοποίησή του για μεταγωγή σημάτων, ρύθμιση του αγγειακού τόνου ή μεταβολισμό του.^{22-24,26,27,233-236}

Αντίθετα με την αραχνοειδή μήνιγγα, η διέγερση των ET_B μέσω σαραφοτοξίνης στη χοριοειδή μήνιγγα, στα 3 λεπτά, προκαλεί αύξηση των επιπέδων του NO και στα δύο διαλύματα και εξισορρόπηση τους. Υποθέτουμε πως η διέγερση αυτή στη χοριοειδή μήνιγγα σηματοδοτεί την παραγωγή περίσσειας ποσοτήτων NO από τον λεπτομηνιγγικό ιστό ή την αποβολή του από τα κύτταρα των μηνίγγων στον εξωκυττάριο χώρο και άρα στα διαλύματα Krebs των ημιθαλάμων του Ussing. Ο ρόλος αυτής της μεταβολής των επιπέδων του NO μπορεί να σχετίζεται με εκ νέου ρύθμιση του αγγειακού τόνου, μεταβολισμό του NO ή διακυτταρική σηματοδότηση.^{22-24,26,27,233-236}

Η δράση της Ουαμπαΐνης και της Αμιλοριδης

Η παρουσία διαμεμβρανικής αντίστασης στα πειράματα αναφοράς υποδεικνύει έμμεσα την ύπαρξη ιοντικών διαύλων στις λεπτομήνιγγες συνεπώς η μελέτη, ο διαχωρισμός και η κατηγοριοποίηση των διαύλων

ήταν επιτακτικός. Επίσης η μη ύπαρξη ενδεδειγμένης μελέτης των ιοντικών διαύλων των λεπτομηνίγγων κατέστησε αναγκαία τη διερεύνηση της ύπαρξης διαύλων. Ένας από τους σημαντικότερους ιοντικούς διαύλους, η Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάση, ανευρίσκεται σε μια πληθώρα κυττάρων επιτελώντας ουσιαστικό ρόλο στην ιοντική ισορροπία μεταξύ ενδοκυτταρίου και εξωκυτταρίου χώρου. Η εκτίμηση της ιοντικής μεταφοράς μετρώντας την λεπτομηνιγγική διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) μετά από την εφαρμογή αναστολέων ιοντικών διαύλων όπως η ουαμπαΐνη (αναστολέας της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης) ή η αμιλοριδίνη (μη εκλεκτικός αναστολέας των επιθηλιακών διαύλων νατρίου και του αντιμεταφορέα Na^+-H^+) μπορεί να αναδείξει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δράση των διαύλων αυτών στην αραχνοειδή και χοριοειδή μήνιγγα.

Η εφαρμογή ουαμπαΐνης $10^{-3}M$ στην αραχνοειδή ή στη χοριοειδή επιφάνεια των λεπτομηνίγγων αύξησε τη διαμεμβρανική αντίσταση ταχέως και στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) συνεπώς, η ιοντική διαπερατότητα του ιστού ελαττώθηκε σημαντικά καθώς η διαμεμβρανική αντίσταση και η ιοντική διαπερατότητα έχουν αντιστρόφως ανάλογη συμπεριφορά. Το υψηλό ποσοστό (πάνω από 100% στο 3^ο λεπτό και άρα σχεδόν διπλάσια επίδραση) της αυξημένης διαμεμβρανικής αντίστασης μετά από την εφαρμογή της ουαμπαΐνης στην αραχνοειδή επιφάνεια υποδεικνύει τη συνδρομή της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης στο ηλεκτροφυσιολογικό προφίλ του λεπτομηνιγγικού ιστού. Λιγότερο εμφανή αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την εφαρμογή της ουαμπαΐνης στη χοριοειδή επιφάνεια. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να στηρίζεται στην πιθανότητα να υπάρχουν λιγότερες αντλίες

Νατρίου-Καλίου στη χοριοειδή επιφάνεια. Επιπρόσθετα, οι ανοσο-ιστοχημική επιβεβαίωση της παρουσίας της α_1 υπομονάδας της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης μαζί με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφυσιολογίας με τη διάταξη Ussing, τεκμηριώνουν το σημαντικό ρόλο της στη συνολική μεταφορά ιόντων και άρα στην ιοντική διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων. Μελέτες σε επιθηλιακούς και μεσοθηλιακούς ιστούς οι οποίοι επενδύουν κλειστές βιολογικές κοιλότητες που εμπεριέχουν βιολογικά υγρά έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης στη διακίνηση των βιολογικών υγρών και της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών σε αυτά.^{36,47} Πρωτόκολλα που μελετούν τη δράση της ουαμπαΐνης και της ακεταζολαμίδης σε παρασκευάσματα χοριοειδούς πλέγματος αναδεικνύουν το ρόλο των ουσιών αυτών στην αναστολή της παραγωγής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Η αναστολή της παραγωγής του ENY με τη δράση της ουαμπαΐνης στα συγκεκριμένα πειραματικά πρωτόκολλα ανέρχεται στο σημαντικό ποσοστό του 70% διεγείροντας τη συζήτηση γύρω από το ρόλο και τη συμβολή της αραχνοειδούς, της χοριοειδούς μήνιγγας και άλλων σημείων του κεντρικού νευρικού συστήματος εκτός του χοριοειδούς πλέγματος στην ομοιόσταση και διακίνηση του ENY.^{85,109,237,238} Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, η παρούσα μελέτη του ρόλου της ουαμπαΐνης στην ηλεκτροφυσιολογία του λεπτομηνιγγικού ιστού παρέχει δεδομένα για τη δράση της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης στην ιοντική διαπερατότητα του συγκεκριμένου ιστού και θέτει ερωτήματα όσον αφορά τη συμβολή της Νάτριο-Κάλιο-ΑΤΡάσης στη διακίνηση του ENY σε σημεία εκτός του χοριοειδούς πλέγματος. Τα

ευρήματα της μελέτης θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε περαιτέρω ερευνητικά πρωτόκολλα τα οποία θα αμφισβητούσαν την επικρατούσα άποψη ότι η αραχνοειδής και η χοριοειδής μήνιγγα αποτελούν απλώς μια ανενεργή φυσιολογικά δεξαμενή ENY.

Η επίδραση αμιλορίδης $10^{-5}M$ στην αραχνοειδή και στη χοριοειδή επιφάνεια του λεπτομηνιγγικού ιστού δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά την μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης από τα επίπεδα των αντίστοιχων μαρτύρων. Παρόλα αυτά, η χρήση ανοσοιστοχημείας ανέδειξε την παρουσία της β - και δ -υπομονάδας του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC) στον λεπτομηνιγγικό ιστό. Για να ερμηνεύσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα θα πρέπει να αναλύσουμε το ρόλο δύο σημαντικών παραγόντων που αφορούν τη συγκέντρωση της αμιλορίδης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη και την κυτταρική εντόπιση του ENaC στα αραχνοειδή και στα χοριοειδή κύτταρα.

