

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Μ. Π. Σ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΝΗ ΓΙΑΝΝΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΤΩΝ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΜΟΥΣΚΑΡΙΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ
ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΘΥΜΙΟΥ

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ΠΜΣ << Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής >>. Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αρπάζω την ευκαιρία να ευχαριστήσω ολόψυχα όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της:

Την κ. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της εκπόνησης της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας και την κατανόηση που έδειξε σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Η συνεχής καθοδήγησή της με πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια των πειραματικών εργασιών και την συγγραφή της παρούσας εργασίας, με βοήθησαν να αποκτήσω πολλές γνώσεις, πνευματικά εφόδια και να οξύνω την κρίση μου στο ερευνητικό πεδίο της Ιατρικής επιστήμης.

Την κ. Παρασκευά Ευφροσύνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την πολύτιμη βοήθειά της στην εφαρμογή και ερμηνεία μεθόδου της Μοριακής Βιολογίας.

Την κ. Σταματίου Ροδόπη, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας, για την διαρκή παρακολούθηση και στήριξη που μου έδειξε. Στη συνεργασία μαζί της μου μετέδωσε με υπομονή πολλές γνώσεις και μεθόδους για την λειτουργία του εργαστηρίου και την διεκπεραίωση των πειραμάτων καθ'όλη τη διάρκεια των πειραματικών εργασιών.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον Επιστημονικό Υπεύθυνο του ΜΠΣ κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας και τον Αναπληρωματικό Επιστημονικό Υπεύθυνο κ. Μολυβδά Πασχάλη Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας για την ακούραστη προσπάθεια να διατηρήσουν το συγκεκριμένο πρόγραμμα ζωντανό, ενδιαφέρον και ωφέλιμο για τους σπουδαστές του.

Λάρισα 2013

Ελένη Γιάννη

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Αφιερώνω την εργασία αυτή στους γονείς μου και στον αδερφό μου, ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης για την αγάπη, την υποστήριξη και την κατανόηση που μου παρέχουν ακούραστα.

Λάρισα 2013

Ελένη Γιάννη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες.....	9
Σκοπός της εργασίας.....	12

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	15
Λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ).....	15
1 Λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών.....	16
1.1 Δομή των ΛΜΚ των αεραγωγών.....	16
1.2 Λειτουργίες των ΛΜΚ των αεραγωγών.....	17
2 Οι δράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος στα ΛΜΚ των αεραγωγών.....	18
2.1 Η επίδραση του παρασυμπαθητικού-χολινεργικού νευρικού συστήματος στα ΛΜΚ των αεραγωγών.....	20
3 Υποδοχείς ακετυλοχολίνης.....	20
3.1 Νικοτινικοί υποδοχείς.....	21
3.1.1 Νικοτινικοί υποδοχείς στους αεραγωγούς.....	22
3.2 Μουσκαρινικοί υποδοχείς.....	22
3.2.1 Μουσκαρινικοί υποδοχείς στους αεραγωγούς.....	24
4 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ.....	26
4.1 Συστολή των ΛΜΚ μετά από διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων.....	26
4.2 Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ μετά από διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων.....	28
5 Μουσκαρινικοί αγωνιστές.....	30
5.1 Ακετυλοχολίνη.....	30

5.2	Καρβαχόλη.....	31
6	Η συμπεριφορά των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.....	31
6.1	Η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών.....	31
6.2	Μεταβολές στο φαινότυπο των ΛΜΚ κατά την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.....	33
7	Πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών.....	34
7.1	Ιδιότητες φαινοτύπου ΛΜΚ.....	36
7.2	Μηχανισμοί της πλαστικότητας του φαινοτύπου των ΛΜΚ.....	37
7.2.1	Μηχανισμοί που οδηγούν στην ωρίμανση των ΛΜΚ.....	38
7.2.1	Μηχανισμοί που οδηγούν στην τροποποίηση των ΛΜΚ.....	40
8	Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στο φαινότυπο των ΛΜΚ	43
9	Χολινεργικοί διαβίβαση και μουσκαρινικοί υποδοχείς σε παθήσεις του αναπνευστικού (ΧΑΠ-άσθμα).....	45

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Μέθοδοι και υλικά.....	47
1	Καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων ανθρώπου.....	47
2	Κατεργασία των ΛΜΚ με μουσκαρινικούς αγωνιστές.....	47
3	Παρατήρηση με οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο της μορφολογίας των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων.....	48
4	Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	48
4.1	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	48
5	Ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	50
5.1	Εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ.....	50
5.2	Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης	50

5.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	51
5.4	Δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου.....	53
5.5	Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	54
5.6	Ηλεκτροφόρηση της πηκτής.....	54
5.7	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	55
5.8	Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών	56
6	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).....	58
6.1	Απομόνωση RNA από ΛΜΚ αναπνευστικού.....	58
6.2	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA.....	60
6.3	Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	60
6.4	Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).....	61
7	Δέσμευση [<i>N</i> -methyl- ³ H]scopolamine ([³ H]NMS) σε μεμβράνες απομονωμένων ΛΜΚ αεραγωγών.....	63
8	Ανάλυση των δεδομένων από τα πειράματα.....	64
	Αποτελέσματα.....	65
1	Επίδραση των μωσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη – καρβαχόλη στην μορφολογία των ΛΜΚ.....	65
2	Επίδραση των μωσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου α-ακτίνη, βαριά αλύσου της μυοσίνης (MHC) και δεσμίνη σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων.....	66
2.1	Επίδραση των μωσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της α-ακτίνης σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων.....	66
2.2	Επίδραση των μωσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.....	70
2.3	Επίδραση των μωσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της δεσμίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.....	73

3	Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων M ₂ και M ₃ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.....	76
3.1	Επίδραση του μουσκαρινικού αγωνιστή ακετυλοχολίνη στην έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων M ₃ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.....	76
3.2	Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων M ₂ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.....	77
	Συζήτηση.....	79
	Περίληψη.....	83
	Abstract.....	85
	Βιβλιογραφία.....	87

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AMK:** λεία μυϊκά κύτταρα
- XAI:** χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
- [³H]NMS:** *N*-methyl-³H]scopolamine
- ACh:** acetylcholine
- AChE:** acetylcholinesterase
- APS:** ammonium persulfate
- ASMC:** airway smooth muscle cell
- BSA:** bovine serum albumin
- C/EBPs:** CCAAT/enhancer-binding proteins
- cADPR:** cyclic ADP ribose
- CaM:** calmodulin
- CCh:** carbachol
- ChAT:** choline acetyl-transferase
- Cpm:** counts per minute
- CTGF:** connective-tissue growth factor
- DAG:** diacylglycerol
- DAPI:** 4'-6-Diamidino-2-phenylindole
- DMEM/F12:** Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham/F12
- DMSO:** dimethylsulfoxide
- dNTPs:** deoxyribonucleotide triphosphates
- DTT:** dithiothreitol
- EBP:** emopamil binding protein
- ECP:** eosinophil cationic protein
- EDTA:** ethylenediamine
- EGF:** epidermal growth factor
- eNANC:** excitatory Non-Adrenergic Non-Cholinergic
- ERK:** extracellular signal regulated kinase
- FBS:** fetal bovine serum
- Gi:** inhibitory G protein
- GM-CSF:** granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- GPCR:** G protein coupled receptor
- Gs:** stimulatory G protein

IGF: insulin growth factor
IL: interleukin
iNANC: inhibitory nonadrenergic noncholinergic
INF: interferon
InsR: insulin receptor
IP3: inositol trisphosphate
JAK/STAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway
LN: laminin
MAL: megakaryocytic acute leukemia
MAPK: mitogen activated protein kinases
Mcdn: myocardin
MEK: MAPK kinase
MHC: myosin heavy chain
MKL: megakaryoblastic leukemia factor
MLC: myosin light chain
MLCK: myosin light chain kinase
MLCP: myosin light chain phosphatase
MR: muscarinic receptor
mTOR: mammalian target of rapamycin
nAChRs: nicotinic achetylcholine receptors
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NANC: nonadrenergic noncholinergic
NK: natural killer
nm a-actin: nonmuscle a-actin
NNK: [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone]
NO: nitric oxide
OD: optical density
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: platelet derived growth factor
PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA: protein kinase A

PKC: protein kinase C
PLC: phospholipase C
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride
qRT-PCR: quantitative real-time PCR
RER: rough endoplasmic reticulum
RhoGEFs: Rho-specific guanine exchange factors
ROCK: Rho-associated protein kinase
RT buffer: reverse transcription buffer
RTK: receptor tyrosine kinase
SDS PAGE: sodium dodecyl sulfate
sm a-actin: smooth muscle α -actin
sm MHC: smooth muscle myosin heavy chain
SR: sarcoplasmic reticulum
SRF: serum response factor
TCF: ternary complex factors
TEMED: tetramethylethylenediamine
TGF: transforming growth factor
VEGF: vascular endothelial growth factor
VIP: vasoactive intestinal peptide

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) του αναπνευστικού έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια νόσων του αναπνευστικού που χαρακτηρίζονται από απόφραξη των αεραγωγών όπως άσθμα, ΧΑΠ και κυστική ίνωση. Οι παθήσεις αυτές αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί την απόφραξη των αεραγωγών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, τα ΛΜΚ θεωρείται ότι συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια αυτών των παθήσεων.

Στην παθογένεια του άσθματος τα ΛΜΚ εμπλέκονται με δυο τρόπους. Πρώτον ρυθμίζουν τον τόνο των βρόγχων, παρουσιάζοντας διαφορετικές ιδιότητες στην σύσπαση και χάλαση και δεύτερον ενορχηστρώνουν και διαιωνίζουν την φλεγμονή και επαναδιαμόρφωση στα τοιχώματα των αεραγωγών, που χαρακτηρίζεται μεταξύ των άλλων από αύξηση της μάζας των ΛΜΚ.

Σε κυτταροκαλλιέργειες, τα ΛΜΚ των αεραγωγών εμφανίζουν αφενός μεν διάφορους φαινότυπους, αφετέρου δε πλαστικότητα, ικανότητα δηλαδή να μεταπίπτουν από τον ένα φαινότυπο στον άλλο. Οι μεταβολές του φαινότυπου των ΛΜΚ από «συσταλτό» σε «συνθετικό» ή «υπερ-συσταλτό» φαίνεται πως εμπλέκεται στην παθογένεια νόσων του αναπνευστικού όπως το άσθμα. Η διάκριση μεταξύ των φαινότυπων των ΛΜΚ βασίζεται στην έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην συστολή, στην ικανότητα πολλαπλασιασμού και την ικανότητα σύνθεσης πρωτεϊνών, παραγόντων φλεγμονής και εξωκυττάριας ουσίας. Στις κυτταροκαλλιέργειες τα ΛΜΚ φαίνεται να εκφράζουν μεικτό πληθυσμό ΛΜΚ διαφόρων φαινότυπων με μεγάλη ετερογένεια. Μελέτες έχουν δείξει πως ο φαινότυπος αλλάζει ως απάντηση σε ερεθίσματα που υπάρχουν στο περιβάλλον των ΛΜΚ. Δεν είναι γνωστό ακόμη αν οι φαινότυποι αυτοί των ΛΜΚ αντιστοιχούν σε πληθυσμούς των ΛΜΚ εκ των προτέρων καθορισμένους να εκφράζουν αυτές τις ιδιότητες ή ο ίδιος πληθυσμός κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες μπορεί να εκφράσει και διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Στόχος της μελέτης αυτής είναι η διερεύνηση της επίδρασης των μουσκαρινικών αγωνιστών (ακετυλοχολίνη & καρβαχόλη) στον φαινότυπο των ΛΜΚ. Η μελέτη έγινε σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Συγκεκριμένα εξετάζεται αν η καρβαχόλη και η ακετυλοχολίνη μεταβάλλουν τον φαινότυπο των ΛΜΚ.

