



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**“Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΣΤΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ
ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ ΠΡΟΒΑΤΟΥ,,**

Υπό

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Δ. ΚΟΥΡΤΗ

ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΣ 2015

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση των
απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

©2015 Παναγιώτα Κούρτη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6^η/02-07-2012

ΓΣΕΣ)

- 1^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης**
(Επιβλέπων) Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς**
Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Κωνσταντίνος Τεπετές**
Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Λάζαρος Σακκάς**
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Χρυσή Χατζόγλου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Φίλιππος Τρυποσκιάδης**
Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση αυτής της μελέτης αποτέλεσε για μένα ένα ενδιαφέρον ταξίδι στα μονοπάτια της γνώσης και της επιστήμης. Θα ήθελα λοιπόν να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη στους ανθρώπους που μου έδωσαν αυτήν την ευκαιρία και στάθηκαν δίπλα μου μέχρι την ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Πρώτα απ'όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιωάννη Στεφανίδη, επιστημονικό υπεύθυνο αυτής της διατριβής, για τη εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την αμέριστη συμπαράστασή του. Οι συμβουλές του και η βοήθειά του ήταν καθοριστικής σημασίας για τη ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου τόσο στον Καθηγητή Φυσιολογίας Αδάμ-Πασχάλη Μολυβδά όσο και στον Καθηγητή Πνευμονολογίας Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη.

Θερμά ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Χρύσα Χατζόγλου για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές της.

Πολλή σημαντική ήταν η βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση αυτής της έρευνας ο Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Σωτήρης Ζαρογιάννης. Τον ευχαριστώ πολύ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑ: Παναγιώτα

ΕΠΙΘΕΤΟ: Κούρτη

ΗΜ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 09/03/1974

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Α. Συγγρού 2-ΤΚ 41335 Λάρισα

EMAIL: giotakourti@yahoo.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1994-2000 Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή Σόφιας
Βαθμός: 8,3/10

2011 Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Νεφρολογίας
Παν/κο Νοσοκομείο Λάρισας

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΙΩΝ

Ελληνική Νεφρολογική Εταιρία

Ιατρικός Σύλλογος Λάρισας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Kourti P, Zarogiannis SG, Liakopoulos V, Karioti A, Eleftheriadis T, Hatzoglou C, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Endothelin-1 acutely reduces the permeability of visceral sheep peritoneum in vitro through both endothelin-A and endothelin-B receptors.

Artif Organs. 2013 Mar; 37(3):308-12

2. Rountas C, Sioka E, Karagounis A, Golphinopoulos S, **Kourti P**, Stefanidis I, Zacharoulis D, Tzortzis V.

Spontaneous perirenal hemorrhage in end-stage renal disease treated with selective embolization.

Ren Fail. 2012; 34(8):1037

3. Arampatzis S, Giannakoulas N, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, **Kourti P**, Karasavvidou F, Matsouka P, Stefanidis I.

Simultaneous clinical resolution of focal segmental glomerulosclerosis associated with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab.

BMC Nephrol. 2011 Jul 5; 12:33

4. Liakopoulos V, Arampatzis S, **Kourti P**, Tsolkas T, Zarogiannis S, Eleftheriadis T, Giannopoulou M, Stefanidis I

Aeromonas hydrophila as a causative organism in peritoneal dialysis-related peritonitis: case report and review of the literature.

Clin Nephrol. 2011 Feb;75 Suppl 1:65-8

5. Liakopoulos V, Zarogiannis S, **Kourti P**, Hatzoglou C, Karioti A, Arampatzis S, Giannopoulou M, Musso C, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I

Effect of cimetidine on the electrophysiologic profile of isolated visceral sheep peritoneum.

Adv Perit Dial. 2009; 25:20-3

6. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, **Kourti P**, Giannopoulou M, Arampatzis S, Liakopoulos V, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Spirolactone increases permeability of visceral sheep peritoneum.

AdvPerit Dial. 2009; 25:16-9

7. Liakopoulos V, Dovas S, Simopoulou T, Zarogiannis S, Giannopoulou M, **Kourti P**, Arampatzis S, Eleftheriadis T, Stefanidis I.

Acute renal failure: a rare presentation of hypothyroidism.

Ren Fail. 2009; 31(4):323-6

8. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Liakopoulos V, **Kourti P**, Giannopoulou M, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Rapid effect of dexamethasone on the permeability of visceral sheep peritoneum.

AdvPerit Dial. 2008; 24:2-6

9. Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, **Kourti P**, Vogiatzidis K, Potamianos S, Eleftheriadis T, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of sodium-potassium pump inhibition by ouabain on the permeability of isolated visceral sheep peritoneum.

AdvPerit Dial. 2007; 23:43 -7

10. **Kourti P**, Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Giannopoulou M, Chronopoulou I, Mertens PR, Potamianos S, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of endothelin-1 on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

AdvPerit Dial. 2007; 23:38-42

11. Zarogiannis S, Vogiatzidis K, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Potamianos S, Eleftheriadis T, Dovas S, **Kourti P**, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

mu-Opioid stimulation of isolated parietal sheep peritoneum decreases peritoneal permeability in vitro.

Adv Perit Dial. 2007; 23:34-7

12. Stefanidis I, Liakopoulos V, **Kourti P**, Zarogiannis S, Poultsidi A, Mertens PR, Salmas M, Hatzoglou C, Gourgoulialis K, Molyvdas PA.

Amiloride-sensitive sodium channels on the parietal human peritoneum: evidence by ussing-type chamber experiments.

ASAIO J. 2007 May-Jun; 53(3):335-8

13. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, **Kourti P**, Poultsidi A, Eleftheriadis T, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Inhibition by mercuric chloride of aquaporin-1 in the parietal sheep peritoneum: an electrophysiologic study.

AdvPerit Dial. 2006; 22:7-10

14. Zarogiannis S, **Kourti P**, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultsidi A, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

AdvPerit Dial. 2005; 21:5-8

15. Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, **Kourti P**, Poultsidi A, Mertens PR, Gourgoulianis K, Molyvdas PA.

Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: ussing-type chamber experiments.

Artif Organs. 2005 Nov; 29(11):919-22

16. Liakopoulos V, Wurth P, Mertens PR, Eleftheriadis T, **Kourti P**, Voliotis G, Heintz B, Koukoulis GN, Stefanidis I.

Endothelin-1 plasma levels in hemodialysis treatment--the influence of type 2 diabetes.

Ren Fail. 2005; 27(5):515-22

17. Liakopoulos V, Petinaki E, Bouchlariotou S, Mertens PR, Trakala M, **Kourti P**, Riehl J, Ikononov V, Stefanidis I.

Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae) peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD).

Clin Nephrol. 2004 Nov; 62(5):391-6. Review

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Λιακόπουλος Β, Ζαρογιάννης Σ, Χατζόγλου Χ, **Κούρτη Π**, Ζέγγος Ν, Καρατόλιας Ν, Γουργουλιάνης Κ, Μολυβδάς ΠΑ, Στεφανίδης Ι.

Η επίδραση της αδρεναλίνης στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες του περισπλάχνιου πετάλου του περιτοναίου προβάτου.

Ελληνική Νεφρολογία, 2005; 17: 54-58

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Liakopoulos V, Zarogiannis S, **Kourt P**^{*}, Hatzoglou C, Karioti A, Arampatzis S, Giannopoulou M, Musso C, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of cimetidine on the electrophysiologic profile of isolated visceral sheep peritoneum.

29th Annual Dialysis Conference, Houston, Texas, USA, March 2009

2. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, **Kourti P**, Giannopoulou M, Arampatzis S, Liakopoulos V, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Spirolactone increases permeability of visceral sheep peritoneum.

29th Annual Dialysis Conference, Houston, Texas, USA, March 2009

3. Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, **Kourti P**, Liakopoulos V, Gourgoulisanis K, Molyvdas P.A, Stefanidis I.

Rapid effect of dexamethasone on the permeability of the visceral sheep peritoneum.

28th Annual Dialysis Conference, March, 2008, Orlando, Florida, USA

4. Liakopoulos V, Zarogiannis S, **Kourti P**^{*}, Hatzoglou C, Karioti A, Musso C, Gourgoulisanis K, Molyvdas P.A, Stefanidis I.

Effect of cimetidine on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

**14th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis, June 2008,
Istanbul, Turkey**

5. Kourti P*, Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Giannopoulou M, Atmatzidis E, Gourgoulialis K, Molyvdas P.A, Stefanidis I.

Effect of endothelin-1 on the electrophysiological profile of isolated visceral sheep peritoneum.

10th International Conference on Endothelin, Bergamo, Italy September 2007

6. Kourti P*, Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Giannopoulou M, Chronopoulou I, Mertens PR, Potamianos S, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of endothelin-1 on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

27th Annual Dialysis Conference, Denver, Colorado, USA, February 2007

7. Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, **Kourti P**, Vogiatzidis K, Potamianos S, Eleftheriadis T, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of sodium-potassium pump inhibition by ouabain on the permeability of isolated visceral sheep peritoneum.

27th Annual Dialysis Conference, Denver, Colorado, USA, February 2007

8. Zarogiannis S, **Kourti P**, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Giannopoulou M, Dovas S, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I

Endothelin-1 decreases the permeability of isolated visceral sheep peritoneum.

**17th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,
June 2007, Amsterdam, The Netherlands**

9. Kourti P, Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Giannopoulou M, Dovas S, Oikonomidou E, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Stefanidis I

Effect of Endothelin-1 on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

XLIVERA-EDTA Congress, June 2007, Barcelona, Spain

10. Kourti P, Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Karioti A, Kanaki A, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I

Effect of ET-1 on the electrophysiological profile of isolated visceral sheep peritoneum.

40th American Society of Nephrology, November, 2007, San Francisco, USA.

11. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, **Kourti P**, Poultzidi A, Eleftheriadis T, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect Of The Inhibition Of Aquaporin-1 By HgCl₂ On The Electrophysiological Profile Of Parietal Sheep Peritoneum.

26th Annual Dialysis Conference, San Francisco, California, USA, February 2006

12. Zarogiannis S, **Kourti P**, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultzidi A, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum.

25th Annual Dialysis Conference, Tampa Bay, Florida, USA, February 2005

13. Zarogiannis S, Liakopoulos V, **Kourti P**, Hatzoglou C, Poultzidi A, Oikonomidou E, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of the inhibition of aquaporin-1 by HgCl₂ on the electrophysiological profile of parietal sheep peritoneum.

ANIMOD 2005, 6th International Meeting on Animal Models in Peritoneal Dialysis, Prague, Czech Republic, October 2005

14. Zarogiannis S, **Kourti P**, Liakopoulos V, Poultzidi A, Hatzoglou C, Gourgoulianis K, Molyvdas PA, Stefanidis I.

Effect of Amiloride on the Electrophysiological Profile of Isolated Human Parietal Peritoneum.

ASN Renal Week 2005, Philadelphia, Pennsylvania, USA, November 2005

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Λιακόπουλος Β, Ζαρογιάννης Σ*, Χατζόγλου Χ, **Κούρτη Π**, Γουργουλιάνης Κ, Μολυβδάς ΠΑ, Στεφανίδης Ι.

Επίδραση αδρεναλίνης στο ηλεκτροφυσιολογικό προφίλ τοιχωματικού περιτοναίου προβάτου.

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Ρόδος, Ιούνιος 2004

2. Λιακόπουλος Β, Ζαρογιάννης Σ, **Κούρτη Π**, Πουλτσίδα Α, Χατζόγλου Χ, Ελευθεριάδης Θ, Γουργουλιάνης Κ, Μολυβδάς ΠΑ, Στεφανίδης Ι.

Η επίδραση της αμιλορίδης στη διαμεσοθηλιακή μεταφορά νατρίου σε τοιχωματικό περιτόναιο ανθρώπου.

14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Χαλκιδική, Ιούνιος 2006

**“Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΣΤΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ
ΤΟΥ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ ΠΡΟΒΑΤΟΥ,,**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΟΥΡΤΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης (Επιβλέπων)

Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς

Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
Περιτοναϊκή κάθαρση	17
Ιστορική αναδρομή	18
Επιδημιολογικά στοιχεία.....	22
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ	23
Ανατομία του περιτοναίου.....	23
Αιμάτωση του περιτοναίου.....	25
Περιτοναϊκό μικροαγγειακό δίκτυο	25
Νεύρωση του περιτοναίου.....	27
Κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του περιτοναϊκού υγρού	28
Δομή και λειτουργία των μεσοθηλιακών κυττάρων	29
Λειτουργίες της περιτοναϊκής μεμβράνης	31
Το περιτόναιο ως μεμβράνη κάθαρσης.....	32
Μηχανισμοί μεταφοράς στο περιτόναιο	36
Μορφολογικές αλλαγές στο περιτόναιο	40
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1	45
Σύνθεση της ενδοθηλίνης-1	49
Μηχανισμός δράσης της ενδοθηλίνης-1	52
Ενδοθηλίνη-1 και καρδιαγγειακό σύστημα	56
Ενδοθηλίνη-1 και νεφρός.....	59
Ενδοθηλίνη-1 και αναπνευστικό σύστημα	60
Ενδοθηλίνη-1 και νευρικό σύστημα	61
Ενδοθηλίνη-1 και καρκινογένεση	62
Ενδοθηλίνη-1 και συστηματικά νοσήματα	63
Ενδοθηλίνη-1 και ανάπτυξη ουλώδους ιστού	64
Υποδοχείς της ενδοθηλίνης-1	66
Ανταγωνιστές της ενδοθηλίνης-1.....	69
Ενδοθηλίνη-1 και περιτοναϊκή κάθαρση	71
Σαραφοτοξίνες	73
Σκοπός της μελέτης	74
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	76
ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΟ	77
Μελέτη διαπερατότητας μεμβρανών με τη μέθοδο Ussing.....	77
Μέτρηση αντίστασης R σε επιθηλιακό ιστό	78
Συλλογή και προετοιμασία του ιστού	81
Πειραματική διαδικασία	81
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	108
SUMMARY	109
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Περιτοναϊκή κάθαρση

Η ανάπτυξη της περιτοναϊκής κάθαρσης αποτέλεσε μια πρόκληση για την επιστήμη και πολύ περισσότερο για την ιατρική. Για αρκετά χρόνια, από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, μια πλειάδα επιστημόνων εργάστηκαν με υπομονή και εφευρετικότητα για να καταστήσουν την περιτοναϊκή κάθαρση μια εφαρμόσιμη και σωτήρια θεραπεία για ασθενείς με σοβαρές νόσους των νεφρών.

Η περιτοναϊκή κάθαρση αποτελεί μια μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η επιβίωση των ασθενών που υποβάλλονται σ' αυτή, φαίνεται να είναι καλύτερη τον πρώτο χρόνο, συγκριτικά με τους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση. Το ποσοστό των ασθενών που μπορεί να εφαρμόσει τη μέθοδο αυτή πέραν της πενταετίας κυμαίνεται στο 50-70%. Η διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης για μικρομοριακές ουσίες αυξάνει βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου και έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της υπερδιήθησης και την απώλεια της μεθόδου.

Το μεσοθήλιο, όπως είναι γνωστό, αποτελεί το βασικό φραγμό διακίνησης ιόντων και ύδατος και είναι ουσιώδους σημασίας για την αποτελεσματικότητα της περιτοναϊκής κάθαρσης. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ξεκάθαρα ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ίνωσης της περιτοναϊκής μεμβράνης και στην απώλεια των χαρακτηριστικών της ως μεμβράνη κάθαρσης. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί σκλήρυνσης του περιτοναίου δεν έχουν μελετηθεί σε όλη τους την έκταση, είναι βέβαιο ότι είναι αρκετοί οι παράγοντες που

εμπλέκονται σ' αυτήν τη διαδικασία. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται τοπικά ή εντοπίζονται στη συστηματική κυκλοφορία, ως αποτέλεσμα της εφαρμογής διαλυμάτων χαμηλής βιοσυμβατότητας και των συχνών επεισοδίων περιτονίτιδας, φαίνεται να διαδραματίζουν έναν καθοριστικό ρόλο.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων της περιτοναϊκής μεμβράνης δεν έχουν πλήρως μελετηθεί. Θα ήταν λοιπόν χρήσιμη η προσθήκη οποιασδήποτε γνώσης που αφορά στις ιδιότητες των κυττάρων αυτών, με απώτερο στόχο την κλινική εφαρμογή των ευρημάτων στον τομέα της περιτοναϊκής κάθαρσης.

Ιστορική αναδρομή

Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα για πρώτη φορά περιγράφηκε το ουραιμικό σύνδρομο ως αποτέλεσμα της συγκέντρωσης τοξικών ουσιών, παραπροϊόντων του μεταβολισμού, στο αίμα και στους ιστούς που φυσιολογικά αποβάλλονται από τα ούρα (Cameron, 2002). Η αντιμετώπιση αυτού του συνδρόμου, περιελάμβανε αναποτελεσματικές μεθόδους όπως διατροφικές παρεμβάσεις, χορήγηση υγρών με επακόλουθη αυξημένη διούρηση, εφίδρωση και χρήση καθαρτικών μέσων (Maher, 1991).

Αν και η περιτοναϊκή μεμβράνη είχε περιγραφεί ακόμα και από τους ταριχευτές στην αρχαία Αίγυπτο, εκτεταμένες μελέτες σε ζώα καθώς και παρατηρήσεις σε ανθρώπους άρχισαν να πραγματοποιούνται συστηματικά στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης της χειρουργικής της κοιλιάς. Στις αρχές του 1860, ο von Recklinghausen περιέγραψε τα μεσοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν την περιτοναϊκή κοιλότητα και το λεμφικό δίκτυο

(*Recklinghausen, 1862*). Το 1877 ο Wegner μελέτησε τη διακίνηση ουσιών και υγρών μέσω της περιτοναϊκής μεμβράνης σε κουνέλια (*Wegner, 1877*). Τους παραπάνω ερευνητές ακολούθησε μια πλειάδα επιστημόνων που συνέχισε να εργάζεται πάνω στη μελέτη της δομής και της φυσιολογίας της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Πρώτος ο Georg Ganter συνέλαβε την ιδέα να χρησιμοποιηθούν οι φυσικές μεμβράνες του οργανισμού ως φίλτρα διάλυσης. Έτσι, το 1923 δημοσίευσε στο μοναδικό του άρθρο τα αποτελέσματα πειραμάτων, τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους, απομάκρυνσης ουραιμικών τοξινών με τη χρήση περιτοναϊκών πλύσεων (*Ganter, 1923*). Δυστυχώς στη συνέχεια εγκατέλειψε την έρευνα διότι η μέθοδος αυτή δεν στάθηκε αρκετή ώστε να σώσει τη ζωή των ασθενών του.

Η μοντέρνα εποχή της περιτοναϊκής άρχισε το 1959 με τον Morton Maxwell, ο οποίος είχε ήδη ξεκινήσει να μελετάει τη φυσιολογία του περιτοναίου μαζί με τον Homer Smith στο πανεπιστήμιο της Νέας Υόρκης (*McBride et al, 1984*). Οι παραπάνω ερευνητές ήταν οι πρώτοι που εισήγαγαν νάιλον καθετήρες και αποστειρωμένα διαλύματα κάθαρσης σε γυάλινα μπουκάλια.

Παράλληλα, μια άλλη ομάδα ερευνητών υπό τη καθοδήγηση των Doolan και Murphy στο Oakland Hospital στην Καλιφόρνια, βελτίωσε περαιτέρω την ποιότητα των καθετήρων με τη χρήση πολυβινυλοχλωριδίου και τροποποίησε τη σύσταση των προϋπαρχόντων διαλυμάτων. Επομένως, στις αρχές της δεκαετίας του 1960, για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η περιοδική περιτοναϊκή κάθαρση σε μια γυναίκα με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια για επτά μήνες, (*McBride et al, 1985*).

Επίσης, το 1960 ο Boen στο Σιάτλ, εισήγαγε την αυτοματοποιημένη περιτοναϊκή κάθαρση κατ' οίκον, όταν ανέπτυξε μια μηχανική μονάδα με μια αυτόματη διάταξη που επέτρεπε την έγχυση και απομάκρυνση του υγρού από την

περιτοναϊκή κοιλότητα κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Η τεχνική αυτή εφαρμοζόταν μια φορά την εβδομάδα και κατόπιν ο καθετήρας αφαιρούνταν (*Boen et al, 1964*).

Πραγματικά, μεγάλο βήμα για την περαιτέρω εξέλιξη της μεθόδου ήταν η κατασκευή από τον Tenckhoff το 1963 καθετήρων που ελαχιστοποιούσαν την πιθανότητα περιτονίτιδας. Στους καθετήρες που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε προσέθεσε δυο τσόχινους δακτυλίους (cuffs), που είχαν ως αποτέλεσμα το καλύτερο στερέωμα του καθετήρα στον υποκείμενο ιστό, την ανάπτυξη ουλώδους ιστού και τη δημιουργία συνεπώς ενός αποτελεσματικού φυσικού φραγμού έναντι των μικροβίων. Το υλικό κατασκευής για τους καθετήρες αυτούς ήταν σιλικόνη (*Tenckhoff and Schechter, 1968*). Οι παραπάνω καθετήρες χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα.

Ένα από τα μεγαλύτερα κέντρα περιτοναϊκής στις αρχές της δεκαετίας του εβδομήντα ήταν στον Καναδά το Toronto Western Hospital. Πράγματι, το 1970 ο Ωραιόπουλος δέχτηκε τη θέση του διευθυντή στο παραπάνω κέντρο έχοντας υπό την εποπτεία του 16 ασθενείς που υποβάλλονταν σε διαλείπουσα περιτοναϊκή κάθαρση. Όταν ο Ωραιόπουλος έλαβε γνώση για τους καθετήρες του Tenckhoff τους χρησιμοποίησε σε όλους τους ασθενείς του (*Oreopoulos, 2007*).

Παρ' όλες τις βελτιώσεις στις τεχνικές και στα διαλύματα που επετεύχθησαν μέχρι εκείνη τη στιγμή, η επιβίωση των ασθενών που υποβάλλονταν σε διαλείπουσα περιτοναϊκή κάθαρση δεν ήταν ικανοποιητική. Το 1975 οι Moncrief και Poronich μελετώντας την κινητική της ουρίας, εισήγαγαν ένα νέο σχήμα περιτοναϊκών πλύσεων, που είχε ως σκοπό την απόλυτη εξισορρόπηση της ουρίας του πλάσματος με την ουρία του διαλύματος, με τελικό στόχο τη μέγιστη απομάκρυνση της ουρίας από το πλάσμα. Υπολόγισαν με ακρίβεια ότι για να

πραγματοποιηθεί ικανοποιητική κάθαρση σε ένα μέσο ασθενή απαιτείται όγκος αλλαγών δυο λίτρων. Παράλληλα κρίνεται απαραίτητος ως ελάχιστος χρόνος μεταξύ των αλλαγών τουλάχιστον τρεις ώρες και ο μέγιστος αριθμός των αλλαγών στο 24ωρο πέντε. Η παραπάνω διαδικασία για να είναι αποδοτική, έπρεπε να επαναλαμβάνεται επτά ημέρες την εβδομάδα. Ουσιαστικά εισήγαγαν αυτό που αργότερα ο Nolph ονόμασε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (Nolph, 2002). Η παραπάνω διαδικασία ήταν απλή καθώς επιτυγχάνονταν σταθερή απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού και μπορούσε να εφαρμοστεί σε εξωνοσοκομειακές συνθήκες. Επιπροσθέτως είχε καλή ανεκτικότητα από πλευράς καρδιαγγειακού συστήματος και δεν ήταν απαραίτητος ο διαιτητικός περιορισμός, ενώ ο καθετήρας μετά από κάθε αλλαγή καλύπτονταν για να χρησιμοποιηθεί για την επόμενη. Η αχίλλειος πτέρνα όμως παρέμεινε η περιτονίτιδα, που η συχνότητά της ήταν περίπου ένα επεισόδιο κάθε δέκα εβδομάδες ανά ασθενή (Porovich et al, 1978).

Το 1976 ο Ωραιόπουλος κατόπιν παρότρυνσης του Nolph αποφάσισε να εισάγει σε όλους τους ασθενείς του τη συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (Oreopoulos, 1998). Η αποδοχή του νέου αυτού σχήματος ήταν μεγάλη. Παράλληλα, εκείνο τον καιρό στον Καναδά τα διαλύματα κάθαρσης ήταν διαθέσιμα σε πλαστικούς σάκους. Ο Ωραιόπουλος είχε την ιδέα, μετά το τέλος της ενστάλαξης του περιτοναϊκού διαλύματος στην κοιλιά, ο καθετήρας να συσφίγγεται και ο άδειος σάκος να περιτυλίγεται και να παραμένει προσδεμένος στο σώμα του ασθενούς μέχρι την επόμενη αλλαγή. Το δεδομένο αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μειωθούν τα επεισόδια των περιτονίτιδων σε ένα, κάθε 8-11 μήνες ανά ασθενή. Η περιτοναϊκή κάθαρση ήταν εκεί για να παραμείνει (Oreopoulos, 1979).

Το 1980 ο Buoncristiani δημοσίευσε ένα άρθρο με καταπληκτικά αποτελέσματα, καθώς τα επεισόδια περιτονίτιδας ήταν ένα για κάθε 40 μήνες ανά ασθενή. Ουσιαστικά ο Buoncristiani είχε εισάγει το σύστημα σύνδεσης τύπου Υ. Στο παραπάνω σύστημα το βασικό άκρο συνδέεται στον καθετήρα και τα δυο άλλα άκρα στο σάκο με το διάλυμα και τον άδειο σάκο αντίστοιχα. Βασικό σημείο σε αυτού του τύπου τη σύνδεση είναι το <ξέπλυμα>, δηλαδή η διέλευση διαλύματος προς τον άδειο σάκο, όντας ο καθετήρας ακόμα κλειστός, για την απομάκρυνση τυχόν μικροβίων κατά τη διάρκεια της σύνδεσης. Σταδιακά το παραπάνω σύστημα άρχισε να γίνεται παγκόσμια αποδεκτό (Buoncristiani, 1996).

Παράλληλα, αναπτύσσονταν και η αυτοματοποιημένη περιτοναϊκή κάθαρση με τη χρήση κυκλικών διατάξεων (cycler). Ο στόχος ήταν η ελαχιστοποίηση των περιτονίτιδων, καλύτερες καθάρσεις και ικανοποιητική ποιότητα ζωής. Με την πάροδο του χρόνου, η παραπάνω μέθοδος προτιμήθηκε από την πλειονότητα των ασθενών, διότι επέφερε θετικά αποτελέσματα στον τρόπο ζωής τους.

Επιδημιολογικά στοιχεία

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 παρατηρήθηκε μια γρήγορη αύξηση του αριθμού των ασθενών που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση. Αυτή η αύξηση συνεχίστηκε και κατά την πενταετία 1990-1995, με ρυθμό αύξησης κάθε χρόνο 15% (Nolph, 1996). Στο τέλος του 1997 ο πληθυσμός των ασθενών σε περιτοναϊκή κάθαρση ανέρχονταν στις 115.000, εκπροσωπώντας το 14% του συνολικού αριθμού των αιμοκαθαρόμενων παγκοσμίως (Annual Baxter World-Wide Survey, 1998). Στη συνέχεια όμως παρατηρήθηκε μια μείωση του ρυθμού ένταξης των ασθενών στην περιτοναϊκή. Επομένως το 2004 σε παγκόσμια κλίμακα ο αριθμός

τους έφτασε τις 149.000 αποτελώντας το 11% του συνολικού αριθμού των ασθενών που λαμβάνουν κάποιο είδος κάθαρσης (*Oliver et al, 2007*).

Αξιοσημείωτο είναι, ότι σε διαφορετικές χώρες ποικίλει το ποσοστό των ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση. Έτσι στη Γαλλία, στη Γερμανία και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής κυμαίνεται στο 5-10%, στη Σκανδιναβία, στην Ολλανδία, στην Αυστραλία και στον Καναδά 20-30%, ενώ στο Hong-Kong πάνω από 75% (*Grassmann et al, 2004*). Ακόμα και στην ίδια χώρα τα ποσοστά ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή. Στην Ελλάδα το 2013 από τους 12.675 ασθενείς που λαμβάνουν κάποιας μορφής υποκατάσταση νεφρικής λειτουργίας, οι 651 υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση και το 50% αυτών σε αυτοματοποιημένη (ΥΣΕ).

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

Ανατομία του περιτοναίου

Το περιτόναιο αποτελεί τη μεγαλύτερη ορογόνο μεμβράνη του οργανισμού που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του κοιλιακού τοιχώματος (τοιχωματικό πέταλο) και τα εσωτερικά όργανα της κοιλιακής χώρας (σπλαγγχνικό πέταλο). Ως περιτοναϊκή κοιλότητα ορίζεται ο χώρος που περικλείεται από το τοιχωματικό και σπλαγγχνικό πέταλο του περιτοναίου (*Williams et al, 1980*). Η βασική του λειτουργία είναι να δημιουργεί μια λεία επιφάνεια, εξαλείφοντας με αυτόν τον τρόπο την τριβή μεταξύ των σπλάγγχνων (*Nance, 1995*). Φυσιολογικά η περιτοναϊκή κοιλότητα περιέχει περίπου 100ml υγρού. Μπορεί όμως να χωρέσει μέχρι και εικοσαπλάσια ποσότητα υγρού, δηλαδή 2000ml χωρίς να δημιουργηθεί αίσθημα δυσφορίας (*Nolph and Twardowski, 1985*).

Η περιτοναϊκή κοιλότητα αποτελείται από συνδετικό ιστό επικαλυμμένο με ένα στρώμα μεσοθηλιακών κυττάρων, που διαπερνάται από ένα πλούσιο δίκτυο αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων. Σε συγκεκριμένες περιοχές του περιτόναιου, όπως το επίπλουν και το μεσεντέριο, παρατηρούνται πτυχώσεις από διπλό στρώμα περιτοναϊκής μεμβράνης, γεγονός που εξασφαλίζει τη σίγουρη σύνδεση των σπλάγχχνων στο οπίσθιο τοίχωμα της κοιλιακής κοιλότητας καθώς και τη σταθερή σύνδεση μεταξύ τους.

Η μέγιστη επιφάνεια της περιτοναϊκής μεμβράνης στους ενήλικες είναι περίπου όση και η επιφάνεια του δέρματος, δηλαδή 1-2 τμ (*Verger, 1985*). Όμως η λειτουργική επιφάνεια του περιτοναίου, μπορεί να ελαττωθεί κάτω από 1τμ ως αποτέλεσμα συμφύσεων προηγηθέντων χειρουργικών επεμβάσεων (*Mion and Boen, 1965*). Το σπλαγχνικό περιτόναιο αποτελεί και το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής περιτοναϊκής μεμβράνης, ενώ το τοιχωματικό καταλαμβάνει μόνο το 15% αυτής. Το 60% του σπλαγχνικού περιτοναίου το καταλαμβάνει το μεσεντέριο ενώ το 15% αυτού καλύπτει το ήπαρ (*Knapowski et al, 1979*). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το σπλαγχνικό περιτόναιο συμμετέχει κατά κύριο λόγο στην περιτοναϊκή κάθαρση. Όμως, οι μελέτες σε πειραματόζωα ανέδειξαν ότι η συμμετοχή του συγκεκριμένου τμήματος του περιτοναίου στην περιτοναϊκή κάθαρση είναι λιγότερη, απ' ότι αναμένεται αναφορικά με την ανατομική κατανομή (*Rubin et al, 1987*).