Η αμιλορίδη χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία για τη λειτουργική μελέτη των επιθηλιακών διαύλων Νατρίου (ENaC) μετά την ανακάλυψή τους από τον Benos και συν.^{182,183,239-242}, ενώ ο ρόλος τους αναδείχθηκε στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II από τις εργασίες των Matalon και Benos.^{183,243-246} Οι υπομονάδες β - και δ - του ENaC χρησιμοποιήθηκαν στο κομμάτι της ιστοπαθολογίας των λεπτομηνιγγών για τη μελέτη της ύπαρξης μια τροποποιητικής υπομονάδας (β -υπομονάδα) και μίας μονάδας αγωγιμότητας (δ -υπομονάδα).²⁴⁷ Η ύπαρξη επιθηλιακών διαύλων Νατρίου έχει τεκμηριωθεί και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα δε της υπομονάδας δ , του ENaC.²⁴⁸⁻²⁵²

Η συγκέντρωση της α μιλορίδης που χρησιμοποιήθηκε ($10^{-5}M$) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πρωτόκολλα που βασίζονται στη διάταξη Ussing για την ηλεκτροφυσιολογική μελέτη του ENaC σε μεσοθηλιακούς μεμβρανικούς ιστούς, όπως ο υπεζωκότας και το περιτόναιο.^{36,38,44,46} Αποτελεί επίσης τη μέγιστη τάξη μεγέθους που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ιστούς χωρίς να πρόαγεται η εμφάνιση μη-ειδικών δράσεων της αμιλορίδης. Συγκέντρωση α μιλορίδης $>10^{-4}M$ μπορεί να οδηγήσει στην εκπόλωση των κυττάρων, στην καταστροφή της ομοιόστασης του pH σε αυτά, στην καταστολή του μεταβολισμού ή μπορεί να δράσει ως απορρυπαντική ουσία και συνεπώς είναι ακατάλληλη για τη μελέτη των διαύλων ENaC.¹⁸⁰ Συμπερασματικά η συγκέντρωση της α μιλορίδης που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας είναι η ενδεδειγμένη για να αναστείλει δραστικά τους διαύλους ENaC σε περίπτωση που αυτοί είναι παρόντες και ενεργοί. Η ανοσο-ιστοχημική επιβεβαίωση της παρουσίας των διαύλων ENaC στα αραχνοειδή και στα χοριοειδή κύτταρα χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη διαμεμβρανική αντίσταση του λεπτομηνιγγικού ιστού μετά την εφαρμογή της α μιλορίδης (αναστολέα του ENaC) υποδεικνύει πως πιθανότατα αυτοί οι διαύλοι δεν έρχονται σε επαφή με τον αναστολέα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν οι διαύλοι ENaC εντοπίζονται στην πλευρά των αραχνοειδών και χοριοειδών λεπτομηνιγγικών κυττάρων που βλέπει προς τον υπαραχνοειδή χώρο (εντόπιση προς τα μέσα, προς το χώρο κυκλοφορίας του ENY). Στο παρόν πρωτόκολλο Ussing οι ουσίες που χρησιμοποιούμε (π.χ. ουαμπαΐνη, αμιλορίδη, κ.τ.λ.) τοποθετούνται στο διάλυμα Krebs που εμβαπτίζει τα

αραχνοειδή κύτταρα από την πλευρά που *in vivo* βλέπει προς τη σκληρά μήνιγγα και τα χοριοειδή κύτταρα από την πλευρά που *in vivo* βλέπει την επιφάνεια του εγκεφάλου. Συνεπώς, οι πλευρές των αραχνοειδών και των χοριοειδών κυττάρων που βλέπουν τον υπαραχνοειδή χώρο (προς τα μέσα) δεν έρχονται σε επαφή με τις ουσίες που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η προτεινόμενη ερμηνεία έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που αναδεικνύουν ότι οι διάλυτοι ENaC εμφανίζουν μια πολωμένη εντόπιση στους μεσοθηλιακούς ιστούς-μεμβράνες που έχουν επωμιστεί το ρόλο της διακίνησης βιολογικών υγρών. Η πλευρά της εντόπισης σε αυτούς τους ιστούς είναι προς την πλευρά των μεμβρανών που έρχεται σε επαφή με το βιολογικό υγρό.^{36,44,46,180,184,190,253} Αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη, η βιολογική κοιλότητα που περιέχει υγρό (εδώ ENY), είναι ο υπαραχνοειδής χώρος και τα κύτταρα, που ορίζουν και επενδύουν τη δομή αυτή, είναι τα αραχνοειδή και τα χοριοειδή κύτταρα που ενδεχόμενα να συμβάλλουν στη διακίνηση του ENY λόγω της πολωμένης εμφάνισης ιοντικών διαύλων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνηγορούν υπέρ των ακόλουθων συμπερασμάτων:

1. Οι λεπτομήνιγγες εμφανίζουν χαμηλή διαμεμβρανική αντίσταση σε συνθήκες ιοντικής ισορροπίας η οποία απαντάται σε ιστούς τύπου «leaky epithelia» και εμφανίζει μεσοθηλιακού τύπου ιοντική δραστηριότητα.
2. Η ET-1 δρά ταχέως στην αραχνοειδή μήνιγγα σε συγκέντρωση 10^{-8} Μ και αυξάνει την διαμεμβρανική λεπτομηνιγγική αντίσταση με αποτέλεσμα να μειώνεται η ιοντική της διαπερατότητα.
3. Η δράση αυτή της ET-1 οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στη διέγερση των υποδοχέων ET_A και στην παρουσία ασβεστίου εξωκυττάρια. Η πιθανή αναστολή των διαύλων $K(V)$ και $KATP$ από την ET-1 καθώς και η πιθανή μεταβολή της δράσης των διαύλων ασβεστίου τύπου L, SOCCs, NSCCs, ή των εξαρτώμενων από το ασβέστιο διαύλων Καλίου ή Χλωρίου από την εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου μπορεί να μετέχει στη μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης που προκαλείται από την επίδραση του ET-1 στην αραχνοειδή μήνιγγα.
4. Υποδοχείς ET_A και ET_B εντοπίστηκαν ανοσο-ιστοχημικά στις λεπτομήνιγγες.

5. Η σαραφοτοξίνη S6c (εκλεκτικός αγωνιστής των ET_B) σε συγκέντρωση 10⁻⁷M με εφαρμογή στην αραχνοειδή ή στη χοριοειδή επιφάνεια, σε χρονικό πλαίσιο 3^{ωv} λεπτών δεν μετέβαλλε τη διαμεμβρανική αντίσταση του λεπτομηνιγγικού ιστού στατιστικά σημαντικά.
6. Σε συνθήκες ιοντικής ισορροπίας του λεπτομηνιγγικού ιστού η παραγωγή και η απελευθέρωση του NO στον εξωκυττάριο χώρο είναι μικρότερη στην αραχνοειδή μήνιγγα από τη χοριοειδή.
7. Μετά την επίδραση σαραφοτοξίνης S6c στην αραχνοειδή μήνιγγα τα επίπεδα του NO στον εξωκυττάριο χώρο μειώνονται και εξισορροπούνται.
8. Μετά την επίδραση σαραφοτοξίνης S6c στη χοριοειδή μήνιγγα τα επίπεδα του NO στον εξωκυττάριο χώρο αυξάνονται και εξισορροπούνται.
9. Ενδεχόμενη φαρμακολογική ρύθμιση των επιπέδων του εξωκυττάριου ασβεστίου ή των ET_A ή της μεταβολής των επιπέδων του NO στο λεπτομηνιγγικό ιστό να αλλάζει την εξέλιξη ή την εμφάνιση της κλινικής εικόνας σε αιμορραγίες και αιματώματα που εμφανίζονται σε γειτνίαση με την αραχνοειδή μήνιγγα, όπως η υπαραχνοειδής αιμορραγία ή το υποσκληρίδιο αιμάτωμα.
10. Η ουαμπαΐνη 10⁻³M δρα ταχέως και παρατεταμένα στην αραχνοειδή και χοριοειδή μήνιγγα και αυξάνει τη διαμεμβρανική αντίσταση με ισχυρότερη δράση όταν επιδρά από τη μεριά της

αραχνοειδούς μήνιγγας. Τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης διαύλων Νατρίου-Καλίου ΑΤΡάσης στις λεπτομήνιγγες και μάλιστα σε μεγαλύτερο αριθμό στην αραχνοειδή επιφάνεια.