Ο φαινότυπος των ΛΜΚ προσδιορίζεται με την μελέτη:

1. Της μορφολογίας των ΛΜΚ στις καλλιέργειες σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης
2. Της έκφρασης της α-ακτίνης των ΛΜΚ, της δεσμίνης και της MHC (myosin heavy chain - βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης) των ΛΜΚ με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.
3. Μέτρηση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνών α-ακτίνη, δεσμίνη και MHC των ΛΜΚ.
4. Μελέτη της έκφρασης των M₂ και M₃ μουςκαρινικών υποδοχέων με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT- PCR) και με τη μέθοδο της δέσμευσης της [N-methyl-³H]scopolamine ([³H]NMS) στις μεμβράνες των απομονωμένων ΛΜΚ αντίστοιχα.

Τα παραπάνω πειράματα έγιναν τις ημέρες 0, 3, 7 και 15 σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού, παρουσία ορού 10%, παρουσία καρβαχόλης (3×10^{-7} M) και ακετυλοχολίνης (10^{-5} M).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

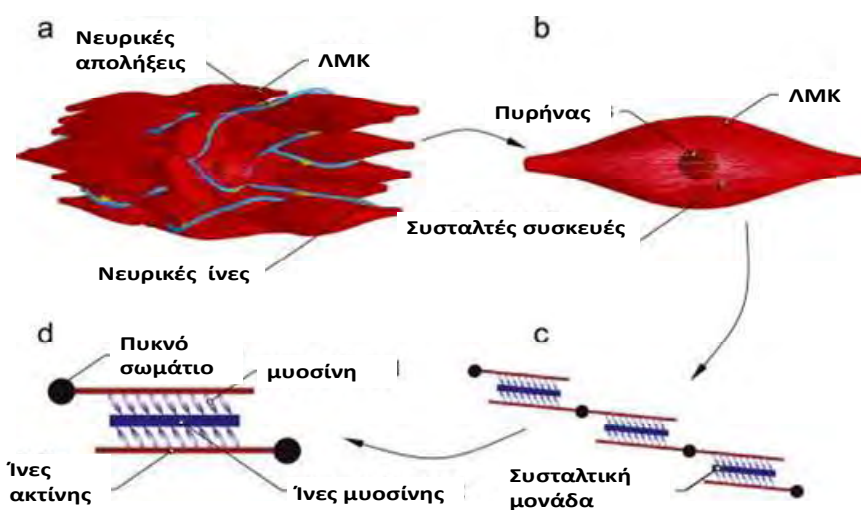
Λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ)

Ο λείος μυϊκός ιστός απαρτίζεται από λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) που επιστοιβάζονται με τη μορφή δεματίων ή επιμηκών δεσμίδων, ατρακτοειδών κυττάρων με λεπτά άκρα (λείες μυϊκές ίνες). Η διάμετρος των ΛΜΚ είναι 2-5 μm , το μήκος ποικίλλει από 20 έως 500 μm και έχουν ένα μόνο κεντρικό πυρήνα. Η σημαντικότερη δομή των ΛΜΚ είναι η συσταλτική τους συσκευή, η οποία αποτελείται από τα λεπτά (ακτίνης) και τα παχιά (μυοσίνης) νημάτια. Ο κυτταροσκελετός που σχηματίζεται από ακτίνη και ενδιάμεσα νημάτια δεσμίνης είναι εξίσου απαραίτητος για την λειτουργία των ΛΜΚ (εικόνα 1). Τα ΛΜΚ δεν εμφανίζουν κάθετη γράμμωση επειδή η διάταξη των νημάτων τους δεν είναι τόσο αυστηρά οργανωμένη όσο στα γραμμωτά μυϊκά κύτταρα.

Ο λείος μυϊκός ιστός απαντά στα τοιχώματα των αγγείων, των ουρητήρων, της ουροδόχου κύστης, στο αναπαραγωγικό σύστημα ανδρών και γυναικών, στο αναπνευστικό σύστημα – στους αεραγωγούς, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στα εξαρτήματα του δέρματος και στην ίριδα. Τα βασικά λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά των ΛΜΚ είναι ίδια, ενώ διαφέρουν ουσιαστικά ως προς τα ερεθίσματα που επηρεάζουν την συμπεριφορά τους, με σκοπό να εκτελέσουν ξεχωριστές αποστολές στον οργανισμό σε συγκεκριμένες στιγμές.

Εικόνα 1. Λεία Μυϊκά Κύτταρα

Πηγή: Schmitz και συν 2010, τροποποιημένη



Τα ΛΜΚ παρουσιάζουν αυτόματη ηλεκτρική και μηχανική δραστηριότητα που προκαλεί την σύσπασή τους. Η συστολή τους πραγματοποιείται ακούσια με ταχύτητα μικρότερη από αυτή των γραμμωτών μυϊκών κυττάρων. Τα ΛΜΚ έχουν την ικανότητα να παραμένουν σε συστολή για μακρύ χρονικό διάστημα, χωρίς να επέρχεται κάματος. Εκτός από την κύρια λειτουργία τους που είναι η συστολή, τα ΛΜΚ παρουσιάζουν και άλλες ικανότητες όπως τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την σύνθεση-έκκριση αυξητικών παραγόντων, συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει και ορμονών όπως η ακετυλοχολίνη. Τα ΛΜΚ έχουν την ικανότητά να διαιρούνται, με σκοπό τη διατήρηση ή και την αύξηση του αριθμού τους. Ο πολλαπλασιασμός μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως απάντηση σε βλάβη των ΛΜΚ, είτε στα πλαίσια της φυσιολογικής λειτουργίας τους. [1,2,3].

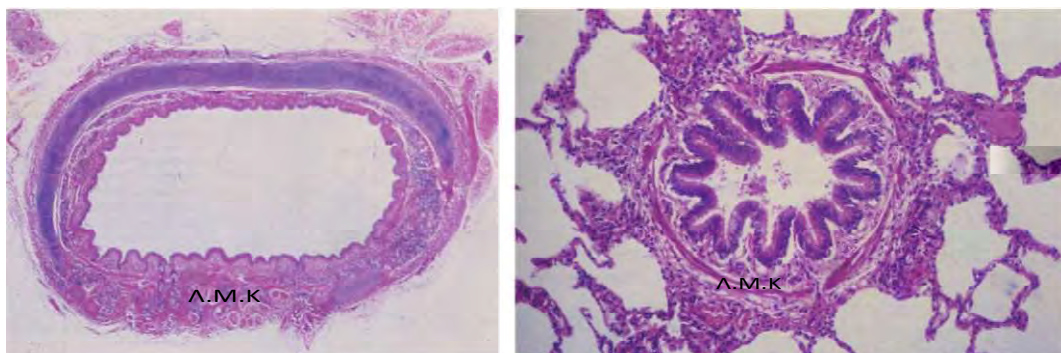
1. Λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών

1.1 Δομή των ΛΜΚ στους αεραγωγούς

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών ΛΜΚ περιγράφονται για πρώτη φορά από τον Reissessen [4]. Στο αναπνευστικό τα ΛΜΚ σχηματίζουν το μυϊκό χιτώνα του τοιχώματος των αεραγωγών (κεντρικών και περιφερικών), κάτω από το βλεννογόνο (εικόνα 2). Στο μυϊκό χιτώνα των βρόγχων τα ΛΜΚ οργανώνονται σε διασταυρούμενες δεσμίδες ελικοειδώς διατεταγμένων ΛΜΚ. Τα συναντάμε σε όλο το μήκος του βρογχικού δέντρου.

Εικόνα 2. Μυϊκός χιτώνας στην τραχεία και στους βρόγχους

Πηγή: Wheater PR και συν 1987



Τα τοιχώματα των τμημάτων της τραχείας και των βρόγχων, τα οποία δεν καταλαμβάνονται από χόνδρινα ημικρίκια και χόνδρους, αποτελούνται κατά κύριο λόγο από λείες μυϊκές ίνες. Επίσης τα τοιχώματα των βρογχιολίων αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από λείες μυϊκές ίνες, με εξαίρεση τα τελικά - αναπνευστικά βρογχιόλια, στο τοίχωμα των οποίων υπάρχουν λίγες μόνο λείες μυϊκές ίνες. Τα ΛΜΚ λόγω του ατρακτοειδούς σχήματος αποκαλούνται και λείες μυϊκές ίνες [5].

1.2 Λειτουργίες των ΛΜΚ των αεραγωγών

Τα ΛΜΚ με την σύσπαση και την χάλασή τους ελέγχουν το διαμέτρημα των αεροφόρων οδών κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων της αναπνοής. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο τόνος των ΛΜΚ ρυθμίζει τις διαστάσεις των αεροφόρων οδών, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται οι ελάχιστες δυνατές αντιστάσεις με τον ελάχιστο νεκρό χώρο. Η αύξηση του τόνου των ΛΜΚ σε παθολογικές καταστάσεις προκαλεί αύξηση των αντιστάσεων των αεροφόρων οδών και περιορισμό στην είσοδο του αέρα στους πνεύμονες. Αυτός είναι ο κλασικός ρόλος των ΛΜΚ στους αεραγωγούς [6].

Τα πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι τα ΛΜΚ των αεραγωγών είναι πολυδύναμα κύτταρα που αλληλεπιδρούν δυναμικά με το περιβάλλον τους, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες φλεγμονής και εμφανίζουν πολλές λειτουργίες. Τα ΛΜΚ των αεραγωγών κάτω από τον έλεγχο κυρίως των μουσκαρινικών υποδοχέων, εκτός από την συστολή τους, μπορούν να πολλαπλασιαστούν, να μεταναστεύσουν, να παράγουν χυμοκίνες, κυτταροκίνες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, αυξητικούς παράγοντες και ακετυλοχολίνη. Ο φαινότυπος των ΛΜΚ των αεραγωγών παρουσιάζει αξιοσημείωτη πλαστικότητα. Με αυτή την ιδιότητα, αντίθετα με τα καρδιακά και σκελετικά μυϊκά κύτταρα που είναι τελικά διαφοροποιημένα, τα ΛΜΚ των αεραγωγών μπορούν να υποστούν σημαντικές και αναστρέψιμες μεταβολές στο φαινότυπό τους, ως απάντηση σε αλλαγές και ερεθίσματα από το τοπικό περιβάλλον [7].