Το πάχος του περιτοναίου ποικίλει ανάλογα με την ανατομική του θέση. Στο σπλαγχνικό κυμαίνεται από 30 έως 250μm (*Di Fiore, 1981*). Ενδεικτικά στο μεσεντέριο, κατά μέσο όρο το πάχος υπολογίζεται στα 30μm και κατ' εξαίρεση

μπορεί να φτάσει μέχρι και 100μm (Baron, 1941). Αντίστοιχα, το πάχος του τοιχωματικού περιτοναίου μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 2mm (Williams et al, 1981).

Αιμάτωση του περιτοναίου

Το σπλαγχνικό περιτόναιο αιματώνεται από την κοιλιακή άνω και κάτω μεσεντέριο αρτηρία, ενώ το τοιχωματικό περιτόναιο αιματώνεται από την περισπωμένη, λαγόνια, οσφυϊκή, μεσοπλεύρια και επιγαστρική αρτηρία. Οι φλέβες που αποχετεύουν το αίμα του σπλαγχνικού περιτοναίου καταλήγουν στην πυλαία φλέβα, ενώ το φλεβικό σύστημα που αποχετεύει το τοιχωματικό περιτόναιο καταλήγει στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, φάρμακα και διαλυτές ουσίες που χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά, να απορροφούνται από το σπλαγχνικό περιτόναιο και να αποτελούν αντικείμενο του ηπατικού μεταβολισμού (Lukus et al, 1971).

Περιτοναϊκό μικροαγγειακό δίκτυο

Τα μεγάλα αγγεία που τροφοδοτούν με αίμα τα εσωτερικά όργανα, αντίστοιχα αιματώνουν και το σπλαγχνικό περιτόναιο. Λειτουργούν ως ένα δίκτυο αγωγών που διασχίζουν το μεσεντέριο, διακλαδίζονται και αναδιπλώνονται δημιουργώντας ένα πλέγμα τριχοειδών. Είναι αυτό που ουσιαστικά συμμετέχει στη διαπεριτοναϊκή μεταφορά ουσιών και στην ανταλλαγή υγρών.

Το σπλαγχνικό μικροαγγειακό δίκτυο εντοπίζεται στην επιφάνεια του μεσεντερίου και περιλαμβάνει πλούσιο αριθμό αρτηριακών και φλεβικών τοξοειδών σχηματισμών.

Πριν από 50 χρόνια οι Chambers και Zweifach περιέγραψαν την τοπογραφική ανατομία της μικροκυκλοφορίας του μεσεντέριου (*Chambers and Zweifach, 1946*). Το τυπικό δίκτυο των τριχοειδών αποτελείται από αρτηρίδια, τερματικά αρτηρίδια, προτριχοειδικούς σφικτήρες, αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις, κανάλια διόδου, τριχοειδή, μετατριχοειδικά φλεβίδια και φλεβίδια (*Zweifach, 1959*).

Η ροή στο δίκτυο των τριχοειδών είναι εξαιρετικά ευμετάβλητη, ενώ μόνο το 20-50% αυτών πληρούνται με αίμα (*Johnson and Wayland, 1967*). Η επίδραση αγγειοδραστικών παραγόντων και η έκθεση του περιτοναίου στα περιτοναϊκά διαλύματα έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της αιμάτωσης των τριχοειδών (*Mortier et al, 2002*).

Το τοιχωματικό αγγειακό δίκτυο του περιτοναίου αντιπροσωπεύεται από την αγγειακή παροχή στον κρεμαστήρα μυ, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο παραπάνω μυς εκτείνεται από το μυϊκό σύστημα του κοιλιακού τοιχώματος (*Smuje et al, 1970*). Χαρακτηριστικό γνώρισμα του αγγειακού δικτύου του τοιχωματικού περιτοναίου είναι η απουσία μικρών αρτηριακών και φλεβικών τοξοειδών σχηματισμών εκ των οποίων να εγείρονται τα τριχοειδή (*Miller, 1985*).

Στο περιτοναϊκό μικροαγγειακό δίκτυο, τα τριχοειδή αποτελούν το κύριο σημείο ανταλλαγής ουσιών και διαλύματος (*Taylor and Granger, 1984*). Σημαντικές μεταβολές στη διαπερατότητά τους μπορούν να συμβούν τόσο σε καταστάσεις φλεγμονής του περιτοναίου (*Gabella, 1995*) όσο και υπό την επίδραση διαφόρων αγγειοδραστικών ουσιών και φαρμάκων, όπως νιτροπρουσίδη (*Roberts and Palade, 1995*), ισταμίνη, βραδικινίνη, VEGF και στοιχεία του συμπληρώματος (*Granger et al, 1979*).

Το μέγεθος των τριχοειδών κυμαίνεται στα 5-8μm, αρκετό ώστε να επιτρέπει την διέλευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (*Gabella, 1995*). Το τοίχωμα των τριχοειδών αποτελείται από το ενδοθήλιο και το βασικό πέταλο. Δε διαθέτουν λείες μυϊκές ίνες με αποτέλεσμα να μη συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου (*Miller, 1985*).

Υπάρχουν τρία είδη τριχοειδικών αγγείων που εντοπίζονται στην περιοχή του μεσεντερίου: 1) με συνεχές ενδοθήλιο 2) με διάτρητο ενδοθήλιο 3) και με διακοπτόμενο ενδοθήλιο (*Miller, 1985*). Στο ανθρώπινο τοιχωματικό περιτόναιο το ποσοστό των διάτρητων τριχοειδών είναι χαμηλό και κυμαίνεται περίπου στο 1,75% της συνολικής επιφάνειας (*Gotloib et al, 1985*). Η διάμετρος των πόρων κυμαίνεται περίπου στα 60-90nm, ίδιων διαστάσεων με τα νεφρικά περισωληναρικά τριχοειδή και τα τριχοειδή του σπειράματος (*Friederici, 1968*).

Το ενδοθήλιο του μικροαγγειακού δικτύου κατέχει κεντρικό ρόλο στη φυσιολογία του δικτύου (*Luscher and Barton, 1997*). Ενδοθηλιακής προέλευσης ουσίες ρυθμίζουν την αιμοδυναμική, τη θρομβογένεση, την ινωδόλυση και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απαντούν σε μια σειρά μηχανικών και νευροορμονικών ερεθισμάτων με την απελευθέρωση διασταλτικών και συσπαστικών παραγόντων (*Villar et al, 2006*).

Νεύρωση του περιτοναίου

Στο μεσεντέριο των αρουραίων βρέθηκαν αδρενεργικοί νευρώνες που νευρώνουν τις βασικές και μικρές αρτηρίες. Τα προτριχοειδικά αρτηριόλια, οι αθροιστικές φλέβες και οι μικρές φλέβες δεν διαθέτουν νεύρωση και η λειτουργία τους καθορίζεται από την επίδραση ορμονικών αγγειοδραστικών ουσιών. Το

ανθρώπινο μεσεντερικό λεμφαγγειακό δίκτυο διαθέτει αδρενεργικούς και χολινεργικούς νευρώνες. Τα λεμφικά τριχοειδή είναι απαλλαγμένα νεύρωσης. Ο υπομεσοθηλιακός συνδετικός ιστός διαθέτει σωματία Vater-Paccini τα οποία λειτουργούν ως ο βασικός υποδοχέας της αίσθησης της πίεσης (Furness, 1973).

Κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του περιτοναϊκού υγρού

Το κυτταρικό περιεχόμενο του περιτοναϊκού υγρού υγιούς ανθρώπου μπορεί εύκολα να μεταβληθεί εξαιτίας της επίδρασης διάφορων παραγόντων και για αυτό είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Η μελέτη περιτοναϊκού υγρού υγιούς γυναίκας ανέδειξε την εξής σύσταση: μακροφάγα και μεσοθηλιακά κύτταρα 70% του συνολικού πληθυσμού, ενώ τα λεμφοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα δεν ξεπερνούσαν το 18% και 7% αντίστοιχα (Bercovici and Gallily, 1978). Η σύσταση των κυττάρων ασθενών που υποβάλλονται σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση είναι η εξής: 50 κύτταρα/mL εκ των οποίων η πλειονότητα είναι μακροφάγα, περίπου 50% και σε μικρότερο ποσοστό λεμφοκύτταρα, κύτταρα του συνδετικού ιστού και μεσοθηλιακά κύτταρα (Cichoki et al, 1983). Κατά τη διάρκεια της περιτονίτιδας παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων με τα ουδετερόφιλα να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό (Rubin et al, 1980).

Επίσης, προσταγλανδίνες και κυτοκίνες παράγονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα κατά τη διάρκεια της κάθαρσης. Έχουν διαπιστωθεί οι εξής: προσταγλαδίνη E2, προσταγλανδίνη F2a, θρομβωξάνη B2, (Steinhauer et al, 1985) καρκινικός νεκρωτικός παράγοντας α, ιντερλευκίνη-1, (Shaldon et al, 1986) ιντερλευκίνη-6, (Goldman et al, 1990) και ιντερλευκίνη-8 (Lin et al, 1993). Η παρουσία

του TNFα σε ασθενή, που υποβάλλεται σε περιτοναϊκή κάθαρση και είναι ελεύθερος λοίμωξης, είναι μάλλον αποτέλεσμα διάχυσης από την κυκλοφορία (Zemel et al, 1994). Οι υπόλοιπες κυτοκίνες, που αναφέρθηκαν παραπάνω, παράγονται τοπικά στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Αξιοσημείωτη αύξηση των προσταγλανδινών και των κυτοκινών συναντάται στο υπερδιήθημα σε περίπτωση περιτονίτιδας (Steinhauer et al, 1985).

Δομή και λειτουργία των μεσοθηλιακών κυττάρων

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα που επικαλύπτουν τις ορογόνες κοιλότητες, όπως την πλευριτική, την περικαρδιακή και την περιτοναϊκή κοιλότητα (Lai-Fook, 2004). Αν και για πρώτη φορά περιγράφησαν, πριν έναν αιώνα περίπου, μόλις τις τελευταίες δύο δεκαετίες μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους. Πρόκειται για μια κατηγορία κυττάρων που παίζουν ενεργό ρόλο στη διαμεμβρανική μεταφορά ηλεκτρολυτών, καθώς και στην έκκριση και επαναρρόφηση υγρών στις ορογόνες κοιλότητες. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχουν τον όγκο των υγρών στις κοιλότητες που επικαλύπτουν και συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασής τους. Αποτελούν επιπλέον την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι χημικών, λοιμωδών ή μηχανικών παραγόντων (Zocchi, 2002).

Ιστολογικές μελέτες ανέδειξαν μια ομοιογένεια στη μορφολογία των μεσοθηλιακών κυττάρων. Πρόκειται για πεπλατισμένα, επιπεδωμένα κύτταρα με λεπιδωτή μορφή και διάμετρο περίπου 25μm. Κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα εντοπίζονται στα σημεία επαφής της μεμβράνης με τα εσωτερικά όργανα, όπως το ήπαρ, ο σπλήνας, το διάφραγμα καθώς και σε περιοχές τραυματισμού της (Mutsaers, 2002). Αφθονία κροσών και μικρολαχνών καλύπτουν την κορυφαία

επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Έχουν ως σκοπό την προστασία από την μηχανική τριβή, παγιδεύοντας νερό και ορώδες περιεχόμενο και ρυθμίζοντας την έκκριση του επιφανειακού παράγοντα (*Bird, 2004*).

Η μελέτη των μεσοκυττάρων δεσμών των μεσοθηλιακών κυττάρων του τοιχωματικού και περισπλάγγνιου περιτοναίου ανέδειξε δύο ειδών δεσμούς, τους ισχυρούς δεσμούς και τις συνδέσεις διαβίβασης (*gap junctions*). Οι ισχυροί δεσμοί πραγματοποιούνται μεταξύ των κυτταρικών σωμάτων διπλανών κυττάρων ή μεταξύ των κυτταρικών προεξοχών του ενός κυττάρου και του κυτταρικού σώματος του γειτονικού κυττάρου. Οι συνδέσεις διαβίβασης αποτελούνται από ένα ή δυο συνδεδεμένα νήματα που προσδίδουν χαρακτηριστική νηματοειδή κατάταξη και εστιακή ασυνέχεια. Τα δύο είδη των ενώσεων συναντώνται σε συνέχεια ή εναλλάσσονται. Αυτός ο πολυμορφισμός υποδηλώνει αξιοσημείωτη ελαστικότητα στη δόμηση και αποδόμηση αυτών των συνδέσεων. Σε γενικές γραμμές η μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των μεσοθηλιακών δεσμών μοιάζουν με τις συνδέσεις στο ενδοθήλιο των φλεβών. Οι συνδέσεις διαβίβασης είναι πιο συχνές στο περισπλάγγνιο περιτόναιο απ' ό,τι στο τοιχωματικό (*Simionescu and Simionescu, 1977*).

Μια πληθώρα ερευνών, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ανέδειξαν την ύπαρξη μιας σειράς ιοντικών διαύλων και συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρολυτών στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, αποδείχτηκε σημαντικός ο ρόλος των εν λόγω κυττάρων τόσο στην ανοσολογική αντίδραση και στην παρουσίαση αντιγόνου όσο και στην επούλωση των τραυματισμών. Επιπρόσθετα, συνθέτουν μια πληθώρα από κυτοκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και συστατικά θεμέλια ουσίας, που ελέγχουν τη φλεγμονή και διεγείρουν τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση (Herrick and Mutsaers, 2004). Πολύ σημαντική είναι η ινωδολυτική δράση των μεσοθηλιακών κυττάρων και η ικανότητά τους να απομακρύνουν αποθέματα ινωδογόνου που δημιουργούνται στις ορογόνους κοιλότητες μετά από μηχανικό τραυματισμό ή φλεγμονή (Mutsaers, 2002).

Λειτουργίες της περιτοναϊκής μεμβράνης

Πριν από έναν αιώνα περίπου ο Robinson συνόψισε τις λειτουργίες του περιτόναιου ως εξής: 1) να ρυθμίζει την παραγωγή του περιτοναϊκού υγρού για θρεπτικούς και μηχανικούς λόγους 2) να διευκολύνει την κίνηση 3) να μειώνει την τριβή 4) να φέρει σε επαφή τα αγγεία και τα νεύρα με τα εσωτερικά όργανα

Το περιτόναιο είναι μια ορογόνος μεμβράνη που εμβρυολογικά προέρχεται από το μεσένγγυμα και αποτελείται από ένα στρώμα μεσοθηλιακών κυττάρων και συνδετικό ιστό. Ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας είναι μεγαλύτερος στο σπλαγχνικό απ' ό τι στο τοιχωματικό περιτόναιο. Η επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων προς την περιτοναϊκή κοιλότητα διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών προεκτάσεων τις μικρολάχνες. Η κατανομή τους είναι άνιση και πιο συχνά παρατηρούνται στο σπλαγχνικό περιτόναιο παρά στο τοιχωματικό (Baradi and Crae, 1976). Ουσιαστικά οι μικρολάχνες αυξάνουν τη λειτουργική επιφάνεια του περιτοναίου στα 40 m² (Curry and Michel, 1980). Οι μικρολάχνες είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στον ελάχιστο τραυματισμό και την ξηρότητα. Επιλέον, η απώλεια των μικρολαχνών σε ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση αποτελεί ένδειξη απόπτωσης των κυττάρων (Di Paolo et al, 1986). Οι μικρολάχνες είναι αρνητικά φορτισμένες γεγονός που παίζει ρόλο στη

διαπερατότητα του περιτοναίου για διάφορες ουσίες, όπως οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος (Gotloib ,1986). Το λεπτό στρώμα των μεσοθηλιακών κυττάρων απλώνεται πάνω σε ένα στρώμα από διάμεσο συνδετικό ιστό το πάχος του οποίου ποικίλει στα διάφορα σημεία του περιτοναίου (Gotloib et al, 1983).

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας εκκρίνουν γλυκοσαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες και φωσφολιπίδια και εξασφαλίζουν ένα ολισθηρό στρώμα γλυκοκάλικα που προστατεύει την ορογόνο μεμβράνη από την τριβή, τη φλεγμονή και τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Η έκκριση των χημειοκινών προάγει τη διαμεσοθηλιακή μετανάστευση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων στο σημείο της βλάβης και την εισροή των λευκοκυττάρων από το αγγειακό δίκτυο στην περιτοναϊκή κοιλότητα (Li et al, 1998). Επίσης, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίησή τους και τη μετανάστευσή τους μεσολαβώντας στην επανόρθωση και στην ανανέωση του ιστού (Herrick and Mutsaers, 2004).

Το περιτόναιο συμμετέχει ενεργά στη μεταφορά και διακίνηση κυττάρων, υγρών και ηλεκτρολυτών και λειτουργεί ως βιολογικός φραγμός. Η μεταφορά αυτή διέπεται από τους κανόνες της διάχυσης και της συναπαγωγής (convection), ενώ η αρνητική φόρτίσή του είναι ένας παράγοντας εκλεκτικής διαπερατότητας (Galadi et al, 1991).

Το περιτόναιο ως μεμβράνη κάθαρσης

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, ο περιτοναϊκός φραγμός αποτελεί μια τρισδιάστατη κατασκευή, τα συστατικά της οποίας είναι η περιτοναϊκή μεμβράνη, ο

υποκείμενος συνδεδετικός ιστός και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μικροαγγειακού δικτύου. Επομένως, η μεταφορά των διαλυμένων ουσιών, από τα τριχοειδή του περιτοναίου στο διάλυμα κάθαρσης της περιτοναϊκής κοιλότητας, προϋποθέτει το πέρασμά τους από το τοίχωμα των τριχοειδών, το διάμεσο ιστό και το στρώμα των μεσοθηλιακών κυττάρων.

Το τοίχωμα των τριχοειδών είναι πιθανότατα ο πιο σημαντικός φραγμός για τη μεταφορά των ουσιών και των διαλυμάτων. Η μεταφορά των διαλυμένων ουσιών εξαρτάται από το μέγεθός τους και πραγματοποιείται μέσα από ένα σύστημα πόρων (*Mayerson et al, 1960*). Σύμφωνα με το μοντέλο των τριών πόρων, το οποίο έχει τεκμηριωθεί με έρευνες, υπάρχει ένας αριθμός μικρών πόρων με διάμετρο 40-50 Å⁰ μέσω των οποίων γίνεται η μεταφορά των ουσιών με χαμηλό μοριακό βάρος. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ένας μικρός αριθμός μεγάλων πόρων που αντιστοιχεί στο 0,1% του συνολικού αριθμού των πόρων, με διάμετρο 150 Å⁰. Οι παραπάνω πόροι συμμετέχουν στη διακίνηση μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Τέλος, διαπιστώνεται η ύπαρξη πολύ μικρών πόρων με ακτίνα 3-5 Å⁰ οι οποίοι επιτρέπουν τη διέλευση μόνο νερού (*Rippe et al, 2004*). Οι παραπάνω πόροι αντιστοιχούν στις ακουαπουρίνες-1 που φαίνεται να αποτελούν το κύριο κανάλι μεταφοράς του νερού (*Krepper, 1994*).

Ο διάμεσος ιστός προέρχεται από το μεσέγχυμα, αποτελείται από ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου και βλενοπολυσακχαρίτες που του προσδίδουν μορφή γέλης και είναι αρνητικά φορτισμένος (*Hruza, 1977*). Η συγκέντρωση του κολλαγόνου και το πάχος του διαμέσου στρώματος ποικίλει στις διάφορες περιοχές της περιτοναϊκής μεμβράνης. Ο διάμεσος ιστός αποτελείται από δυο φάσεις, μια πλούσια σε νερό και μια πλούσια σε κολλοειδές, που διαπλέκονται μεταξύ τους και

διατηρούν μια ισορροπία (*Wiederhielm, 1972*). Στην παραπάνω δομή συναντάται και ένα διακυτταρικό διάστημα ελεύθερο νερού, κυρίως ανάμεσα στο κολλοειδές. Η διακίνηση των υγρών γίνεται μέσω του κυτταρικού διάκενου· οι μικρομοριακές ουσίες κατά ένα ποσοστό διακομίζονται μέσω της κολλοειδούς φάσης, ενώ οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της φάσης πλούσιας σε νερό.

Το σπλαχνικό περιτόναιο συμμετέχει κατά 30% στη μεταφορά των ουσιών (*Baron, 1941*). Πρέπει να σημειωθεί ότι η μετακίνηση των ουσιών τελικά εξαρτάται όχι μόνο από το μοριακό τους βάρος και το ηλεκτρικό φορτίο αλλά και από την απόσταση που πρέπει να διανύσουν, δηλαδή από το πάχος του διάμεσου ιστού. Σύμφωνα με το πρότυπο κατανομής μεγάλη σημασία έχει η κατανομή των τριχοειδών στην περιτοναϊκή μεμβράνη, καθώς και η απόσταση που πρέπει να διανύσουν οι διαλυμένες ουσίες και το νερό μέσω του διάμεσου ιστού προς το μεσοθήλιο. Η μεταφορά εξαρτάται περισσότερο από το εμβαδόν επιφανείας των περιτοναϊκών τριχοειδών, παρά από το συνολικό εμβαδόν επιφανείας της περιτοναϊκής μεμβράνης. Επιπλέον η απόσταση κάθε τριχοειδούς από το μεσοθήλιο καθορίζει τη σχετική του συμβολή και η αθροιστική συμβολή όλων των παραπάνω τριχοειδών καθορίζει τη δραστική επιφάνεια και την αντίσταση της μεμβράνης. Έτσι, από το πρότυπο της κατανομής έχει προκύψει η έννοια της δραστικής επιφάνειας. Αυτή αντιστοιχεί στην επιφάνεια του περιτοναίου που είναι αρκετά κοντά στα περιτοναϊκά τριχοειδή ώστε να συμμετέχει στη μεταφορά. Επομένως, δύο ασθενείς με το ίδιο εμβαδόν επιφάνειας περιτοναίου, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς την περιτοναϊκή αγγειοβρίθεια και κατά συνέπεια να έχουν διαφορετική δραστική επιφάνεια περιτοναίου (*Flessner, 1991*).

Η μονή στιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων αποτελεί τον τελευταίο φραγμό της διακίνησης υγρών και ουσιών. Προβάλλει, όμως, μικρή αντίσταση και θεωρείται χαλαρός φραγμός. Επίσης, η ύπαρξη στάσιμων στρωμάτων υγρών που εξαπλώνονται στο μεσοθήλιο, έχει προταθεί και ως ένας επιπλέον φραγμός. Παρ'όλ' αυτά, ο ρόλος του μεσοθηλίου θεωρείται εξέχουσας σημασίας για τη διατήρηση της λειτουργικότητας και της προσαρμογής του περιτοναίου σε ασθενείς που υποβάλλονται για μακρό χρονικό διάστημα σε περιτοναϊκή κάθαρση (*Flessner, 2005*).

Επιπλέον, ένας ανατομικός σχηματισμός που συμμετέχει ενεργά στη διακίνηση ουσιών και ύδατος και στη διατήρηση της ομοιόστασης της περιτοναϊκής κοιλότητας, είναι το λεμφικό δίκτυο. Τα λεμφαγγεία εξυπηρετούν την αποστράγγιση από το διάμεσο ιστό υλικών, όπως νερό, πρωτεΐνες, κολλοειδή και κύτταρα τα οποία καταλήγουν στο θωρακικό πόρο και κατόπιν στην υποκλείδιο φλέβα (*Schmid-Schonbein, 1990*). Τα λεμφικά τριχοειδή στερούνται νεύρωσης. Τα λεμφικά αγγεία, όμως, διαθέτουν αδρενεργικές και χολινεργικές νευρικές ίνες στο μεσαίο και εσωτερικό τοίχωμά τους. Χαρακτηριστική είναι η ύπαρξη στο περιτόναιο των λεμφικών στομάτων. Πρόκειται για ανοιχτά διαμεσοθηλιακά κανάλια ανάμεσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα και το υπομεσοθηλιακό διαφραγματικό λεμφικό δίκτυο. Αυτά τα στόματα ανοίγουν προς τα υπομεσοθηλιακά λεμφικά αγγεία (*Leak, 1986*). Μέσω αυτών διέρχονται κυρίως μακρομοριακές ουσίες καθώς και άλλοι παράγοντες, όπως καρκινικά κύτταρα, βακτήρια, σωματίδια αλλά και υγρά από την κοιλιακή κοιλότητα στο διαφραγματικό λεμφικό δίκτυο που καταλήγουν στη συστηματική κυκλοφορία. Η διακίνηση των παραπάνω παραγόντων δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους αλλά και από το ηλεκτρικό τους φορτίο. Φαίνεται λοιπόν

ότι η ύπαρξη και η λειτουργία των στομάτων παίζει σημαντικό ρόλο για τη συνολική απορροφητική ικανότητα του περιτοναίου (*French et al, 1959*).

Μηχανισμοί μεταφοράς στο περιτόναιο

Η μεταφορά των διαλυμένων ουσιών κατά τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης βασίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης και της υπερδιήθησης (συναπαγωγής). Οι παραπάνω διεργασίες επιτελούνται ταυτόχρονα. Διάχυση είναι η παθητική μεταφορά ουσιών μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης χωρίς τη μετακίνηση του διαλυτικού μέσου. Η διάχυση μιας ουσίας συμβαίνει μόνο όταν υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης της ουσίας αυτής εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάχυση μιας ουσίας είναι οι εξής: 1) η κλίση συγκέντρωσης της ουσίας, 2) η δραστική επιφάνεια της μεμβράνης, 3) η ενδογενής αντίσταση της περιτοναϊκής μεμβράνης, 4) το μοριακό βάρος της ουσίας και 5) η αιματική ροή του περιτοναίου

Μια ουσία, όπως η ουρία, έχει μεγάλη κλίση συγκέντρωσης κατά την έναρξη ενός κύκλου αλλαγής, διότι στο διάλυμα κάθαρσης η συγκέντρωσή της είναι μηδενική. Σταδιακά η κλίση αυτή μειώνεται. Για το λόγο αυτό χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές ή μεγαλύτεροι όγκοι αλλαγών ώστε να παραμένει υψηλή η κλίση συγκέντρωσης και να επιτυγχάνεται καλύτερη κάθαρση (*Heimbürger et al, 1992*). Η δραστική επιφάνεια του περιτοναίου μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση μεγαλύτερων όγκων κατά τη διάρκεια των αλλαγών. Η ενδογενής αντίσταση της περιτοναϊκής μεμβράνης αντανακλά τις διαφορές στον αριθμό των διαθέσιμων πόρων για μεταφορά ανά μονάδα εμβαδού επιφάνειας τριχοειδών, καθώς και στην απόσταση των τριχοειδών από το μεσοθήλιο κατά μήκος του διάμεσου ιστού. Ουσίες με μικρό

μοριακό βάρος διαχέονται πιο γρήγορα από τις ουσίες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Flessner, 1991).

Εκτιμάται ότι η αιματική ροή στο περιτόναιο των ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση είναι 60-100 ml/min (Maher, 1983). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα, ανέδειξαν ότι αυτό που παίζει σημαντικό ρόλο στην κάθαρση των ουσιών δεν είναι τόσο ο ρυθμός αιματικής ροής όσο ο συνολικός όγκος αίματος των τριχοειδών αγγείων καθώς και ο αριθμός των τριχοειδών που συμμετέχουν στη μεταφορά. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι αποτελεσματική περιτοναϊκή κάθαρση συναντάται σε ασθενείς με βαριά καρδιακή ανεπάρκεια μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, κατάσταση κατά την οποία είναι ελαττωμένη η σπλαγγχνική αιματική ροή (Malach, 1972). Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση νιτροπρωσικού δεν αύξησε την αιματική ροή στο περιτόναιο αύξησε όμως την κάθαρση των ουσιών μικρού μοριακού βάρους αλλά και των μακρομορίων διότι αύξησε την πλήρωση των τριχοειδών (Douma et al, 1997). Επίσης, αποδοτική περιτοναϊκή κάθαρση παρατηρείται σε ανθρώπους με βαριά καρδιακή ανεπάρκεια ή κίρρωση (De Vecchi et al, 2002). Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν ότι σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της κάθαρσης είναι ο συνολικός όγκος αίματος στο περιτοναϊκό αγγειακό δίκτυο και όχι τόσο η αιματική ροή του περιτοναίου.

Υπερδιήθηση είναι η σύγχρονη μεταφορά διαλυτικού μέσου και μέρος των διαλυτών ουσιών που περιέχονται σ' αυτό μέσω της ημιδιαπερατής μεμβράνης. Οφείλεται στη διαφορά της ωσμωτικής πίεσης μεταξύ του υπέρτονου περιτοναϊκού διαλύματος και του σχετικά υπότονου αίματος των τριχοειδών αγγείων της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Ο ρυθμός υπερδιήθισης κατά τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης εξαρτάται από την υδροστατική, κρυσταλλοειδωσμοτική και κολλοειδωσμοτική πίεση. Φυσιολογικά, η υδροστατική πίεση στα τριχοειδή είναι υψηλότερη από την ενδοπεριτοναϊκή γεγονός, που ευνοεί την υπερδιήθηση. Αυτή η διαφορά είναι μεγαλύτερη σε υπερυδατωμένο ασθενή και μικρότερη σε αφυδατωμένο. Η υδροστατική πίεση στα περιτοναϊκά τριχοειδή εξαρτάται από τη στάση του σώματος και από τον όγκο του διαλύματος κάθαρσης που εισάγεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα (*Twardowski et al, 1986*). Η κολοειδωσμοτική πίεση ευνοεί τη διατήρηση των υγρών στον αγγειακό χώρο και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της λευκωματίνης του πλάσματος (*Krediet et al, 1994*). Έτσι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση έχουν χαμηλή συγκέντρωση λευκωματίνης πλάσματος και επομένως έχουν χαμηλή ωσμωτική πίεση και υψηλή υπερδιήθηση. Η κρυσταλλοειδική πίεση εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης που αποτελεί τον κύριο ωσμωτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται στα περιτοναϊκά διαλύματα. Η κλίση συγκέντρωσης της γλυκόζης είναι υψηλή κατά την έναρξη του κύκλου αλλαγής και μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό συμβαίνει λόγω της αραίωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης από το υπερδιήθημα αλλά και από τη διάχυση της ίδιας της γλυκόζης προς το αίμα. Άρα η αποτελεσματικότητα αυτού του ωσμωτικού παράγοντα εξαρτάται από την ιδιότητα της μεμβράνης να προβάλλει <αντίσταση> στη μεταφορά του. Όπως έχει διαπιστωθεί, η διαπερατότητα της γλυκόζης μέσω των πολύ μικρών πόρων είναι ελάχιστη, ενώ είναι σχεδόν μηδενική μέσω των μεγάλων πόρων παρά το μικρό της μέγεθος (*Leyboldt, 1993*).