11. Η ανοσο-ιστοχημεία ανέδειξε την παρουσία της α_1 υπομονάδας της Νατρίου-Καλίου ΑΤΡάσης στις λεπτομήνιγγες.
12. Η αμιλορίδη σε συγκέντρωση $10^{-5}M$ δεν μεταβάλλει την ιοντική διαπερατότητα των λεπτομηνίγγων ενώ η ανοσο-ιστοχημεία ανέδειξε την παρουσία των διαύλων ENaC με αποτέλεσμα να υποθέτουμε την παρουσία τους επί τα εντός των λεπτομηνίγγων, στον υπαραχνοειδή χώρο και όχι στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα διαλύματα των πειραμάτων.
13. Ενδεχόμενη φαρμακολογική ρύθμιση των διαύλων Νάτριο-Κάλιο ΑΤΡάση και ENaC θα μπορούσε να συμβάλει στη ρύθμιση της διακίνησης του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στον υπαραχνοειδή χώρο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στην διαμεμβρανική αντίσταση (R_{TM}) των λεπτομηνιγγων προβάτου, χρησιμοποιώντας τη διάταξη Ussing. Η τιμή αναφοράς της R_{TM} του λεπτομηνιγγικού ιστού μετρήθηκε $10,12 \pm 0,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Αμέσως μετά την επίδραση ET-1 (10^{-8} M) στην αραχνοειδή επιφάνεια του λεπτομηνιγγικού ιστού, η R_{TM} αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$). Προσθήκη του ειδικού αναστολέα των υποδοχέων τύπου A της ενδοθηλίνης (ET_A), BQ123 (10^{-6} M) κατέστειλε την δράση της ET-1 στην αραχνοειδή επιφάνεια. Η αφαίρεση του ασβεστίου από το διάλυμα Krebs που εμβάπτιζε τον λεπτομηνιγγικό ιστό επίσης κατέστειλε τη δράση της ET-1. Ο αναστολέας της Νατρίου-Καλίου ΑΤΡάσης, ουαμπαΐνη (10^{-3} M) αύξησε σημαντικά και παρατεταμένα την R_{TM} του λεπτομηνιγγικού ιστού ενώ η αμιλοριδία (10^{-5} M) δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Η ανοσο-ιστοχημεία ανέδειξε την ύπαρξη των υποδοχέων τύπου A και B της ενδοθηλίνης στον λεπτομηνιγγικό ιστό καθώς επίσης και της α_1 υπομονάδας της Νάτριο-Κάλιο ΑΤΡάσης (A1ATP1) και του επιθηλιακού διαύλου Νατρίου (ENaC). Σε κατάσταση ιοντικής ισορροπίας, ο μεταβολισμός και η χρησιμοποίηση του NO από την αραχνοειδή ή τη χοριοειδή μήνιγγα είναι διαφορετικός και μεταβάλλεται από την επίδραση της σαραφοτοξίνης S6c (10^{-7} M).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ET-1 έχει ταχεία δράση στην αραχνοειδή μήνιγγα. Αυτή η ταχεία επίδραση μεσολαβείται από τη διέγερση των υποδοχέων ET_A καθώς και από τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου ασβεστίου. Σημαντική είναι επίσης και η δράση της Νάτριο-Κάλιο ΑΤΡάσης στη μεταβολή της λεπτομηνιγγικής R_{TM} , ενώ αναγνωρίστηκαν οι υποδοχείς ET_A, ET_B και οι διαύλοι A1ATP1 και ENaC στις λεπτομηνιγγες.

SUMMARY

The effect of endothelin-1 on the transmembrane resistance (R_{TM}) of sheep's leptomeninges was studied using the Ussing chamber technique. Basal transmembrane resistance of the leptomeningeal tissue was found to be $10.12 \pm 0.45 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Immediately after the addition of ET-1 (10^{-8} M) on the arachnoidal side of the leptomeningeal tissue, the R_{TM} was increased significantly ($p < 0.05$).

Addition of the selective endothelin receptor type A blocker, BQ123 (10^{-6} M) suppressed the effect of the ET-1 on the arachnoidal side. The usage of calcium-free Krebs, bathing the leptomeningeal tissue, suppressed the ET-1 effect as well. The sodium-potassium-ATPase inhibitor, ouabain (10^{-3} M) increased the R_{TM} of the leptomeningeal tissue significantly, in a sustained way, while amiloride (10^{-5} M) had no effect. Immuno-histochemistry revealed the presence of endothelin type A and B receptors at the leptomeningeal tissue as well as the presence of the α_1 subunit of the sodium-potassium-ATPase (A1ATP1) and epithelial sodium ion (ENaC) channel. While in ionic equilibrium, the metabolism and the utilization of the NO by the arachnoid or pial mater is different and the action of sarafotoxin S6c (10^{-7} M) can modify it.

In conclusion, our results show that the ET-1 has a rapid effect on the arachnoidal side. This rapid effect is mediated by the stimulation of ET_A receptors as well as the concentration of extracellular calcium. The action of sodium-potassium-ATPase is also important in modifying the leptomeningeal R_{TM} , while the presence of ET_A , ET_B , A1ATP, and ENaC have been identified in the leptomeningeal tissue.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*. Jan 1 2006(176 Pt 1):295-329.
2. MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 1 1990;87(6):2359-2363.
3. Masaki T. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. Jan 1 2000;35(4 Suppl 2):S3-5.
4. Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci*. Apr 1 2004;25(4):219-224.
5. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. Aug 10 1995;333(6):356-363.
6. Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *FASEB J*. Sep 1 1991;5(12):2713-2720.
7. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. Mar 31 1988;332(6163):411-415.
8. Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, et al. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. *Stroke*. Dec 1 2000;31(12):2971-2975.
9. Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Grignani G, Spanu G, Pacchiarini L, Paoletti P. Endothelin and aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a study of subarachnoid cisternal cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. Jan 1 1994;57(1):66-72.
10. Juvola S. Plasma endothelin concentrations after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. Mar 1 2000;92(3):390-400.
11. Juvola S. Plasma endothelin and big endothelin concentrations and serum endothelin-converting enzyme activity following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. Dec 1 2002;97(6):1287-1293.
12. Kästner S, Oertel MF, Scharbrodt W, Krause M, Böker D-K, Deinsberger W. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH. *Acta neurochirurgica*. Dec 1 2005;147(12):1271-1279; discussion 1279.
13. Kessler IM, Pacheco YG, Lozzi SP, de Araújo AS, Onishi FJ, de Mello PA. Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surgical neurology*. Jan 1 2005;64 Suppl 1:S1:2-5; discussion S1:5.
14. Suzuki H, Sato S, Suzuki Y, et al. Endothelin immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid haemorrhage. *Ann Med*. Jan 1 1990;22(4):233-236.
15. Suzuki K, Meguro K, Sakurai T, Saitoh Y, Takeuchi S, Nose T. Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage. *Surgical neurology*. Feb 1 2000;53(2):131-135.
16. Suzuki R, Masaoka H, Hirata Y, Marumo F, Isotani E, Hirakawa K. The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. Jul 1 1992;77(1):96-100.
17. Chiang M-F, Chiu W-T, Lin FJ, Thajeb P, Huang C-J, Tsai S-H. Multiparametric analysis of cerebral substrates and nitric oxide delivery in cerebrospinal fluid in patients with intracerebral haemorrhage: correlation with hemodynamics and outcome. *Acta neurochirurgica*. Jun 1 2006;148(6):615-621; dicussion 621.
18. Fouyas IP, Brennan P, Kelly PAT, Whittle IR. The role of endothelin in the cerebrovascular response following intracerebral haemorrhage: experimental studies using the endothelin antagonist SB209670. *Br J Neurosurg*. Feb 1 2008;22(1):35-39.