Οι μεταβολές στο φαινότυπο, οδηγούν τα ΛΜΚ των αεραγωγών να υιοθετήσουν με αναστρέψιμο τρόπο *συσταλτό ή συνθετικό-πολλαπλασιαστικό* φαινότυπο. Οι διαφορετικοί φαινότυποι αντικατοπτρίζουν και την διαφορετική λειτουργικότητά των ΛΜΚ των αεραγωγών, η οποία ελέγχεται από την διαφορά στην έκφραση συγκεκριμένων δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Επίσης διαφορά υπάρχει στον αριθμό και την λειτουργία των μουσκαρινικών υποδοχέων και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι ενεργά στους δύο φαινότυπους [8].

Στους αεραγωγούς των ενηλίκων τα ΛΜΚ εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, χαμηλή συνθετική δραστηριότητα και εκφράζουν ένα μοναδικό σύνολο συστατικών πρωτεϊνών, μουσκαρινικών υποδοχέων, διαύλων ιόντων και σηματοδοτικών μορίων, που απαιτούνται για την συστατική τους δραστηριότητα. Στις χρόνιες φλεγμονώδεις πνευμονοπάθειες όπως το βρογχικό άσθμα και την χρόνια βρογχίτιδα έχει παρατηρηθεί πως η συνεχής σύσπαση και αύξηση του τόνου των ΛΜΚ οδηγεί σε βρογχόσπασμο σε οξείες κρίσεις και σε υπερτροφία/υπερπλασία των ΛΜΚ μακροπρόθεσμα, με επακόλουθο αύξηση της μάζας των ΛΜΚ και την πάχυνση του μυϊκού χιτώνα των αεραγωγών προκαλώντας δυσχέρεια στην είσοδο του αέρα. Επομένως τα ΛΜΚ των αεραγωγών δεν προκαλούν μόνο βρογχόσπασμο αλλά συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση και στην ανάπτυξη και συντήρηση της φλεγμονής στους αεραγωγούς [9, 10].

2. Οι δράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος στα ΛΜΚ του αναπνευστικού

Ο κυρίαρχος ρυθμιστής του τόνου των ΛΜΚ στους αεραγωγούς είναι το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) και κυρίως το παρασυμπαθητικό. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο νευρογενής έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τα ΛΜΚ των αεραγωγών είναι πολύ σύνθετος. Έχουν αναγνωριστεί τρία νευρωνικά μονοπάτια του αυτόνομου νευρικού συστήματος που ρυθμίζουν τον τόνο των ΛΜΚ (πίνακας 1):

- Το **παρασυμπαθητικό** που προκαλεί σύσπαση των ΛΜΚ, κυρίως μετά από την ενεργοποίηση των M₃-μουσκαρινικών υποδοχέων από την ενδογενώς απελευθερούμενη ακετυλοχολίνη.
- Το **συμπαθητικό** που προκαλεί χάλαση των ΛΜΚ μετά από την ενεργοποίηση των β₂-αδρενεργικών υποδοχέων από την επινεφρίνη και
- Το **μη χολινεργικό μη αδρενεργικό σύστημα** (NANC non-adrenergic non-cholinergic) που παρουσιάζει δύο επιμέρους δίκτυα με αντίθετη λειτουργική αποστολή, το ανασταλτικό (iNANC) και το διεγερτικό (eNANC). Οι ίνες του ανασταλτικού NANC δικτύου μεταφέρονται μαζί με το πνευμονογαστρικό νεύρο, χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστές το VIP (vasoactive intestinal peptide) και/ή το NO (nitric oxide) και προκαλούν βρογχοδιαστολή. Οι διεγερτικές NANC ίνες, μετά την διέγερση των βρογχοπνευμονικών αισθητήριων νεύρων του πνευμονογαστρικού,

εκλύουν ταχυκινίνες (ουσία P, νευροκινίνη A) και προκαλούν σύσπαση των ΛΜΚ του αναπνευστικού [11].

Πίνακας 1. Οι δράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος στα ΛΜΚ αναπνευστικού

Σκέλος ΑΝΣ	Νευροδιαβιβαστής	Υποδοχέας	Επίδραση
Χολινεργικό	Ακετυλοχολίνη	Μουσκαρινικοί M ₃ υποδοχείς	Βρογχοσύσπαση
Αδρενεργικό	Νορεπινεφρίνη	α-αδρενεργικοί υποδοχείς	Βρογχοσύσπαση
	Επινεφρίνη	β-αδρενεργικοί υποδοχείς	Βρογχοχάλαση
Μη αδρενεργικό μη χολινεργικό	VIP, NO	Υποδοχέας VIP, Γουανυλική κυκλάση	Βρογχοχάλαση
	Ταχυκινίνες	Υποδοχέας NK	Βρογχοσύσπαση

Διαταραχές στην ισορροπία μεταξύ των νευρωνικών μονοπατιών στα ΛΜΚ των αεραγωγών μπορεί να οδηγήσουν σε δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις στους βρόγχους. Μια τέτοια διαταραχή εμφανίζεται για παράδειγμα σε χρόνιες αποφρακτικές πνευμονοπάθειες, όπως το άσθμα και τη χρόνια βρογχίτιδα και αποτελεί μια από τις αιτίες που οδηγεί σε στένωση των βρόγχων. Επίσης, οι διαταραχές που εμφανίζεται στη νευροδιαβίβαση στις νόσους αυτές του αναπνευστικού παίζουν ρόλο και στην εξέλιξη της φλεγμονής στους αεραγωγούς, καθώς μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και νευρικών ερεθισμάτων του ΑΝΣ στους αεραγωγούς. Κυτταροκίνες και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής επηρεάζουν την έκλυση νευροδιαβιβαστών επειδή ερεθίζουν τις αισθητικές ίνες που βρίσκονται κάτω από το επιθήλιο των αεραγωγών και ενεργοποιούν τοπικά και κεντρικά αντανακλαστικά. Αντίστροφα, νευρογενείς

μηχανισμοί μπορούν να αυξήσουν ή να περιορίσουν τη φλεγμονώδη απάντηση στους αεραγωγούς [12, 13].

2.1 Η επίδραση του παρασυμπαθητικού - χολινεργικού νευρικού συστήματος στα ΛΜΚ των αεραγωγών

Η διέγερση του χολινεργικού παρασυμπαθητικού συστήματος στους πνεύμονες είναι ο κατεξοχήν νευρικός βρογχοσυσπαστικός μηχανισμός των αεραγωγών στον άνθρωπο. Η ακετυλοχολίνη είναι ο νευροδιαβιβαστής όλων των συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών προγαγγλιακών ιών όπως και των μεταγαγγλιακών παρασυμπαθητικών νευρών. Από τα παρασυμπαθητικά γάγγλια στο τοίχωμα των αεραγωγών οι μεταγαγγλιακές χολινεργικές νευρικές ίνες καταλήγουν στα ΛΜΚ, στους υποβλεννογόνιους αδένες και τα αγγεία των βρόγχων. Στα γάγγλια, η ακετυλοχολίνη που απελευθερώνεται από τις προγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού δεσμεύεται σε νικοτινικούς υποδοχείς, ενώ στις μεταγαγγλιακές νευρομυϊκές συνάψεις δεσμεύεται σε μουσκαρινικούς υποδοχείς.

Η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τις παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες προκαλεί συστολή των ΛΜΚ, έκκριση βλέννης και αγγειοδιαστολή. Σε πειράματα σε ζώα έχει αποδειχθεί ότι ηλεκτρική διέγερση του πνευμονογαστρικού οδηγεί σε έκλυση ακετυλοχολίνης από τις τελικές απολήξεις των νευρών και σε ενεργοποίηση των μουσκαρινικών χολινεργικών υποδοχέων των ΛΜΚ και των υποβλεννογονίων αδένων. Εάν προηγηθεί χορήγηση του ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων ατροπίνη αποτρέπεται η βρογχοσύσπασση και η έκκριση βλέννης. Κατά τη διάρκεια φλεγμονής στους αεραγωγούς διάφοροι μηχανισμοί οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από το παρασυμπαθητικό. Επομένως στο άσθμα και στη ΧΑΠ ο αποκλεισμός μετασυναπτικών μουσκαρινικών υποδοχέων είναι το κλειδί για την αναστροφή της απόφραξης στους αεραγωγούς [14].

3. Υποδοχείς ακετυλοχολίνης

Διακρίνονται δύο τύποι υποδοχέων ακετυλοχολίνης, οι μουσκαρινικοί και οι νικοτινικοί υποδοχείς. Ο διαχωρισμός αυτός στηρίχθηκε στο γεγονός ότι η μουσκαρίνη και η νικοτίνη διεγείρουν τους δύο αυτούς υποδοχείς εκλεκτικά και ανεξάρτητα. Η ακετυλοχολίνη ενεργεί επάνω και στα δύο είδη υποδοχέων.

Διακρίνονται δύο υπότυποι (νευρικοί και μυϊκοί) νικοτινικών υποδοχέων και πέντε υπότυποι μουσκαρινικών υποδοχέων (M_1 - M_5). Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι χημειοεξαρτώμενοι ιοντικοί διάλυοι (ιοντοτροπικοί) ενώ οι μουσκαρινικοί ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (μεταβοτροπικοί).

3.1 Νικοτινικοί υποδοχείς

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης ανήκουν στην υπεροικογένεια των ιοντικών διαύλων ενεργοποιούμενων μέσω προσδέτη και αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που απαρτίζονται από πέντε ομόλογες υπομονάδες. Οι νικοτινικοί υποδοχείς χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τους νευρικούς και τους μυϊκούς. Οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, καθώς και σε μη νευρικά κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Οι μυϊκοί νικοτινικοί υποδοχείς (nAChRs - nicotinic achetylcholin receptors) απαντώνται στις μετασυναπτικές μεμβράνες των νευρομυϊκών συνάψεων. Οι μυϊκοί nAChRs είναι άμεσα υπεύθυνοι για τη διαβίβαση στη νευρομυϊκή σύναψη, ενώ οι νευρικοί συνήθως παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στις συναπτικές διαβιβάσεις των μηνυμάτων στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα [15].

Ο φυσιολογικός προσδέτης των νικοτινικών υποδοχέων είναι η ακετυλοχολίνη. Ενώ τα συστατικά του καπνού από το τσιγάρο, όπως η νικοτίνη και η ουσία NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone] αποτελούν υψηλής συγγένειας αγωνιστές. Η δέσμευση των παραπάνω ουσιών από τους νικοτινικούς υποδοχείς προκαλεί δομικές αλλαγές στους υποδοχείς που επιφέρουν την διάνοιξη των ιοντικών διαύλων [16].

Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει νικοτινικούς υποδοχείς νευρικού τύπου σε μη νευρωνικά κύτταρα εντός και εκτός του νευρικού συστήματος όπως στο επιθήλιο βρόγχων, στο ενδοθήλιο αγγείων, στα κερατινοκύτταρα του δέρματος και άλλα. Επίσης, σε πρόσφατες μελέτες έχει αναδειχθεί η ικανότητα των νικοτινικών υποδοχέων να επιταχύνουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, την καρκινική διήθηση και την αγγειογένεση και να προβάλλουν αντίσταση στην απόπτωση των κυττάρων. Με βάση αυτά τα δεδομένα οι nAChR καθίστανται υπολογίσιμοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια μελετάται η πιθανότητα να αποτελέσουν οι νικοτινικοί

υποδοχείς καινούργιο στόχο αντικαρκινικών θεραπειών, σε καρκίνους που προκαλούνται από τον καπνό του τσιγάρου [17].

3.1.1 Νικοτινικοί υποδοχείς στους αεραγωγούς

Στο αναπνευστικό έχουν ανιχνευτεί νικοτινικοί υποδοχείς νευρικού τύπου στα γάγγλια του ΑΝΣ (συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά) καθώς και σε δομικά και φλεγμονώδη κύτταρα στους αεραγωγούς όπως στα μακροφάγα, στα ηωσινόφιλα, στα ουδετερόφιλα, στα μαστοκύτταρα, στα λεμφοκύτταρα, στα ΛΜΚ, στα επιθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες. Ο ρόλος των νικοτινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ είναι άγνωστος. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι οι νικοτινικοί υποδοχείς σε αντίθεση με την προφλεγμονώδη δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη ρόλο σε διάφορους τύπους κυττάρων [18].

Οι νικοτινικοί αγωνιστές έχει αποδειχθεί ότι περιορίζουν την παραγωγή κυτταροκινών και παρεμποδίζουν την εξέλιξη της φλεγμονής. Η ακετυλοχολίνη, νευρωνικής ή μη νευρωνικής προέλευσης, μπορεί μέσω των $\alpha 7$ νικοτινικών υποδοχέων να επάγει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα σε μοντέλα οξείας φλεγμονής. Η αντιφλεγμονώδης δράση της ακετυλοχολίνης στους αεραγωγούς ρυθμίζεται από τους $\alpha 7$ νικοτινικούς υποδοχείς στα μακροφάγα [19].

3.2 Μουσκαρινικοί υποδοχείς

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς διακρίνονται σε 5 υποομάδες M_1, M_2, M_3, M_4 και M_5 . Κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια και εκφράζονται σε διαφορετικά όργανα και σε διαφορετικές περιοχές του νευρικού συστήματος [20].

Οι G πρωτεΐνες, με τις οποίες συνδέονται οι μουσκαρινικοί υποδοχείς αποτελούνται από τρεις διαφορετικές υποομάδες α, β, γ που συνδέονται με μόρια GTP και γεφυρώνουν τους υποδοχείς με μόρια όπως την αδενυλκυκλάση, τη φωσφολιπάση C και ιοντικούς διαύλους. Όταν η ακετυλοχολίνη προσδέεται στους υποδοχείς, στην υπομονάδα α αποσυνδέεται το μόριο της GDP και συνδέεται η GTP. Αυτή η ενέργεια προκαλεί τον αποχωρισμό της α μονάδας από την $\beta\gamma$ -μονάδα, οι οποίες στη συνέχεια ρυθμίζουν την δραστηριότητα διαφόρων μορίων. Η μονάδα α υδρολύει το μόριο GTP σε GDP. Η υδρόλυση επιφέρει επανασύνδεση των μονάδων α και $\beta\gamma$ τερματίζοντας και την δράση της ακετυλοχολίνης.

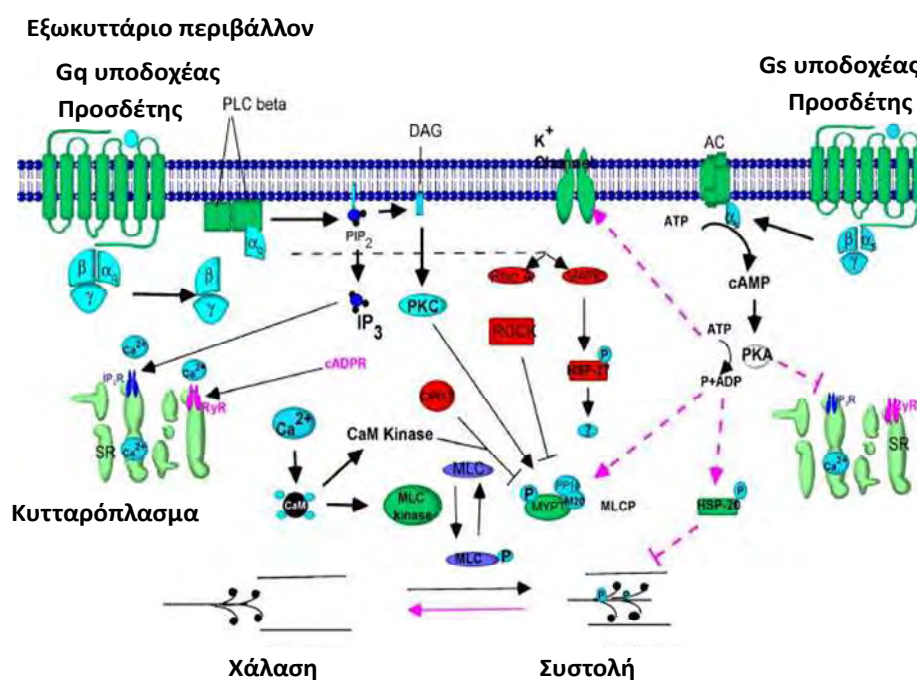
- Οι M_1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε εξωκρινείς αδένες. Ο M_1 υποδοχέας συνδέεται με την G_q πρωτεΐνη, η α -

μονάδα της οποίας ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (PLC). Η ενεργοποίηση της PLC δραστηριοποιεί δύο ενδοκυττάριους αγγελιοφόρους: την τριφωσφορική ινositόλη που προκαλεί την απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυττάρια αποθήκες και την διακυλογλυκερόλη που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C. Ωστόσο σε ορισμένους ιστούς μπορεί να βρεθεί συνδεδεμένος με την Gs (stimulatory -διεγερτική) ή Gi (inhibitory-ανασταλτική) πρωτεΐνη, οι οποίες τροποποιούν τα επίπεδα του cAMP (εικόνα 3).

- Οι M_2 υποδοχείς συνδέονται με την Gi πρωτεΐνη, η οποία έχει αντίθετη δράση με την Gs πρωτεΐνη και μειώνει τα επίπεδα του cAMP στα κύτταρα.
- Οι M_3 εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος αλλά κυρίως σε λείους μυς και αδένες και συνδέονται με Gq πρωτεΐνη.
- Οι M_4 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συνδέονται με Gi πρωτεΐνη.
- Η ακριβής θέση των M_5 υποδοχέων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Φαίνεται ότι έχουν παρόμοια λειτουργία με τους M_3 και M_1 μουσκαρινικούς υποδοχείς [21, 22].

Εικόνα 3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες.

Πηγή: Deprak και συν, 2006.



3.2.1 Μουσκαρινικοί υποδοχείς στους αεραγωγούς.

Στις αεροφόρους οδούς οι μουσκαρινικοί υποδοχείς εκφράζονται από νευρωνικά και μη κύτταρα. Στα μη νευρωνικά κύτταρα ανήκουν τα κύτταρα της φλεγμονής και τα δομικά κύτταρα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα αναπνευστικά λεία μυϊκά κύτταρα, τα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Οι υποομάδες των μουσκαρινικών υποδοχέων και η λειτουργία τους σε δομικά και φλεγμονώδη κύτταρα στο αναπνευστικό

Πηγή: Meurs και συν 2012

Τύπος κυττάρου	Τύπος μουσκαρινικού υποδοχέα	Λειτουργικός ρόλος
ΛΜΚ	M ₃	Συστολή, πολλαπλασιασμός, διευκολύνει την απελευθέρωση κυτταροκινών
	M ₂	Λειτουργικός ανταγωνιστής β-αγωνιστών.
Ινοβλάστες	M ₂	Πολλαπλασιασμός, παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας
Χολινεργικά νεύρα	M ₁	Διευκολύνει την μεταβίβαση στα γάγγλια
	M ₂	Προσυναπτική αναστολή έκκρισης ακετυλοχολίνης
Επιθηλιακά κύτταρα	M _{1,3}	Διευκολύνει την απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοτακτικού παράγοντα.
Βλεννώδη κύτταρα	M ₃	Παραγωγή βλέννης
Αδενοειδή κύτταρα	M _{1/3}	Έκκριση νερού και ηλεκτρολυτών
Μακροφάγα	M ₃	Έκκριση χημειοτακτικού παράγοντα

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των ΛΜΚ των αεραγωγών. Σε αυτούς τους υποδοχείς συνδέονται οι μουσκαρινικοί αγωνιστές ακετυλοχολίνη, καρβαχόλη και μεταχολίνη. Αποτελούν στόχο της αντιχολινεργικής θεραπείας στις αποφρακτικές παθήσεις του αναπνευστικού, όπως άσθμα και ΧΑΠ [23].

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς που ανιχνεύονται κατά μήκος του βρογχικού δέντρου είναι οι M_1 , M_2 και M_3 [24, 25] (πίνακας 2).

Οι M_1 μουσκαρινικοί υποδοχείς εκφράζονται στα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα και στα παρασυμπαθητικά γάγγλια (εικόνα 4). Στα επιθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν την μεταφορά νερού και ηλεκτρολυτών, ενώ στα γάγγλια διευκολύνουν την παρασυμπαθητική νευροδιαβίβαση.

Οι M_2 μουσκαρινικοί υποδοχείς εντοπίζονται τόσο στις προγαγγλιακές όσο και στις μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού όπου λειτουργούν ως ανασταλτικοί αυτοϋποδοχείς, μέσω των οποίων η ακετυλοχολίνη αναστέλλει την έκλυσή της. Στο αλλεργικό άσθμα οι M_2 υποδοχείς έχει παρατηρηθεί ότι δυσλειτουργούν και αδυνατούν να ανταποκριθούν στη δράση της ακετυλοχολίνης, επειδή καταλαμβάνονται από ένα πρωτεϊνικό μόριο που παράγεται από τα ηωσινόφιλα και ανταγωνίζεται τη δράση της ακετυλοχολίνης. Η παρουσία της ακετυλοχολίνης σε αυξημένη ποσότητα πολλαπλασιάζει τις δράσεις της στα νευρωνικά και μη κύτταρα στους αεραγωγούς και επιτείνουν την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος τους

Οι M_2 υποδοχείς εκφράζονται και από αναπνευστικά μεσεγχοματικά κύτταρα στα οποία υπάγονται τα ΛΜΚ και οι ινοβλάστες. Μελέτες έχουν δείξει ότι στα ΛΜΚ επηρεάζουν την ανταποκρισιμότητα τους σε συμπαθητικούς διεγέρτες καθώς ελαττώνουν τον σχηματισμό του cAMP [26].