Επίσης κατά τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης παρατηρείται και το φαινόμενο του <φιλτραρίσματος>. Πρόκειται για το φαινόμενο κατά το οποίο ένα

ποσοστό μιας διαλυμένης ουσίας κατά τη διέλευσή της μαζί με το νερό μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης κατακρατείται ή φιλτράρεται. Όταν συνυπάρχει το <φιλτράρισμα>, η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης, ως μέθοδος συναπαγωγής, μειώνεται. Ο συντελεστής κατακράτησης μιας ουσίας εξαρτάται από το μοριακό της βάρος και το φορτίο και διαφέρει από ασθενή σε ασθενή. Στην περιτοναϊκή κάθαρση το <φιλτράρισμα> οφείλεται κατά κύριο λόγο στους πολύ μικρούς πόρους οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το 50% της ολικής υπερδιήθησης και μεταφέρουν νερό χωρίς διαλυμένες ουσίες (*Chen et al, 1991*).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ως εναλλακτικός ωσμωτικός παράγοντας χρησιμοποιείται η ικοδεξτρίνη. Είναι ένα μεγάλο μόριο και με τη χρήση της επιτυγχάνεται παρατεταμένη υπερδιήθηση, η οποία διατηρείται σταθερή ακόμα κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αλλαγής μεγάλης διάρκειας.

Κατά τη διακίνηση υγρών στην περιτοναϊκή κοιλότητα, παρατηρείται και το φαινόμενο της επαναρρόφησης από το λεμφικό δίκτυο. Μέσω των λεμφαγγείων, επιτυγχάνεται απορρόφηση υγρών με σχετικά σταθερό ρυθμό, ενώ η κατακράτηση διαλυμένων ουσιών είναι πολύ περιορισμένη ή σχεδόν μηδενική. Τελικά, αντισταθμίζεται η απομάκρυνση τόσο των διαλυμένων ουσιών όσο και των υγρών. Ένα μικρό ποσοστό των απορροφούμενων υγρών καταλήγει στα υποδιαφραγματικά αγγεία. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών απορροφάται, μέσω του τοιχωματικού περιτοναίου, στους ιστούς του κοιλιακού τοιχώματος από όπου στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα επιχώρια λεμφαγγεία. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην ενδοπεριτοναϊκή πίεση και στο βαθμό της λεμφικής επαναρρόφησης. Όσο υψηλότερη είναι αυτή, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του απορροφημένου υγρού. Έχει διαπιστωθεί ότι αύξηση της

ενδοπεριτοναϊκής πίεσης κατά 10mmHg από εξωτερική πίεση έχει ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτη αύξηση της λεμφικής επαναρρόφησης και μείωση της τελικής υπερδιήθισης. Η ενδοπεριτοναϊκή πίεση αυξάνεται με τη χορήγηση μεγαλύτερων όγκων αλλαγής ή στην όρθια θέση (*Imholz et al, 1993*).

Μορφολογικές αλλαγές στο περιτόναιο

Αποτελεί γεγονός ότι η παρατεταμένη έκθεση του περιτοναίου στα διαλύματα της κάθαρσης, που είναι εξ' ορισμού χαμηλής βιοσυμβατότητας, καθώς και οι λοιμώξεις της περιτοναϊκής κοιλότητας οδηγούν σε ιστολογικές αλλαγές της μεμβράνης. Οι αλλαγές αυτές αφορούν τόσο στην εκφύλιση ή απώλεια του μεσοθηλίου και την υπομεσοθηλιακή πάχυνση της μεμβράνης όσο και σε αλλαγές στη δομή και στο πλήθος των αγγείων. Είναι επίσης ευθεία η συσχέτιση αυτών των αλλαγών με τη διάρκεια εφαρμογής της μεθόδου καθώς και με τα επεισόδια των περιτονίτιδων. Μακροπρόθεσμα οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της υπερδιήθισης και την ανεπάρκεια της μεθόδου.

Πριν ακόμη γίνουν ορατές οι αλλαγές στο μεσοθήλιο, παρατηρούνται μεταβολές σε κυτταρικό επίπεδο, όπως αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, αύξηση της αναλογίας πυρήνας/κυτταρόπλασμα, κυτταροπλασματική βασεοφιλία και κενотоπίωση. Σε μικρότερο βαθμό διαπιστώνονται και στοιχεία φλεγμονής τόσο οξείας, όπως η παρουσία ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων, όσο και χρόνιας φλεγμονής με την παρουσία λεμφοκυττάρων.

Ο κυτταρικός εκφυλισμός, το διάμεσο οίδημα και η αποδιοργάνωση της βιολογίας του κυττάρου διαπιστώνονται με την έναρξη της μεθόδου. Η συνεχής

επαφή της περιτοναϊκής μεμβράνης με τα διαλύματα κάθαρσης, οδηγούν στη διατήρηση υψηλού ρυθμού αναδιοργάνωσης των μεσοθηλιακών κυττάρων και κατά συνέπεια σε σημαντικές αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο. Τις πρώτες μέρες εφαρμογής της περιτοναϊκής, παρατηρείται υπερπλασία των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, γεγονός που αποδεικνύει την αύξηση της δραστηριότητάς τους. Αν και ο αριθμός των πινοκυτταρικών κυστιδίων των μεσοθηλιακών κυττάρων μειώνεται, ο όγκος τους αυξάνεται. Χαρακτηριστική είναι η απότομη αύξηση του ενδοπλασματικού δικτύου, η δομή του οποίου προσομοιάζει αυτή των εκκριτικών κυττάρων. Εκφυλιστικές αλλοιώσεις παρατηρούνται και στα μιτοχόνδρια στα οποία διαπιστώνεται πύκνωση και διόγκωσή τους. Αλλαγές εντοπίζονται και στον πυρήνα, ο οποίος διαγράφεται ακανόνιστος και διαπλατυσμένος, ενώ η χρωματίνη συγκεντρώνεται σε ένα πυκνό δαχτυλίδι στην περιφέρειά του. Τελικά, η μορφολογία των μεσοθηλιακών κυττάρων μεταβάλλεται και μετατρέπονται σε στρογγυλά και κυβοειδή. Αυξάνουν τον όγκο τους και προσομοιάζουν στα εκκριτικά κύτταρα, ενώ διαχωρίζονται σταδιακά από τη βασική μεμβράνη.

Η παραπάνω μετατροπή των μεσοθηλιακών κυττάρων έχει να κάνει με τη διαταραχή που προκαλούν τα περιτοναϊκά διαλύματα στην ομοίωση της περιτοναϊκής κοιλότητας. Βασικά, απομακρύνουν τις ουσίες που τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν, όπως φωσφολιπίδια για τη σύνθεση του λιπαντικού, προσταγλανδίνες και προστακυκλίνες για τον έλεγχο του αγγειακού τόνου, αντιθρομβωτικούς παράγοντες, στοιχεία της τοπικής ανοσίας και ενδεχομένως και πολλά άλλα που δεν γνωρίζουμε. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή διέγερση των κυττάρων έτσι ώστε να γίνονται υπερτροφικά και να μεταβάλλουν τη δομή τους.

Στη συνέχεια παρατηρείται απογύμνωση του μεσοθηλίου και βλάβη του υποκείμενου διάμεσου ιστού. Χαρακτηριστικές είναι οι αλλαγές που παρατηρούνται στις μικρολάχνες. Αρχικά, μειώνονται στο μήκος, κατόπιν ελαττώνεται ο αριθμός τους και τελικά εξαφανίζονται από την επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Μετά από 8-10 μήνες συνεχούς περιτοναϊκής κάθαρσης είναι δύσκολο να εντοπιστούν μεσοθηλιακά κύτταρα με μικρολάχνες, ενώ σε ποσοστό 1/3 βιοπτικών υλικών ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση δεν ανευρίσκεται μεσοθήλιο. Οι παραπάνω αλλαγές μπορούν να εξηγηθούν με διάφορες υποθέσεις. Μια υπόθεση είναι ότι τα περιτοναϊκά διαλύματα προκαλούν διαστολή της περιτοναϊκής κοιλότητας, απομακρύνοντας το τοιχωματικό από το σπλαγχνικό πέταλο. Το δεδομένο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη της τριβής μεταξύ των οργάνων και τον περιορισμό των συνθηκών που διεγείρουν την παραγωγή των μικρολαχνών. Αλλαγές παρατηρούνται επίσης και στη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου. Σύντομα οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις προκαλούν κατακερματισμό της βασικής μεμβράνης. Περίπου τέσσερις μήνες μετά την έναρξη παρατηρείται διπλασιασμός του πάχους της. Πιθανότατα, αυτές οι αλλαγές να οφείλονται στη μεγάλη περιεκτικότητα των διαλυμάτων σε γλυκόζη (*Di Paolo and Sacchi, 2000*).

Όπως αναφέρθηκε, τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα. Σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ένταξη στην περιτοναϊκή κάθαρση, τα μεσοθηλιακά κύτταρα χάνουν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο και αποκτούν χαρακτηριστικά ινοβλαστών (*Yanez-Mo et al, 2003*). Οι βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν θυμίζουν αυτές που συναντώνται στην επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάπτωση. Η μεσεγγυματική

μετάπτωση αποτελεί ένα σύνολο από διαδικασίες που αρχίζουν με τη διάρρηξη των διακυτταρικών δεσμών, την απώλεια του φορτίου και καταλήγουν σε μετατροπή των μεσοθηλιακών κυττάρων, σε κύτταρα παρόμοια με τις ινοβλάστες με αυξημένη ικανότητα πρόκλησης ίνωσης (*Thiery, 2003*). Οι ινοβλάστες που προκύπτουν, είναι το αποτέλεσμα της μεσεγγυματικής μετάπτωσης του περιτοναϊκού ιστού στα πλαίσια της επανόρθωσής του από τις βλάβες που προκαλεί η περιτοναϊκή κάθαρση. Ένα μέρος αυτών, ως αποτέλεσμα της αυξημένης διεισδυτικής τους ικανότητας, διηθεί τον υπομεσοθηλιακό ιστό και προκαλεί ίνωση του περιτοναίου (*Yanez-Mo et al, 2003*).

Η ανάπτυξη ινώδους ιστού στην περιτοναϊκή μεμβράνη είναι πολυπαραγοντική. Η χρόνια φλεγμονή, καθώς επίσης και η έκθεση της μεμβράνης στα διαλύματα κάθαρσης, ενισχύουν την παραπάνω διαδικασία. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι κατά ένα μεγάλο μέρος η ανάπτυξη ίνωσης εξαρτάται από το βαθμό της αγγειοπάθειας η οποία οδηγεί σε μια σχετική ισχαιμία που με τη σειρά της επιτείνει την ανάπτυξη ίνωσης (*Pereira et al, 1992*).

Όπως είναι γνωστό, ο κύριος ωσμωτικός παράγοντας των διαλυμάτων της περιτοναϊκής κάθαρσης είναι η γλυκόζη και αποτελεί ίσως μια από τις πιο σημαντικές αιτίες που προκαλεί την αποδιοργάνωση του περιτοναίου. Φαίνεται ότι η γλυκόζη και τα προϊόντα αποδόμησής της, μέσω του σχηματισμού των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), προκαλούν την παραγωγή μιας σειράς διεγερτών, συμπεριλαμβανομένου του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα (βTGF), που χαρακτηρίζονται από ισχυρή ινογενετική δράση. Ο βTGF είναι γνωστό πως επάγει και συντονίζει τη μεταμόρφωση των μεσοθηλιακών κυττάρων σε ινοβλάστες (*Margets et al, 2001*). Το υπερδιήθημα των ασθενών, που υποβάλλονται

σε περιτοναϊκή κάθαρση, περιέχει αυξημένες συγκεντρώσεις του βTGF, απόρροια της αυξημένης τοπικής παραγωγής του μετά από την έκθεση της περιτοναϊκής μεμβράνης στη γλυκόζη (Zweers *et al*, 1990). Άλλωστε, ο βTGF αποτελεί το βασικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ανάπτυξη της διάμεσης ίνωσης στη διαβητική νεφροπάθεια (Sharma and Ziyadeh, 1995). Είναι γνωστό, επίσης, ότι ο βTGF παράγεται και κατά τη διάρκεια των περιτονίτιδων και αποτελεί γενικά κακό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της περιτοναϊκής κάθαρσης (Lai *et al*, 2000).

Η ίνωση δεν είναι η μοναδική δομική αλλαγή που παρατηρείται στην περιτοναϊκή μεμβράνη ως αποτέλεσμα της περιτοναϊκής κάθαρσης. Καθοριστικής σημασίας είναι και οι αλλαγές που συμβαίνουν στο αγγειακό της δίκτυο. Παρατηρούνται αλλαγές τόσο στον αριθμό των τριχοειδών όσο και στη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, οι αγγειακές ανωμαλίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικού βαθμού υποενδοθηλιακή υαλίνωση κυρίως των φλεβιδίων, των μικρών φλεβών και συχνά των αρτηριολίων, με αποτέλεσμα την πλήρη απόφραξη του αυλού των αγγείων και το διπλασιασμό της βασικής μεμβράνης ακόμα και των τριχοειδών. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της εξωκυττάριας ουσίας και εναπόθεση κολλαγόνου τύπου IV στο τοίχωμα των αρτηριών. Οι παραπάνω αλλαγές συνδέονται άμεσα με την εναπόθεση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) στο τοίχωμα των αγγείων (Williams *et al*, 2002). Η αγγειογένεση και η αυξημένη διαπερατότητα των μικρών αγγείων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της διαπερατότητας των ουσιών και την απώλεια της υπερδιήθησης (Williams *et al*, 2002). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) αποτελεί μια ισχυρή αγγειογενετική κυτοκίνη που εμπλέκεται στην αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειακή διαπερατότητα. Η

τοπική σύνθεση του VEGF, κατά τη χρόνια περιτοναϊκή κάθαρση, παίζει κεντρικό ρόλο στην νεοαγγειογένεση και τη λειτουργική φθορά του περιτοναίου (*Aroeira et al, 2005*). Το πλήθος αυτών των αλλαγών που παρατηρούνται στο αγγειακό δίκτυο της περιτοναϊκής μεμβράνης προσομοιάζει τις αλλαγές που συναντώνται στη διαβητική μικροαγγειοπάθεια. Είναι σαφής η συσχέτιση ανάμεσα στη βαρύτητα της αγγειοπάθειας με την απώλεια της υπερδιήθησης και τη διάρκεια της περιτοναϊκής κάθαρσης (*Williams et al, 2002*).

Στους παράγοντες, που μπορούν να επιδράσουν στα χαρακτηριστικά της περιτοναϊκής μεμβράνης ως μεμβράνη κάθαρσης συγκαταλέγεται και η ουραιμία. Είναι φανερό επίσης, ότι μπορεί να επηρεάσει τη δομή των μεσοθηλιακών κυττάρων και συνεργικά, με τη βλάβη που προκαλείται στο μεσοθήλιο από τα περιτοναϊκά διαλύματα, να συμβάλλει στη μεσεγχυματική μετάπτωση τους (*Combet et al, 2001*).

Η μεγαλύτερη πρόκληση για την περιτοναϊκή κάθαρση είναι η διατήρηση της ακεραιότητας και της λειτουργικότητας της μεμβράνης, για όσο το δυνατόν μακρότερο χρονικό διάστημα. Δυστυχώς, η έκθεση της περιτοναϊκής μεμβράνης σε υπέρτονα, υπεργλυκαιμικά και όξινα διαλύματα κάθαρσης, καθώς και τα συχνά επεισόδια περιτονίτιδας προκαλούν βλάβες στο περιτόναιο που καταλήγουν στη δημιουργία ίνωσης και αγγειογένεσης.

ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1

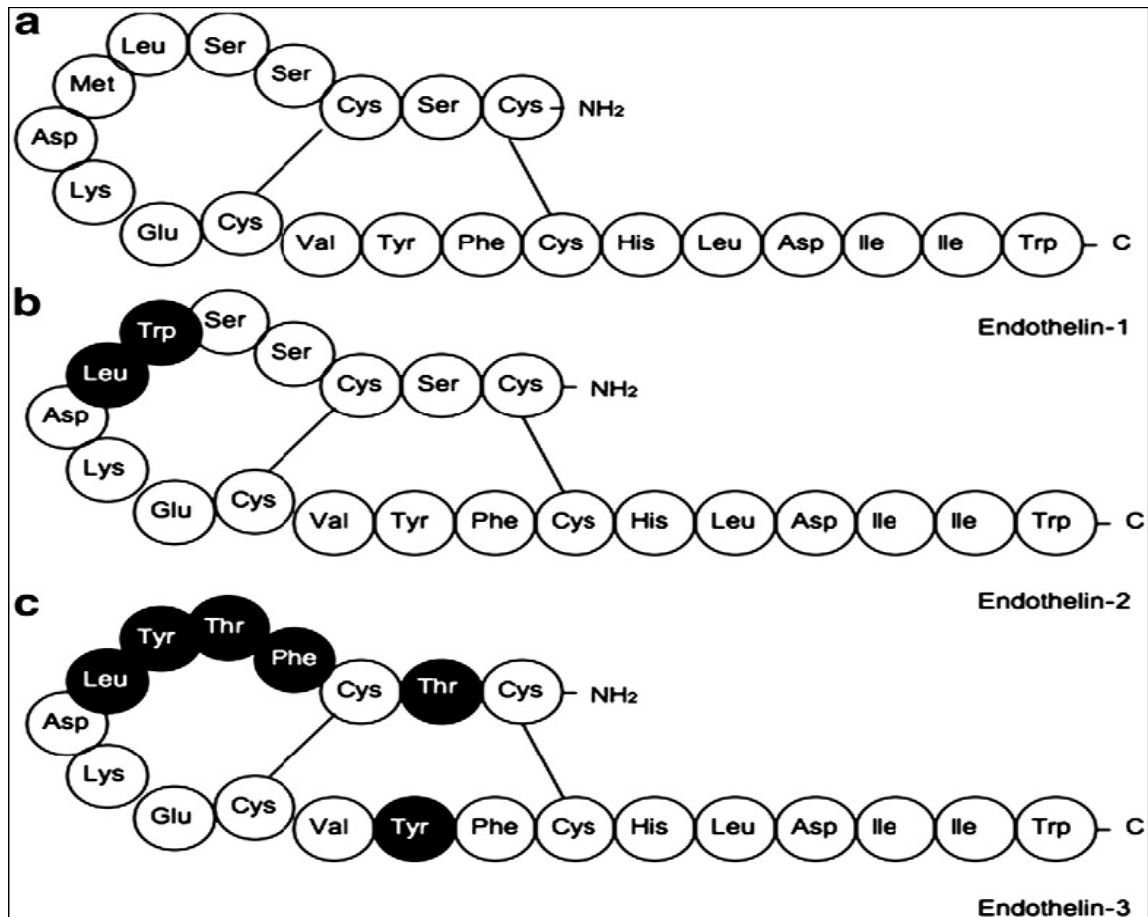
Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) απομονώθηκε για πρώτη φορά από καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής χοίρου το 1988 από τον Yanagisawa και τους συνεργάτες του. Πρόκειται για ένα πεπτίδιο με 21 αμινοξέα και 2492 Daltons

μοριακό βάρος. Οι δυο δισουλφιδικές γέφυρες, που εντοπίζονται στη χημική της σύσταση, αποτελούν μοναδικό εύρημα μεταξύ των πεπτιδίων των θηλαστικών. Η μια δισουλφιδική γέφυρα ενώνει τα αμινοξέα της κυστεΐνης στις θέσεις 1 και 15, ενώ η άλλη γέφυρα ενώνει το N-τελικό άκρο (αμινοτελικό) με τα υδροφοβικά αμινοξέα στο C-τελικό άκρο (καρβοξυτελικό) του πεπτιδίου (Εικόνα 1). Το C-τελικό άκρο περιέχει τα αμινοξέα που ενώνονται στους υποδοχείς, ενώ το N-τελικό άκρο καθορίζει τη συγγένεια σύνδεσης στο υποδοχέα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ET-1 εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6 (*Sawamura et al, 1989*).

Η ET-1 αν και εκκρίνεται κυρίως από το ενδοθήλιο, συντίθεται επίσης στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, τα μεσοθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα μακροφάγα, τις ινοβλάστες, τους νευρώνες του εγκεφάλου, τα καρδιακά μυοκύτταρα και τα νησίδια του παγκρέατος. Γενικά, παράγεται από μια πληθώρα κυττάρων σχεδόν σε όλα τα όργανα [Πίνακας 1]. Δρα ως παρακρινικός ή αυτοκρινικός παράγοντας, μέσω της ένωσης με δυο τουλάχιστον υποδοχείς (*Khimji and Rockey, 2010*).

Την έκκριση της ET-1 διεγείρουν εκτός από την ίδια την ενδοθηλίνη, η αγγειοτενσίνη II, οι κατεχολαμίνες, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, οι ελεύθερες ρίζες, η θρομβίνη, η ινσουλίνη, οι παράγοντες φλεγμονής, η υποξία και η διατημητική τάση (*Levin, 1995*). Αντίθετα, τη σύνθεσή της αναστέλλουν το νιτρικό οξείδιο, το νατριουρητικό πεπτίδιο, η ηπαρίνη και οι προσταγλανδίνες (*Motte et al, 2006*).

Εκτός από την ET-1, έχουν ταυτοποιηθεί άλλες δυο μορφές ενδοθηλίνης, η ενδοθηλίνη-2 (ET-2) και ενδοθηλίνη-3 (ET-3). Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν βρίσκονται αντίστοιχα στα χρωμοσώματα 1 και 20.



Εικόνα 1: Η χημική δομή των τριών ομάδων των ενδοθηλινών

Η ET-2 διαφέρει σε δύο αμινοξέα από την ET-1 (Inoue et al, 1989). Εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συναντάται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, στις ωθήκες και τους νεφρούς. Η ET-2, αν και έχει μελετηθεί λιγότερο, αποτελεί ισχυρό αγγειοσυσπαστικό. Υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καρδιακή ανεπάρκεια, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην καρκινογένεση. Επίσης, η ET-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των ωθηκών και είναι αυτή που καθορίζει την τελική φάση της ωορρηξίας (Maguire et al, 2012).

Η ώριμη μορφή της ET-3 διαφέρει από την ET-1 σε έξι αμινοξέα. Συναντάται στο πλάσμα και σε ιστούς, όπως η καρδιά, ενώ δεν παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο νευρικό σύστημα, όπου παίζει

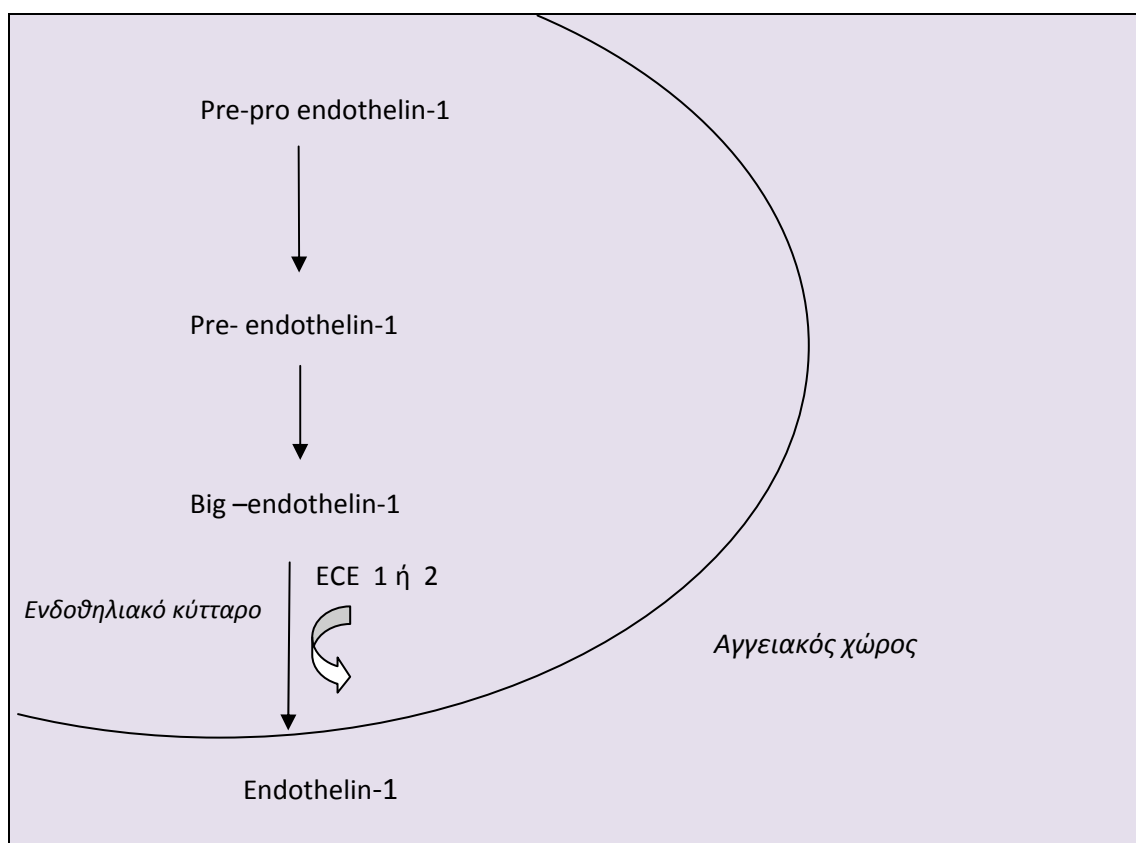
ένα σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανοικοδόμηση. Επίσης, παράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και των νεφρικών σωληναρίων. Η ET-3 προκαλεί την απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών ουσιών όπως το μονοξείδιο του αζώτου και την προστακυκλίνη (*Matsumoto et al, 1989*).

Ενδοθηλίνη-1	Ενδοθηλίνη-2	Ενδοθηλίνη-3
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού	Νευρωνικά στρωματικά κύτταρα
Καρδιομυοκύτταρα	Γαστρεντερικά στρωματικά κύτταρα	Νευρογλοιακά κύτταρα
Λεία μυϊκά κύτταρα αορτής	Καρδιομυοκύτταρα	Κύτταρα των επινεφριδίων
Επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού	Τροφοβλάστη	Επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα
Νευρωνικά στρωματικά κύτταρα	Επιθηλιακά κύτταρα των αδένων της μήτρας	Επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου
Αστροκύτταρα		Επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού
Νευροεκκριτικές νευρικές απολήξεις της νευροϋπόφυσης		
Μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού		
Κύτταρα Sertoli		
Κύτταρα του ενδομητρίου		

Πίνακας 1. Πηγές παραγωγής ET-1, ET-2, ET-3

Σύνθεση της ενδοθηλίνης-1

Η ET-1 παράγεται μέσα από μια πολύπλοκη μοριακή διαδικασία. Προέρχεται από ένα πρόδρομο πεπτίδιο που ονομάζεται προπροενδοθηλίνη-1. Η προπροενδοθηλίνη-1 μετατρέπεται σε ένα πεπτίδιο με 203 αμινοξέα, γνωστό ως πρενδοθηλίνη-1. Με τη μεσολάβηση μιας ενδοπεπτιδάσης η πρενδοθηλίνη-1 μετατρέπεται στην μεγάλη ενδοθηλίνη-1 (big ET-1). Στη συνέχεια, η μεγάλη ενδοθηλίνη-1 μέσω του μετατροπικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (ECE) μετατρέπεται στην τελική μορφή της (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σύνθεση της ενδοθηλίνης-1

Έχουν προσδιοριστεί τρεις τύποι μετατρεπτικού ενζύμου: ECE-1, ECE-2 και ECE-3. Τα παραπάνω ένζυμα ανήκουν στην ομάδα M13 των πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει τύπου II δομικές πρωτεΐνες της μεμβράνης με δραστηριότητα μεταλοπρωτεασών. Όμως, το ECE-1 είναι το κύριο λειτουργικό ένζυμο και για τις τρεις ομάδες ενδοθηλίνης.

Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί 4 υποομάδες ECE-1: ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c και ECE-1d. Ο ECE-1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Φαίνεται να επεξεργάζεται τις μεγάλες ενδοθηλίνες τόσο ενδοκυττάρια όσο και στην επιφάνεια του κυττάρου. Κατανέμεται κυρίως στα λεία μυϊκά κύτταρα. Ο ECE-1 συμμετέχει και στη διαδικασία υδρόλυσης πρωτεϊνών, όπως η βραδυκινίνη και η ινσουλίνη. Ο ECE-2 εντοπίζεται στο δίκτυο Golgi και εκκρίνεται σε αφθονία στο νευρικό ιστό και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ECE-1 και ο ECE-2 δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση για τη μεγάλη ET-1 σε σχέση με τη μεγάλη ET-2 και μεγάλη ET-3 (*Khimji and Rockey, 2010*).

Έχει διαπιστωθεί ότι το 50-90% της ET-1, που εκκρίνεται, βρίσκεται στην ώριμη μορφή της, ενώ έχουν αναγνωριστεί δύο κύριοι δρόμοι έκκρισής της. Ο ένας δρόμος εμπλέκει την έκκρισή της σε εκκριτικούς κόκκους, γνωστοί και ως σωματίδια Weilbel-Palade, που φαίνεται να παίζουν το ρόλο του διαμερίσματος αποθήκευσης της ET-1. Μετά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα σωματίδια Weilbel-Palade μετατοπίζονται, συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους με τη διαδικασία της εξωκύττωσης. Η παραπάνω διαδικασία ενεργοποιείται μετά από εξωτερικό ερέθισμα, όπως

υποθερμία, μηχανικό στρες ή υπό την επίδραση ουσιών, όπως ισταμίνη και θρομβίνη (Mourik et al, 2002).

Ο δεύτερος δρόμος έκκρισης της ET-1 είναι δομικός και αποτελεί τον κύριο εκκριτικό μηχανισμό. Απαντάται στα περισσότερα κύτταρα που παράγουν ενδοθηλίνη και συμβάλλει στη έκκριση μεγαλύτερων ποσοτήτων απ' ότι ο πρώτος τρόπος (Russell and Davenport, 1999).

Η ET-1, που παράγεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, απελευθερώνεται στη βασική επιφάνεια των κυττάρων όπου και δρά πάνω στα λεία μυϊκά κύτταρα. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ET-1 συναντώνται στις συνδέσεις μεταξύ του ενδοθηλίου και των λείων μυϊκών κυττάρων. Έτσι, η συγκέντρωση της ET-1 στους ιστούς είναι υψηλότερη απ' ότι στο πλάσμα, και η αλλαγή στα επίπεδα συγκέντρωσής της στο πλάσμα, ως απάντηση στα διάφορα ερεθίσματα, είναι αργή. Ενδεικτικά η συγκέντρωση της ET-1 στο πλάσμα είναι 1-10 pmol/L. Επίπεδα ET-1 πλάσματος κάτω των παραπάνω ορίων μπορεί να προκαλέσουν αγγειασύσπαση γεγονός που αποδεικνύει ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα ET-1 δεν αντανακλούν τη φυσιολογική της δράση (Haynes and Webb, 1998). Η επαγωγή της έκκρισης της ET-1 πάνω από το βασικό επίπεδο διαρκεί 2 με 5 ώρες και εξαρτάται από το μηχανισμό σύνθεσης και απελευθέρωσης (Nucci et al, 1988). Γι' αυτό το λόγο, η ET-1 θεωρείται ένα πεπτίδιο με αυτοκρινική/παρακρινική δράση παρά ένα πεπτίδιο με ενδοκρινική δράση. Άρα, τα επίπεδα της κυκλοφορούσας ET-1 αντιπροσωπεύουν την περίσσεια της ενδογενούς ET-1 που είναι συνδεδεμένη με τους ιστούς και δεν αποτελούν ένδειξη της δραστικότητάς της. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα σε παθολογικές καταστάσεις αποτελούν έναν ανακριβή δείκτη αγγειακής ενδοθηλιακής δραστηριότητας. Αντίθετα οι αυξημένες συγκεντρώσεις ET-

1 στα ούρα αντικατοπτρίζουν τοπική νεφρική δραστηριότητα παρά συστηματική δράση της ET-1 (*Wagner et al, 1999*).