19. Zuo Y, Cheng G, Gao D-K, et al. Gross-total hematoma removal of hypertensive basal ganglia hemorrhages: A long-term follow-up. *Journal of the Neurological Sciences*. Jan 12 2009;287(1-2):100-104.
20. Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, Galron R, Sarova-Pinhas I, Sokolovsky M. Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke*. Oct 1 1997;28(10):1951-1955.
21. Oliveira-Ferreira AI, Milakara D, Alam M, et al. Experimental and preliminary clinical evidence of an ischemic zone with prolonged negative DC shifts surrounded by a normally perfused tissue belt with persistent electrocorticographic depression. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Mar 4 2010;30(8):1504-1519.
22. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. Jan 1 2006;100(1):318-327.
23. Chen Y, McCarron RM, Golech S, et al. ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*. Feb 1 2003;284(2):C243-249.
24. Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, Konno S, Takeda H. Dilatation of cerebral microvessels mediated by endothelin ETB receptor and nitric oxide in cats. *Neurosci Lett*. Aug 1 1994;176(2):157-160.
25. Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nature clinical practice Neurology*. May 1 2007;3(5):256-263.
26. Suhardja A. Mechanisms of disease: roles of nitric oxide and endothelin-1 in delayed cerebral vasospasm produced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. Dec 1 2004;1(2):110-116; quiz 112 p following 116.
27. Thorin E, Nguyen TD, Bouthillier A. Control of vascular tone by endogenous endothelin-1 in human pial arteries. *Stroke*. Jan 1 1998;29(1):175-180.
28. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch*. May 1 2010;459(6):951-958.
29. Zuccarello M, Boccaletti R, Rapoport RM. Role of NO in endothelium-dependent relaxation of rabbit basilar artery in situ. *Neurol Res*. Mar 1 2000;22(2):204-208.
30. Zuccarello M, Boccaletti R, Romano A, Rapoport RM. Endothelin B receptor antagonists attenuate subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke*. Sep 1 1998;29(9):1924-1929.
31. Rabinstein AA, Lanzino G, Wijdicks EF. Multidisciplinary management and emerging therapeutic strategies in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet neurology*. Apr 7 2010;9(5):504-519.
32. Larsen EH, Hans H. Ussing--scientific work: contemporary significance and perspectives. *Biochim Biophys Acta*. Nov 13 2002;1566(1-2):2-15.
33. Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros*. Aug 1 2004;3 Suppl 2:123-126.
34. Ussing H, ZERAHN K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*. Aug 25 1951;23(2-3):110-127.
35. Hatzoglou C, Gourgoulianis KI, Hatzoglou A, Castanas E, Molyvdas PA. Rapid effects of 17beta-estradiol and progesterone on sheep visceral and parietal pleurae via a nitric oxide pathway. *J Appl Physiol*. Aug 1 2002;93(2):752-758.
36. Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol*. Apr 1 2001;90(4):1565-1569.

37. Payne DK, Kinasewitz GT, Gonzalez E. Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura. *J Appl Physiol*. Dec 1988;65(6):2558-2564.
38. Sarkos S, Hatzoglou C, Dahabre J, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Effect of amiloride in human and sheep parietal pleura. *Respiratory physiology & neurobiology*. Aug 30 2002;132(2):233-237.
39. Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, et al. Comparison of the electrophysiological properties of the sheep isolated costal and diaphragmatic parietal pleura. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Jan 1 2007;34(1-2):129-131.
40. Zarogiannis S, Hatzoglou C, Stefanidis I, et al. Effect of adrenaline on transmesothelial resistance of isolated sheep pleura. *Respiratory physiology & neurobiology*. Feb 28 2006;150(2-3):165-172.
41. Kourti P, Zarogiannis S, Liakopoulos V, et al. Effect of endothelin-1 on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis*. Jan 1 2007;23:38-42.
42. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, et al. Inhibition by mercuric chloride of aquaporin-1 in the parietal sheep peritoneum: an electrophysiologic study. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis*. Jan 1 2006;22:7-10.
43. Simon M. Peritoneal mesothelium in vitro: an electrophysiologic study. *Perit Dial Int*. Jul-Aug 1996;16(4):393-397.
44. Stefanidis I, Liakopoulos V, Kourti P, et al. Amiloride-sensitive sodium channels on the parietal human peritoneum: evidence by ussing-type chamber experiments. *ASAIO J*. Jan 1 2007;53(3):335-338.
45. Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, et al. Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: ussing-type chamber experiments. *Artificial organs*. Nov 1 2005;29(11):919-922.
46. Zarogiannis S, Kourti P, Hatzoglou C, et al. Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis*. Jan 1 2005;21:5-8.
47. Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, et al. Effect of sodium-potassium pump inhibition by ouabain on the permeability of isolated visceral sheep peritoneum. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis*. Jan 1 2007;23:43-47.
48. Zarogiannis S, Stefanidis I, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Gourgoulisanis K, Molyvdas P-A. Effect of adrenaline on the electrophysiologic profile of isolated visceral sheep peritoneum. *Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis*. Jan 1 2004;20:23-26.
49. Vogiatzidis K, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Matafia G, Gourgoulisanis K, Molyvdas P-A. mu-Opioid influence on transmesothelial resistance of isolated sheep pleura and parietal pericardium. *Eur J Pharmacol*. Jan 20 2006;530(3):276-280.
50. Adams EA, Choi HM, Cheung CY, Brace RA. Comparison of amniotic and intramembranous unidirectional permeabilities in late-gestation sheep. *Am J Obstet Gynecol*. Jul 2005;193(1):247-255.
51. Eis AW, Mitchell MD, Myatt L. Endothelin transfer and endothelin effects on water transfer in human fetal membranes. *Obstet Gynecol*. Mar 1 1992;79(3):411-415.
52. Verikouki CH, Hatzoglou CH, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Kallitsaris A, Messinis IE. Rapid effect of progesterone on transepithelial resistance of human fetal membranes: evidence for non-genomic action. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Feb 1 2008;35(2):174-179.

53. Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D. The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Jan 1 1988;14(1):1-17.
54. Jayatilaka AD. Arachnoid granulations in sheep. *J Anat*. Apr 1 1965;99:315-327.
55. Mack J, Squier W, Eastman JT. Anatomy and development of the meninges: implications for subdural collections and CSF circulation. *Pediatr Radiol*. Mar 1 2009;39(3):200-210.
56. McLone DG. The subarachnoid space: a review. *Child's brain*. Jan 1 1980;6(3):113-130.
57. Meltzer CC, Fukui MB, Kanal E, Smirniotopoulos JG. MR imaging of the meninges. Part I. Normal anatomic features and nonneoplastic disease. *Radiology*. Nov 1 1996;201(2):297-308.
58. Patel N, Kirmi O. Anatomy and imaging of the normal meninges. *Semin Ultrasound CT MR*. Dec 2009;30(6):559-564.
59. Snell RS. Clinical Neuroanatomy. Jan 1 2006:539.
60. Weller RO. Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes*. Mar 1 2005;89(284):22-34.
61. Bakay L. Discovery of the arachnoid membrane. *Surg Neurol*. Jul 1991;36(1):63-68.
62. Sanan A, van Loveren HR. The arachnoid and the myth of Arachne. *Neurosurgery*. Jul 1999;45(1):152-155; discussion 155-157.
63. Key A, G R. *Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindwebes*. Stockholm: Samson and Wallin; 1876.
64. Drake RL, Gray H. *Gray's atlas of anatomy*. 1st ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2008.
65. Nabeshima S, Reese TS, Landis DM, Brightman MW. Junctions in the meninges and marginal glia. *J Comp Neurol*. Nov 15 1975;164(2):127-169.
66. Haines DE. On the question of a subdural space. *Anat Rec*. May 1 1991;230(1):3-21.
67. Haines DE, Harkey HL, al-Mefty O. The "subdural" space: a new look at an outdated concept. *Neurosurgery*. Jan 1 1993;32(1):111-120.
68. Reina MA, López García A, de Andrés JA, Villanueva MC, Cortés L. [Does the subdural space exist?]. *Revista española de anestesiología y reanimación*. Nov 1 1998;45(9):367-376.
69. Yamashima T, Friede RL. Why do bridging veins rupture into the virtual subdural space? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. Feb 1 1984;47(2):121-127.
70. Kanamalla US, Baker KB, Boyko OB. Gadolinium diffusion into subdural space: visualization with FLAIR MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. Jun 2001;176(6):1604-1605.
71. Arutiunov AI, Baron MA, Majorova NA. Experimental and clinical study of the development of spasm of the cerebral arteries related to subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. Jun 1 1970;32(6):617-625.
72. Arutiunov AI, Baron MA, Majorova NA. The role of mechanical factors in the pathogenesis of short-term and prolonged spasm of the cerebral arteries. *J Neurosurg*. Apr 1 1974;40(4):459-472.
73. Barrionuevo PJ, Dujovny M, Kossovsky N, Laha RK. Scanning electron microscopic anatomy of the supratentorial basal cisterns. *Neurosurgery*. Jan 1 1978;3(1):54-60.
74. Killer HE. Architecture of arachnoid trabeculae, pillars, and septa in the subarachnoid space of the human optic nerve: anatomy and clinical considerations. *British Journal of Ophthalmology*. Jun 1 2003;87(6):777-781.
75. Sternberg S. *Histology for Pathologists*. 1st ed. New York: Raven Press; 1992:164-167.