Επίσης στα ΛΜΚ και τους ινοβλάστες (όπου κυριαρχούν οι M_2 υποδοχείς), φαίνεται ότι οι M_2 ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP κινασών, τα οποία οδηγούν σε πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνεται ότι οι M_2 υποδοχείς εμπλέκονται και στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών [27,28].

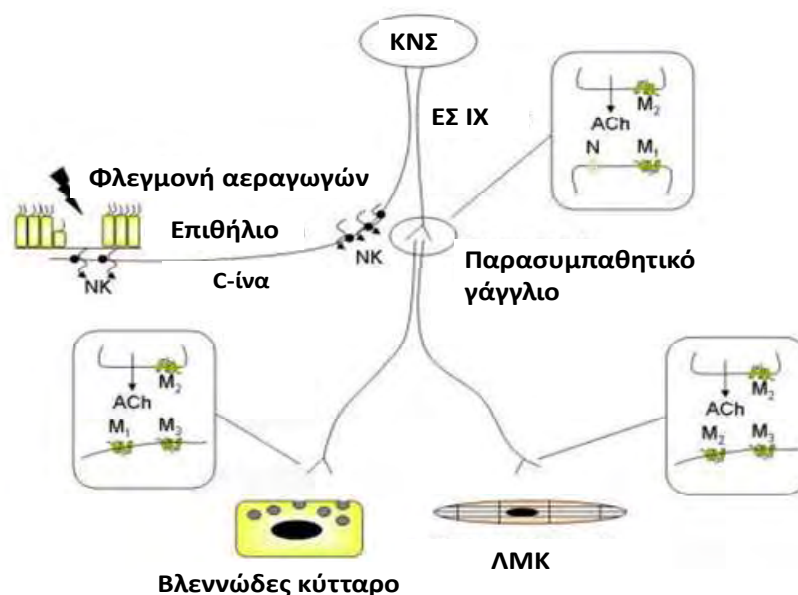
Οι M_3 υποδοχείς είναι οι κύριοι υποδοχείς που ρυθμίζουν την παραγωγή βλέννης από τους υποβλεννογόNIους αδένες και την συσταλτικότητα των ΛΜΚ στους αεραγωγούς. Η διέγερσή τους από αγωνιστές προκαλεί σύσπαση των ΛΜΚ και πολλαπλασιασμό ιδιαίτερα σε συνθήκες φλεγμονής συμβάλλοντας στην ανάπτυξη

της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος στους αεραγωγούς. Ακόμα, οι M₃ υποδοχείς ανιχνεύονται στο ενδοθήλιο των αγγείων της βρογχικής κυκλοφορίας και πιθανότατα ευθύνονται για την αγγειοδιασταλτική χολινεργική δράση που παρατηρείται στους περιφερικούς αεραγωγούς. Για το λόγο αυτό οι M₃ υποδοχείς αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο της αντιχολινεργικής θεραπείας σε αποφρακτικές πνευμονοπάθειες [29].

M₄ μουσκαρινικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευτεί μόνο σε ΛΜΚ βρογχιολίων κουνελιού και η λειτουργία τους δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί [30]

Εικόνα 4. Δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων σε φλεγμονή στους αεραγωγούς

Πηγή: Gosens και συν 2006, τροποποιημένη



4. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ

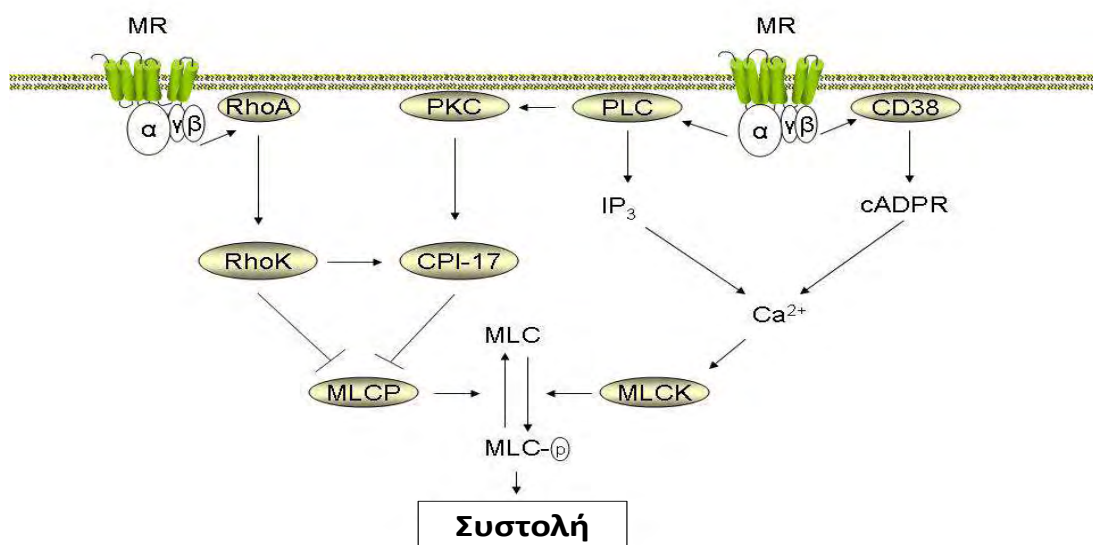
4.1 Συστολή των ΛΜΚ μετά από διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών εκφράζουν κυρίως M₂ υποδοχείς που συνδέονται με G_i πρωτεΐνη και M₃ υποδοχείς που συνδέονται με G_q πρωτεΐνη. Το 80% των μουσκαρινικών υποδοχέων είναι M₂ υποδοχείς, αλλά οι M₃ υποδοχείς φαίνεται να είναι αυτοί που διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στις λειτουργίες των ΛΜΚ. Η συστολή των ΛΜΚ μέσω της διέγερσης των μουσκαρινικών υποδοχέων ρυθμίζεται

από Ca^{2+} εξαρτώμενα και μη Ca^{2+} εξαρτώμενα μονοπάτια [25, 31] (εικόνα 5). Η διέγερση των G_q - M_3 μουςκαρινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ αεραγωγών ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C, η οποία υδρολύει την διφωσφορική 4,5 φωσφατιδινοσιτόλη (PIP_2) σε τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη (InsP_3) και 1,2-διακυλογλυκερόλη (DAG). Η InsP_3 οδηγεί σε απελευθέρωση του Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου, ενώ η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Το Ca^{2+} και η PKC συμβάλλουν στην ρύθμιση της συστολής των ΛΜΚ των αεραγωγών. Οι M_3 υποδοχείς συνδέονται επίσης στον παράγοντα CD38, με άγνωστο μηχανισμό, ο οποίος συμβάλλει στην παραγωγή της κυκλικής ADP ριβόζης (cyclic ADP ribose). Η cADPR προκαλεί απελευθέρωση Ca^{2+} αλληλεπιδρώντας με υποδοχείς ρυανοδίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ελεύθερα κυτταροπλασματικά ιόντα Ca^{2+} συνδέονται με την καλμοδουλίνη και μαζί ενεργοποιούν την κινάση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK). Η MLCK-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC) στη συσταλτή συσκευή είναι απαραίτητο γεγονός για την επίτευξη συστολής των ΛΜΚ.

Εικόνα 5. Κεντρικά σηματοδοτικά μονοπάτια για την συστολή των ΛΜΚ των αεραγωγών μέσω των μουςκαρινικών υποδοχέων

Πηγή: Gosens και συν 2006



Τα μη Ca^{2+} εξαρτώμενα μονοπάτια περιλαμβάνουν τα μονοπάτια που αναστέλλουν την δράση της MLCP και προκαλούν συστολή των ΛΜΚ σε σταθερές τιμές Ca^{2+} . Η φωσφορυλίωση της MLC ελέγχεται και από μονοπάτια που αναστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης της MLC (MLCP). Η διακυλογλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CPI-17 που αναστέλλει τη δράση της MLCP. Ο CPI-17 φωσφορυλιώνεται επίσης και από την Rho-κινάση, που ενεργοποιείται από το μόριο RhoA. Η έκφραση και η λειτουργία των μορίων RhoA, CPI-17 και CD38 αυξάνει από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες *in vitro* και σε πειραματικά μοντέλα άσθματος και ΧΑΠ *ex vivo*.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συστολή των ΛΜΚ μπορεί να είναι αποτέλεσμα συγχρονισμένης ενεργοποίησης των M_2 και M_3 υποδοχέων. Οι M_2 υποδοχείς έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν συστολή στα ΛΜΚ, αναστέλλοντας την βρογχοδιασταλτική δράση των β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων μέσω ελάττωσης του ενδοκυττάριου cAMP. Επίσης, ένα άλλο μονοπάτι που χρησιμοποιούν οι M_2 υποδοχείς για να επιτευχθεί συστολή των ΛΜΚ, είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού των RhoA/Rho κινάσεων [24, 32, 33].

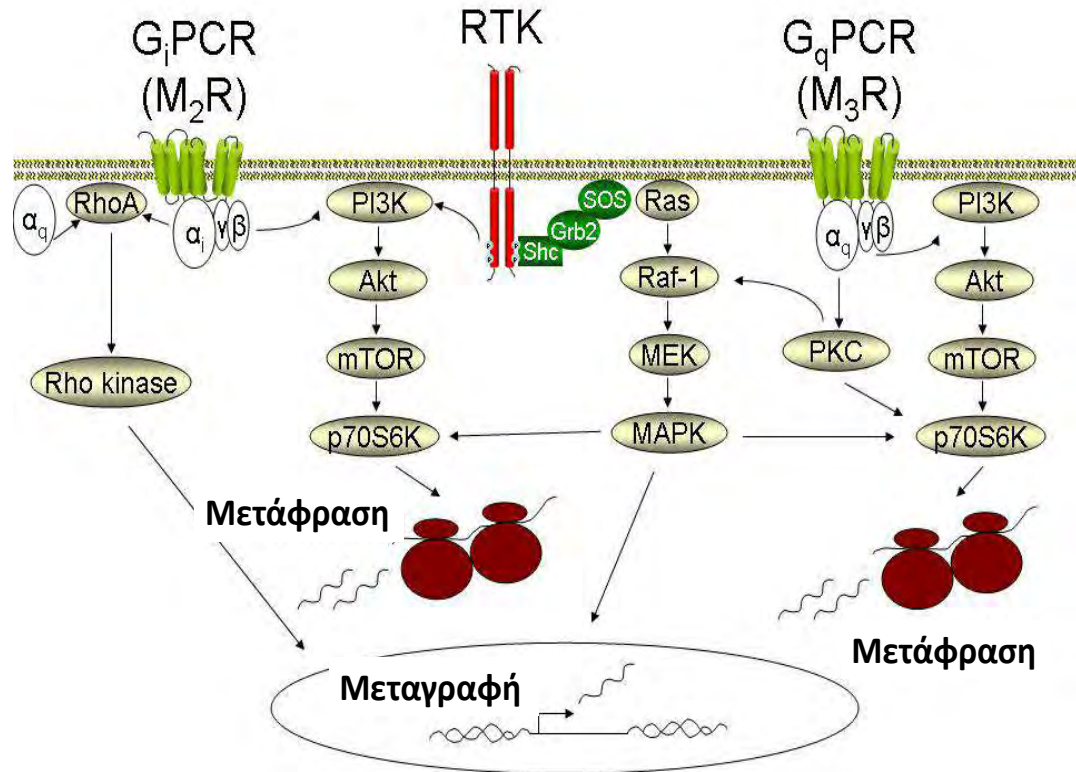
4.2 Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ μετά από διέγερση των μουςκαρινικών υποδοχέων

Η διέγερση των μουςκαρινικών υποδοχέων από μόνη της φαίνεται πως δεν είναι αρκετή να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Έχει διαπιστωθεί όμως ότι αγωνιστές των μουςκαρινικών υποδοχέων παρουσιάζουν προ-μιτογόνες δράσεις ενισχύοντας την μιτογόνο δράση των αυξητικών παραγόντων (PDGF, EGF) επί των ΛΜΚ ανθρώπου και βοός. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται και εκπληρώνουν τις προμιτογόνες δράσεις που προκύπτουν από την διέγερση των μουςκαρινικών υποδοχέων δεν έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Παρόλα αυτά έχουν ταυτοποιηθεί μερικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την συνεργική μιτογόνο αλληλεπίδραση των αγωνιστών των μουςκαρινικών υποδοχέων με τους αυξητικούς παράγοντες (εικόνα 6) [34, 35].