Η κάθαρση της ET-1 από την κυκλοφορία είναι πολύ γρήγορη. Μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση αυτού του πεπτιδίου ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι ένα λεπτό, ενώ η αγγειοσυσπαστική δράση διαρκεί για μια ώρα. Το μεγαλύτερο μέρος της κυκλοφορούσας ET-1 καθαίρεται κυρίως από το πνευμονικό αγγειακό δίκτυο και ένα μικρότερο ποσοστό μέσω των νεφρών. Η διαδικασία της κάθαρσης στους πνεύμονες πραγματοποιείται μέσω των Β υποδοχέων. Μια απλή διέλευση μέσω των πνευμόνων έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του 50% της κυκλοφορούσας ET-1 (*Duruis et al, 1996*).

Μηχανισμός δράσης της ενδοθηλίνης-1

Η δράση της ET-1 είναι εξαιρετικά περίπλοκη και η ενεργοποίηση των υποδοχέων της οδηγεί σε ποικίλες κυτταρικές αντιδράσεις, μέσω αλληλεπιδράσεων σε μια αλυσίδα οδών που περιλαμβάνουν τον G-πρωτεΐνης ενεργοποιημένου επιφανειακό κυτταρικό υποδοχέα (G-protein activated cell surface receptor), τις G-συζευγμένες πρωτεΐνες, την οδό της φωσφολιπάσης και άλλους G-πρωτεΐνης συζευγμένους συντελεστές.

Σε ένα από τα κλασικά μονοπάτια δράσης, η ενεργοποίηση του ETA υποδοχέα από τη φωσφολιπάση C οδηγεί στην παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol triphosphate) και της διακυγλυκερίνης (DAG) από την 4,5 διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP₂). Η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) διαχέεται σε ειδικούς υποδοχείς στο ενδοπλασματικό δίκτυο και απελευθερώνει το αποθηκευμένο Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Αυτό οδηγεί σε μια απότομη αύξηση του

ενδοκυττάριου Ca^{2+} γεγονός που με τη σειρά του προκαλεί κυτταρική συστολή και αγγειοσύσπαση. Η αγγειοσυσπαστική δράση της ET-1 παραμένει, παρόλο που η ET-1 έχει διαχωριστεί από τους υποδοχείς. Αυτό συμβαίνει πιθανά επειδή τα ενδοκυττάρια επίπεδα του Ca^{2+} παραμένουν υψηλά (Chester et al, 1989) ή επειδή οι μηχανισμοί δράσης της ET-1 παραμένουν ενεργοποιημένοι για μακρό χρονικό διάστημα (Clarke et al, 1989).

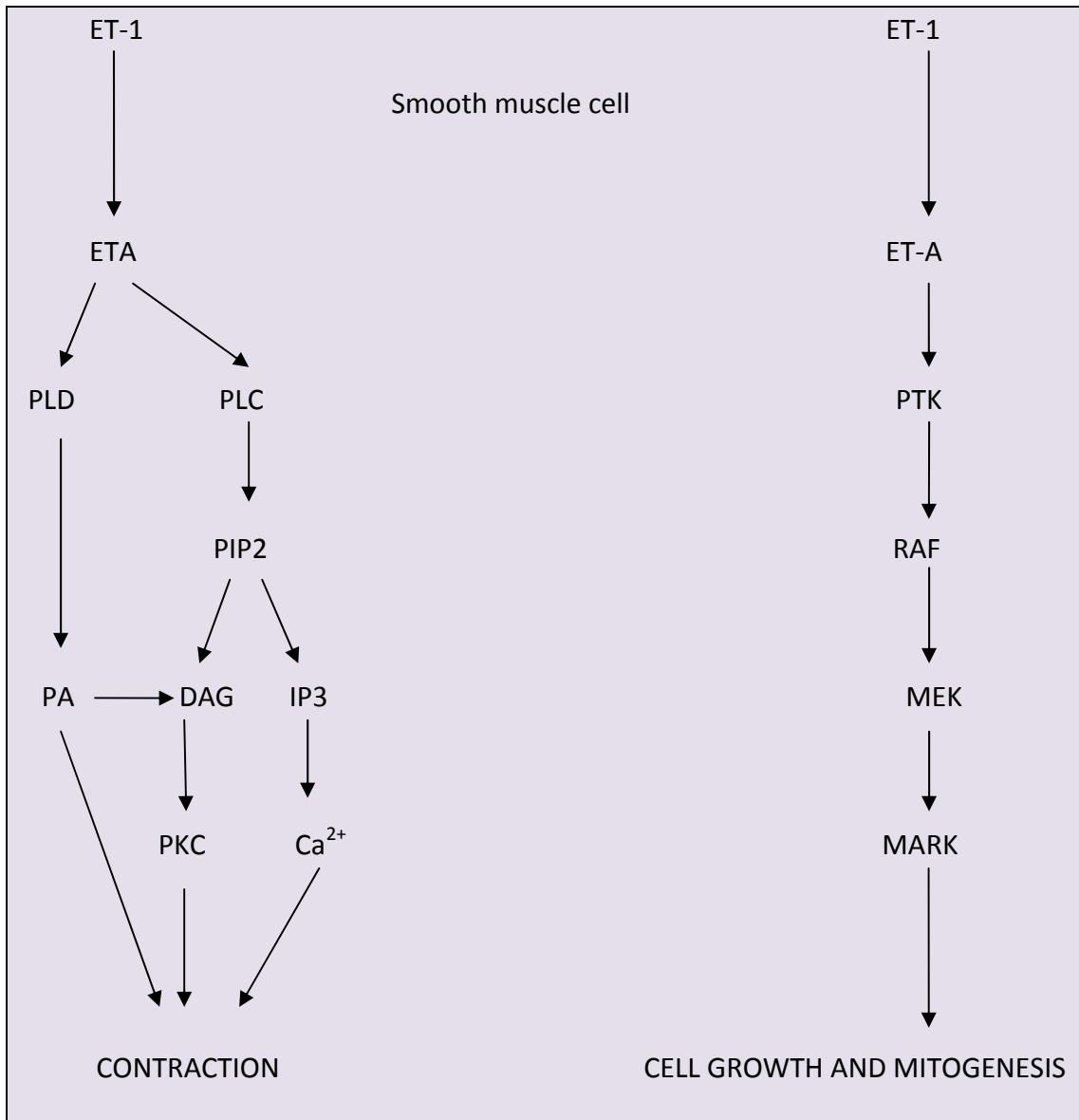
Σε λιγότερο κλασικούς μηχανισμούς δράσης της, όπως στα μυοκύτταρα των καρδιακών κοιλιών, η ET-1 διεγείρει την φωσφατιδυλοχολίνη, ειδική φωσφολιπάση (PC-PLD) και την φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη, ειδική φωσφολιπάση C (PI-PLC). Και τα δυο παραπάνω ένζυμα ενώνονται στον ETA υποδοχέα και τον ενεργοποιούν (Clerk and Sugden, 1997). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του φωσφατιδικού οξέος (PA) και χολίνης από τη φωσφατιδυλοχολίνη (PLD). Η αποφωσφορυλίωση του φωσφατιδικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της διακυλγλυκερίνης (DAG) που παίζει το ρόλο του ενεργοποιητή της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Το τελικό αποτέλεσμα της παραπάνω αλυσίδας αντιδράσεων είναι η σύσπαση των καρδιακών μυοκυττάρων (Taher et al, 1993).

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι η ET-1 διεγείρει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος και της προσταγλανδίνης στην ίριδα των κουνελιών και στα στεφανιαία αγγεία χοίρου, ως απάντηση της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A_2 και του αυξημένου ενδοκυττάριου ασβεστίου. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι στον ακτινωτό μυ του οφθαλμού, η ET-1 μέσω της οδού της cAMP διεγείρει την έκκριση της προσταγλανδίνης με αποτέλεσμα τη χαλάρωσή του (Kajikuri et al, 1992).

Με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης και την παραγωγή του αραχιδονικού οξέος, επιπλέον η ET-1 διεγείρει την πρωτεϊνική τυροσινική κινάση (PTK) στα

νεοπλασματικά κύτταρα (*Nelson et al, 2003*). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή στις οδούς των μιτογόνων-ενεργοποιητών κινασών RAF/MEK/MAPK (mitogen-activated protein kinase) και την συνακόλουθη διέγερση της μεταγραφής των πρωτοογκογονιδίων με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τις μεταστάσεις (Εικόνα 3).

Επίσης, σε ένα κλασικό δρόμο δράσης της, η ET-1 διεγείρει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής NO-συνθάσης (eNOS) (*Herrera et al, 2009*). Φαίνεται όμως το NO έχει αγγειοχαλαρωτική δράση και ανταγωνίζεται την περαιτέρω σύνθεση της ET-1 καταστέλλοντας τη μεταγραφή της προπεπτο ET-1 (*Khimji and Rockey, 2010*).



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης της ET-1

Ενδοθηλίνη-1 και καρδαγγειακό σύστημα

Η ET-1 αναγνωρίστηκε ως το πιο ισχυρό αγγειοσυσπαστικό πεπτίδιο που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και χαρακτηρίζεται από δράση μακράς διάρκειας (Yanagisawa et al, 1988). Ενδεικτικά παρουσιάζει 10 φορές πιο ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση από την αγγειοτεσίνη II. Επομένως, αποτελεί βασικό παράγοντα της ρύθμισης του τόνου του περιφερειακού αγγειακού δικτύου και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης στον ανθρώπινο οργανισμό (Haynes et al, 1996).

Η ET-1 ασκεί απευθείας αγγειοσυσπαστική δράση στο αρτηριακό σύστημα μέσω της σύσπασης των λείων μυϊκών κυττάρων. Επιδρά, όμως, έμμεσα και σε άλλους νευροορμονικούς και ενδοκρινικούς παράγοντες, συμμετέχοντας στην παθοφυσιολογία της ιδιοπαθούς υπέρτασης. Έτσι, η ET-1 προκαλεί μετατροπή της αγγειοτεσίνης I σε αγγειοτεσίνη II διεγείροντας τη σύνθεση της επινεφρίνης και της αλδοστερόνης in vitro. Λειτουργεί δηλαδή συνεργικά με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτεσίνης-αλδοστερόνης, με αποτέλεσμα την αγγειοσύσπαση (Rossi et al, 1999).

Η ET-1 επίσης συμμετέχει στην υπερτροφία του αρτηριακού τοιχώματος γεγονός σημαντικό στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης. Αν και στο πλάσμα των ασθενών με υπέρταση τα επίπεδα της ET-1 είναι φυσιολογικά, η συγκέντρωσή της όμως στο αγγειακό τοίχωμα είναι αυξημένη. Αποτέλεσμα αυτού του δεδομένου, είναι η αυξητική της επίδραση στο τοίχωμα των αγγείων, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στις ινοβλάστες. Επομένως η αποδιοργάνωση του συστήματος της ET-1 έχει ως αποτέλεσμα την αρτηριοσκλήρυνση και την εμφάνιση επιπλοκών, όπως χρόνια νεφρική νόσο, αγγειακή υπέρτασική εγκεφαλοπάθεια και καρδιακή νόσο (Ikeda et al, 1999).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ανταγωνιστές των ETA υποδοχέων της ET-1 μπορούν να μειώσουν την αρτηριακή υπέρταση σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο δρώντας συνεργικά με τους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης. Επιπρόσθετα, οι ETA ανταγωνιστές της ET-1 μπορούν να επιδράσουν θετικά στη μείωση της πρωτεϊνουρίας τόσο στη διαβητική όσο και στη μη διαβητική νεφροπάθεια. Άρα οι ανταγωνιστές της ET-1 θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα γενιά φαρμάκων για τη θεραπεία της υπέρτασης, προσφέροντας όμως και αρκετά οφέλη στην αντιμετώπιση της χρόνια νεφρικής νόσου που αυτή συνεπάγεται (*Dhaum et al, 2009*).

Η ET-1 έχει συνδεθεί με την παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας τόσο στους ανθρώπους όσο και σε πειραματικά μοντέλα. Τα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια είναι 2-3 φορές υψηλότερα, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή από τον καρδιακό ιστό αλλά και από τους πνεύμονες. Η βαρύτητα των συμπτωμάτων και οι αιμοδυναμικές ανωμαλίες που συναντώνται στην καρδιακή ανεπάρκεια, σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα ET-1 στον ορό που αποτελούν επίσης σοβαρό προγνωστικό δείκτη. Επίσης, η ET-1 διεγείρει την έκκριση νευροορμονών, όπως βασοπρεσίνη, αγγειοτεσίνη II και τη νορεπινεφρίνη που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας και έχουν και αρρυθμογόνο δράση (*McMurray et al, 1992*).

Η χρήση ανταγωνιστών της ET-1 σε πειραματικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας είχε θετικά αποτελέσματα. Ωστόσο η θεραπεία ασθενών με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια με ανταγωνιστές της ET-1 δεν ήταν δραστική και σε πολλές περιπτώσεις είχε ως αποτέλεσμα και την επιδείνωσή τους. Οι ανταγωνιστές συνδέθηκαν με αρκετά σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως βαριά υπόταση και

ηπατοτοξικότητα, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκε και περαιτέρω επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας (Szokodi et al, 2003).

Η δράση της ET-1 έχει συσχετιστεί με την υπερτροφία της αριστεράς κοιλίας. Εκτός από την άμεση επίδραση που ασκεί στα μυοκύτταρα, διεγείρει και την έκκριση κυτοκινών, την παραγωγή φιμπρινονεκτίνης και κολαγόνου, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρδιακής ίνωσης και την υπερτροφία της αριστεράς κοιλίας (Piacentini et al, 2000).

Επίσης, η ET-1 φαίνεται να εμπλέκεται και στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιακού ισχαιμικού συνδρόμου. Η ET-1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αντίστασης των στεφανιαίων αγγείων και στην αιματική ροή των τριχοειδών προκαλώντας αγγειοσύσπαση (Kinlay et al, 2001). Έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα ET-1 στις αθηρωματικές πλάκες ασθενών με στεφανιαία νόσο (Zeiber et al, 1994). Ο υποκείμενος μηχανισμός της πρόκλησης της αρτηριοσκλήρυνσης από την ET-1, βασίζεται στη διέγερση της παραγωγής του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β), του αυξητικού παράγοντα προερχόμενου από τα αιμοπετάλια (PDGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινωβλαστών (BFGF) και μορίων συγκόλλησης που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Goettsch et al, 2001). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα αυξάνονται σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και ασταθή στηθάγχη και αποτελούν κακό προγνωστικό δείκτη (Hoffmann et al, 1998). Παρόμοια η επαναστένωση των αγγείων μετά από επιτυχή διαδερμική αγγειοπλαστική συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των στεφανιαίων ως αποτέλεσμα της δράσης της ET-1 (Shirai et al, 2006). Αν και η χρήση ανταγωνιστών της ET-1 σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται να μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος, η

μακροχρόνια χορήγησή τους δε φαίνεται να έχει ευεργετική δράση και να βελτιώνει την επιβίωση (*Cernacek et al, 2003*).

Τέλος, η ET-1 εμπλέκεται στην παθογένεια και άλλων αγγειακών παθήσεων όπως η νόσος του Raynaud (*Zamora et al, 1990*), η προεκλαμψία (*Ajne et al, 2003*), καθώς και σε νόσους όπου παρατηρείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, όπως ο διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο και η υπερλιποπρωτεϊναιμία (*Mather et al, 2002*).

Ενδοθηλίνη-1 και νεφρός

Στο νεφρό η ET-1 παράγεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα των αθροιστικών σωληναρίων. Αν και συναντώνται και οι δυο υποδοχείς, φαίνεται πως στα επιθηλιακά κύτταρα οι ETB υπερέχουν. Το νεφρικό αγγειακό δίκτυο είναι πιο ευαίσθητο στην επίδραση της ET-1 συγκρινόμενο με τα αγγεία άλλων οργάνων. Η ET-1 προκαλεί αγγειοσύσπαση τόσο στο προσαγωγό όσο και στο απαγωγό αρτηριόλιο του νεφρικού σπειράματος. Εκτός από τις αιμοδυναμικές επιδράσεις, η ET-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην επαναρρόφηση του άλατος και του ύδατος, τη διατήρηση της οξεοβασικής ισοροπίας, την προαγωγή της ανάπτυξης των μεσαγγειακών κυττάρων και την ενεργοποίηση των κυττάρων φλεγμονής (*Evans et al, 1998*).

Η ET-1 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της οξείας νεφρικής βλάβης, της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας καθώς επίσης της σπειραματοσκλήρυνσης και της διάμεσης ίνωσης (*Hocher et al, 1997*). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα σχετίζονται με τη βαρύτητα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (*Remuzzi and Benigni, 1993*). Σε πειραματικά μοντέλα η χρήση ανταγωνιστών είχε ως αποτέλεσμα την προστατευτική δράση έναντι στην ισχαιμική βλάβη, στην αυτοάνοση νεφρίτιδα, στη

νεφρίτιδα του λύκου, στη διαβητική νεφροπάθεια και στην νεφροτοξικότητα οφειλόμενη στην καλσινευρίνη (*Sugimoto et al, 2001*). Σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια η χορήγηση εκλεκτικών αναστολέων των ETA υποδοχέων οδήγησε στη μείωση της πρωτεϊνουρίας και τη βελτίωση της αρτηριακής πίεσης (*Goddard et al, 2004*). Γίνεται σαφές, λοιπόν, ότι το σύστημα της ET-1 είναι αρκετά σημαντικό στη νεφρική παθολογία. Χρειάζονται, όμως, περαιτέρω έρευνα και προσθήκη επιπλέον γνώσης για το ρόλο των ανταγωνιστών τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια νεφρική βλάβη.

Ενδοθηλίνη-1 και αναπνευστικό σύστημα

Η ET-1 παράγεται και απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών αγγείων (*Mattoli et al, 1990*). Οι υποδοχείς της ET-1 είναι εκτενώς κατανομημένοι στα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών και των πνευμονικών αγγείων και στο δίκτυο του αυτόνομου νευρικού συστήματος που πλαισιώνει τους μύες της τραχείας (*Ergul et al, 1995*). Η ET-1 έχει ισχυρή βρογχοσπαστική δράση (*Macquin-Mavier et al, 1989*) και εμπλέκεται σε μια σειρά πνευμονικών διαταραχών, όπως το άσθμα (*Sofia et al, 1993*), την κρυπτογενή ινωτική κυψελίτιδα και την πνευμονική υπέρταση (*Giaid et al, 1993*). Αυξημένη δραστηριότητα της ET-1, που προκαλεί αύξηση του αγγειακού τόνου και ανακατασκευή της δομής των αγγείων, έχει διαπιστωθεί στο πνευμονικό αγγειακό δίκτυο των ασθενών με πνευμονική υπέρταση (*Giaid et al, 1993*). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πιο σημαντικά αποτελέσματα από τη χρήση των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1, παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με πνευμονική υπέρταση. Έτσι διαπιστώθηκε μείωση του αγγειόσπασμου του αγγειακού πνευμονικού δικτύου,

βελτίωση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας και του πάχους του τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών (*Rubin et al, 2002*).

Ενδοθελίνη-1 και νευρικό σύστημα

Αξιοσημείωτη είναι η δράση της ET-1 στο νευρικό σύστημα. Όπως προαναφέρθηκε η ET-1, η ET-3 καθώς και οι υποδοχείς τους συναντώνται τόσο στα νευρογλοιακά και νευρωνικά κύτταρα όσο και στα αγγεία του νευρικού συστήματος. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι η ET-1 είναι σημαντική για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης στον νευρικό σύστημα, για τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, τη ρύθμιση της αναπνοής και τη δράση του συμπαθητικού στο νεφρό (*Macrae et al, 1993*). Επιπρόσθετα, η ET-1 εμπλέκεται στην απελευθέρωση νευροπεπτιδίων όπως η προλακτίνη και οι γοναδοτροπίνες (*Stojilkovic et al, 1990*), ενώ είναι σημαντική η δράση της σχετικά με τις νευροσυμπεριφορικές απαντήσεις, όπως η ιδιοδεκτικότητα και η θερμοκρασία (*Zhu and Herbert, 1996*).

Η ET-1 φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στις αγγειακές παθήσεις του νευρικού συστήματος. Έχει καταγραφεί αυξημένη δραστηριότητά της στο αγγειακό δίκτυο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε περιπτώσεις αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Στις υπαραχνοειδείς αιμορραγίες έχουν διαπιστωθεί πολύ υψηλά επίπεδα ET-1 με αρκετά ισχυρή επίδραση στις εγκεφαλικές αρτηρίες, ενώ θεωρείται ο κύριος διαμεσολαβητής του αγγειόσπασμου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1 σε πειραματικά μοντέλα με ζώα έδειξε να έχει προστατευτική δράση στην εγκεφαλική αγγειοπάθεια. Η θεραπεία ασθενών, όμως, με ανταγωνιστές της ET-1 αν και είχε ευεργετική δράση δε βελτίωσε το συνολικό αποτέλεσμα (*Kramer and Fletcher, 2009*).

Ενδοθηλίνη-1 και καρκινογένεση

Αρκετά δεδομένα δείχνουν ότι η ET-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογία της καρκινογένεσης καθώς διαθέτει ισχυρή μιτογόνο δράση. Θεωρείται εξαιρετικής σημασίας <ορμόνη> για την ανάπτυξη μιας σειράς καρκίνων, όπως του προστάτη (*Pirtskhalaishvili and, Nelson, 2000*), του μαστού (*Alanen et al, 2000*), του πνεύμονα (*Ahmed et al ,2000*), του τραχήλου της μήτρας (*Venuti et al, 2000*), των ωοθηκών (*Bagnato et al, 1995*) και του παχέος εντέρου (*Asham et al, 2001*).

Η άμεση επίδραση της ET-1 στα νεοπλασματικά κύτταρα περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό τους, την αντίσταση στην απόπτωση (*Eberle et al, 2002*), τη μετανάστευση και την επακόλουθη διήθηση των ιστών (*Rosano et al, 2002*). Ο μηχανισμός της έμμεσης δράσης της ET-1 στην καρκινογένεση σχετίζεται με την ιδιότητά της να ελέγχει μια ομάδα κινασών οι οποίες με τη σειρά τους ασκούν άμεση δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την αγγειογένεση, την επιθηλιακή-μεσεγχεματική μετάπτωση, την κινητικότητα και τη διείσδυση των κυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση και μετάσταση (*Knowles et al, 2005*). Επιπλέον, η έμμεση δράση της ET-1 στην καρκινογένεση περιλαμβάνει τη φλεγμονή, την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας και την ανακατασκευή (*Grimshaw et al, 2002*).

Η δράση της ET-1 στη μετάσταση των καρκίνων φαίνεται να είναι έμμεση. Προαγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), διεγείρουν την έκκριση της ET-1 και αυτή με τη σειρά της προκαλεί τη διαδικασία της αγγειογένεσης, (*Knowles et al, 2005*).

Συναθροίζοντας όλες τις παραπάνω δράσεις καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ET-1 είναι ένα πεπτίδιο με σημαντική συμμετοχή στη διαδικασία της

καρκινογένεσης και τα επίπεδά της στο πλάσμα ασθενών που πάσχουν από καρκίνο θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα σημαντικό προγνωστικό δείκτη. Σε θεραπευτικό επίπεδο θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η χρήση εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της ET-1 θα ασκούσε αποτελεσματική αντικαρκινική δράση. Σε μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, η χρήση εκλεκτικών αναστολέων των ETA (*atrasentan*), αν και είχε θετικά αποτελέσματα στη μείωση του PSA και της αλκαλικής φωσφατάσης, δε βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των ασθενών (*Lalich et al, 2007*).

Ενδοθηλίνη-1 και συστηματικά νοσήματα

Τελευταία έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για το ρόλο της ET-1 στα νοσήματα του συνδετικού ιστού. Αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα έχουν βρεθεί στο συστηματικό σκληρόδερμα, στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο, στη μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (*Sharp syndrome*), στη δερματομυοσίτιδα, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στη νόσο του Buerger, στην αρθρίτιδα Takayasu καθώς επίσης και στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (*Mayes, 2003*). Τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα στο σκληρόδερμα σχετίζονται άμεσα με την έκταση της νόσου, με την πνευμονική συμμετοχή, την πνευμονική υπέρταση και τη νεφρική κρίση (*Sticherling, 2006*).

Τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η ET-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ίνωσης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Βασική έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους ανέδειξε ότι η ET-1 είναι βασικός συντελεστής στην παθοφυσιολογία της ίνωσης συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής ίνωσης. Η ET-1 προκαλεί την ενεργοποίηση των ινοβλαστών, τον πολλαπλασιασμό τους και τη διαφοροποίησή

τους σε μυοϊνοβλάστες, διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την εξεσημασμένη εναπόθεση κολλαγόνου (Sticherling, 2006).

Ενδοθηλίνη-1 και ανάπτυξη ουλώδους ιστού

Η ανάπτυξη ουλώδους ιστού είναι μια ολοκληρωμένη απάντηση στην ιστική βλάβη προκαλούμενη κυρίως από τη φλεγμονή. Μια σειρά δεδομένων καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της ET-1 στην ανάπτυξη ουλώδους ιστού σε μια σειρά οργάνων, όπως οι πνεύμονες (Hocher et al, 2000), το δέρμα (Shephard et al, 2004), οι νεφροί (Hocher and Paul, 2000), η καρδιά (Guarda et al, 1993) και το ήπαρ (Rockey et al, 1998).

Ο υποκείμενος μηχανισμός της ινωγενετικής δράσης της ET-1 φαίνεται να είναι πολυπαραγοντικός. Η ET-1 εμφανίζεται να έχει απευθείας δράση ρυθμίζοντας: 1) την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση 2) την ενεργοποίηση και επαγωγή της σύνθεσης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο τύπου I, III και φιβρονεκτίνης 3) την αναστολή αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας μέσω της διέγερσης των κυτταρικών αναστολέων της μεταλοπρωτεϊνάσης (Shi-Wen et al, 2001). Κοινό σημείο στην ανάπτυξη της ίνωσης είναι ότι η ιστική βλάβη οδηγεί στην ενεργοποίηση ειδικών ινογόνων κυττάρων-τελεστών (fibrogenic effector cells). Τα φλεγμονώδη κύτταρα κυρίως διεγείρουν τα κύτταρα-τελεστές με την απελευθέρωση κυτοκινών. Αυτά τα κύτταρα-τελεστές (effector cells) είναι μεσεγχυματικής καταγωγής. Παραδείγματα αποτελούν οι μυοϊνοβλάστες και ινοβλάστες του δέρματος, οι ινοβλάστες της καρδιάς, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού. Τα περισσότερα από τα παραπάνω κύτταρα παρουσιάζουν κάποιου είδους αυτοκρινικής ρύθμισης. Συχνά

αφού τα κύτταρα-τελεστές ενεργοποιηθούν, παράγουν κυτοκίνες που με τη σειρά τους διεγείρουν τα κύτταρα-τελεστές σε μια αυτοκρινική κυκλική αντίδραση.

Η επούλωση των τραυμάτων των ιστών περιλαμβάνει μια σειρά από βιοχημικές και δομικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέου επιθηλίου, αιμοφόρων αγγείων και συνδετικού ιστού, μια διαδικασία δηλαδή ίνωσης (*Razzaque and Tagushi, 2003*). Μελέτη της παραπάνω διαδικασίας κυρίως σε τραυματισμούς του δέρματος θα μπορούσε να αποτελέσει ένα μοντέλο μελέτης της δράσης της ET-1. Τρεις είναι οι βασικές φάσεις της επούλωσης: η φλεγμονή, ο πολλαπλασιασμός και η δημιουργία εξωκυττάριας ουσία με ανακατασκευή του ιστού (*Clark, 1996*). Στις πρώτες φάσεις της φλεγμονής ενεργοποιείται ο μηχανισμός πήξης, κατόπιν τα μακροφάγα αναλαμβάνουν σημαντικό ρόλο συνθέτοντας και εκκρίνοντας ρυθμιστικούς και αυξητικούς παράγοντες (*Greenhalgh, 1996*). Ένα από τα σημαντικά γεγονότα στην ανάπλαση των ιστών, που παρατηρείται τόσο στο δέρμα όσο και στους πνεύμονες ή και σε άλλα όργανα, είναι η μετανάστευση των ινωβλαστών στο σημείο του τραυματισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαδικασίας κατά την οποία οι ινοβλάστες, οι μυοϊνοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλούν την παραγωγή κολλαγόνου, ινικής, φιμπρονεκτίνης, πρωτεογλυκανών και άλλων μορίων που συμμετέχουν στη δημιουργία ουλώδους ιστού. Οι ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες του ουλώδους ιστού εκκρίνουν εξωκυττάρια ουσία βασικό συστατικό της οποίας είναι το κολλαγόνο. Ο ουλώδης ιστός είναι μεταβολικά ενεργός ιστός και χρειάζεται αυξημένη αιματική κυκλοφορία για να στηρίξει την ανάπτυξή του. Η αγγειογένεση, δηλ. η δημιουργία νέων αγγείων, επικρατεί στη φάση του πολλαπλασιασμού του νέου ιστού (*Badyrak, 2002*).

Στη φάση της φλεγμονής η ET-1 μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα και να διεγείρει τα μονοκύτταρα για την παραγωγή κυτοκινών. Επίσης η ET-1 προκαλεί τη χημειοταξία των ινοβλαστών, τον πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό του κολλαγόνου, όπως προαναφέρθηκε (*Peacock et al, 1992*).

Συγκεντρώνοντας όλα τα δεδομένα αποδεικνύεται ότι η ET-1 συμμετέχει ενεργά στην ινογένεση. Η ET-1 είναι ένα μόριο που μπορεί να προκαλέσει αντίσταση στην απόπτωση των ινοβλαστών. Επίσης μπορεί να αυξήσει την έκφραση των προϊνωτικών συστατικών, της φμπρονεκτίνης καθώς επίσης και των αυξητικών παραγόντων του συνδετικού ιστού. Είναι γνωστό επίσης ότι η ET-1 μπορεί να δράσει συνεργικά με μια σειρά μορίων που επιτείνουν τη διαδικασία της ινογένεσης, όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor) και τον προερχόμενο από τα αιμοπετάλια αυξητικό παράγοντα (platelet-derived factor) και να προκαλέσει κυτταρική μετατροπή ή απάντηση (*Shi-Wen et al, 2004*).