76. Hutchings M, Weller RO. Anatomical relationships of the pia mater to cerebral blood vessels in man. *J Neurosurg*. Sep 1 1986;65(3):316-325.
77. Lopes CA, Mair WG. Ultrastructure of the outer cortex and the pia mater in man. *Acta Neuropathol*. May 31 1974;28(1):79-86.
78. Millen J, Woollam D. On the nature of the pia mater. *Brain*. Sep 1 1961;84:514-520.
79. Patel TR, McAuley MA, McCulloch J. Effects on feline pial arterioles in situ of bosentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. Jul 21 1994;260(1):65-71.
80. Zhang ET, Inman CB, Weller RO. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat*. Jun 1 1990;170:111-123.
81. Nonaka H, Akima M, Nagayama T, Hatori T, Zhang Z, Ihara F. Microvasculature of the human cerebral meninges. *Neuropathology*. Jun 1 2003;23(2):129-135.
82. Krisch B, Leonhardt H, Oksche A. Compartments and perivascular arrangement of the meninges covering the cerebral cortex of the rat. *Cell Tissue Res*. Jan 1 1984;238(3):459-474.
83. Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. Jan 1 2010;119(1):55-73.
84. Chodobski A, Szymdynger-Chodobska J, McKinley MJ. Cerebrospinal fluid formation and absorption in dehydrated sheep. *Am J Physiol*. Aug 1 1998;275(2 Pt 2):F235-238.
85. Cserr HF. Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev*. Apr 1 1971;51(2):273-311.
86. Milhorat TH, Hammock MK, Fenstermacher JD, Levin VA. Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain. *Science*. Jul 23 1971;173(994):330-332.
87. Pollay M, Curl F. Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *Am J Physiol*. Oct 1 1967;213(4):1031-1038.
88. Redzic ZB, Segal MB. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev*. Oct 14 2004;56(12):1695-1716.
89. Curl FD, Pollay M. Transport of water and electrolytes between brain and ventricular fluid in the rabbit. *Exp Neurol*. Apr 1 1968;20(4):558-574.
90. Gómez DG, DiBenedetto AT, Pavese AM, Firpo A, Hershan DB, Potts DG. Development of arachnoid villi and granulations in man. *Acta Anat (Basel)*. Jan 1 1982;111(3):247-258.
91. Gomez DG, Potts DG. The surface characteristics of arachnoid granulations. *Arch Neurol*. Aug 1 1974;31(2):88-93.
92. Gomez DG, Potts DG, Deonarine V. Arachnoid granulations of the sheep. Structural and ultrastructural changes with varying pressure differences. *Arch Neurol*. Feb 1 1974;30(2):169-175.
93. Gomez DG, Potts G, Deonarine V, Reilly KF. Effects of pressure gradient changes on the morphology of arachnoid villi and granulations of the monkey. *Lab Invest*. Jun 1 1973;28(6):648-657.
94. Grzybowski DM, Holman DW, Katz SE, Lubow M. In vitro model of cerebrospinal fluid outflow through human arachnoid granulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1 2006;47(8):3664-3672.
95. Jayatilaka AD. An electron microscopic study of sheep arachnoid granulations. *J Anat*. Jul 1 1965;99(Pt 3):635-649.
96. Wolpaw ER, Schaumburg HH. Structure of the human arachnoid granulation. *J Neurosurg*. Dec 1 1972;37(6):724-727.

97. Yamashima T. On Arachnoid Villi and Meningiomas: Functional Implication of Ultrastructure, Cell Adhesion Mechanisms, and Extracellular Matrix Composition. *Pathol Oncol Res.* Jan 1 1996;2(3):144-149.
98. Welch K, Friedman V. The cerebrospinal fluid valves. *Brain.* Sep 1960;83:454-469.
99. Alksne JF, Lovings ET. Functional ultrastructure of the arachnoid villus. *Arch Neurol.* Nov 1972;27(5):371-377.
100. Milhorat TH. The third circulation revisited. *J Neurosurg.* Jun 1 1975;42(6):628-645.
101. Inoue K, Seker A, Osawa S, Alencastro LF, Matsushima T, Rhoton AL. Microsurgical and endoscopic anatomy of the supratentorial arachnoidal membranes and cisterns. *Neurosurgery.* Oct 1 2009;65(4):644-664; discussion 665.
102. Lilliequist B. The anatomy of the subarachnoid cisterns. *Acta radiologica.* Jan 1 1956;46(1-2):61-71.
103. Lilliequist B. The subarachnoid cisterns. An anatomic and roentgenologic study. *Acta radiologica Supplementum.* Jan 1 1959;185:1-108.
104. Rhoton AL. The posterior fossa cisterns. *Neurosurgery.* Sep 1 2000;47(3 Suppl):S287-297.
105. Davson H, Segal MB. *Physiology of the CSF and blood-brain barriers.* Boca Raton: CRC Press; 1996.
106. DuBoulay G, O'Connell J, Currie J, Bostch T, Verity P. Further investigation on the pulsatile movements in the cerebrospinal fluid pathway. *Acta Radiologica.* 1972;13:496-523.
107. Praetorius J. Water and solute secretion by the choroid plexus. *Pflugers Arch.* Apr 1 2007;454(1):1-18.
108. Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience.* Jan 1 2004;129(4):957-970.
109. Pollay M, Hisey B, Reynolds E, Tomkins P, Stevens FA, Smith R. Choroid plexus Na⁺/K⁺-activated adenosine triphosphatase and cerebrospinal fluid formation. *Neurosurgery.* Nov 1 1985;17(5):768-772.
110. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* Jul 1 2003;83(3):871-932.
111. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Hay J, Johnston M. Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am J Physiol.* Jan 1 1998;274(1 Pt 2):R88-96.
112. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol.* Mar 1 1999;276(3 Pt 2):R818-823.
113. Bulat M, Lupret V, Orešković D, Klarica M. Transventricular and transpial absorption of cerebrospinal fluid into cerebral microvessels. *Collegium antropologicum.* Jan 1 2008;32 Suppl 1:43-50.
114. Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D. Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal fluid research.* Dec 10 2004;1(1):2.
115. Koh L, Zakharov A, Johnston M. Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal fluid research.* Sep 20 2005;2:6.
116. Li J, Zhou J, Shi Y. Scanning electron microscopy of human cerebral meningeal stomata. *Ann Anat.* Jun 1 1996;178(3):259-261.
117. McComb JG. Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg.* Sep 1 1983;59(3):369-383.