Οι μουςκαρινικοί υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην δραστηριοποίηση της κινάσης p42/p44 MAP κινάσης, της Rho κινάσης και της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) (εικόνα 6). Αυτά τα μονοπάτια αποτελούν τα βασικά μονοπάτια που επάγουν

Εικόνα 6. Σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων μέσω G συνδεδεμένων υποδοχέων

Πηγή: Gosens και συν 2006



και ρυθμίζουν την αντιγραφή/μεταγραφή του DNA και την είσοδο των ΛΜΚ στον κυτταρικό κύκλο.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K έχει ιδιαίτερη σημασία στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Η PI3K μέσω των ενδιάμεσων μορίων Akt και mTOR, ενεργοποιεί το μόριο p70S6K, που συμβάλλει στη διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσώματα. Η p42/p44 MAP κινάση που ενεργοποιείται από την επίδραση των παραγόντων Ras, Raf και MEK ενεργοποιεί αφενός το p70S6K και αφετέρου παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή παραγόντων μεταγραφής που καθορίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Τέλος η Rho κινάση ενεργοποιεί παράγοντες μεταγραφής που παίζουν κεντρικό ρόλο στην μεταγραφή γονιδίων ειδικών των ΛΜΚ και οδηγούν στην συσσώρευση συσταλών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την συστολή στα ΛΜΚ [24, 36, 37, 38].

5. Μουσκαρινικοί Αγωνιστές

Οι υποδοχείς γενικά ενεργοποιούνται τόσο από τους ενδογενείς νευροδιαβιβαστές, όσο και από συγγενικές συνθετικές εξωγενείς ουσίες που αποκαλούνται αγωνιστές. Οι κυριότεροι μουσκαρινικοί αγωνιστές που συνδέονται στους μουσκαρινικούς υποδοχείς είναι η ακετυλοχολίνη, που αποτελεί τον ενδογενή χολινεργικό νευροδιαβιβαστή και η καρβαχόλη που παράγεται συνθετικά.

5.1 Ακετυλοχολίνη

Η ακετυλοχολίνη είναι η μοναδική ενδογενής ουσία που λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής του παρασυμπαθητικού.

Η ακετυλοχολίνη συντίθεται από τη χολίνη και το ακετυλο-συνένζυμο Α υπό την επίδραση του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση (ακετυλάση ChAT) (εικόνα 7). Η σύνθεσή της στους αεραγωγούς πραγματοποιείται τόσο στους χολινεργικούς νευρώνες όσο και σε μη νευρωνικά κύτταρα, τα οποία έχει παρατηρηθεί ότι εκφράζουν την ChAT και απελευθερώνουν ακετυλοχολίνη. Η ακετυλοχολίνη που συντίθεται τοπικά από μη νευρωνικά κύτταρα λειτουργεί ως παρακρινής/αυτοκρινής ορμόνη για παρακείμενα δομικά ή φλεγμονώδη κύτταρα αεραγωγών. Μη νευρωνικά κύτταρα που εκκρίνουν ακετυλοχολίνη στους αεραγωγούς είναι τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, οι ινοβλάστες και τα ΛΜΚ. Η άμεση απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από αυτά τα κύτταρα δεν έχει αποδειχθεί άμεσα [39].

Εικόνα 7. Σύνθεση της ακετυλοχολίνης



Στις νευρικές απολήξεις, η παραγόμενη ακετυλοχολίνη αποθηκεύεται σε κυστίδια απ'όπου απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή. Στα μη νευρωνικά κύτταρα η ακετυλοχολίνη βρίσκεται σε διάχυτη μορφή. Μετά τη σύνδεσή της με

χολινεργικούς υποδοχείς (μουςκαρινικούς ή/και νικοτινικούς) σε νευρωνικά και μη κύτταρα, η ελεύθερη ακετυλοχολίνη υδρολύεται ταχύτατα από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Το σημαντικό αυτό ένζυμο βρίσκεται στα χολινεργικά νεύρα, στα γάγγλια του ΑΝΣ, στις νευρομυϊκές συνάψεις (κινητικές πλάκες) του σωματικού νευρικού συστήματος και στα ερυθροκύτταρα [40].

5.2 Καρβαχόλη

Η καρβαχόλη (καρβαμοϋλοχολίνη) είναι εστέρας της χολίνης και παράγεται συνθετικά. Ως παρασυμπαθομιμητικό φάρμακο έχει χολινεργική (μουςκαρινική και νικοτινική) δράση, όμοια με αυτή της ακετυλοχολίνης. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο προαναφερόμενων μουςκαρινικών αγωνιστών είναι η ικανότητα της καρβαχόλης να προκαλεί αντιδράσεις εκατό φορές περίπου ισχυρότερες και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την ακετυλοχολίνη, επειδή δεν υδρολύεται από τις χολινεστεράσες.

Και οι δύο μουςκαρινικοί αγωνιστές έχουν την ίδια συγγένεια με όλους τους τύπους των μουςκαρινικών και νικοτινικών υποδοχέων. Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως η ακετυλοχολίνη και η καρβαχόλη συμπεριφέρονται διαφορετικά κυρίως ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που πυροδοτούνται μετά την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς [41].

6. Η συμπεριφορά των ΛΜΚ των αεραγωγών στην αναδιαμόρφωση

Σε πολλές πρόσφατες μελέτες αποδεικνύεται πλέον ότι τα ΛΜΚ των αεραγωγών μπορεί να μετατραπούν από «παθητικά» συσταλτά ΛΜΚ σε «ενεργά» πολυλειτουργικά κύτταρα που διαμορφώνουν την εξέλιξη της φλεγμονής και κατ' επέκταση την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών σε χρόνιες πνευμονοπάθειες [42].

6.1 Η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών

Σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος όπως στο άσθμα και στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) παρατηρείται *αναδιαμόρφωση (remodeling)* του τοιχώματος στους αεραγωγούς. Η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος στους αεραγωγούς αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο που προκαλεί δομικές αλλαγές στους αεραγωγούς, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Στην αναδιαμόρφωση οφείλεται η παραμονή της απόφραξης των αεραγωγών σε ασθενείς που πάσχουν από

άσθμα και (ΧΑΠ), η οποία παρατηρείται ακόμα και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, μήνες μετά από την πλήρη υποχώρηση των συμπτωμάτων. Οι μεταβολές που συμβαίνουν στους αεραγωγούς κατά την αναδιαμόρφωση μικραίνουν το εύρος των αεραγωγών και κατά συνέπεια ελαττώνεται η ποσότητα του αέρα που εισέρχεται στους πνεύμονες (εικόνα 8). Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών γιατί η διαδικασία της φλεγμονής και η λειτουργική έκπτωση των αεραγωγών δεν μπορούν πλέον να εξηγήσουν όλες τις παθοφυσιολογικές αλλαγές σε αυτές τις παθήσεις [43, 44].

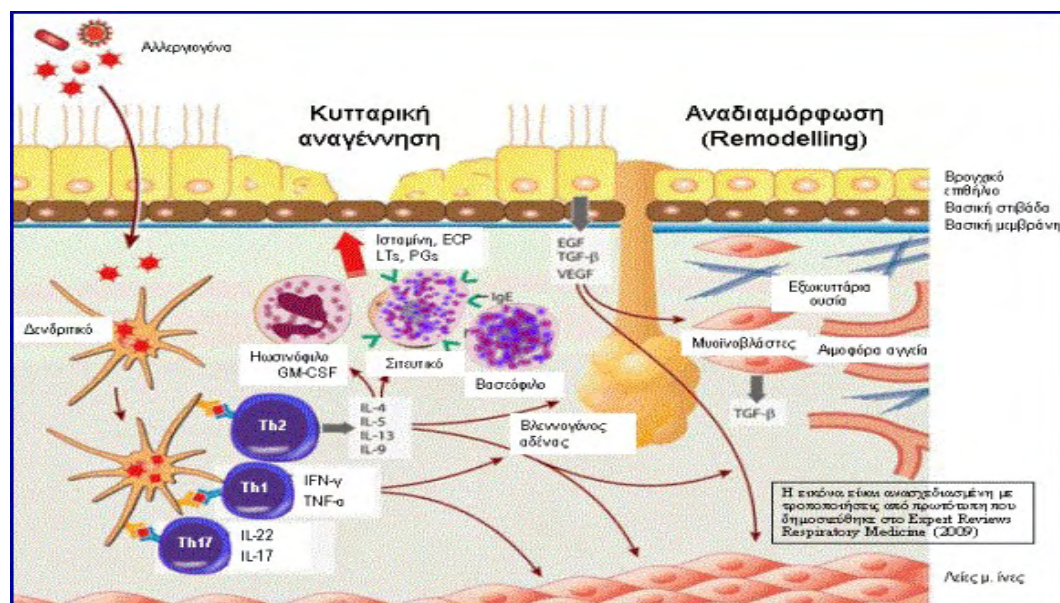
Στη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος στους αεραγωγούς συμμετέχουν δύο παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί: Η *ανάπλαση*, η οποία είναι η διαδικασία αντικατάστασης των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη από παρεγχυματικά κύτταρα του ίδιου τύπου και η *αντικατάσταση των ιστών από συνδετικό ιστό* που εν συνεχεία ωριμάζει σε ουλώδη ιστό. Σε αρκετές περιπτώσεις οι δύο αυτές διαδικασίες συμβάλλουν στην εμμόνη της φλεγμονής παρά την εφαρμοζόμενη θεραπευτική αγωγή [45].