Υποδοχείς της ενδοθηλίνης-1

Έχουν αναγνωριστεί δυο ειδών υποδοχείς ενδοθηλίνης: ο υποδοχέας A (ETA) και ο υποδοχέας B (ETB). Ένας τρίτος υποδοχέας απομονώθηκε στα αμφίβια *Xenopus laevis* με αυξημένη συγγένεια στην ET-3 και ονομάστηκε ETc. Μέχρι τώρα αντίστοιχος υποδοχέας στα θηλαστικά δεν έχει εντοπιστεί. Πρόκειται για επταελικοειδής G-πρωτεΐνης συζευγμένοι (heptahelical G protein-coupled) υποδοχείς με μοριακό βάρος από 45 μέχρι 50 KDa, ενώ τα γονίδια που τους κωδικοποιούν βρίσκονται στο 4 και 13 χρωμόσωμα αντίστοιχα. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στους ιστούς, συμβάλλοντας στις φυσιολογικές δράσεις

της ET-1. Έχουν εντοπιστεί σε μια πληθώρα οργάνων, όπως πνεύμονες, καρδιά, νεφροί, γαστρεντερικό σύστημα, επινεφρίδια, οφθαλμός και εγκέφαλος [Πίνακας 2]. Η βασική τους λειτουργία, όμως, είναι η διατήρηση του τόνου των αγγείων (Sakurai et al, 1990).

Ο ETA υποδοχέας αποτελείται από 427 αμινοξέα και κυρίως μεσολαβεί για τις αγγειοσυσπαστικές και τις αυξητικές δράσεις της ET-1 (Ishikawa et al, 1991). Συναντάται στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών του μέσου χιτώνα και η ενεργοποίησή του προκαλεί αγγειοσύσπαση. Είναι εκλεκτικός με μεγαλύτερη συγγένεια στην ET-1 και μικρότερη κατά σειρά για την ET-2 και την ET-3 (Davenport, 2002).

Ο ETB υποδοχέας περιέχει 442 αμινοξέα και, όπως φαίνεται, έχει διευρυμένες δράσεις, όπως την κάθαρση της ET-1, την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη δράση της NO-συνθάσης και την παραγωγή του NO, τη σύνθεση της προστακυκλίνης και την καταστολή του ECE-1 (Sakurai et al, 1990). Ο ETB υποδοχέας διαθέτει παρόμοια συγγένεια και για τις τρεις ομάδες ενδοθηλίνης. (Ishikawa et al, 1991). Επίσης έχουν ανακαλυφτεί δύο επιπλέον τύποι B υποδοχέα, ο ETB1 και ETB2 όμως η μοριακή τους δομή ερευνάται ακόμα (Battistini et al, 1994). Ο ETC υποδοχέας έχει μεγαλύτερη συγγένεια στην ET3 απ' ό τι στην ET-1 και, όταν διεγείρεται, προκαλεί απελευθέρωση του NO (Karne et al, 1993).

Ο ETB απαντάται κυρίως στους νεφρούς, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο (Gomezsanchez et al, 1990) αλλά και στις ινοβλάστες (Katwa et al, 1993). Η πυκνότητα των ETB υποδοχέων στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών είναι περίπου 15% και η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, όπως η προστακυκλίνη και το νιτρικό οξείδιο. Έχει αποδειχτεί όμως,

ότι ο ETB υποδοχέας που εντοπίζεται σε κάποια από τα αγγεία σε κουνέλια και ποντικούς προκαλεί αγγειοσύσπαση (*Davenport, 2002*). Επίσης ο ETB υποδοχέας διαμεσολαβεί για την κάθαρση του 80% της κυκλοφορούσας ενδοθηλίνης από τους πνεύμονες (*Luscher, 1990*).

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η έκθεση του περιτοναίου σε διάλυμα d-γλυκόζης 4% περιτοναϊκής κάθαρσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του mRNA των υποδοχέων ETB της περιτοναϊκής μεμβράνης. Επίσης η παραπάνω μελέτη ανέδειξε ότι οι ETB υποδοχείς αποτελούν το <μονοπάτι> μέσω του οποίου η ET-1 προάγει την ανάπτυξη της ίνωσης. Δηλ., η σύνθεση της φιβρονεκτίνης διεγείρεται από έναν μηχανισμό που εξαρτάται από τους ETB υποδοχείς (*Shimizu et al, 2006*).

	ΕΙΔΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
Ενδοθηλιακά κύτταρα	ETB	Αγγειακός τόνος Κάθαρση της κυκλοφορούσας ET-1
Λεία μυϊκά κύτταρα	ETA, ETB	Διατήρηση του τόνου των λείων μυϊκών κυττάρων Κυτταρικός πολλαπλασιασμός
Μυοϊνοβλάστες	ETA, ETB	Συσταλτικότητα Σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας
Καρδιομυοκύτταρα	ETA, ETB	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, συσταλτικότητα, απόπτωση προκαλούμενη από την υποξία
Ηπατοκύτταρα	ETA, ETB	Ηπατικός ενεργειακός μεταβολισμός Σύνθεση και μεταβολισμός της ET-1
Κύτταρα των αθροιστικών σηληναρίων του νεφρού	ETB	Σωληναριακή επαναρρόφηση
Νευρώνες	ETA, ETB	Επιμήκυνση των νευριτών, απόκριση των νευρώνων στο stress και απόπτωση
Οστεοβλάστες	ETA,ETB	Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση της σύνθεσης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
Κερατινοκύτταρα	ETA, ETB	Πολλαπλασιασμός και σύνθεση μελανίνης
Λιποκύτταρα	ETA, ETB	Μεταβολισμός των λιπιδίων και της γλυκόζης

Πίνακας 2: Κατανομή των υποδοχέων της ET-1, ETA και ETB

Ανταγωνιστές της ενδοθηλίνης-1

Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1 αναπτύχθηκαν κυρίως με σκοπό να καταστείλουν τη δράση της σε μια σειρά καρδιαγγειακών καταστάσεων. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα και συνεχίζουν να

χρησιμοποιούνται ο BQ123 και ο BQ788. Ο BQ123 είναι ένα κυκλικό πενταπεπτίδιο και αποτελεί τον πιο εκλεκτικό και ισχυρό ανταγωνιστή των ETA υποδοχέων (Davenport and Battistini, 2002). Σε μελέτες in vitro αποδείχτηκε ότι η εκλεκτικότητα του παραπάνω ανταγωνιστή για τον υποδοχέα A είναι 1000 φορές πιο ισχυρή συγκρινόμενη με άλλους ανταγωνιστές (Peter and Davenport, 1996).

Ένας περιορισμένος αριθμός πεπτιδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων ETB έχει αναπτυχθεί. Είναι λιγότερο ισχυροί και παρουσιάζουν χαμηλότερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τους αντίστοιχους των A υποδοχέων (Davenport and Battistini, 2002). Ο BQ788 αποτελεί έναν δραστικό και εκλεκτικό ανταγωνιστή των ETB υποδοχέων. Όπως έχει αποδειχτεί σε in vitro μελέτες, καταστέλλει δραστικά την ένωση της ενδοθηλίνης με τους B υποδοχείς σε ιστούς με υψηλή πυκνότητα των παραπάνω υποδοχέων και επιπλέον φάνηκε πως δε διαθέτει δράση αγωνιστή των υποδοχέων B (Ishikawa et al, 1994).

Αν και οι μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενοι ανταγωνιστές της ET-1 στην κλινική πράξη φαίνεται να είναι ασφαλείς, η εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών είναι συχνή. Έτσι, έχουν καταγραφεί κεφαλαλγία, ζάλη, ναυτία, περιφερικό οίδημα, λοιμώξεις του ανωτέρου αναπνευστικού, ιγμορίτιδα, δύσπνοια και στηθάγχη. Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι αποτέλεσμα της μη ειδικής αγγειοδιασταλτικής δράσης των ανταγωνιστών (Anand et al, 2004). Επίσης συχνά έχει αναφερθεί δοσοεξαρτώμενη ηπατοτοξικότητα. Συνήθως είναι ασυμπτωματική και διαγιγνώσκεται με την αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Είναι αναστρέψιμη κατάσταση και η ηπατική λειτουργία επανέρχεται στη φυσιολογική μετά τη μείωση ή τη διακοπή του φαρμάκου (Rubin et al, 2002).

Οι περισσότεροι από τους ανταγωνιστές της ET-1 εμπλέκονται στην αποδόμηση των φαρμάκων στο κυττόχρωμα P450 και επομένως αναπόφευκτα παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με μια σειρά φαρμάκων, όπως τις στατίνες, την κυκλοσπορίνη Α και την κετοκοναζόλη (*Dingemanse and Van Giersbergen, 2004*). Επίσης έχει παρατηρηθεί αναιμία, νωρίς μετά την έναρξη της θεραπείας, που εξαρτάται όμως από τη δόση του φαρμάκου (*Galie et al, 2005*). Ενδεικτικά οι πιο συχνά χορηγούμενοι ανταγωνιστές στην κλινική πράξη για τη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης και των καρδαγγειακών νοσημάτων είναι οι εξής: bosentan, clazosetan, tezosetan, ambrisetan, atrasetan και sitaxsentan.

Ενδοθηλίνη-1 και περιτοναϊκή κάθαρση

Στην περιτοναϊκή κάθαρση συντελείται μια διαδικασία χρόνιας βλάβης της περιτοναϊκής μεμβράνης, κυρίως λόγω της έκθεσης της σε χαμηλής βιοσυμβατότητας διαλύματα. Επιπλέον, η αδυναμία να επιτευχθούν οι στόχοι τόσο της υπερδιήθησης όσο και της κάθαρσης, έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση μεγαλύτερων όγκων αλλαγών και διαλυμάτων μεγαλύτερης ωσμωτικότητας. Οι παραπάνω παράγοντες, όπως η υπερωσμωτικότητα και η αυξημένη μηχανική τάση, μπορούν να προκαλέσουν απελευθέρωση της ET-1 στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι αυξάνοντας τον όγκο του διαλύματος κατά 500ml σε κάθε πλύση, παρατηρείται τριπλασιασμός της παραγωγής της ET-1 στα πρώτα 30 min της αλλαγής. Το παραπάνω φαινόμενο εξηγείται ως εξής: το μηχανικό stress είναι πιο μεγάλο στην αρχική φάση της περιτοναϊκής πλύσης κατά την είσοδο του διαλύματος στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Επιπλέον, η εξισορρόπηση του pH του διαλύματος κάθαρσης από 5,5 σε φυσιολογικά ή ακόμα και σε αλκαλικά επίπεδα,

συμβαίνει στο πρώτα 30 min μετά από την έναρξη της αλλαγής. Άλλωστε είναι γνωστό ότι το χαμηλό pH αποτελεί ισχυρό εκλυτικό παράγοντα για την παραγωγή της ET-1 σε μια σειρά ιστών. Η συγκέντρωση της ET-1 στο πλάσμα δεν επηρεάζεται γεγονός που αποδεικνύει ότι η αύξηση της συγκέντρωσής της είναι αποκλειστικά τοπική (*Morgera et al, 1999*).

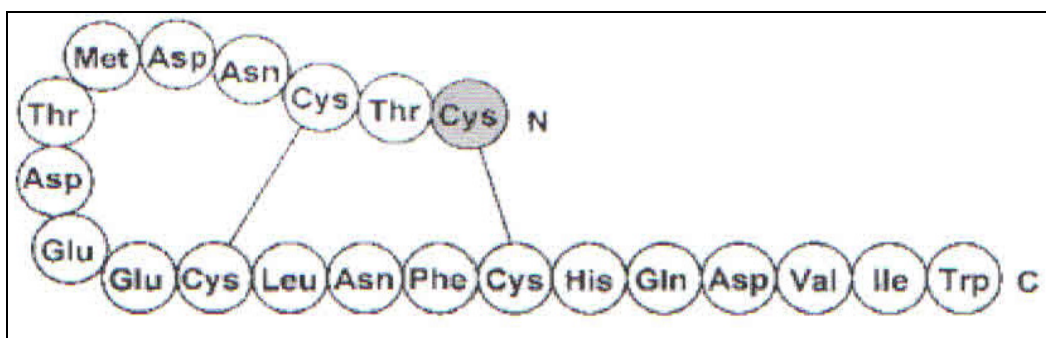
Το αγγειακό τοίχωμα των τριχοειδών του περιτοναίου, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ενδεχομένως τον πιο σημαντικό φραγμό στη διακίνηση των ουσιών. Η τοπική παραγωγή της ET-1 και η επακόλουθη αγγειοσύσπαση που προκαλεί, έχει ως αποτέλεσμα βραχυπρόθεσμα τη μείωση στην κάθαρση των διαλυμένων ουσιών. Μακροπρόθεσμα, κυριαρχεί η μιτογόνο και ινογενετική δράση της ET-1 που συμβάλει στην ανάπτυξη ίνωσης και την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας στο μεσοθήλιο του περιτοναίου, καθώς επίσης και στην σκλήρυνση των τριχοειδών. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η περιτοναϊκή μεμβράνη να χάσει τα χαρακτηριστικά της ως μεμβράνη κάθαρσης. Επομένως, η τοπική χρήση ανταγωνιστών της ET-1 ίσως θα μπορούσε να δράσει ευεργετικά στη διάσωση της λειτουργικότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης και κατ' επέκταση της μεθόδου.

Σαραφοτοξίνες

Οι σαραφοτοξίνες (SRTX) μαζί με τις ενδοθηλίνες αποτελούν μια ομοιογενή ομάδα ισχυρών αγγειασυσπαστικών πεπτιδίων. Δρούν στο αγγειακό σύστημα μέσω πανομοιότυπων υποδοχέων και προκαλούν σύσπαση τόσο του καρδιακού μυ όσο και των λείων μυών σε διάφορους ιστούς των σπονδυλωτών οργανισμών. Οι σαραφοτοξίνες απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1982 στο δηλητήριο των ερπετών του γένους *Atractaspis engaddensis*. Αποτελεί το πιο ισχυρό δηλητήριο ερπετών που έχει περιγραφεί ποτέ.

Οι σαραφοτοξίνες παρουσιάζουν 60% ομοιομορφία με τις ενδοθηλίνες των θηλαστικών. Η πιο βασική τους διαφορά εντοπίζεται κυρίως στο N-τερματικό άκρο. Τα παραπάνω πεπτίδια αποτελούνται από 21 αμινοξέα με δυο δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των αμινοξέων της κυστεΐνης στις θέσεις 1-15 και 3-11. Έχει αποδειχτεί μέχρι τώρα, ότι η βιολογική δράση των σαραφοτοξινών σχετίζεται με κινητοποίηση των ενδοκυττάρων ιόντων Ca^{2+} . Επιπλέον, χρησιμοποιούν την οδό της μεταγωγής του φωσφοϊνοσιτιδίου μέσω των ειδικών G-συζευγμένων πρωτεϊνών υποδοχέων και τελική ενεργοποίηση των C και D φωσφολιπασών (Ducanel, 2002).

Έξι χρόνια μετά την ανακάλυψη των σαραφοτοξινών διαπιστώθηκε η ύπαρξη τριών υποομάδων α, b και c οι οποίες χαρακτηρίζονται από 85% ομοιομορφία στη βασική τους δομή και διαθέτουν πανομοιότυπη C-τερματική άκρη. Η SRTX-c είναι αυτή που συναντάται κατά το πλείστον στο δηλητήριο του συγκεκριμένου ερπετού και είναι 30 φορές λιγότερο τοξική σε σχέση με την SRTX-a και SRTX-b (Εικόνα 4). Επίσης, οι τρεις υποομάδες των σαραφοτοξινών αλληλεπιδρούν με την ίδια συγγένεια με τον υποδοχέα B της ET-1 (Ducanel, 2005).



Εικόνα 4 : Χημική δομή της Sarafotoxin 6c

Σκοπός της μελέτης

Η φυσιολογική μεταφορά ουσιών και διαλύματος διαμέσου του περιτοναϊκού μεσοθηλίου είναι σημαντική για μια αποτελεσματική θεραπεία περιτοναϊκής κάθαρσης. Ένα από τα βασικά προβλήματα που σχετίζονται με την περιτοναϊκή κάθαρση είναι η ανεπαρκής υπερδιήθηση που παρατηρείται στο 50% των ασθενών που υποβάλλονται σ' αυτή τη θεραπεία, μετά από 6 χρόνια. Έχει αποδειχτεί ότι σε μια θεραπεία περιτοναϊκής κάθαρσης η διαπερατότητα του περιτοναίου για μικρομοριακές ουσίες αυξάνεται με το χρόνο. Η κατάσταση αυτή προηγείται της ανεπαρκούς υπερδιήθησης και καθιστά αυτή τη θεραπεία αναποτελεσματική (Krediet, 1999). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν σαφή συσχέτιση μεταξύ της διαμεμβρανικής αντίστασης και της ενεργού μεταφοράς ιόντων σε βιολογικές μεμβράνες, όπως το περιτόναιο (Simon, 1996).

Επίσης υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η ET-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση κολλαγόνου I στο περιτόναιο ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση (Morgera et al, 2003).

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι να διερευνήσει τη φυσιολογία του περιτοναίου. Συγκεκριμένα να εξετάσει τη δράση της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) στο

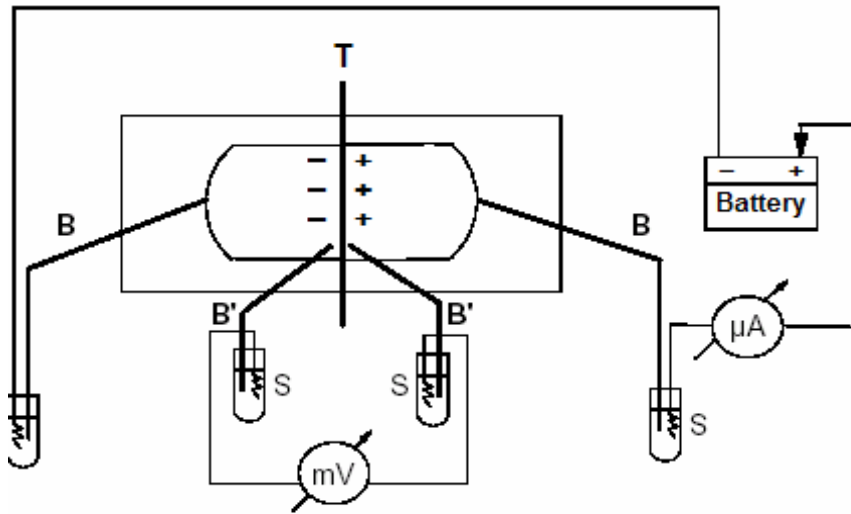
ηλεκτρικό προφίλ και τη διαπερατότητα του περισπλάγγχιου πετάλου του περιτοναίου και να διερευνήσει το ρόλο των υποδοχέων ET-A, ET-B στη δράση αυτή. Προς το σκοπό αυτό θα πραγματοποιηθούν πειράματα διαπερατότητας (Ussing) με τη χρήση ειδικών αναστολέων και πεπτιδίων ανάλογων της ET-1 ώστε να διερευνηθεί η δράση τόσο των υποδοχέων όσο και των ανταγωνιστών τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ–ΥΛΙΚΟ

Μελέτη διαπερατότητας μεμβρανών με τη μέθοδο Ussing

Όταν ο Hans Ussing κατασκεύασε τη συσκευή που αργότερα πήρε και το όνομά του δεν μπόρεσε να προβλέψει την έκταση των εφαρμογών της συγκεκριμένης διάταξης. Αρχικά σχεδιάστηκε για τη μελέτη τη διακίνησης ιόντων διαμέσου του δέρματος βατράχου. Στη συνέχεια, όμως, χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη της ακεραιότητας των στρωμάτων των κυττάρων και τις διηθητικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (*Li et al, 2004*). Το σύστημα αποτελείται από δυο λειτουργικές μονάδες, το θάλαμο και το ηλεκτρικό κύκλωμα. Πρόκειται για ένα σύστημα συγκοινωνούντων δοχείων, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται η προς μελέτη βιολογική μεμβράνη (T). Εκατέρωθεν της μεμβράνης ο θάλαμος γεμίζει με το προς μελέτη διάλυμα. Ο θάλαμος με το υγρό θερμαίνεται στη ζητούμενη θερμοκρασία και τροφοδοτείται με οξυγόνο ή άλλο αέριο. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους: για οξυγόνωση του διαλύματος και για ανάδευση με σκοπό να εξασφαλιστεί η μεταγωγή της θερμότητας. 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 (μA), ρεύμα μπορεί να διαπεράσει τον ιστό διαμέσου ενός δεύτερου ζεύγους ηλεκτροδίων (**B**, **B**) που βρίσκονται σε απόσταση 3 cm το καθένα από την επιφάνεια του ιστού (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. 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:** μιλιοβολτόμετρο. **μA:** μικροαμπερόμετρο. **Battery:** Μπαταρία. **T:** Ιστός. (Stefanidis et al, 2005)

Αξίζει να σημειωθεί ότι με το πέρασμα των χρόνων αναπτύχθηκαν αρκετές παραλλαγές της αρχικής συσκευής, ώστε να ικανοποιούνται όλες οι ανάγκες και απαιτήσεις των ερευνητών. Έτσι, σχεδιάστηκαν μοντέλα, ώστε να μελετηθούν ακόμα και πολύ μικρά τεμάχια ιστού καθώς επίσης και η διαπερατότητα σε καλλιέργειες κυττάρων.

Μέτρηση αντίστασης R σε επιθηλιακό ιστό

Ο επιθηλιακός ιστός διαθέτει δυο χαρακτηριστικά που τον κάνουν να διαφέρει από τους άλλους ιστούς: πολικότητα και συνοχή. Η πολικότητα δημιουργείται από την ασύμμετρη κατανομή των πρωτεϊνών τόσο στην κορυφαία

όσο και στη βασική επιφάνεια των μεμβρανών. Οι δύο επιφάνειες του επιθηλιακού ιστού διαχωρίζονται από ένα στρώμα πρωτεϊνών που δημιουργούν μεταξύ τους στενές συνδέσεις. Ο σχηματισμός και η διαπερατότητα των στενών συνδέσεων καθορίζει την ακεραιότητα και κατά συνέπεια το βαθμό συνοχής του επιθηλιακού ιστού.

Ο αρχικός στόχος τελικά του Hans Ussing ήταν η καταγραφή της συνοχής του επιθηλιακού ιστού. Η ακεραιότητα του ιστού μπορεί να προσδιορισθεί με το μετρίσιμο μέγεθος της αντίστασης:

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

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 επιφάνειας που μετράται.

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

Για να μετρήσουμε την αντίσταση R_t της μεμβράνης αρκεί να εφαρμόσουμε το νόμο του Ohm: $R_t = \Delta U / \Delta I$. Είναι κατανοητό από τα παραπάνω ότι για να μετρηθεί η συνολική αντίσταση της μεμβράνης με τη μέθοδο Ussing θα πρέπει να εφαρμοστεί τάση εκατέρωθεν αυτής (voltage clamp). 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.

Η εφαρμογή της τάσης θα έχει ως αποτέλεσμα τη διακίνηση ηλεκτρολυτών και άλλων ιοντικών στοιχείων διαμέσου των κυττάρων. Το φαινόμενο της ιοντικής μετανάστευσης, όμως, δεν αντανakλά πάντα την κατάσταση των κυττάρων ως μέσο μεταφοράς φορτισμένων σωματιδίων. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την εξαγωγή εσφαλμένων συμπερασμάτων. Επιπλέον η ανταπόκριση των κυττάρων στη μετακίνηση των ηλεκτρολυτών έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων και την περαιτέρω καταστροφή των κυττάρων.

Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα μια εναλλακτική τεχνική της μεθόδου εφαρμόστηκε σε αρκετές των περιπτώσεων. Η τεχνική αυτή ονομάστηκε Σύνδεση Ρεύματος (current clamp). Στην περίπτωση αυτή εκατέρωθεν της μεμβράνης εφαρμόζονται παλμοί συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος, μικρής διάρκειας και προκαθορισμένης έντασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ρεύμα που διαπερνά τον ιστό να προκαλεί μια πολύ σύντομη εκτροπή στην τάση αφήνοντας έτσι το κύτταρο σε ηρεμία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Παρόλο 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 (*Li et al, 2004*).

Συλλογή και προετοιμασία του ιστού

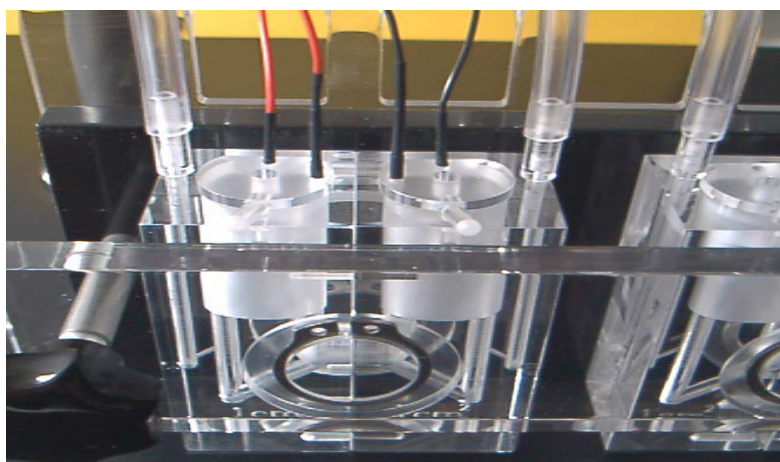
Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τμήματα περισπλάγχχνιου περιτοναίου από ενήλικα πρόβατα, θηλυκά και αρσενικά. Η συλλογή του ιστού έγινε στο σφαγείο αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), στους 4°C και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο εντός 30 λεπτών, με τη συνεχή παροχή οξυγόνου από ειδική συσκευή. Η απομόνωση της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με προσοχή και με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων, ώστε η επιφάνειά της να υποστεί όσο το δυνατό λιγότερη καταπόνηση. Τα τμήματα του περιτοναίου που απομονώθηκαν διατηρήθηκαν σε διάλυμα Krebs-Ringer, με σύνθεση (σε mM): 117,5 NaCl, 1,15 NaH₂PO₄, 24,99 NaHCO₃, 5,65 KCl, 1,18 MgSO₄, 2,52 CaCl₂, και 5,55 γλυκόζη. Στο διάλυμα διοχετεύονταν συνεχώς αέριο σύνθεσης 95% O₂ - 5% CO₂. Έτσι, το περιτόναιο μπορούσε να διατηρηθεί λειτουργικό ώστε από τον ιστό του ίδιου ζώου να ολοκληρωθούν αρκετές σειρές πειραμάτων.

Πειραματική διαδικασία

Το σπλαγχνικό περιτόναιο τοποθετήθηκε ως διαχωριστική μεμβράνη μεταξύ δύο ακρυλικών ημιθαλάμων τύπου Ussing (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) οι οποίοι περιείχαν υγρό Krebs-Ringer (Εικόνα 3). Αρχικά ο ιστός εξετάστηκε μακροσκοπικά για να εντοπιστούν τυχόν τραυματισμοί και στη συνέχεια τοποθετήθηκε με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να διατηρηθεί ακέραιος. Κάθε ημιθάλαμος περιείχε 4 ml υγρού εξασφαλίζοντας την άσκηση ίδιας υδροστατικής πίεσης εκατέρωθεν της μεμβράνης, ενώ συνεχώς διοχετευόταν στον

κάθε ημιθάλαμο αέριο σύστασης 95% O₂ - 5% CO₂. Η επιφάνεια του ιστού εκτεθειμένη στο υγρό ήταν 1cm². Οι μετρήσεις της διαμεσοθηλιακής αντίστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 37°C διότι η μεταφορά των ιόντων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία.

Η διαμεσοθηλιακή αντίσταση (R_{TM} , Transmesothelial resistance) του περιτοναίου, μετρήθηκε με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων Ag/AgCl, το καθένα εκ των οποίων ήταν τοποθετημένο σε απόσταση 3 mm από την επιφάνεια της μεμβράνης, σε συνθήκες ανοιχτού κυκλώματος. Η διαμεμβρανική αντίσταση εκφράστηκε σε Ω/cm^2 ιστού. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, γινόταν νέα μέτρηση της R_{TM} κάθε ένα λεπτό. 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 (Εικόνα 4). Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά την τοποθέτηση του ιστού ανάμεσα στους ημιθαλάμους ακολουθούσε μια περίοδος ηρεμίας του ιστού διάρκειας 30-40 λεπτά. Επίσης πριν τοποθετηθεί ο ιστός το σύστημα είχε υπολογίσει την αντίσταση του υγρού, η οποία αυτομάτως αφαιρούνταν κατά τη μέτρηση της R_{TM} του ιστού.



Εικόνα 3. Ακρυλικός θάλαμος τύπου Ussing που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία



Εικόνα 4. Η ηλεκτρική διάταξη και ο υπολογιστής για την καταγραφή μέσω λογισμικού (*Clamp version 2.14 software: AC Micro-Clamp, Aachen, Germany*)

Για να καθορισθεί η R_{TM} σε συνθήκες σύνδεσης ρεύματος, χορηγήθηκε συνεχές ρεύμα έντασης 50 μA και διάρκειας 200ms, ανά 6 δευτερόλεπτα από μια συσκευή Voltage/Current Clamp (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany), με τη βοήθεια ζεύγους ηλεκτροδίων Ag/AgCl που βρίσκονταν τοποθετημένα σε απόσταση 3cm, εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι μετρήσεις που αφορούσαν στην R_{TM} μετά την προσθήκη ουσιών, πραγματοποιούνταν σε συνθήκες σύνδεσης ρεύματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το πειραματικό διάλυμα που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια του περιτοναίου που *in vivo* είναι εκτεθειμένη στο περιτοναϊκό υγρό, ορίστηκε ως ορώδες διάλυμα και η επιφάνεια της μεμβράνης αντίστοιχα ως κορυφαία. Το διάλυμα, που ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια του περιτοναίου που *in vivo* εφάπτεται στο διάμεσο ιστό, αναφέρθηκε

ως διάμεσο διάλυμα, ενώ αντίστοιχα η μεσοθηλιακή επιφάνεια του περιτοναίου ορίστηκε ως βασική.

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν άμεσα πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, θερμαίνονταν στους 37°C και βρισκόταν σε συνεχή οξυγόνωση με μείγμα αερίων 95% O₂-5% CO₂.

Αρχικά διεξήχθησαν 36 πειράματα αναφοράς στο περισπλάγγνιο περιτόναιο μόνο με διάλυμα Krebs εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων με τις υπο μελέτη ουσίες. Οι μετρήσεις άρχιζαν άμεσα μετά την τοποθέτηση της κάθε ουσίας και είχαν διάρκεια 30 λεπτά.

Στην πρώτη ομάδα πειραμάτων, προστέθηκε ενδοθηλίνη-1 (ET-1) στην κορυφαία καθώς και στη βασική επιφάνεια του περισπλάγγνιου περιτοναίου, σε διαφορετικά ιστικά τεμάχια σε συγκεντρώσεις 10⁻⁷, 10⁻⁹ και 10⁻¹² M. Καταγράφηκαν οι μεταβολές της διαμεσοθηλιακής αντίστασης μέχρι τα 30 πρώτα λεπτά από την προσθήκη της ουσίας. Στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά του περισπλάγγνιου περιτοναίου μετά την προσθήκη αναστολέων των υποδοχέων ETA και ETB της ET-1.

Συγκεκριμένα, αρχικά προστέθηκε αποκλειστικά ο ειδικός αναστολέας του A υποδοχέα της ET-1, BQ123 σε συγκέντρωση 10⁻⁶M στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του περισπλάγγνιου περιτοναίου και μελετήθηκε η μεταβολή της αντίστασης της μεμβράνης. Σε διαφορετικά ιστικά τεμάχια αντίστοιχα μελετήθηκε η δράση του αναστολέα των B υποδοχέων της ET-1, ο BQ788, στην ίδια συγκέντρωση. Επιπρόσθετα, σε μια σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η συμπεριφορά της μεμβράνης μετά από την προσθήκη της ET-1 με τον κάθε αναστολέα χωριστά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της διαπερατότητας της μεμβράνης με την προσθήκη

και των δυο αναστολέων BQ123, BQ788 (10^{-6} M) και της ET-1 (10^{-7} M) εκατέρωθεν του περισπλάγγνιου περιτοναίου.