118. Pollay M. The Function and Structure of the CSF Outflow System. *Cerebrospinal fluid research*. Jun 21 2010;7(1):9.
119. Silver I, Kim C, Mollanji R, Johnston M. Cerebrospinal fluid outflow resistance in sheep: impact of blocking cerebrospinal fluid transport through the cribriform plate. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Feb 1 2002;28(1):67-74.
120. Zakharov A. Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. *Microvasc Res*. Jan 1 2004;67(1):96-104.
121. Papaiconomou C, Bozanovic-Sosic R, Zakharov A, Johnston M. Does neonatal cerebrospinal fluid absorption occur via arachnoid projections or extracranial lymphatics? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Oct 1 2002;283(4):R869-876.
122. Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal fluid research*. Jan 1 2008;5:10.
123. Macaulay N, Zeuthen T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*. Sep 15 2009.
124. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci*. Dec 31 2008;31(1):37-43.
125. Kimelberg HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*. Jan 1 2004;129(4):851-860.
126. Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E. Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *Am J Physiol*. Jan 1 1980;238(1):F42-49.
127. Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO. Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol*. Jan 1 1992;83(3):233-239.
128. Spring KR. Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation. *News Physiol Sci*. Jun 1 1999;14:92-98.
129. Schultz SG. A century of (epithelial) transport physiology: from vitalism to molecular cloning. *Am J Physiol*. Jan 1 1998;274(1 Pt 1):C13-23.
130. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.
131. Frömter E, Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature New Biol*. Jan 5 1972;235(53):9-13.
132. Balaban 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 Membr Biol*. Sep 14 1979;49(4):363-390.
133. Gumbiner B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol*. Dec 1 1987;253(6 Pt 1):C749-758.
134. Harris PJ, Chatton JY, Tran PH, Bungay PM, Spring KR. pH, morphology, and diffusion in lateral intercellular spaces of epithelial cell monolayers. *Am J Physiol*. Jan 1 1994;266(1 Pt 1):C73-80.
135. Gorodeski GI, De Santis BJ, Goldfarb J, Utian WH, Hopfer U. Osmolar changes regulate the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol*. Oct 1 1995;269(4 Pt 1):C870-877.
136. Wright EM, Pietras RJ. Routes of nonelectrolyte permeation across epithelial membranes. *J Membr Biol*. Jul 12 1974;17(3):293-312.
137. Gorodeski GI. The cultured human cervical epithelium: a new model for studying paracellular transport. *J Soc Gynecol Investig*. Jan 1 1996;3(5):267-280.
138. Gorodeski GI, Goldfarb J. Extracellular ATP regulates transcervical permeability by modulating two distinct paracellular pathways. *Am J Physiol*. May 1 1997;272(5 Pt 1):C1602-1610.

139. Gorodeski GI, Jin W, Hopfer U. Extracellular Ca²⁺ directly regulates tight junctional permeability in the human cervical cell line CaSki. *Am J Physiol*. Feb 1 1997;272(2 Pt 1):C511-524.
140. Gorodeski GI, Peterson DE, De Santis BJ, Hopfer U. Nucleotide receptor-mediated decrease of tight-junctional permeability in cultured human cervical epithelium. *Am J Physiol*. Jun 1 1996;270(6 Pt 1):C1715-1725.
141. Gotoh Y, Kamada N, Momose D. The advantages of the Ussing chamber in drug absorption studies. *J Biomol Screen*. Aug 1 2005;10(5):517-523.
142. Clausen C. Impedance analysis in tight epithelia. *Meth Enzymol*. Jan 1 1989;171:628-642.
143. Diamond JM, Machen TE. Impedance analysis in epithelia and the problem of gastric acid secretion. *J Membr Biol*. Jan 1 1983;72(1-2):17-41.
144. Gordon LG, Kottra G, Frömter E. Electrical impedance analysis of leaky epithelia: theory, techniques, and leak artifact problems. *Meth Enzymol*. Jan 1 1989;171:642-663.
145. Mollanji R, Papaiconomou C, Boulton M, Midha R, Johnston M. Comparison of cerebrospinal fluid transport in fetal and adult sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Oct 1 2001;281(4):R1215-1223.
146. Watts SW. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Feb 1 2010;298(2):R254-260.
147. Kozakai T, Sakate M, Saida K. Regulation of endothelin-1 expression and function by nutrient stress in mouse colon epithelia. *Scand J Gastroenterol*. Jan 1 2008;43(7):886-894.
148. Gauthier C, Reddix R. Dual effect of [D-Pen(2), D-Pen(5)]enkephalin on ion transport in guinea pig colon. *Eur J Pharmacol*. Mar 3 2000;390(3):335-338.
149. Smith PL, Lee CP, Pullen M, et al. Nonpeptide endothelin receptor antagonists: IV. Identification of receptors in rabbit colonic mucosa and smooth muscle and correlation with physiological effects. *J Pharmacol Exp Ther*. Mar 1 1995;272(3):1204-1210.
150. Kiyohara T, Okuno M, Nakanishi T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Effect of endothelin 1 on ion transport in isolated rat colon. *Gastroenterology*. May 1 1993;104(5):1328-1336.
151. Moumami C, Xie Y, Kachur JF, Gaginella TS. Endothelin-1 stimulates contraction and ion transport in the rat colon: different mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther*. Jul 1 1992;262(1):409-414.
152. Brown MA, Smith PL. Endothelin: a potent stimulator of intestinal ion secretion in vitro. *Regul Pept*. Oct 1 1991;36(1):1-19.
153. Blouquit S, Sari A, Lombet A, et al. Effects of endothelin-1 on epithelial ion transport in human airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Aug 1 2003;29(2):245-251.
154. Satoh M, Shimura S, Ishihara H, Nagaki M, Sasaki H, Takishima T. Endothelin-1 stimulates chloride secretion across canine tracheal epithelium. *Respiration*. Jan 1 1992;59(3):145-150.
155. Tamaoki J, Kanemura T, Sakai N, Isono K, Kobayashi K, Takizawa T. Endothelin stimulates ciliary beat frequency and chloride secretion in canine cultured tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. May 1 1991;4(5):426-431.
156. Fouassier L, Chinet T, Robert B, et al. Endothelin-1 is synthesized and inhibits cyclic adenosine monophosphate- dependent anion secretion by an autocrine/paracrine mechanism in gallbladder epithelial cells. *J Clin Invest*. Jun 15 1998;101(12):2881-2888.
157. Angelova K, Puett D, Narayan P. Identification of endothelin receptor subtypes in sheep choroid plexus. *Endocrine*. Dec 1 1997;7(3):287-293.

158. Okada M, Kobayashi M, Maruyama H, et al. Effects of a selective endothelin A-receptor antagonist, BQ-123, in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Oct 1 1995;22(10):763-768.
159. Itoh S, Sasaki T, Asai A, Kuchino Y. Prevention of delayed vasospasm by an endothelin ETA receptor antagonist, BQ-123: change of ETA receptor mRNA expression in a canine subarachnoid hemorrhage model. *J Neurosurg*. Nov 1 1994;81(5):759-764.
160. Feger GI, Schilling L, Ehrenreich H, Wahl M. Endothelin-induced contraction and relaxation of rat isolated basilar artery: effect of BQ-123. *J Cereb Blood Flow Metab*. Sep 1 1994;14(5):845-852.
161. Clozel M, Watanabe H. BQ-123, a peptidic endothelin ETA receptor antagonist, prevents the early cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage after intracisternal but not intravenous injection. *Life Sci*. Jan 1 1993;52(9):825-834.
162. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci*. Jan 1 1992;50(4):247-255.
163. Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. *Cardiovascular drug reviews*. Jun 19 2002;20(1):53-66.
164. Feger GI, Schilling L, Ehrenreich H, Wahl M. Endothelium-dependent relaxation counteracting the contractile action of endothelin-1 is partly due to ETB receptor activation. *Research in experimental medicine Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*. Jan 1 1997;196(6):327-337.
165. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 24 1994;91(11):4892-4896.
166. Vatter H, Konczalla J, Weidauer S, et al. Characterization of the endothelin-B receptor expression and vasomotor function during experimental cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. Jun 1 2007;60(6):1100-1108; discussion 1108-1109.
167. Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. Jun 1 2002;54(2):219-226.
168. Szok D, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. In depth pharmacological characterization of endothelin B receptors in the rat middle cerebral artery. *Neurosci Lett*. Nov 13 2001;314(1-2):69-72.
169. Sokolovsky M, Shraga-Levine Z. Sarafotoxins and their relationship to the endothelin family of peptides. In: Warner TD, ed. *Endothelin and its Inhibitors*: Springer; 2001:11-34.
170. Pierre LN, Davenport AP. Blockade and reversal of endothelin-induced constriction in pial arteries from human brain. *Stroke*. Mar 1 1999;30(3):638-643.
171. Yamaga S, Tsutsumi K, Niwa M, et al. Endothelin receptor in microvessels isolated from human meningiomas: quantification with radioluminography. *Cell Mol Neurobiol*. Jun 1 1995;15(3):327-340.
172. Kawai N, Yamamoto T, Yamamoto H, McCarron RM, Spatz M. Endothelin 1 stimulates Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁻ cotransport through ETA receptors and protein kinase C-dependent pathway in cerebral capillary endothelium. *J Neurochem*. Oct 1 1995;65(4):1588-1596.
173. Williams DL, Jones KL, Pettibone DJ, Lis EV, Clineschmidt BV. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 15 1991;175(2):556-561.

174. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*. Oct 14 1988;242(4876):268-270.
175. Schonher W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *AJP: Cell Physiology*. Apr 11 2007;293(2):C509-C536.
176. Ward SC. Novel Receptors for Ouabain: Studies in Adrenocortical Cells and Membranes. *Hypertension*. Feb 1 2002;39(2):536-542.
177. Halperin JA, Riordan JF, Tosteson DC. Characteristics of an inhibitor of the Na⁺/K⁺ pump in human cerebrospinal fluid. *J Biol Chem*. Jan 15 1988;263(2):646-651.
178. Bowler JM, Purves RD, Macknight AD. Effects of potassium-free media and ouabain on epithelial cell composition in toad urinary bladder studied with X-ray microanalysis. *J Membr Biol*. Aug 1 1991;123(2):115-132.
179. Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol*. Jul 1 1990;81(1):19-27.
180. Garty H. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J*. May 1 1994;8(8):522-528.
181. Matalon S, Bauer ML, Benos DJ, et al. Fetal lung epithelial cells contain two populations of amiloride-sensitive Na⁺ channels. *The American journal of physiology*. Apr 1993;264(4 Pt 1):L357-364.
182. Matalon S, Benos DJ, Jackson RM. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na⁺ channels in alveolar epithelial cells. *The American journal of physiology*. Jul 1996;271(1 Pt 1):L1-22.
183. Matalon S, Bridges RJ, Benos DJ. Amiloride-inhibitable Na⁺ conductive pathways in alveolar type II pneumocytes. *The American journal of physiology*. Feb 1991;260(2 Pt 1):L90-96.
184. Nie H-G, Tucker T, Su X-F, et al. Expression and regulation of epithelial Na⁺ channels by nucleotides in pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. May 1 2009;40(5):543-554.
185. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. Jan 23 1992;355(6358):353-356.
186. Kawanabe Y, Hashimoto N, Masaki T. Ca²⁺ channels involved in endothelin-induced mitogenic response in carotid artery vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*. Feb 1 2002;282(2):C330-337.
187. Ostuni MA, Marazova K, Peranzi G, et al. Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Jun 2004;286(6):G1069-1080.
188. Kaditis A, Alexopoulos E, Ntamagka G, et al. Serum nitrite and nitrate levels in children with obstructive sleep-disordered breathing. *Sleep Med*. Mar 2010;11(3):258-262.
189. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. May 15 2007;851(1-2):51-70.
190. Mutsaers S. The mesothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Jan 1 2004;36(1):9-16.
191. Feng B, Strichartz G. Endothelin-1 raises excitability and reduces potassium currents in sensory neurons. *Brain Res Bull*. Aug 14 2009;79(6):345-350.

192. Hagiwara K, Nunoki K, Ishii K, Abe T, Yanagisawa T. Differential inhibition of transient outward currents of Kv1.4 and Kv4.3 by endothelin. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 17 2003;310(2):634-640.
193. Kobayashi S, Nakaya H, Takizawa T, et al. Endothelin-1 partially inhibits ATP-sensitive K⁺ current in guinea pig ventricular cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* Jan 1 1996;27(1):12-19.
194. Mayhan WG, Mayhan JF, Sun H, Patel KP. In vivo properties of potassium channels in cerebral blood vessels during diabetes mellitus. *Microcirculation.* Jan 1 2004;11(7):605-613.
195. Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki T, et al. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circulation Research.* Mar 1 1992;70(3):612-616.
196. Rainbow RD, Hardy MEL, Standen NB, Davies NW. Glucose reduces endothelin inhibition of voltage-gated potassium channels in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol (Lond).* Sep 15 2006;575(Pt 3):833-844.
197. Rainbow RD, Norman RI, Everitt DE, Brignell JL, Davies NW, Standen NB. Endothelin-I and angiotensin II inhibit arterial voltage-gated K⁺ channels through different protein kinase C isoenzymes. *Cardiovasc Res.* Aug 1 2009;83(3):493-500.
198. Shimoda LA, Sylvester JT, Booth GM, et al. Inhibition of voltage-gated K(+) currents by endothelin-1 in human pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Nov 1 2001;281(5):L1115-1122.
199. Shimoda LA, Sylvester JT, Sham JS. Inhibition of voltage-gated K⁺ current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am J Physiol.* May 1 1998;274(5 Pt 1):L842-853.
200. Kasemsri T, Armstead WM. Endothelin impairs ATP-sensitive K⁺ channel function after brain injury. *Am J Physiol.* Dec 1 1997;273(6 Pt 2):H2639-2647.
201. Park WS, Ko EA, Han J, Kim N, Earm YE. Endothelin-1 acts via protein kinase C to block KATP channels in rabbit coronary and pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* Feb 2005;45(2):99-108.
202. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol.* Jun 30 1999;375(1-3):133-138.
203. Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Feb 1 1999;26(2):149-153.
204. Sokolovsky M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell Mol Neurobiol.* Oct 1 1995;15(5):561-571.
205. de Aguilera EM, Irurzun A, Vila JM, Aldasoro M, Galeote MS, Lluch S. Role of endothelium and calcium channels in endothelin-induced contraction of human cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* Mar 1 1990;99(3):439-440.
206. Albert AP, Large WA. Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium.* Jan 1 2003;33(5-6):345-356.
207. Ceccarelli F, Scavuzzo MC, Giusti L, et al. ETA receptor-mediated Ca²⁺ mobilisation in H9c2 cardiac cells. *Biochem Pharmacol.* Mar 1 2003;65(5):783-793.
208. Chen C, Wagoner PK. Endothelin induces a nonselective cation current in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* Aug 1 1991;69(2):447-454.
209. Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, et al. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* May 1 1989;86(10):3915-3918.