Η φύση της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών διαφέρει στις δύο παραπάνω παθήσεις, επειδή στην παθοφυσιολογία τους εμπλέκονται διαφορετικά κύτταρα. Στη ΧΑΠ επικρατούν τα CD8+ λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, ενώ στο άσθμα τα ηωσινόφιλα και τα CD4+ λεμφοκύτταρα. Όλα τα παραπάνω κύτταρα είναι πηγή αυξητικών παραγόντων, πρωτεασών, κυτταροκινών και χυμοκινών, που προκαλούν δομικές αλλαγές στους αεραγωγούς [46].

Οι δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στη ΧΑΠ περιλαμβάνουν: καταστροφή πνευμονικού παρεγχύματος (εμφύσημα), ίνωση, μεταπλασία επιθηλίου, υπερτροφία βλεννοδών αδένων και αύξηση της μάζας των ΛΜΚ στους αεραγωγούς και στα αγγεία. Στο άσθμα επέρχεται υπερτροφία και υπερπλασία ΛΜΚ, πάχυνση και ίνωση της υπο-επιθηλιακής βασικής μεμβράνης, υπερτροφία βρογχικών αδένων με υπερέκκριση βλέννης, υπερπλασία καλυκοειδών κυττάρων, αύξηση της εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας και αλλαγή της σύστασής της, αύξηση του αριθμού των αγγείων (αγγειογένεση) και πάχυνση-μεταπλασία επιθηλίου αεραγωγών. Σε αντίθεση με τη ΧΑΠ στο άσθμα παρόλο που παρατηρείται πάχυνση της βασικής μεμβράνης και εύθραυστο επιθήλιο, δεν αναπτύσσεται εμφύσημα. Η αύξηση της μάζας των ΛΜΚ στο άσθμα παρατηρείται στους μεγάλους αεραγωγούς, ενώ στη ΧΑΠ στους μικρούς αεραγωγούς [47].

Εικόνα 8. Η παθοφυσιολογία της αναδιαμόρφωσης στο τοίχωμα των αεραγωγών

Πηγή: Busse και συν 2009, τροποποιημένη.



6.2 Μεταβολές στο φαινότυπο των ΛΜΚ κατά την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών

Μία από τις σημαντικότερες παθολογικές δομικές αλλαγές που συμβαίνει κατά την διαδικασία της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος στους αεραγωγούς είναι η υπερπλασία/υπερτροφία των ΛΜΚ των αεραγωγών, η οποία οδηγεί σε αύξηση της μάζας του μυϊκού χιτώνα στους αεραγωγούς, με πολλές λειτουργικές επιπτώσεις. Οι κυριότερες επιπτώσεις είναι η ελάττωση της διαμέτρου των αεραγωγών, η αύξηση των αντιστάσεων των αεραγωγών, η υπεραντιδραστικότητα, η πρόκληση βρογχόσπασμου και η χρόνια απόφραξη των αεραγωγών [48].

Τα ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση δεν ευθύνονται μόνο για την απόφραξη των αεραγωγών, αλλά έχει βρεθεί επίσης ότι αλληλεπιδρούν με δυναμικό τρόπο με το περιβάλλον τους, ιδιαίτερα σε συνθήκες φλεγμονής, υφίστανται μεταβολές στο φαινότυπο και συμβάλλουν στην ανάπτυξη και συντήρηση της φλεγμονής στους αεραγωγούς. Κατά την αναδιαμόρφωση τα ΛΜΚ των αεραγωγών, εκτός από την κύρια λειτουργική τους ιδιότητα την συστολή, μπορούν να πολλαπλασιάζονται, να συνθέτουν και να εκκρίνουν ουσίες. Η λίστα των ουσιών που συντίθενται και εκκρίνονται από τα ΛΜΚ των αεραγωγών περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες (PDGF-BB, IGF, CTGF, TGFbeta, VEGF), πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο, λαμινίνη, perlecan), κυτταροκίνες Th1 και Th2 κυττάρων (GM-CSF, IL-1 beta, IL-13), πεπτίδια (βραδυκίνη) και διάφορες χυμοκίνες (eotaxin, IL-6, IL-

8). Τα επίπεδα των προαναφερόμενων μεσολαβητών είναι υψηλότερα σε ΛΜΚ αεραγωγών από ασθενείς με άσθμα σε σύγκριση με αυτά από φυσιολογικά άτομα [49].

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών αποκτούν τις προαναφερόμενες ιδιότητες μετατρέποντας τον φαινότυπό τους από συσταλτό σε συνθετικό/πολλαπλασιαστικό. Η αλλαγή του φαινοτύπου των ΛΜΚ επάγεται από πολλούς παράγοντες που προέρχονται από το μικροπεριβάλλον όπως οι αυξητικοί παράγοντες (π.χ PDGF, TGFβ, ινσουλίνη, FBS κ.α), οι μεσολαβητές της φλεγμονής (π.χ βραδυκινίνη, λευκοτριένια, ισταμίνη), τα συστατικά εξωκυττάρια ουσίας (laminin) και μουσκαρινικοί αγωνιστές (π.χ ακετυλοχολίνη) [50]. Αυτοί οι παράγοντες ασκούν δράση ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια. Προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των μονοπατιών είναι η πρόσδεση του παράγοντα σε συγκεκριμένους υποδοχείς που βρίσκονται συνήθως στην κυτταρική μεμβράνη. Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές - ακετυλοχολίνη- αλληλεπιδρούν με μουσκαρινικούς υποδοχείς που ανιχνεύονται στη κυτταρική μεμβράνη των ΛΜΚ. Η ακετυλοχολίνη κάτω από συνθήκες φλεγμονής ενισχύει την σύσπαση των ΛΜΚ. Ο ακριβής ρόλος της αυξημένης χολινεργικής δραστηριότητας στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και των ΛΜΚ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς [51]. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η εναλλαγή του φαινοτύπου των ΛΜΚ των αεραγωγών κατά την διάρκεια της αναδιαμόρφωσης στο άσθμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Δεδομένα από μελέτες υποστηρίζουν ότι στο άσθμα συμβαίνει μετατροπή του φαινοτύπου σε συνθετικό [52]. Το ερώτημα, εάν υπάρχουν στους αεραγωγούς ΛΜΚ που προορίζονται να μετατραπούν σε ασθματικά ΛΜΚ ή αν τα ΛΜΚ στο άσθμα είναι φυσιολογικά κύτταρα που μετατρέπονται σε ασθματικά λόγω των συνθηκών του ασθματικού περιβάλλοντος, παραμένει ακόμα αναπάντητο και απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

7. Πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών

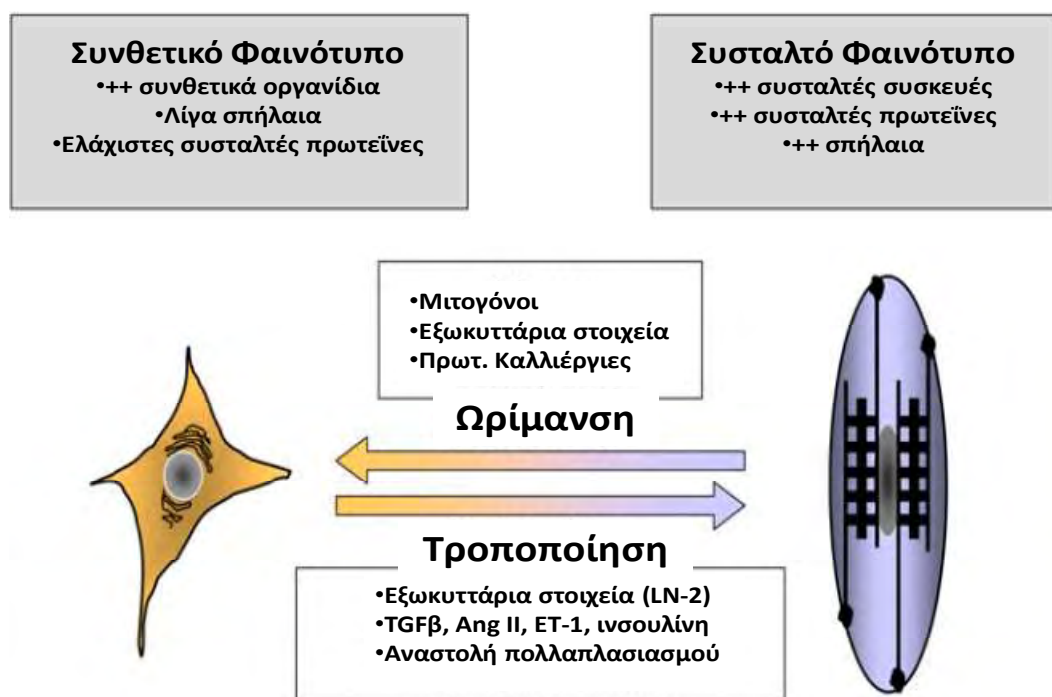
In vivo και *in vitro* έχουν αναγνωρισθεί τρεις τύποι φαινοτύπων ΛΜΚ, στους οποίους μεταπίπτουν με αναστρέψιμο τρόπο τα διαφοροποιημένα ΛΜΚ: ο συσταλτός, ο συνθετικός και ο υπερσυσταλτός φαινότυπος. Η μετάπτωση από τον ένα φαινότυπο στον άλλο επέρχεται μετά από αλλαγές στην έκφραση ειδικών γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για τον φαινότυπο, και αλλαγές στη σύνθεση πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά. Η μετάπτωση από τον συνθετικό στο συσταλτό φαινότυπο και αντίστροφα είναι αναστρέψιμη και ρυθμίζεται από

πολλαπλά εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Η ικανότητα των ΛΜΚ να αλλάζουν τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά υπό την επίδραση εσωτερικών ή/και εξωτερικών παραγόντων οφείλεται σε μία ιδιότητά τους που αποκαλείται πλαστικότητα φαινοτύπου. Η πλαστικότητα του φαινοτύπου προσφέρει σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ των αεραγωγών την ικανότητα, να αλλάξουν τις λειτουργικές τους ιδιότητες και να αποκτήσουν μία ή και περισσότερες λειτουργίες όπως η σύσπαση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών.. Η θεωρία της πλαστικότητας των ΛΜΚ είναι πλέον ευρέως αποδεκτή [53, 54, 55].

Η διαδικασία μετατροπής των ΛΜΚ από συσταλτό σε συνθετικό φαινότυπο ονομάζεται *τροποποίηση (modulation)*, ενώ η αντίστροφη διαδικασία ονομάζεται *ωρίμανση (maturation)* (εικόνα 9). Τροποποίηση των ΛΜΚ προκαλούν μιτογόνες ουσίες (πχ PDGF, EGF, ο ορός και η φιβρονεκτίνη) ενώ ωρίμανση προκαλούν συσπαστικοί παράγοντες όπως TGF-β, η ινσουλίνη και η λαμινίνη ή η στέρηση ορού στο υλικό της καλλιέργειας. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας της *τροποποίησης* είναι ΛΜΚ με συνθετικό φαινότυπο, ενώ της *ωρίμανσης* είναι ΛΜΚ με συσταλτό φαινότυπο [56].