Σε μια δεύτερη ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η διαπερατότητα του περιτοναίου υπό την επίδραση της σαραφοτοξίνης σε συγκέντρωση 10^{-7} , αφού προστέθηκε τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια της μεμβράνης. Στη συνέχεια καταγράφηκε η διαμεμβρανική αντίσταση του περιτοναίου μετά την προσθήκη του BQ788(10^{-6} M) και της σαραφοτοξίνης (10^{-7} M).

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism. Οι μεταβολές των τιμών της διαμεσοθηλιακής αντίστασης εκφράσθηκαν σαν εκατοστιαίες μεταβολές από τις τιμές αναφοράς. Οι τιμές εκφράστηκαν σαν μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) συγκεκριμένου αριθμού διαφορετικών πειραμάτων σε κάθε περίπτωση. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με paired *t*-test και One-Way ANOVA με Tukey post hoc test. Θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές οι τιμές που ανταποκρίθηκαν σε $P < 0,05$. Τα σχήματα έγιναν με το στατιστικό πακέτο GraphPrism 5.0.

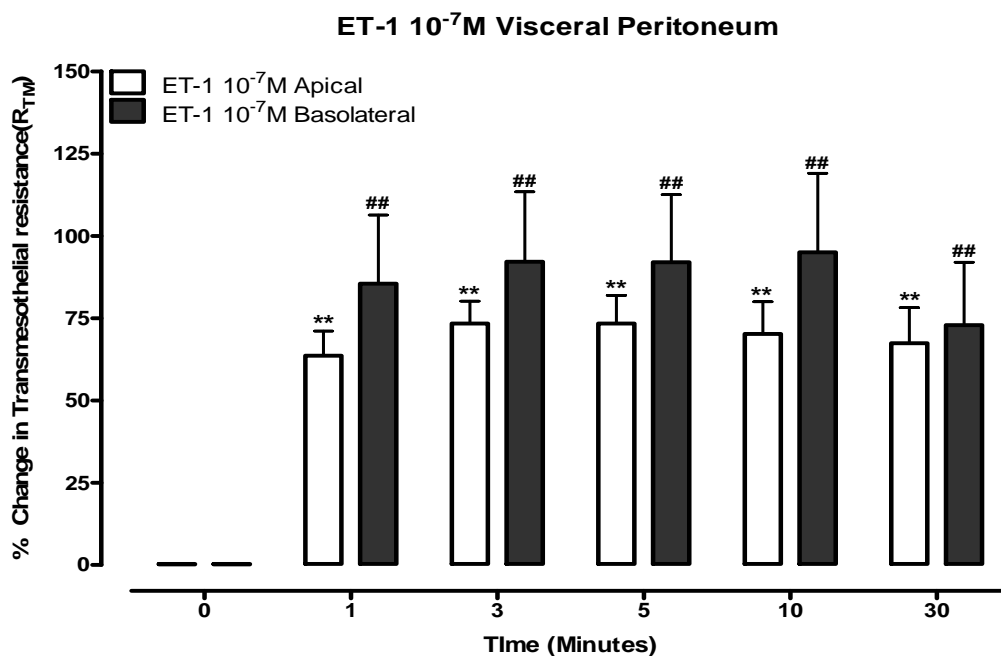
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πειράματα αναφοράς στο σπλαγγνικό περιτόναιο καταγράφηκε αντίσταση $R_{TM} = 20,03 \pm 1,65 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Ουσιαστικά δεν υπήρξε μεταβολή της αντίστασης κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης.

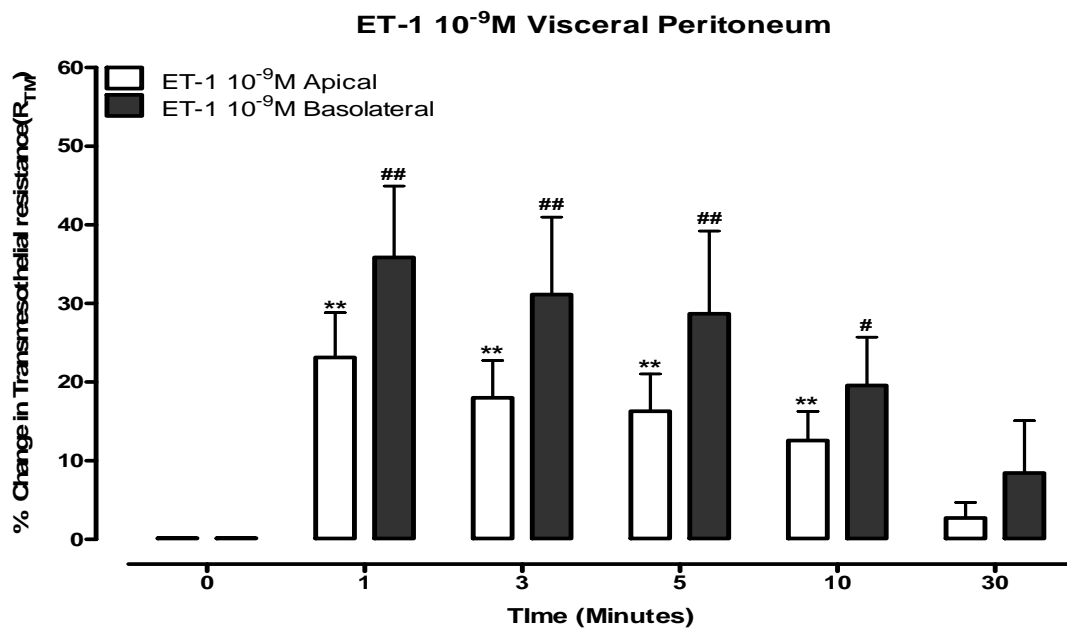
Μετά την προσθήκη της ET-1 σε συγκέντρωση 10^{-7} M στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγγνικού περιτοναίου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης κατά $63,60 \pm 7,46\%$ στο πρώτο λεπτό. Η αύξηση αυτή ήταν $85,50 \pm 20,85\%$ μετά την προσθήκη ET-1 στην βασική επιφάνεια της μεμβράνης.

Η αντίσταση παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη καθ' όλη τη διάρκεια της καταγραφής, δηλαδή μέχρι και 30 λεπτά μετά την προσθήκη της ουσίας (Σχήμα 2). Όταν η συγκέντρωση ET-1 που προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια ήταν 10^{-9} M παρατηρήθηκε αύξηση της αντίστασης στο πρώτο λεπτό κατά $23,14 \pm 5,69\%$. Η αντίστοιχη αύξηση ήταν $35,86 \pm 9,07\%$ μετά την προσθήκη ET-1 (10^{-9} M) στη βασική επιφάνεια της μεμβράνης. Στη συνέχεια η αυξημένη αυτή διαμεμβρανική αντίσταση είχε φθίνουσα πορεία στα επόμενα 30 λεπτά (Σχήμα 3).

Τέλος, κατεγράφησαν και οι μεταβολές της διαμεμβρανικής αντίστασης μετά την προσθήκη της υπό μελέτη ουσίας (ET-1) σε συγκέντρωση 10^{-12} M. Στο πρώτο λεπτό παρατηρήθηκε αύξηση κατά $38,80 \pm 15,07\%$ σε προσθήκη της ET-1 στην κορυφαία επιφάνεια και $17,33 \pm 4,49\%$ σε προσθήκη στη βασική επιφάνεια. Η παραπάνω μεταβολή της αντίστασης στη συνέχεια είχε τάση πτωτική στα επόμενα 30 λεπτά (Σχήμα 4).

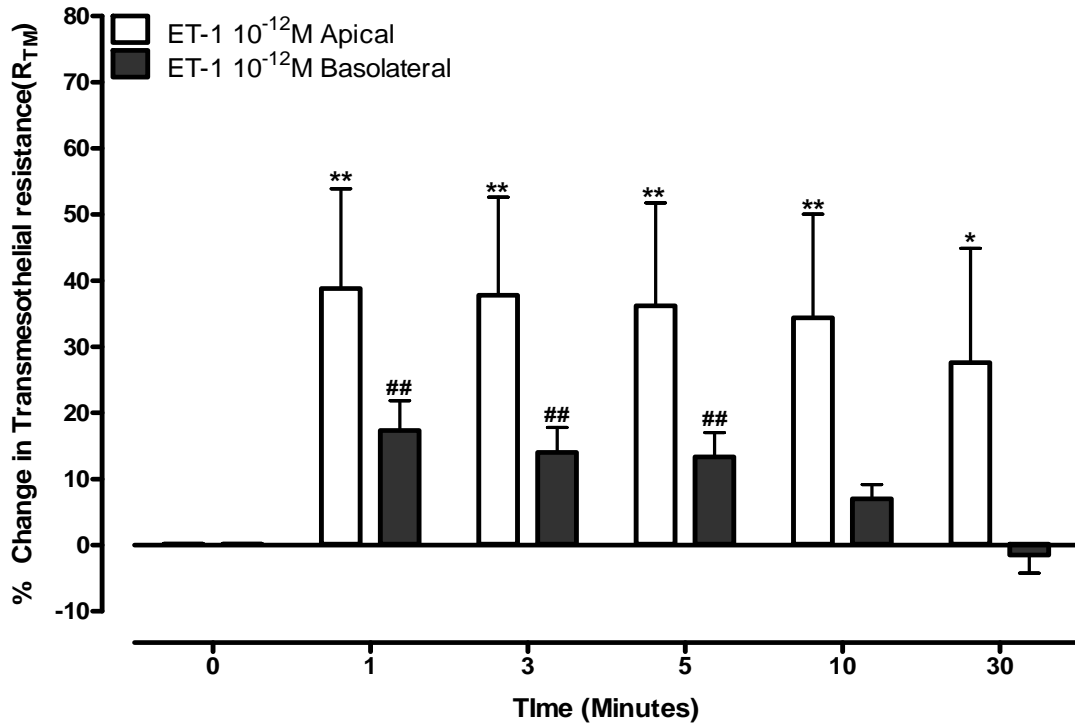


Σχήμα 2. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (% ΔR_{TM}) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη της ET-1 ($10^{-7}M$) στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. ** $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της κορυφαίας επιφάνειας, ## $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της βασικής επιφάνειας



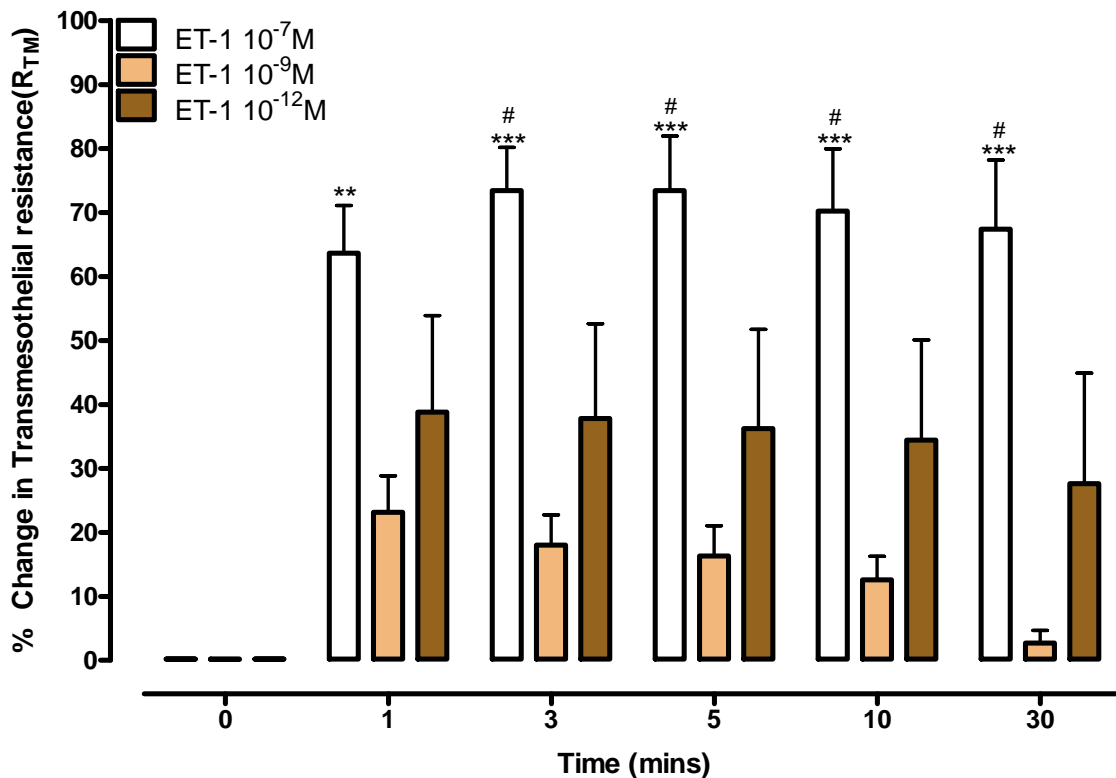
Σχήμα 3. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (% ΔR_{TM}) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη ET-1 (10^{-9} M) στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του σπλαγγνικού περιτοναίου ** $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της κορυφαίας επιφάνειας. # $P < 0,05$ και ## $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της βασικής επιφάνειας

ET-1 10^{-12} M Visceral Peritoneum



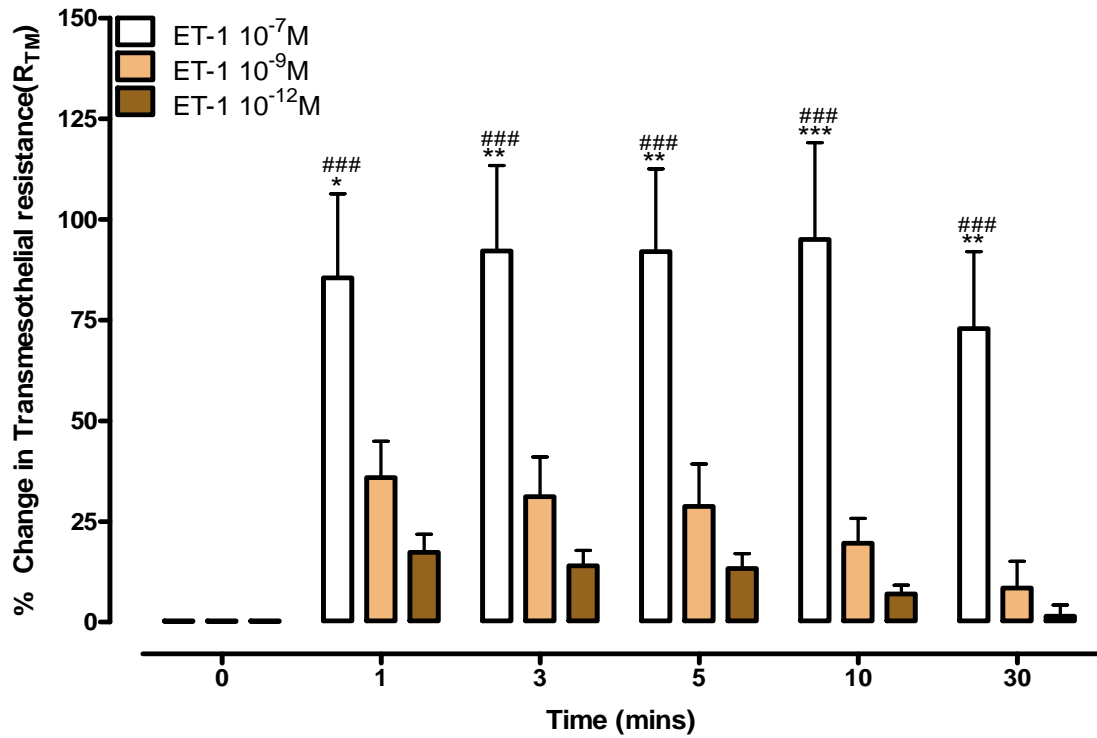
Σχήμα 4. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\% \Delta R_{TM}$) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη ET-1 (10^{-12} M) στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του σπλαγγνικού περιτοναίου. * $P < 0,05$ και ** $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της κορυφαίας επιφάνειας. ## $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς της βασικής επιφάνειας

ET-1 Apical Addition

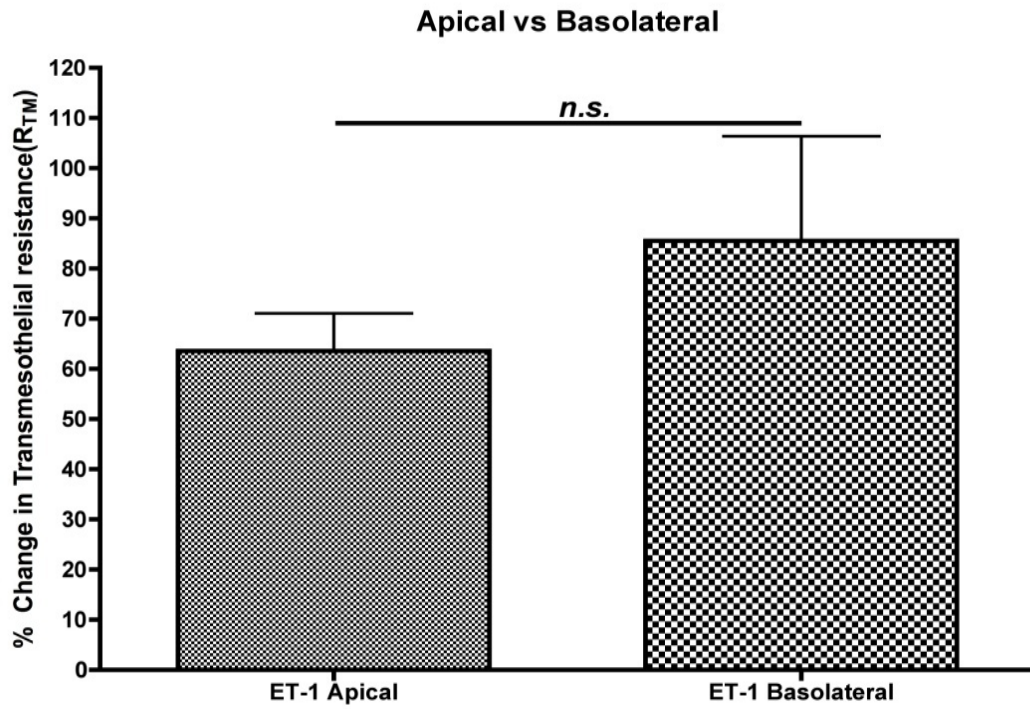


Σχήμα 5. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (% ΔR_{TM}) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη ET-1 ($10^{-7}M, 10^{-9}M, 10^{-12}M$) στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. ** $P < 0,01$ και *** $P < 0,001$ σε σύγκριση ET-1, $10^{-7}M$ και ET-1, 10^{-9} , # $P < 0,05$ σε σύγκριση ET-1, $10^{-7}M$ και ET-1, $10^{-12}M$.

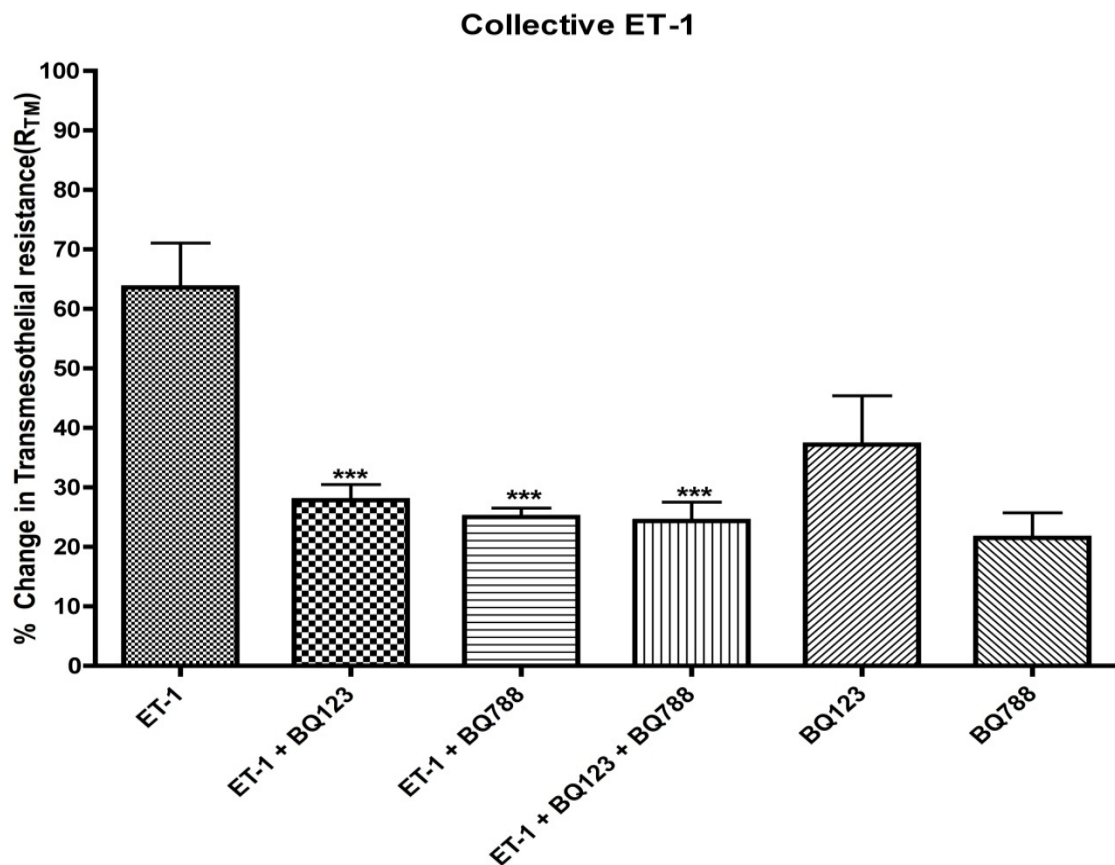
ET-1 Basolateral Addition



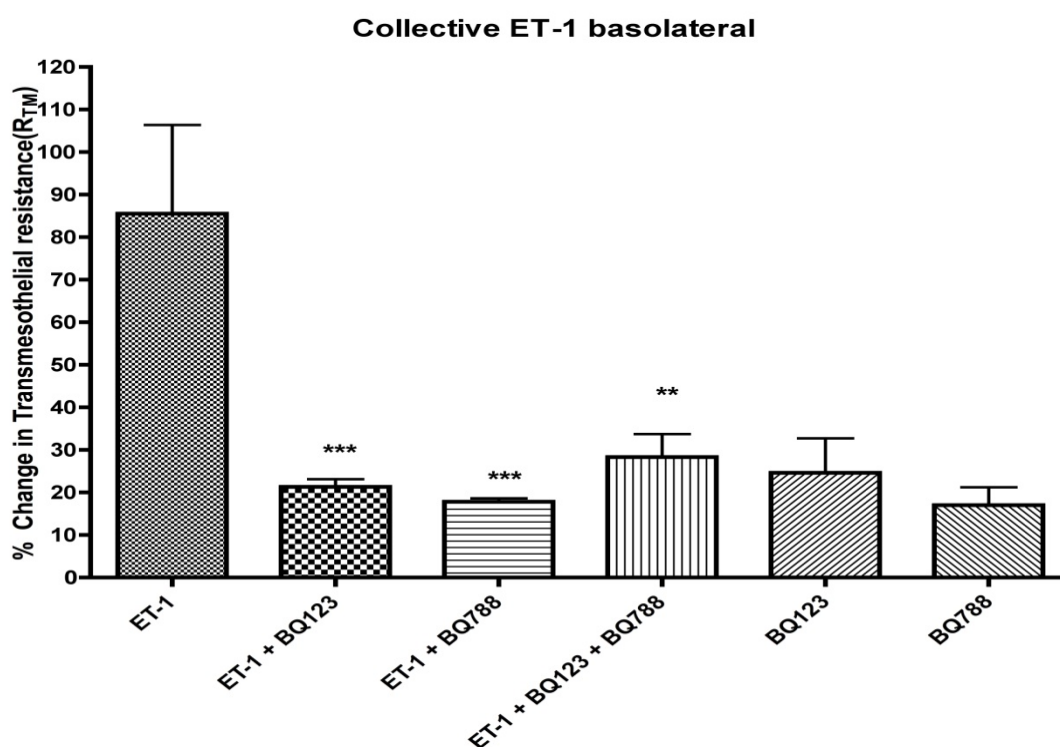
Σχήμα 6. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (% ΔR_{TM}) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη ET-1 ($10^{-7}M$, $10^{-9}M$, $10^{-12}M$) στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. * $P < 0,05$ και ** $P < 0,01$ σε σύγκριση ET-1, $10^{-7}M$ και ET-1, $10^{-9}M$ και ### $P < 0,001$ σε σύγκριση ET-1, $10^{-7}M$ και ET-1, $10^{-12}M$



Σχήμα 7. Εκατοστιαία αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\% \Delta R_{TM}$) μετά την προσθήκη ET-1, $10^{-7}M$ στην κορυφαία και βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου



Σχήμα 8. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta R_{TM}\%$) στο πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη $ET-1(10^{-7}M)$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ123(10^{-6})$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ788(10^{-6}M)$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ123(10^{-6}M)+BQ788(10^{-6}M)$, $BQ123(10^{-6}M)$, $BQ788(10^{-6}M)$ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. *** $P < 0,001$ σε σύγκριση με την $ET-1$



Σχήμα 9. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta RTM\%$) στο πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη $ET-1(10^{-7}M)$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ123(10^{-6}M)$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ788(10^{-6}M)$, $ET-1(10^{-7}M)+BQ123(10^{-6}M)+BQ788(10^{-6}M)$, $BQ123(10^{-6}M)$, $BQ788(10^{-6}M)$ στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. ** $P<0,01$ σε σύγκριση με την $ET-1$ και *** $P<0,001$ σε σύγκριση με την $ET-1$.

Όπως προκύπτει η μεγαλύτερη αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη της $ET-1$ σε συγκέντρωση $10^{-7} M$ στη βασική και στην κορυφαία επιφάνεια του περιτοναίου (Σχήμα 6 και 7). Στην κορυφαία επιφάνεια σε συγκέντρωση $ET-1 10^{-12}M$ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης συγκριτικά με τη μικρότερη συγκέντρωση $10^{-9}M$ (Σχήμα 6). Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης κατά την προσθήκη της $ET-1$ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου δεν ήταν γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης.

Συνολικά η μελέτη της συμπεριφοράς της μεσοθηλιακής μεμβράνης καταδεικνύει μεγαλύτερη αύξηση της αντίστασης στη βασική επιφάνεια της, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική (Σχήμα 7).

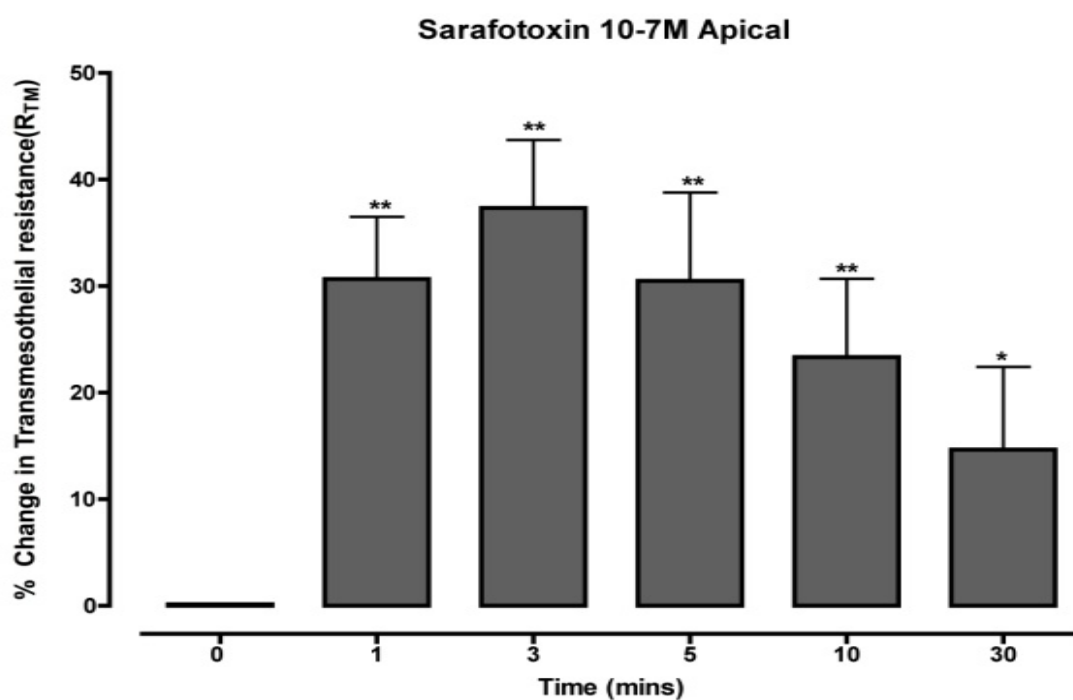
Η μελέτη της επίδρασης των αναστολέων της ET-1 (BQ123, BQ788) σε συγκέντρωση 10^{-6} M ανέδειξε αύξηση της διαμεμβρανικής ηλεκτρικής αντίστασης του περισπλάγχχιου περιτοναίου, μετά την προσθήκη του καθένα ξεχωριστά και στις δυο πλευρές της μεμβράνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι αναστολείς διαθέτουν και αγωνιστική δράση. Η ιδιότητα αυτή των αναστολέων για πρώτη φορά διαπιστώνεται, αφού δεν υπάρχει στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία ανάλογη πληροφορία.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η διαπερατότητα της μεμβράνης σε μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν μετά την ταυτόχρονη προσθήκη ET-1 (10^{-7} M) και των αναστολέων BQ123 και BQ788 σε συγκέντρωση 10^{-6} M.