210. Guibert C, Beech DJ. Positive and negative coupling of the endothelin ETA receptor to Ca²⁺-permeable channels in rabbit cerebral cortex arterioles. *J Physiol (Lond)*. Feb 1 1999;514 (Pt 3):843-856.
211. Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N. Effects of the Ca⁺⁺-permeable nonselective cation channel blocker LOE 908 on subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm in the basilar artery in rabbits. *J Neurosurg*. Mar 1 2003;98(3):561-564.
212. Kawanabe Y, Nauli SM. Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal*. Aug 1 2005;17(8):911-916.
213. Kawanabe Y, Okamoto Y, Enoki T, Hashimoto N, Masaki T. Ca(2+) channels activated by endothelin-1 in CHO cells expressing endothelin-A or endothelin-B receptors. *Am J Physiol, Cell Physiol*. Nov 1 2001;281(5):C1676-1685.
214. Kawanabe Y, Okamoto Y, Hashimoto N, Masaki T. Molecular mechanisms for activation of voltage-independent Ca²⁺ channels by endothelin-1/endothelin-A receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. Nov 1 2004;44 Suppl 1:S219-223.
215. Marsault R, Vigne P, Frelin C. The effect of extracellular calcium on the contractile action of endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 31 1990;171(1):301-305.
216. Spatz M, Kawai N, Bembry J, Lenz F, McCarron RM. Human brain capillary endothelium: modulation of K⁺ efflux and K⁺, Ca²⁺ uptake by endothelin. *Neurochem Res*. Aug 1 1998;23(8):1125-1132.
217. Zuccarello M, Boccaletti R, Tosun M, Rapoport RM. Role of extracellular Ca²⁺ in subarachnoid hemorrhage-induced spasm of the rabbit basilar artery. *Stroke*. Oct 1 1996;27(10):1896-1902.
218. Cheong A, Quinn K, Dedman AM, Beech DJ. Activation thresholds of K(V), BK and Cl(Ca) channels in smooth muscle cells in pial precapillary arterioles. *J Vasc Res*. Jan 1 2002;39(2):122-130.
219. Hu S, Kim HS, Savage P, Jeng AY. Activation of BK(Ca) channel via endothelin ET(A) receptors in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. Apr 18 1997;324(2-3):277-282.
220. Kwan H-Y, Shen B, Ma X, et al. TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Mar 13 2009;104(5):670-678.
221. Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, Zhang Z-D, Nikitina E, Macdonald RL. Voltage-gated K⁺ channel dysfunction in myocytes from a dog model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. Apr 1 2008;28(4):797-811.
222. Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, et al. Temporal profile of potassium channel dysfunction in cerebrovascular smooth muscle after experimental subarachnoid haemorrhage. *Neurosci Lett*. Jul 25 2008;440(1):81-86.
223. Kwan AL, Lin CL, Yanamoto H, Howng SL, Kassell NF, Lee KS. Systemic administration of the potassium channel activator cromakalim attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. Feb 1 1998;42(2):347-350; discussion 350-341.
224. Omeis I, Chen W, Jhanwar-Uniyal M, Rozental R, Murali R, Abrahams JM. Prevention of cerebral vasospasm by local delivery of cromakalim with a biodegradable controlled-release system in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. May 1 2009;110(5):1015-1020.
225. Onoue H, Katusic ZS. Subarachnoid hemorrhage and the role of potassium channels in relaxations of canine basilar artery to nitrovasodilators. *J Cereb Blood Flow Metab*. Feb 1 1998;18(2):186-195.

226. Wellman GC. Ion channels and calcium signaling in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* Oct 1 2006;28(7):690-702.
227. Zhang H, Cook D. Cerebral vascular smooth muscle potassium channels and their possible role in the management of vasospasm. *Pharmacol Toxicol.* Dec 1 1994;75(6):327-336.
228. Zuccarello M, Bonasso CL, Lewis AI, Sperelakis N, Rapoport RM. Relaxation of subarachnoid hemorrhage-induced spasm of rabbit basilar artery by the K⁺ channel activator cromakalim. *Stroke.* Feb 1 1996;27(2):311-316.
229. Ishiguro M, Murakami K, Link T, et al. Acute and chronic effects of oxyhemoglobin on voltage-dependent ion channels in cerebral arteries. *Acta Neurochir Suppl.* Jan 1 2008;104:99-102.
230. Kim CJ, Kim KW, Park JW, Lee JC, Zhang JH. Role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in erythrocyte lysate-induced contraction of rabbit cerebral artery. *Neurol Res.* Oct 1 1999;21(7):705-711.
231. Link TE, Murakami K, Beem-Miller M, Tranmer BI, Wellman GC. Oxyhemoglobin-induced expression of R-type Ca²⁺ channels in cerebral arteries. *Stroke.* Jul 1 2008;39(7):2122-2128.
232. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.* Jun 1 1997;49(2):137-142.
233. Ahlborg G, Lundberg JM. Nitric oxide-endothelin-1 interaction in humans. *J Appl Physiol.* May 1 1997;82(5):1593-1600.
234. Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension.* Nov 1 1990;16(5):477-483.
235. Mathison Y, Israel A. Role of endothelin type B receptor in NO/cGMP signaling pathway in rat median eminence. *Cell Mol Neurobiol.* Dec 1 2002;22(5-6):783-795.
236. Yamazaki J, Kitamura K. Cell-to-cell communication via nitric oxide modulation of oscillatory Cl⁻ currents in rat intact cerebral arterioles. *J Physiol (Lond).* Oct 1 2001;536(Pt 1):67-78.
237. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(4):617-638.
238. Segal MB, Pollay M. The secretion of cerebrospinal fluid. *Exp Eye Res.* Jan 1 1977;25 Suppl:127-148.
239. Benos DJ, Simon SA, Mandel LJ, Cala PM. Effect of amiloride and some of its analogues of cation transport in isolated frog skin and thin lipid membranes. *The Journal of general physiology.* Jul 1976;68(1):43-63.
240. Benos DJ, Mandel LJ. Irreversible inhibition of sodium entry sites in frog skin by a photosensitive amiloride analog. *Science.* Mar 17 1978;199(4334):1205-1206.
241. Sariban-Sohraby S, Latorre R, Burg M, Olans L, Benos D. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channels reconstituted into planar lipid bilayer membranes. *Nature.* Mar 1-7 1984;308(5954):80-82.
242. Matalon S, Kirk KL, Bubien JK, et al. Immunocytochemical and functional characterization of Na⁺ conductance in adult alveolar pneumocytes. *The American journal of physiology.* May 1992;262(5 Pt 1):C1228-1238.
243. Haskell JF, Yue G, Benos DJ, Matalon S. Upregulation of sodium conductive pathways in alveolar type II cells in sublethal hyperoxia. *The American journal of physiology.* Jan 1994;266(1 Pt 1):L30-37.
244. Oh Y, Matalon S, Kleyman TR, Benos DJ. Biochemical evidence for the presence of an amiloride binding protein in adult alveolar type II pneumocytes. *The Journal of biological chemistry.* Sep 15 1992;267(26):18498-18504.

245. Senyk O, Ismailov I, Bradford AL, Baker RR, Matalon S, Benos DJ. Reconstitution of immunopurified alveolar type II cell Na⁺ channel protein into planar lipid bilayers. *The American journal of physiology*. May 1995;268(5 Pt 1):C1148-1156.
246. Yue G, Russell WJ, Benos DJ, Jackson RM, Olman MA, Matalon S. Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 29 1995;92(18):8418-8422.
247. Ji H-L, Su X-F, Kedar S, et al. Delta-subunit confers novel biophysical features to alpha beta gamma-human epithelial sodium channel (ENaC) via a physical interaction. *J Biol Chem*. Mar 24 2006;281(12):8233-8241.
248. Brockway LM, Zhou Z-H, Bubien JK, Jovov B, Benos DJ, Keyser KT. Rabbit retinal neurons and glia express a variety of ENaC/DEG subunits. *Am J Physiol, Cell Physiol*. Jul 1 2002;283(1):C126-134.
249. Giraldez T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, et al. Cloning and functional expression of a new epithelial sodium channel delta subunit isoform differentially expressed in neurons of the human and monkey telencephalon. *Journal of neurochemistry*. Aug 2007;102(4):1304-1315.
250. Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C, Rauh R. The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *The Journal of biological chemistry*. Oct 16 2009;284(42):29024-29040.
251. Ross SB, Fuller CM, Bubien JK, Benos DJ. Amiloride-sensitive Na⁺ channels contribute to regulatory volume increases in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep 2007;293(3):C1181-1185.
252. Wesch D, Miranda P, Afonso-Oramas D, et al. The neuronal-specific SGK1.1 kinase regulates {delta}-epithelial Na⁺ channel independently of PY motifs and couples it to phospholipase C signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. Oct 2010;299(4):C779-790.
253. Garty H, Benos DJ. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiological reviews*. Apr 1988;68(2):309-373.