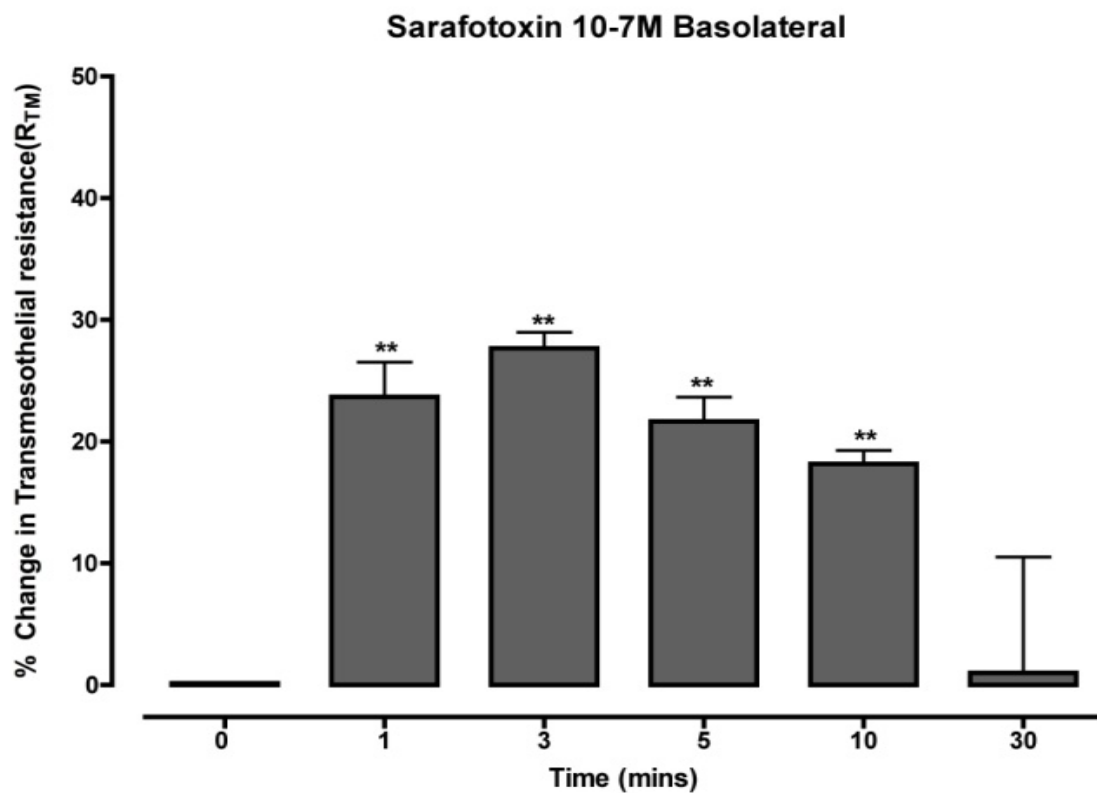
Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης, μετά την προσθήκη της ET-1 και του κάθε αναστολέα ξεχωριστά, ήταν πολύ μικρότερη, συγκρινόμενη με την προσθήκη μόνο της ET-1. Αυτό αποδεικνύει την μερική αναστολή της δράσης της ET-1 τόσο στην κορυφαία όσο και στην βασική επιφάνεια της μεμβράνης στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης οι μεταβολές της διαμεμβρανικής αντίστασης που παρατηρήθηκαν μετά την προσθήκη της ET-1 με τον κάθε αναστολέα χωριστά και αυτές μετά την προσθήκη της ET-1 και των δυο αναστολέων μαζί δεν ήταν σημαντικές (Σχήμα 8,9). Αυτό το εύρημα από τη μια επιβεβαιώνει την ύπαρξη της αγωνιστικής δράσης των

αναστολέων. Επιπρόσθετα αποδεικνύει το γεγονός ότι για να ασκήσει τη βιολογική της δράση η ET-1 είναι απαραίτητη η παρουσία και των δυο υποδοχέων.

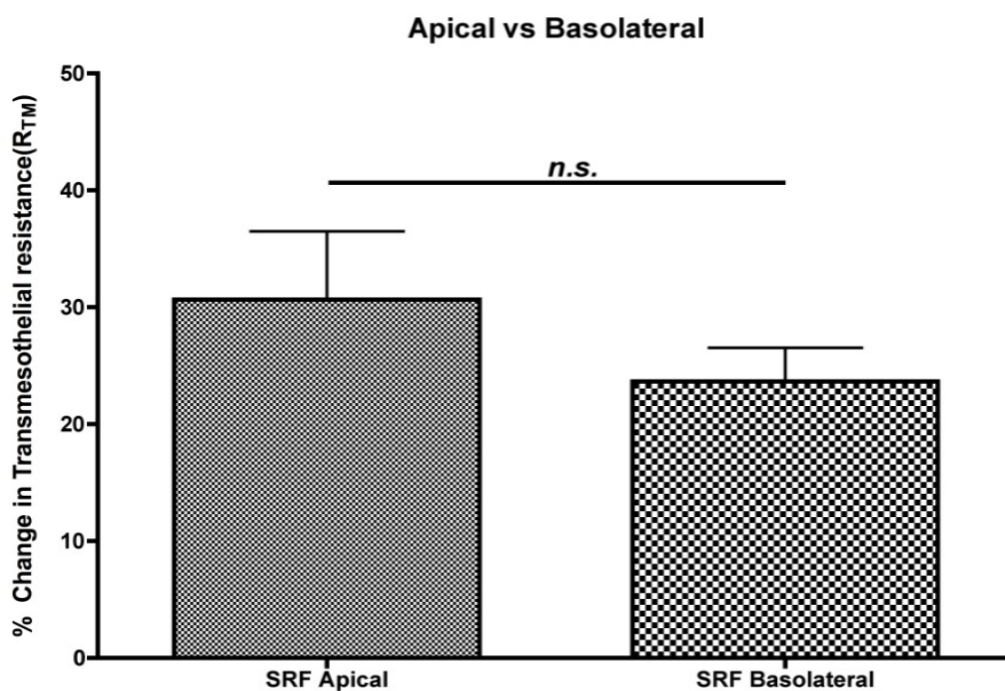
Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε και μια σειρά πειραμάτων με την προσθήκη ενός πεπτιδίου αναλόγου της ET-1 της σαραφοτοξίνης. Κατά την προσθήκη της σαραφοτοξίνης σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ παρατηρήθηκε αύξηση της R_{TM} $30,67 \pm 5,82\%$ στην κορυφαία επιφάνεια και $23,67 \pm 2,86\%$ στη βασική επιφάνεια. Το μέγιστο αυτής της αύξησης καταγράφηκε στο τρίτο λεπτό. (Σχήμα 10,11).



Σχήμα 10. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta R_{TM}\%$) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη σαραφοτοξίνης $10^{-7}M$ στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. * $P < 0,05$ και ** $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς



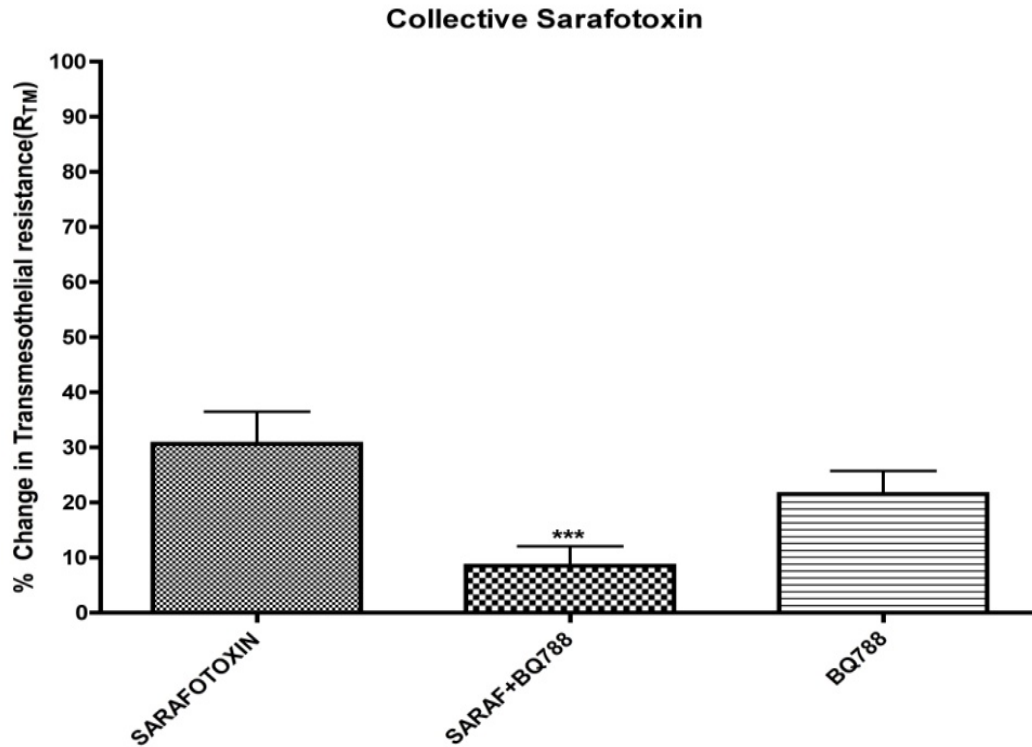
Σχήμα 11. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta R_{TM}\%$) στα πρώτα 30 λεπτά μετά την προσθήκη σαραφοτοξίνης $10^{-7}M$ στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. * $P < 0,05$ και ** $P < 0,01$ σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς



Σχήμα 12. Εκατοστιαία αύξηση της της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta RTM\%$) συγκριτικά μετά την προσθήκη σαραφοτοξίνης ($SRF 10^{-7} M$) στη βασική και κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου

Παρατηρείται λοιπόν μια υπεροχή στη δράση της σπερμτοξίνης στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου χωρίς αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (Σχήμα 12).

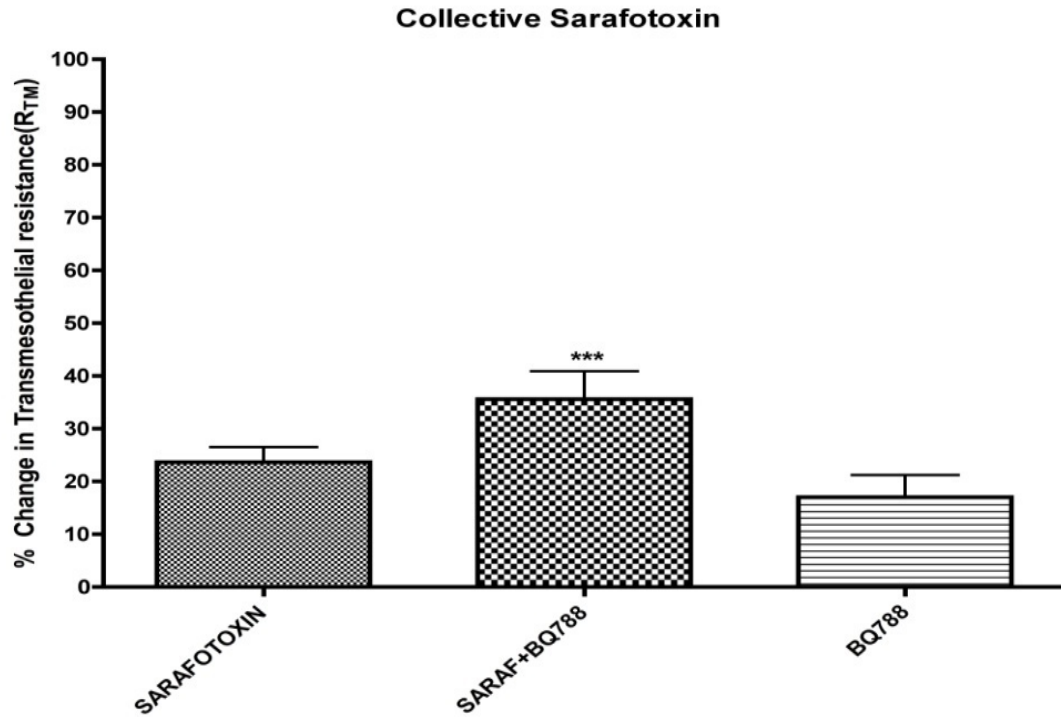
Όταν, όμως, η σαραφοτοξίνη προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια με τον αναστολέα των B υποδοχέων η αύξηση της αντίστασης $8,5 \pm 3,57\%$, ήταν σημαντικά μικρότερη (Σχήμα 13).



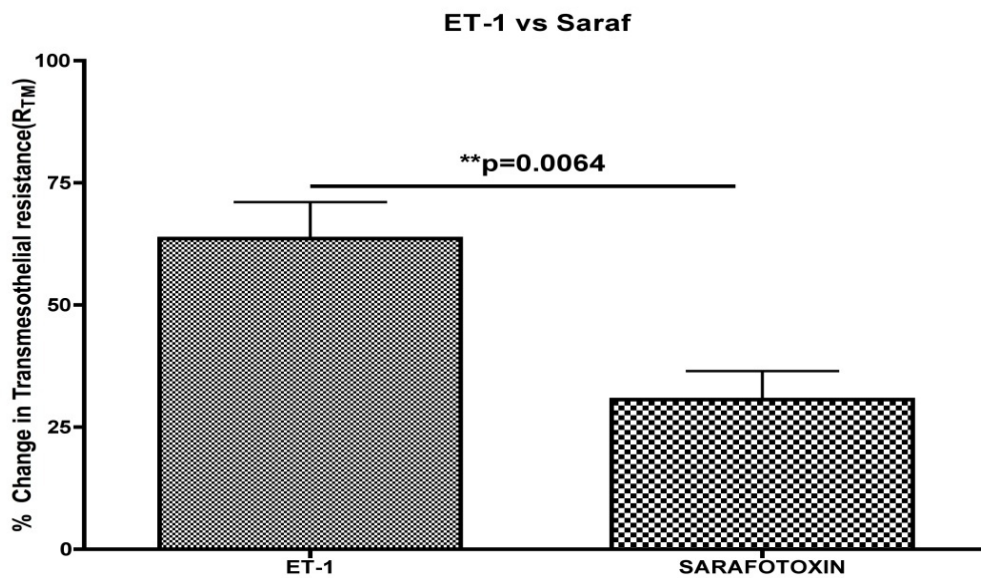
Σχήμα 13. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta R_{TM}\%$) μετά την προσθήκη SARAF($10^{-7}M$), SARAF($10^{-7}M$)+BQ788($10^{-6}M$), BQ788($10^{-6}M$) στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγγικού περιτοναίου. *** $P < 0,001$ σε σύγκριση με την σαραφοτοξίνη

Κατά την προσθήκη της σαραφοτοξίνης και του αναστολέα των B υποδοχέων BQ788 στη βασική επιφάνεια του περιτοναίου, διαπιστώθηκε αύξηση της αντίστασης $35,60 \pm 5,31\%$. Δηλαδή στην περίπτωση αυτή καταγράφηκε περαιτέρω αύξηση της αντίστασης συγκρινόμενη με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν με την προσθήκη μόνο της σαραφοτοξίνης (Σχήμα 14).

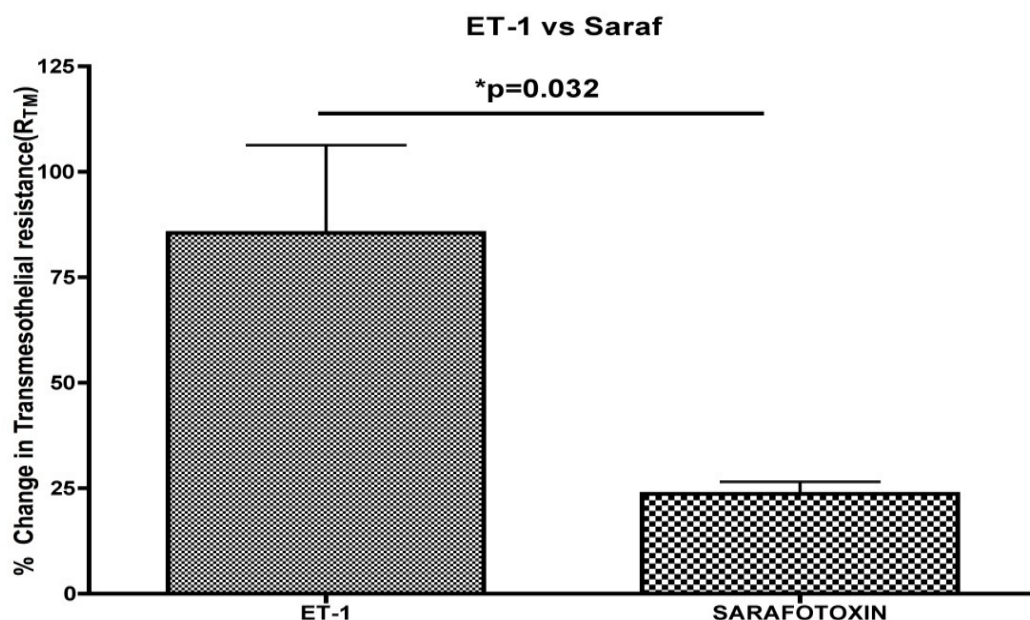
Αυτό αποδεικνύει το γεγονός ότι η δράση της σαραφοτοξίνης δεν κατεστάλη από τον αναστολέα. Τα παραπάνω ευρήματα ενδυναμώνουν τη διαπίστωση της αγωνιστικής δράσης του αναστολέα των B υποδοχέων. Επίσης ενδέχεται στη βασική επιφάνεια του περιτοναίου η δράση της σαραφοτοξίνης να πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών υποδοχέων και όχι μέσω των B, τους οποίους ο αναστολέας δεν μπορεί να καταστείλει.



Σχήμα 14. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta RTM\%$) μετά την προσθήκη SARAF($10^{-7}M$), SARAF($10^{-7}M$)+BQ788($10^{-6}M$), BQ788($10^{-6}M$) στη βασική επιφάνεια του σπλαγγικού περιτοναίου. *** $P < 0,001$ σε σύγκριση με την σαραφοτοξίνη



Σχήμα 15. Εκατοστιαία αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης ($\Delta RTM\%$) συγκριτικά μετά την προσθήκη ET-1($10^{-7}M$) και SARAF($10^{-7}M$) στην κορυφαία επιφάνεια του σπλαγγικού περιτοναίου



Σχήμα 16. Εκατοστιαία μεταβολή της διαμεμβρανικής αντίστασης (ΔRTM %) συγκριτικά μετά την προσθήκη της ET-1 ($10^{-7}M$) και SARAF($10^{-7}M$) στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου

Τέλος συγκρίνοντας συνολικά τις δράσεις των δυο πεπτιδίων μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η ET-1 προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης, όταν προστίθεται στη βασική επιφάνεια του περιτοναίου ενώ η σαραφοτοξίνη όταν προστίθεται στην κορυφαία επιφάνεια. Η δράση όμως της ET-1 είναι πιο ισχυρή συνολικά τόσο στη βασική όσο και στην κορυφαία επιφάνεια (Σχήμα 15,16).

ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΠΛΑΓΧΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΚΟΡΥΦΑΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΒΑΣΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ
ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ(KRB χωρίς ουσία)	20,03±1,65 Ω*cm ² (n=36)	
ET-1,10 ⁻⁷ M	63,60±7,46% (n=6)	85,50±20,85% (n=6)
ET-1,10 ⁻⁹ M	23,14±5,69% (n=7)	35,86±9,07% (n=7)
ET-1,10 ⁻¹² M	38,80±15,07% (n=6)	17,33±4,49% (n=6)
BQ123,10 ⁻⁶ M	37,17±8,22% (n=6)	24,60±8,14% (n=6)
BQ788,10 ⁻⁶ M	21,50±4,24%(n=6)	17±4,21% (n=6)
ET-1(10 ⁻⁷ M)+BQ123(10 ⁻⁶ M)	27,83±2,63% (n=6)	21,33±1,80% (n=6)
ET-1(10 ⁻⁷ M)+BQ788(10 ⁻⁶ M)	25±1,5% (n=6)	17,83±0,79 (n=6)
ET-1(10 ⁻⁷ M)+BQ123(10 ⁻⁶ M)+BQ788(10 ⁻⁶ M)	24,33±3,2% (n=6)	28,33±5,39% (n=6)
SARAFOTOXIN,10 ⁻⁷ M	30,67±5,82% (n=6)	23,67±2,86 (n=6)
SARAF(10 ⁻⁷ M)+BQ788(10 ⁻⁶ M)	8,5±3,57% (n=6)	35,6±5,31% (n=6)

-Οι τιμές εκφράζουν την εκατοστιαία αύξηση (%ΔRTM) της διαμεμβρανικής αντίστασης στο πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών

-Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές ±τυπικό σφάλμα

-n=αριθμός πειραμάτων

-KRB: Krebs-Ringer- Bicarbonate

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε *in vitro* η διακίνηση ιόντων διαμέσου της περιτοναϊκής μεμβράνης του σπλαγχνικού περιτοναίου προβάτου με αναγνωρισμένες ηλεκτροφυσιολογικές τεχνικές (Ussing). Διαπιστώθηκε ότι η ET-1 επηρεάζει σημαντικά τη διαπερατότητα του σπλαγχνικού περιτοναίου. Συγκεκριμένα υπό την επίδρασή της, τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια της μεμβράνης, παρατηρήθηκε ταχεία και αξιοσημείωτη αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ET-1 με κάποιον τρόπο παρεμβαίνει δραστικά στη μεταφορά των ιόντων μέσω του περιτοναίου.

Στα υδάτινα διαλύματα, η διαφορά δυναμικού αντιστοιχεί στη μετακίνηση ιόντων και ισοδυναμεί με την παρουσία συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος. Συνεπώς η διαμεμβρανική αντίσταση η οποία μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ($R=U/I$) αποτελεί δείκτη διακίνησης των ιόντων. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν σαφή συσχέτιση ανάμεσα στη διαπερατότητα των ορογόνων μεμβρανών και τη διαμεμβρανική αντίσταση (*Shear et al, 1966*).

Η διακίνηση των ιόντων στο μεσοθήλιο πραγματοποιείται μέσω διαύλων και ειδικών αντλιών. Τις τελευταίες δυο δεκαετίες έχει συσσωρευτεί γνώση που καταδεικνύει ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στη διακίνηση ηλεκτρολυτών και υγρών, ρυθμίζοντας τον όγκο των υγρών στις κοιλότητες τις οποίες επικαλύπτουν.

Σε *in vitro* μελέτες, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη διαύλων και αντλιών στα μεσοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου και των πειραματόζωων (*Ji and Nie, 2008*). Στο σπλαγχνικό περιτόναιο προβάτου (*Zarogiannis et al, 2005*) και στο ανθρώπινο τοιχωματικό περιτόναιο (*Stefanidis et al, 2007*) βρέθηκαν επιθηλιακοί διάυλοι

νατρίου ευαίσθητοι στην αμιλορίδη (ENaC) καθώς και διάλυτοι K^+ (Fulgenzi et al, 2006). Η αντλία Ca^{2+} -ΑΤΡάση ανιχνεύτηκε στο περιτόναιο ποντικών (Fujimoto, 1993), ενώ διάλυτοι Ca^{2+} περιγράφηκαν στα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα αρουραίων (Li and Li, 2005). Επιπλέον σε αρκετά επιθήλια, όπως στον υπεζοκώτα προβάτου στη βασικοπλάγια αλλά και στην κορυφαία επιφάνεια έχει εντοπιστεί Na^+/K^+ ΑΤΡάση (Hatzoglou et al, 2001).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, υποθέτει κανείς ότι η ET-1 πιθανότατα ασκεί τη δράση της σε κάποιον από τους παραπάνω μεταφορείς. Με τον τρόπο αυτό η ET-1 επιδρά και συγκεκριμένα καταστέλλει τη διακίνηση ηλεκτρολυτών μέσω του περιτοναϊκού μεσοθηλίου. Το γεγονός αυτό μεταφράζεται με την ταχεία αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης μετά την προσθήκη της.

Επιθηλιακοί διάλυτοι Νατρίου (ENaC). Οι επιθηλιακοί διάλυτοι Na είναι χαμηλής αγωγιμότητας εκλεκτικοί διάλυτοι, οι οποίοι διασφαλίζουν τη μεταφορά ιόντων Na διαμέσου της κορυφαίας επιφάνειας των κυττάρων αρκετών επιθηλιακών ιστών. Σ' αυτά συμπεριλαμβάνονται και των επιθηλιακά κύτταρα του άπω νεφρώνα. Οι παραπάνω διάλυτοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του νατρίου και τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης.

Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι η ET-1 δρώντας στους ETB υποδοχείς προκαλεί την καταστολή των ENaC (Gilmore et al, 2001). Συγκεκριμένα, σε διαγονιδιακά πειραματόζωα (ποντίκια) που έφεραν μετάλλαξη με λειτουργική ανεπάρκεια του ETB υποδοχέα ανέπτυξαν νατριοευαίσθητη υπέρταση. Η χορήγηση αμιλορίδης, ισχυρού αναστολέα των ENaC, επανέφερε την αρτηριακή πίεση στα φυσιολογικά επίπεδα. Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ET-1,

μέσω των ET-B, δρά κατασταλτικά στους επιθηλιακούς διαύλους Na, γεγονός απαραίτητο για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (*Gilmore et al, 2001*).

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν επιθηλιακοί δίαυλοι νατρίου στο σπλαγγνικό περιτόναιο προβάτου (*Zarogiannis et al, 2005*). Η αναστολή των ENaC από την ET-1, καταστέλλει τη μεταφορά ιόντων Na μέσω της μεσοθηλιακής μεμβράνης και οδηγεί στην ταχεία αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης. Γεγονός που υποθέτουμε ότι παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Αυτή η συμμετοχή της ET-1 στη διακίνηση των ιόντων, είναι πιθανό ότι επηρεάζει και την απομάκρυνση του νατρίου κατά τη διάρκεια της θεραπείας της περιτοναϊκής κάθαρσης. Η παραπάνω δράση είναι εξέχουσας σημασίας. Δυνατόν να ενέχεται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, στη διατήρηση του όγκου της υπερδιήθησης αλλά και στην επιβίωση των ασθενών που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση (*Ates et al, 2001*).

Na⁺/K⁺-ATPάση. Στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα η αντλία Na⁺/K⁺-ATPάση βρίσκεται στη βασικοπλάγια μεμβράνη και δρα σε συνέργεια με τα ENaC με σκοπό την επαναρρόφηση άλατος. Η παραπάνω αντλία για κάθε δύο ιόντα καλίου που μεταφέρει μέσα στο κύτταρο, εξωθεί τρία ιόντα νατρίου. Η Na⁺/K⁺-ATPάση έχει εντοπιστεί στον υπεζωκότα προβάτων (*Hatzoglou et al, 2001*) και κουνελιών (*Agostoni and Zocchi, 1990*). Στον υπεζωκότα ο βασικός της ρόλος είναι να διατηρεί τον όγκο του πλευριτικού υγρού και τη φυσιολογική σύσταση του κυτταροπλάσματος των μεσοθηλιακών κυττάρων.

Μελέτες σε καλλιέργειες ανθρωπίνων μη μελαγχρωστικών επιθηλιακών κυττάρων του ακτινωτού σώματος του οφθαλμού ανέδειξαν την κατασταλτική δράση της ET-1 στην Na⁺/K⁺-ATPάση μέσω των ETB υποδοχέων (*Prasanna et al, 2010*).

Η δράση της ET-1 στο σπλαγχνικό περιτόναιο θα μπορούσε να είναι ανάλογη αυτής στα επιθηλιακά κύτταρα του οφθαλμού. Η υπόθεση αυτή θα εξηγούσε με επάρκεια τη δράση της ET-1 στη διαπερατότητα του περιτοναίου και θα ήταν σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Υποδοχείς ET-1. Οι ειδικοί υποδοχείς, ETA και ETB, έχουν μεγάλη διασπορά στην επιφάνεια των κυττάρων αρκετών οργάνων. Οι συστηματικές δράσεις της ET-1 επιτυγχάνονται με τη διέγερση των παραπάνω υποδοχέων. Με σκοπό να ελέγξουμε την ύπαρξή τους στο περιτόναιο πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων με τη χρήση εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων αυτών.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο BQ123 που αποτελεί τον αναστολέα του ETA υποδοχέα και ο BQ788 που είναι ο αναστολέας του ETB υποδοχέα. Σε μια σειρά πειραμάτων, μετά την προσθήκη της ET-1, τόσο με τον κάθε αναστολέα χωριστά όσο και με τους δυο αναστολείς μαζί, παρατηρήθηκε εξασθένηση της δράσης της ET-1. Αυτό σημαίνει ότι στη συγκεκριμένη συγκέντρωση, που χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς, άσκησαν μερική καταστολή στη δράση της ET-1. Θεωρώντας δεδομένο ότι η δράση της ET-1 πραγματοποιείται μέσω αυτών των δυο υποδοχέων, το παραπάνω εύρημα αποτελεί μια έμμεση απόδειξη για την ύπαρξή τους στο σπλαγχνικό περιτόναιο του προβάτου. Γίνεται φανερό λοιπόν ότι η δράση της ET-1 στην διαπερατότητα του περιτοναίου πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση ETA και ETB υποδοχέων.

Επίσης, οι μεταβολές της διαμεμβρανικής αντίστασης που παρατηρήθηκαν μετά την προσθήκη της ET-1, τόσο με τον κάθε αναστολέα χωριστά, όσο και αυτές μετά την προσθήκη της ET-1 και των δυο αναστολέων μαζί, δεν ήταν σημαντικές (Σχήμα 8,9). Εξάγεται επομένως το συμπέρασμα στην παρούσα μελέτη πως για να ασκηθεί

η δράση της ET-1 είναι απαραίτητη η διέγερση και των δύο υποδοχέων. Όπως έχει διαπιστωθεί άλλωστε και σε άλλες μελέτες (*Wang et al, 1997*) υπάρχει μια αλληλοεπικάλυψη στη δράση τους.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη του κάθε αναστολέα αποκλειστικά, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης, κυρίως όταν προστέθηκε στην κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης. Αυτό υποδεικνύει την ξεκάθαρη αγωνιστική δράση τους, που δεν ήταν όμως σε όλες τις περιπτώσεις στατιστικά σημαντική. Μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία παρόμοια δράση των αναστολέων σε άλλο ιστό δεν έχει αναφερθεί. Βεβαίως χρειάζεται περαιτέρω αποσαφήνιση.

Σαραφοτοξίνη. Πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων με την προσθήκη ενός πεπτιδίου ανάλογου της ET-1, της σαραφοτοξίνης (SRTXc). Κατά την προσθήκη της τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια, παρατηρήθηκε αύξηση της διαμεμβρανικής αντίστασης. Το παραπάνω γεγονός υποδηλώνει ότι η SRTXc επηρέασε τη διακίνηση ιόντων εκατέρωθεν της περιτοναϊκής μεμβράνης.

Ως γνωστό, η σαραφοτοξίνη διαθέτει εκλεκτική συγγένεια στον ETB υποδοχέα. Επομένως η δράση της στο σπλαγχνικό περιτόναιο ασκείται μέσω της ενεργοποίησης του παραπάνω υποδοχέα.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας προστέθηκε τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια σαραφοτοξίνη και ανταγωνιστής των ETB υποδοχέων. Ήταν σαφής η εξασθένιση της δράσης της σαραφοτοξίνης στην κορυφαία επιφάνεια. Το παραπάνω εύρημα αποδεικνύει το γεγονός ότι η σαραφοτοξίνη δρα μέσω των υποδοχέων B, ενισχύει όμως και την άποψη για την παράλληλη αγωνιστική δράση των αναστολέων, αφού η καταστολή δεν ήταν

πλήρης. Στη βασική επιφάνεια της περιτοναϊκής μεμβράνης, όμως, δεν παρατηρήθηκε ανάλογη δράση των αναστολέων. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου η κατανομή των υποδοχέων δεν ευνοεί τη δράση αυτή.

Με τα παραπάνω ευρήματα, λοιπόν, είναι σαφές ότι τόσο η ET-1 όσο και πεπτίδια ανάλογα της ενδοθηλίνης έχουν επίδραση στη διαπερατότητα του περισπλάγγνιου περιτοναίου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η ET-1 επιδρά στη διαπερατότητα του σπλαγχνικού περοτοναίου. Η δράση αυτή είναι ταχεία και επιβεβαιώνει την ημιδιαπερατή φύση του περιτοναίου.
2. Διαπιστώνεται η ύπαρξη των υποδοχέων A και B της ET-1 τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. Η κατανομή των υποδοχέων είναι ανομειογενής.
3. Η δράση της ET-1 επιτυγχάνεται είτε με την ενεργοποίηση του υποδοχέα A, είτε με την ενεργοποίηση του υποδοχέα B. Η ενεργοποίηση των δυο υποδοχέων έχει συνεργική δράση.

Συνολικά, είναι γνωστή η εμπλοκή της ET-1 στην ανάπτυξη της ίνωσης, ενώ η συγκέντρωσή της βρέθηκε αυξημένη στην περιτοναϊκή κοιλότητα ασθενών υπό περιτοναϊκή κάθαρση. Επιπλέον αποδείχτηκε ότι η ET-1 επηρεάζει τη διαπερατότητα του περιτοναίου. Επομένως, η χρήση τοπικών αναστολέων της ET-1 θα μπορούσε να έχει φαρμακολογική εφαρμογή στη μακρόχρονη διατήρηση της λειτουργικότητας του περιτοναίου ως μεμβράνη κάθαρσης.

SUMMARY

The effect of Endothelin-1 (ET-1) on transmesothelial resistance (RTM) of visceral sheep peritoneum was studied by Ussing chamber experiments. ET-1, 10^{-7} M, BQ-123, (ETA receptor antagonist, 10^{-6} M), BQ-788 (ETB receptor antagonist, 10^{-6} M), and their combinations were added on the apical and the basolateral side of the peritoneum. Additionally, Sarafotoxin (10^{-7} M) simply and in combination with BQ788(10^{-6} M) was added in both apical and basolateral side of the visceral sheep peritoneum.

RTM was measured before and serially after addition of substances, and changes were registered as percentage (Δ RTM %). RTM increased within 1 min after addition of ET-1 apically (Δ RTM $63.60 \pm 7.46\%$; $P < 0.05$) or basolaterally (Δ RTM $85.5 \pm 20.86\%$; $P < 0.05$). RTM also increased within 1 min after the addition of sarafotoxin (Δ RTM 30.67 ± 5.82 , $P < 0.05$) apically or basolaterally (Δ RTM 23.67 ± 2.86 , $P < 0.005$). BQ-123 and BQ-788 and their combination significantly reduced ($P < 0.05$) the effect of ET-1 to a similar degree in all cases. The addition of the BQ788 apically reduced the effect of sarafotoxin.

These results clearly indicate that ET-1 and sarafotoxin reduces ionic permeability of the visceral sheep peritoneum in vitro. Furthermore, it is obvious that this inhibitory effect is mediated through both ETA and ETB receptors. In conclusion, ET-1 and endothelin-like peptides have a clear effect on the permeability of the visceral sheep peritoneum.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1(ET-1) στη διαμεμβρανική αντίσταση (RTM) του σπλαγχνικού περιτοναίου προβάτου μελετήθηκε με μια σειρά πειραμάτων στο σύστημα μελέτης διαπερατότητας μεμβρανών Ussing. Συγκεκριμένα, ET-1, (10^{-7} M), BQ-123 (ανταγωνιστής των υποδοχέων A, 10^{-6} M), BQ-788 (ανταγωνιστής των υποδοχέων B, 10^{-6}), καθώς και οι μεταξύ τους συνδυασμοί προστέθηκαν τόσο στην κορυφαία όσο και στη βασική μεμβράνη του περιτοναίου. Επιπρόσθετα, σαραφοτοξίνη (10^{-7} M) μόνη της και σε συνδυασμό με τον BQ-788 (10^{-6} M) προστέθηκε στην κορυφαία και τη βασική επιφάνεια του σπλαγχνικού περιτοναίου. Η RTM καταμετρήθηκε πριν αλλά και διαδοχικά μετά την προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών. Οι αλλαγές στη διαπερατότητα καταγράφησαν ως εκατοστιαίες μεταβολές της RTM (Δ RTM %).

Η RTM αυξήθηκε μέσα στο πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη της ET-1 τόσο στην κορυφαία επιφάνεια (Δ RTM $63,60 \pm 7,46\%$, $P < 0,05$) όσο και στη βασική ($85,5 \pm 20,86\%$, $P < 0,05$). Η RTM αυξήθηκε στο πρώτο λεπτό μετά την προσθήκη της σαραφοτοξίνης στην κορυφαία (Δ RTM $30,67 \pm 5,82$, $P < 0,05$) και βασική επιφάνεια (Δ RTM $23,67 \pm 2,86$, $P < 0,05$). Οι ανταγωνιστές BQ-123 και BQ-788 και ο συνδυασμός τους μείωσε σημαντικά τη δράση της ET-1 σε παρόμοιο βαθμό σε όλες τις περιπτώσεις. Τέλος, η προσθήκη του BQ-788 μείωσε σημαντικά τη δράση της σαραφοτοξίνης στην κορυφαία επιφάνεια.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ξεκάθαρα αποδεικνύουν ότι η ET-1 και η σαραφοτοξίνη μειώνουν τη διαπερατότητα του σπλαγχνικού περιτοναίου *in vitro*. Επιπλέον, είναι φανερό ότι η παραπάνω δράση πραγματοποιείται μέσω των

υποδοχέων ETA και ETB. Συμπερασματικά, η ET-1 και ανάλογα με την ET-1 πεπτίδια, έχουν σαφή δράση στη διαπερατότητα του σπλαγγνικού περιτοναίου προβάτου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agostoni E, Zocchi L. Solute-coupled liquid absorption from the pleural space. *Respir Physiol* 1990; 81(1):19-27.

Ahmed SI, Thompson J, Coulson JM, Woll PJ. Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(4):422-31.

Ajne G, Wolff K, Fyhrquist F, Carlstrom K, Hensen-Mortberg A, Nisell H. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in normal pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22(3):215-24.

Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology* 2000; 36(2):161-7.

Anand I, McMurray J, Cohn JN, Konstam MA, Notter T, Quiza K, Ruschitzka F, Lüscher TF. Long-term effects of darusentan on left-ventricular remodelling and clinical outcomes in the EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure (EARTH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9431):347-54.

Annual Baxter World-Wide Survey. Baxter Healthcare Corporation: Deerfield, Illinois, 1998.

Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A. mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005; 46:938-48.

Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer* 200; 85(11):1759-63

Ates K, Nergizoglou G, Keven K, et al. Effect of fluid and sodium removal on mortality in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2001; 60:767-76.

Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13:377-383.

Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spegel D, Catt KJ. Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1(9):1059-1066.

Baron M. Structure of the interstitial peritoneum in man. *Am J Anat* 1941; 69:439-496.

Battistini B, Warner TD, Fournier A, Vane JR. Characterization of ETB receptors mediating contractions induced by endothelin-1 or IRL 1620 in guinea-pig isolated airways: effects of BQ-123, FR139317 or PD 145065. *Br J Pharmacol* 1994; 111(4):1009-16.

Bercovici B, Gallily R. The cytology of the human peritoneal fluid. *Cytology* 1978; 22:124.

Bird SD. Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. *Cell Biol Int* 2004; 28:151-9.

Boen ST, Mion CM, Curtis FK. Periodic peritoneal dialysis using repeated puncture technique and automatic cycling machine. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1964; 10:409-414.

Bradi AF, Crae SN. A scanning electron microscope study of mouse peritoneal mesothelium. *Tissue Cell* 1976; 8:159.

Buoncristiani U. Birth and evolution of the 'Y' set. *ASAIO J* 1996; 42(1):8-11.

Cameron JS (ed). The science of dialysis: 'uremic toxins'. *History of The Treatment of Renal Failure by Dialysis*. Oxford:Oxford University Press, 2002:15-23

Cernacek P, Stewart DJ, Monge JC, Rouleau JL. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81(6):598-606.

Chambers R, Zweifach B. Functional activity of the blood capillary bed, with special reference to visceral tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1946; 46:683-694.

Chen TW, Khanna R, Moore H, Twardowski ZJ, Nolph KD. Sieving and reflection coefficients for sodium salts and glucose during peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:1092-1100.

Chester AH, Dashwood MR, Clarke JG, Larkin SW, Davies GJ, Tadjkarimi S, Maseri A, YAcoub MH. Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites. *Am J Cardiol* 1989; 63(18):1395-8.

- Cichoki T, Hanicki Z, Sulowicz w, Smolenski O, Kopec J, Zembala M. Output of peritoneal cells into peritoneal dialysate. Cytochemical and functional studies. *Nephron* 1983; 35:175-182.
- Clark R. Wound repair; overview and general considerations. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. London: Plenum Press; 1996.pp.3-50.
- Clarke JG, Benjamin N, Larkin SW, Webb DJ, Davies GJ, Maseri A. Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am J Physiol* 1989; 257(6 Pt 2):H2033-5.
- Clerk A, Sugden PH. Regulation of phospholipases C and D in rat ventricular myocytes: stimulation by endothelin-1, bradykinin and phenylephrine. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(6):1593-604.
- Combet S, Ferrier ML, van Landschoot M, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata et al. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression and structural modifications in the peritoneum. *J Am soc Nephrol* 2001, 12:2146-57.
- Curry FE, Michel CC. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvasc Res* 1980; 20:96-99.
- Davenport A. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54:219-226.
- Davenport P, Battistini B. Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development . *Clin Sci* 2002;103(supp 48):15-35.
- De Vecchi AF, Colucci P, Salerno F, Scalamogna A, Donticelli C. Outcome of peritoneal dialysis in cirrhotic patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 40:161-168.
- Dhaun N, Macintyre IM, Melville V, Lilitkarntakul P, Johnston NR, Goddard J, Webb DJ. Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-a receptor antagonism in chronic kidney disease. *Hypertension* 2009; 54(1):113-119.
- Di Fiore M. *Atlas of Human Histology*. Philadelphia, Lea and Febiger, 1981.
- Di Paolo N, Sacchi G, De-Mia M et al. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1986; 44:204-211.
- Di Paolo N, Sacchi G. *Atlas of Peritoneal Histology*. *Perit Dial Int*, 2000; (suppl 3):S37-S57.

- Dingemans J, Van Giersbergen PL. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(15):1089-115.
- Douma CE, De Waart DR, Struijk DG, Krediet RT. The nitric oxide donor nitroprusside intraperitoneally affects peritoneal permeability in CAPD. *Kidney Int* 1997; 51:1885-1892.
- Ducanel F. The sarafotoxins. *Toxicon* 2002; 40:1541-1545.
- Ducanel F. Endothelin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2828-2839.
- Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol*, 1996; 81(4):1510-1515.
- Eberle J, Fecker LF, Orfanos CE, Geilen CC. Endothelin-1 decreases basic apoptotic rates in human melanoma cell lines. *J Invest Dermatol* 2002; 119(3):549-55.
- Ergul A, Glassberg MK, Wanner A, Puett D. Characterization of endothelin receptor subtypes on airway smooth muscle cells. *Exp Lung Res* 1995; 21(3):453-68.
- Evans RG, Bergstrom G, Cotterill E, Anderson WP. Renal haemodynamic effects of endothelin-1 and the ETA/ETB antagonist TAK-044 in anaesthetized rabbits. *J Hypertens* 1998; 16(12 Pt 2):1897-905.
- Flessner MF. Peritoneal transport physiology: insights from basic research. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:122.
- Flessner MF. The transport barrier in intraperitoneal therapy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F433-F442.
- French JE, Florey HW, Morris B. The absorption of particles by the lymphatics of the diaphragm. *Q J Exp Physiol* 1959; 45:88-102.
- Friederici HHR. The tridimensional ultrastructure of fenestrated capillaries. *J Ultrastruct Res* 1968; 23:444-456.
- Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 1993; 120:1147-57.
- Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M et al, Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(7):1146-59.
- Furness JB. Arrangement of blood vessels and their relation with adrenergic nerves in the rat mesentery. *J Anat* 1973; 115:347-364.

Gabella G (section ed). Cardiovascular . In: Williams PL, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Ferguson M, eds. *Gray's Anatomy*. New York: Churchill Livingstone, 1995, p. 1465.

Gabella G(section ed). Cardiovascular . In: Williams PL, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Ferguson M, eds. *Gray's Anatomy*. New York: Churchill Livingstone, 1995, p. 1466.

Galadi P, Stostak A, Jaichenko J, Fudin R, Gotloib L. Protamine sulfate induces enhanced peritoneal permeability to proteins. *Nephron* 1991; 57:45-51.

Galié N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, Frost AE, Zwicke D, Naeije R, Shapiro S, Olschewski H, Rubin LJ. Dabprisant therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(3):529-35.

Ganter G. Uber die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse. *Munch Med Wochenschr* 1923; 70:1478-1481

Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993; 341(8860):1550-4.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328(24):1732-9.

Gilmore ES, Stutts MJ, Milgram SL. SRC family kinases mediate epithelial Na⁺ channel inhibition by endothelin. *J Biol Chem* 2001; 276(45):42610-7.

Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ, Webb DJ. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 2004; 109(9):1186-93

Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Münter K, Müller SP, Shaw S, Barton M. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(3):908-13.

Goldman M, Vandenabeele P, Moulart J et al. Intraperitoneal secretion of interleukin-6 during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1990; 56:277-280.

Gomez-Sanchez CE, Cozza EN, Foecking MF, Chiou S, Ferris MW. Endothelin receptor subtypes and stimulation of aldosterone secretion. *Hypertension* 1990; 15(6 Pt 2):744-7.

Gotloib L, Digenis GE, Rabinovich S, Medline A, Oreopoulos DG. Ultrastructure of normal rabbit mesentery. *Nephron* 1983; 34:248-255.

Gotloib L, Shostak A, Bar-Sella P, Eiali V. Fenestrated capillaries in human parietal and rabbit diaphragmatic peritoneum. *Nephron* 1985, 41:200-202.

Gotloib L. Anatomical basis for peritoneal permeability. In: La Greca G, Chiaramonte S, Fabris A, Feriani M, Ronco G, eds. *Peritoneal Dialysis*. Milan: Wichtig Ed, 1986, pp. 3-10.

Granger DN, Richardson PDI, Taylor AE. The effects of iso-prenaline and bradykinin on capillary filtration in the cat small intestine. *Br J Pharmacol* 1979; 67:361-366.

Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. ESRD patients in 2004: global overview of patients numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2587-2593.

Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996; 41:159-167.

Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR. Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(14):1273-81.

Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27(12):2130-4.

Hatzoglou CH, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura. *J Appl Physiol* 2001; 90(4):1565-9.

Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16(8):1081-98.

Haynes WH, Ferro OJ, O'Kane KPJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93:1860.

Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A, Lindholme B. A quantitative description of solute and fluid transport during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1992; 41:1320-1332.

Herrera M, Hong NJ, Oritz PA, Garvin J. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J Biol Chem* 2009; 284(3):1454-60.

Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:621-42.

Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1380-9

Hocher B, Paul M. Transgenic animal models for the analysis of the renal endothelin system. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(7):935-7.

Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23(1):19-26.

Hoffmann E, Assennato P, Donatelli M, Colletti I, Valenti TM. Plasma endothelin-1 levels in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *Am Heart J* 1998; 135(4):684-8.

Hruza Z. Connective tissue. In: Kaley G, Altura BM, eds. *Microcirculation*, Vol. I, Baltimore, MD: University Park Press, 1977, pp. 167-83.

Ikedo T, Ohta H, Okada M, Kawai N, Nakao R, Siegl PK, Kobayashi T, Maeda S, Miyauchi T, Nishikibe M. Pathophysiological roles of endothelin-1 in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1999; 34(3):514-9.

Imholz ALT, Koomen GCM, Struijk DG, Arisz L, Krediet RT. Effect of increased intraperitoneal pressure on fluid and solute transport during CAPD. *Kidney Int* 1993; 44:1078-1085.

Inoue A, Ynagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 87(8):2863.

Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mini N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M, Yano M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Sci USA* 1994;91(11):4892-6.

- Ishikawa T, Li LM, Shinmi O, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes. *Circ Res* 1991; 69(4):918-26.
- Ito K, Kuwahara M, Sugano S. Role of intra- and extracellular calcium stores in mesothelial cell response to histamine. *Am J Physiol* 1995; 268(1 Pt 1):L63-70.
- Ji HL and Nie HG. Electrolyte and fluid transport in mesothelial cells. *J Epithel Biol Pharmacol*. 2008 ; 1: 1–7.
- Johnson PC, Wayland H. Regulation of blood flow in single capillaries. *Am J Physiol* 1967; 212:1405-1415.
- Kajikuri J, Itoh T, Kariyama H. Does Ca²⁺ release by acetylcholine enhance the synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in smooth muscle of the porcine coronary artery? *Jpn J Physiol* 1992; 42(4):665-71.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268(25):19126-33.
- Katwa LC, Guarda E, Weber KT. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27:2125-2129.
- Khimji AK, Rockey DC. Endothelin-biology and disease. *Cellular Signalling*, 2010; 22:1615-1625.
- Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2001; 104(10):1114-8.
- Knapowski J, Feder E, Simon M, Zabel M. Evaluation of the participation of parietal peritoneum in dialysis: physiological, morphological and pharmacological data. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1979; 16:155-164.
- Knowles J, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 and angiogenesis in cancer. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3(4):309-14.
- Kramer A, Fletcher J. Do endothelin-receptor antagonists prevent delayed neurological deficits and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage?: a meta-analysis. *Stroke* 2009; 40(10):3403-6.

- Krediet RT, Koomen GCM, Struijk DG, Van Olden RW, Imholz ALT, Boeschoten EW. Practical methods for assessing dialysis efficiency during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1994;(suppl. 48): S7-S13.
- Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic Peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341-356.
- Krepper MA. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6255-6258.
- Kuwahara M, Kuwahara M. Pericardial mesothelial cells produce endothelin-1 and possess functional endothelin ETB receptors. *Eur J Pharm* 1998; 347:329-335.
- Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li Fk, Leung JC. Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am j Kidney Dis* 2000; 35:644-52.
- Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. *Physiol Rev* 2004; 84(2):385-410.
- Lalich M, McNeel DG, Wilding G, Liu G. Endothelin receptor antagonists in cancer therapy. *Cancer Invest* 2007; 25(8):785-94.
- Leak LV. Distribution of cell surface charges on mesothelium and lymphatic endothelium. *Microvasc Res* 1986; 31:18-30.
- Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*, 1995; 333:356-363.
- Leygoldt JK. Interpreting peritoneal osmotic reflection coefficients using a distributed model of peritoneal transport. *Adv Perit Dial* 1993; 9:3-7.
- Li FK, Davenport A, Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD. Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on direct chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1998; 54:2170-83.
- Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* 2004; 3(Suppl 2):123-6.
- Li YY, Li JC. Effects of nitric oxide on peritoneal lymphatic stomata and lymph drainage via NO-cGMP-Ca²⁺ pathway. *Acta Physiol Sin* 2005; 57(1):45-53.
- Lin CY, Lin CC, Huang TP. Several changes of interleukin-6 and interleukin-8 levels in drain dialysate of uremic patients with continuous ambulatory peritoneal dialysis during peritonitis. *Nephron* 1993; 63:404-408.

- Lukus G, Brindle SD, Greengard P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 178:562-566.
- Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors and regulation of vascular tone in human blood vessels. *Lung* 1990; 168(suppl):27-34.
- Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clinic Cardiol* 1997; 20 (suppl.2):II-10.
- Macquin-Mavier I, Levame M, Istaiti N, Harf A. Mechanisms of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250(2):740-5.
- Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13(2):276-84.
- Maguire JJ, Kuc RE, Pell VR, Green A, Brown M, Kumar S et al. Comparison of human ET(A) and ET(B) receptor signaling via G-protein and β -arrestin pathways. *Life Sci* 2012; 91:544-549.
- Maher JF. Transport kinetics in peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull* 1983(suppl.):S4-S6.
- Maher JF. Antecedents of dialysis: the evolution of knowledge of uremic biochemical toxicity and therapeutic bloodwashing. *Semin Dial* 1991; 4(3):185-188.
- Malach M. Peritoneal dialysis for intractable heart failure in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1972; 29:61-63.
- Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2029-39.
- Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(12):3517-23
- Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 164(1):74-80.
- Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3(2):145-51.

- Mayerson HS, Wolfram CG, Shirley Jr HH, Wasserman K. Regional differences in capillary permeability. *Am J Physiol* 1960; 198:155-160.
- Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Reum* 2003; 48:1190-9.
- McBride P, Morton Maxwell: he made acute peritoneal dialysis a routine procedure. *Perit Dial Int* 1984; 4:58-59
- McBride P, Paul Doolan and Richard Rubin: performed the first successful chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1985; 5:84-86.
- McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85(4):1374-9.
- Miller FN. The peritoneal microcirculation . In: Nolph K, ed. *Peritoneal Dialysis* . Boston, MA: Martinus Nijhoff, 1985, pp. 51-93.
- Mion CM, Boen ST. Analysis of factors responsible for the formation of adhesions during chronic peritoneal dialysis. *Am J Med Sci* 1965; 250:675-679.
- Morgera S, Kuchinke S, Budde K, Lun A, Hoher B, Neumayer HH. Volume stress-induced peritoneal endothelin-1 release in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2585-2590.
- Morgera S, Schlenstedt J, Hambach P, Giessing M, Deger S, Hoher B, Neumayer HH. Combined ETA/ETB receptor blockade of human peritoneal mesothelial cells inhibits collagen I RNA synthesis. *Kidney Int* 2003; 64:2033-2040.
- Mortier S, De Vriese A, Van de Vorde J, Schaub TP, Passlick-Deetjen J, Lameire NH. Hemodynamic effects of peritoneal dialysis solutions on the rat peritoneal membrane :role of acidity, buffer choice, glucose concentration and glucose degradation products. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:480-489.
- Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology Ther*, 2006; 110:386-414.
- Mourik van JA, Romani de W, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* , 2002; 117(2):113-22.
- Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002; 7:171-91.

Nance FC. Diseases of the peritoneum, retroperitoneum, mesentery and omentum. In: Haubrichus, Schaffner F, Berk J, eds. Gastroenterology . Philadelphia , PA: WB Saunders, 1995, pp. 3061-3063.

Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2):110-6

Nolph KD, Twardowski Z. The peritoneal dialysis system. In: Nolph KD, ed. *Peritoneal Dialysis*. Boston, MA: Martinus Nijhoff, 1985, pp. 23-50.

Nolph KD. Has peritoneal dialysis peaked? The impact of the CANUSA study. The Canadian-USA Multicenter study. *ASAIO J* 1996; 42:136-138.

Nolph KD. 1975 to 1984 – An important decade for peritoneal dialysis: memories with personal anecdotes. *Perit Dial Int* 2002; 22:608-613

Nucci G, Thomas R, D’Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(24):9797-800.

Oliver MJ, Quinn RR, Richardson E, Kiss A. Home care assistance and utilization of peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2007; 71(7):673-8.

Oreopoulos DG. Peritoneal Dialysis is here to stay. *Nephron* 1979; 24: 7-9.

Oreopoulos D, Peritoneal Dialysis in Ontario. www.lspd.org/history/ont.php3. International Society of Peritoneal Dialysis web page/history. Accessed on 02/10/2007

Peacock AJ, Dawes KE, Shock A, Gray AJ, Reeves JT, Laurent GJ. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 7:492-499.

Pereira BJ, Poutsika DD, King J, Strom JA, Narayan G, Levey AS, Dinarello CA. In vitro production of interleukin-1 receptor antagonist in chronic renal failure: CAPD and HD. *Kidney Int*, 1992; 42:1419-1424.

Peter MG, Davenport AP. Characterization of the endothelin receptor selective agonist, BQ3020 and antagonists BQ123, FR139317, BQ788, 50235, Ro462005 and bosentan in the heart. *Br J Pharmacol* 1996; 117(3):455-462.

Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2000; (4):565-76.

Pirtskhalaishvili G, Nelson JB. Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate* 2000; 44(1):77-87.

Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD . Continuous ambulatory peritoneal dialysis . *Ann Intern Med* 1978; 88(4):449-455.

Prasanna G, Divas A, Hulet C, Yorio T. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by endothelin-1 in human nonpigmented ciliary epithelial cells. *J Pharm Exp Ther* 2001; 296:966-971.

Razzaque MS, Taguchi T. Pulmonary fibrosis: cellular and molecular events. *Path Int.* 2003; 53:133-145.

Recklinghausen FT. *Die Lymphgefasse und ihre Beziehung zum Bindegewebe.* Berlin: Hirschwald, 1862

Remuzzi G, Benigni A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet* 1993; 342(8871):589-93.

Rippe B, Haraldsson B. How are macromolecules transported across the capillary wall? *News Physiol Sci* 1987; 2:135-138.

Rippe B, Venturoli D, Simonsen O, de Arteaga J. Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int* 2004; 24(1):10-27.

Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108: 2369-2379.

Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rrey C, Housset C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* 1998; 27(2):472-80.

Rosano L, Salani D, Di Castro v, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103 Suppl 48:306S-309S.

Rossi GP, Sacchetto A, Ceasri M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res* 1999; 43(2):300-7.

Rubin J, Rogers WA, Taylor HM. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 1980; 92:7-13.

Rubin J, Jones Q, Planch A, Stanek K. Systems of membranes involved in peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 1987; 110:448-453.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346(12):896-903.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Engl J Med* 2002; 346(12):896-903

Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, 1999; 126(2):391-8.

Sakurai T, Ynagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-5.

Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Masaki T. Analysis of endothelin related peptides in culture supernatant of porcine aortic endothelial cells: evidence for biosynthetic pathway of endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, 15;162(3):1287-94.

Schmid-Schonbein GW. Microlympatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990; 70:987-1028.

Shaldon S, Koch KM, Quellhorst E, Dinarello CA. Hazards of CAPD: interleukin-1 production. In: Maher JF, Winchester JF, eds. *Frontiers in Peritoneal Dialysis*. New York: Field, Rich, 1986, pp. 630-633.

Sharma K and Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diadetic kidney disease: The case for transforming growth factor- β as a key nadiator. *Diabetes* 1995; 44:1139-1146.

Shear L, Harvey JD, Barry KG. Peritoneal sodium transport: enhancement by pharmacologic and physical agents. *J LabClin Med* 1966;67:181-8.

Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost* 2004; 92(2):262-74.

Shimizu M, Ishibashi Y, Taki F, Shimizu H, Hirahara I, kaname S, Fujita T. Endothelin B receptor blocker inhibits high glucose-induced synthesis of fibronectin in human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2006;26:393-401.

Shirai N, Naruko T, Ohsawa M, Ikura Y, Sugama Y, Hirayama M, Kitabayashi C, Ehara S, Inoue T, Itoh A, Haze K, Tanzawa K, Toshiyama M, Yoshikawa J, Ueda M. Expression of endothelin-converting enzyme, endothelin-1 and endothelin receptors at the site of percutaneous coronary intervention in humans. *Hypertens* 2006; 24(4):711-21.

Shi-Wev X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, Black CM, Abraham DJ. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *Invest Dermatol* 2001; 116(3):417-25.

Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2004; 15:2707-2719.

Simionescu M, Simionescu N. Organization of cell junctions in the peritoneal mesothelium. *J Cell Biol*, 1977; 74(1):98-110.

Simon M. Peritoneal mesothelium in vitro: an electrophysiologic study. *Perit Dial Int* 1996; 16:393-397.

Smuje L, Zweifach BW, Intaglietta M. Micropressure and capillary filtration coefficients in single vessels of the cremaster muscle in the rat. *Microvasc Res* 1970; 2:96-110.

Sofia M, Mormile M, Faraone S, Alifano M, Zofra S, Romano L, Carratu L. Increased endothelin-like immunoreactive material on bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma and patients with interstitial lung disease. *Respiration* 1993; 60(2):89-95.

Stefanidis I, Liakopoulos V, kourti P, Zarogiannis S, Poultsidi A, Mertens PR, Salmas M, Hatzoglou C, Gourgoulialis K, Molyvdas PA. Amiloride-sensitive sodium channels on the parietal human peritoneum: evidence by using-type chamber experiments. *ASAIO J* 2007; 53:335-8.

Steinhauer HB, Grünter B, Schollmeyer P. Stimulation of peritoneal synthesis of vasoactive prostaglandins during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Invest* 1985; 15:1-15.

Sticherling M. The role of endothelin in connective tissue diseases. *Rheumatology* 2006; 45:iii8-iii10.

- Stojilkovic SS, Meralli F, Ida T, Krsmanovic LZ, Catt KJ. Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science* 1990; 248(4963):1663-6.
- Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Issliki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;v12(7):1359-68.
- Szokodi I, Piuholo J, Ruskoaho H. Endothelin receptor blockade and exacerbation of heart failure. *Circulation*. 2003; 107(22):e211.
- Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):260-6.
- Taylor AE, Granger DN. Exchange of macromolecules across the circulation. In: Renkin EM, MichelvCC, eds. *Handbook of Physiology, Microcirculation, Section, Chapter 11*, MD: American Physiological Society, 1984, pp. 467-500.
- Tenckhoff H, Schechter H. A bacteriologically safe peritoneal access device. *Trans Am Soc Intern Organs* 1968; 14:181-186.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 740-6.
- Twardowski ZJ, Khanna R, Nolph KD Scalamogna A, Metzler MH, Schneider TW, Prowant BF, Ryan LP. Intra-abdominal pressures during natural activities in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1986; 44: 129-135.
- Venuti A, Salani D, Manni V, Poggiali F, Bagnato A. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *FASEB J* 2000; 14(14):2277-83.
- Verger C. Peritoneal Ultrastructure. In: Nolph KD, ed. *Peritoneal Dialysis*. Boston, MA: Martinus Nijhoff, 1985, pp. 95-113.
- Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 2006; 70:840- 853.

- Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowothen PJ, Schneider B, Waldhauser W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 15; 267(23):16066-8.
- Wang HG, Shibamoto T, Miyahara T. Endothelin-1 selectively contracts portal vein through both ETA and ETB receptors in isolated rabbit liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997;273:1036-43.
- Wegener G. Chirurgische Bemerkungen über die Peritonealhöhle, mit besonderer Berücksichtigung der Ovariectomie. *Arch f Klin Chir* 1877; 20:51-145
- Wiederhielm CA. The interstitial space. In: Fung YC, Perrone N, Anderson M, eds. *Biomechanics: Its Foundations and Objectives*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1972, pp. 273-286.
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Ruhland von M, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT. Morphologic changes in peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13:470-479.
- Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister C. *Gray's Anatomy*, 37th edn. Edinburgh. Churchill Livingstone, 1989, p. 1336.
- Williams PL, Warwick R, eds. *Gray's Textbook of anatomy*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1980, pp. 1319-1389.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
- Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis induces an epithelial-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403-13.
- Zamora MR, O'Brien RF, Rutherford RB, Weil JV. Serum endothelin-1 concentrations and cold provocation in primary Raynaud's phenomenon. *Lancet* 1990; 336(8724):1144-7.
- Zarogiannis S¹, Kourti P, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultsidi A, Gourgoulis K, Molyvdas PA, Stefanidis I. Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial*. 2005;21:5-8
- Zeher AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994; 344(8934):1405-6.

Zemel D, Imholz ALT, De Waart DR, Dinkla C, Struijl DG, Krediet RT. Appearance of tumor necrosis factor α and soluble TNF-receptors I and II in peritoneal effluent of CAPD. *Kidney Int* 1994; 46:1422-1430.

Zhu B, Herbert J. Behavioural, autonomic and endocrine responses associated with C-fos expression in the forebrain and brainstem after intracerebroventricular infusions of endothelins. *Neuroscience* 1996; 71(4):1049-62.

Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 2002; 20(6):162-73.

Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Growth factors VEGF and TGH- β 1 in peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med*, 1999; 134: 124-132.

Zweifach BW. The microcirculation of the blood. *Sci Am* 1959; 200:54-60.