Εικόνα 9. Η πλαστικότητα του φαινοτύπου των ΛΜΚ αναπνευστικού

Πηγή: Halayko και συν 2008, τροποποιημένη.



Η διάκριση μεταξύ των φαινοτύπων των υγιών ή παθολογικών ΛΜΚ καθορίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων κυτταροπλασματικών δεικτών που είναι πρωτεϊνικά μόρια και μεμβρανικοί υποδοχείς χαρακτηριστικοί για κάθε φαινότυπο [57].

7.1 Ιδιότητες φαινοτύπου ΛΜΚ

Τα ΛΜΚ με συσταλτό φαινότυπο χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση συσταλτών πρωτεϊνών, χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών κυτταροσκελετού και απαντούν στα σπασμογόνα ενώ είναι μιτωτικά σιωπηλά (πίνακας 3). Στο κυτταρόπλασμα των ΛΜΚ με συσταλτό φαινότυπο ανευρίσκονται επίσης πολλές μονάδες συστολής. Οι δείκτες του συσταλτού φαινοτύπου είναι πρωτεϊνικά μόρια και περιλαμβάνουν: την α- & γ-ακτίνη (sm α-actin & sm γ-actin) των ΛΜΚ, την βαριά αλυσίδα της μυοσίνης των ΛΜΚ (sm MHC), την δεσμίνη, την καλπονίνη, h-caldesmon, SM-22 και smoothelin [58] (πίνακας 3).

Εκτός από τους προαναφερόμενους πρωτεϊνικούς δείκτες, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης των ΛΜΚ έχει διαπιστωθεί σε πολλές μελέτες αύξηση του αριθμού των εγκοιλώσεων (caveolae) και των πρωτεϊνικών τους μορίων caveolin-1 και caveolin -2 [59]. Όσο αφορά τους μουςκαρινικούς υποδοχείς μελέτες έδειξαν ότι ο αριθμός των M₃ μουςκαρινικών υποδοχέων αυξάνει σε συνθήκες στέρησης ορού οπότε τα ΛΜΚ αποκτούν συσταλτό φαινότυπο, ενώ μειώνεται όταν τα ΛΜΚ αποκτούν λιγότερο συσταλτό φαινότυπο [60].

Τα ΛΜΚ αποκτούν συνθετικό φαινότυπο και διεγείρονται να πολλαπλασιαστούν υπό την επίδραση θρεπτικού ορού ή μιτογόνων αυξητικών παραγόντων. Στο κυτταρόπλασμα των ΛΜΚ με συνθετικό φαινότυπο συσσωρεύονται οργανίδια για την σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων και πολλά μιτοχόνδρια. Οι συσταλτές μονάδες και οι συσταλτικές πρωτεΐνες είναι ελάχιστες. Τα ΛΜΚ με συνθετικό φαινότυπο δεν απαντούν σε σπασμογόνα ερεθίσματα. Χαρακτηριστικοί μοριακοί δείκτες για το συνθετικό φαινότυπο είναι η L-caldesmon, vimentin, a/b PKC και CD44 [61, 62].

Πίνακας 3. Φαινοτυπική ετερογένεια των ΛΜΚ

Πηγή: Hirst και συν 2000

	«Συσταλτό»	«Συνθετικό»	«(Υπερ)συσταλτό»
Ρυθμός πολλαπλασιασμού	Αργός	Γρήγορος	Αργός
Μυοϊνίδια	Παρόν	Μειωμένα	Παρόν
Συσκευή Golgi/RER	Παρούσα	Αυξημένη	Παρούσα
Μηχανική VO/Vmax)	++	+/-	+++
α-ακτίνη	++	+/-	+++
MHC	++	+/-	+++
Nm-ισομορφές ακτίνης (β/γ)	+/-	+++	++
Nm-MHC	+/-	+++	MA
Βιμεντίνη	+	+++	MA
MLCK	++	+/-	++++
h-caldesmon	++	+/-	MA
l-caldesmon	+/-	++	MA
Calponin	++	+/-	MA
Δεσμίνη	++	+/-	MA
PKC (β1/β2)	+/-	+++	MA
CD44	+/-	+++	MA

7.2 Μηχανισμοί της πλαστικότητας του φαινοτύπου

Από τα αποτελέσματα των μελετών που διαθέτουμε έως τώρα, φαίνεται ότι η μετάπτωση του φαινοτύπου των ΛΜΚ από την μία κατάσταση στην άλλη εξαρτάται από το περιβάλλον του. Για να επιτευχθεί η μετάπτωση του φαινοτύπου οι εξωτερικοί

παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες, αγωνιστές συστολής και στοιχεία εξωκυττάριας ουσίας (ουσίες εξωκυττάριας ουσίας και φλεγμονώδη μεσολαβητές) πρέπει να συνεργαστούν και να ρυθμίσουν πληθώρα ενδοκυττάριας σηματοδοτικών μονοπατιών. Απόρροια της πυροδότησης των σηματοδοτικών μονοπατιών είναι η ενεργοποίηση ή η αναστολή της μεταγραφής των ειδικών για τον φαινότυπο γονιδίων και της μετάφρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια.

Από τους παράγοντες που επηρεάζουν τον φαινότυπο έχει παρατηρηθεί ότι η στέρηση ορού, ο TGF- β , η ινσουλίνη και η λαμινίνη προάγουν τον συσταλτό φαινότυπο, ενώ ο PDGF, ο ορός (FBS, fetal bovine serum) και η φιμπροεκτίνη προάγουν τον συνθετικό φαινότυπο. Τα ερεθίσματα ενεργοποιούν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν είτε στην τροποποίηση των ΛΜΚ, είτε στην ωρίμανσή τους [63-66].

7.2.1 Μηχανισμοί που οδηγούν στην ωρίμανση των ΛΜΚ

Η ωρίμανση των ΛΜΚ ρυθμίζεται από τον συντονισμένο έλεγχο της μεταγραφής και μετάφρασης των ειδικών γονιδίων των ΛΜΚ (smooth muscle specific genes) από συγκεκριμένα μονοπάτια. Ειδικά γονίδια των ΛΜΚ που κωδικοποιούν τους δείκτες του συσταλτού φαινοτύπου είναι τα γονίδια για τις πρωτεΐνες smMHC, SM22, calponin και α -ακτίνη [67]. Η μεταγραφή των ειδικών γονιδίων των ΛΜΚ ελέγχεται κυρίως από τον παράγοντα SRF (serum response factor) και τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές του myocardin (Mcdn) και MAL/MKL1 (megakaryocytic acute leukemia/megakaryoblastic leukemia) (εικόνα 10). Οι 5' εκκινήτες των γονιδίων αυτών έχουν τουλάχιστον 2 αλληλουχίες [CC(A/T)GG], η κάθε μια από τις οποίες συνδέεται με διμερή του SRF. Στον πυρήνα, ο SRF συνδέεται με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές Mcdn και MAL/MKL1, οι οποίοι κατευθύνουν τον SRF στους εκκινήτες των ειδικών για τα ΛΜΚ γονίδια [68]. Η είσοδος του SRF στον πυρήνα ελέγχεται από το μονοπάτι Rho/Rho κινασών, οι οποίες αυξάνουν την συγκέντρωση των ινών ακτίνης στο κυτταρόπλασμα. Κατά το πολυμερισμό της ακτίνης υπό την επίδραση του μονοπατιού Rho/Rho κινασών, καταναλώνονται μόρια g-ακτίνης και απελευθερώνεται η δεσμευτική πρωτεΐνη της g-ακτίνης, που αποτελεί τον συνενεργοποιητή μεταγραφικό παράγοντα MAL. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η λειτουργία του κεντρικού ρυθμιστή της μεταγραφής των ειδικών γονιδίων των ΛΜΚ,

που είναι ο παράγοντας SRF, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μονοπατιού των Rho/Rho κινασών [69].

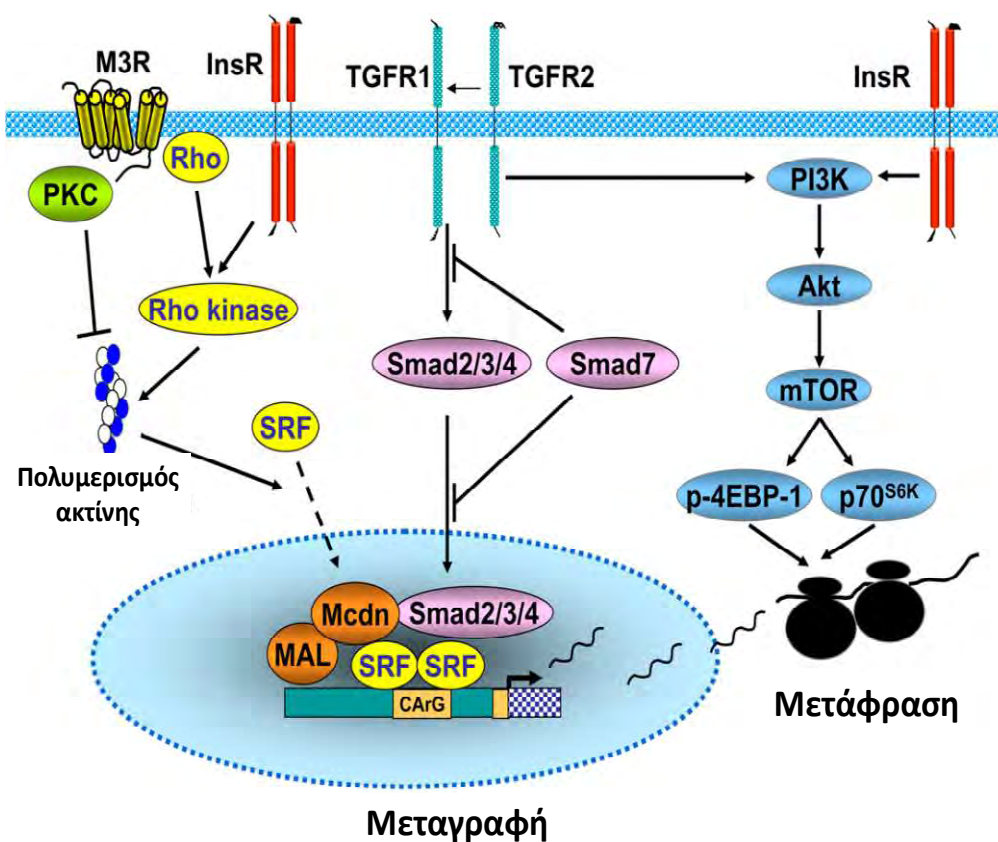
Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των Rho/Rho κινασών μέσω των υποδοχέων κινάσες τυροσίνης (RTK) και υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G (GPCR) συμβαίνει μετά την δράση RhoGEFs Rho-specific guanine exchange factors. Για παράδειγμα οι μουσκαρινικοί υποδοχείς M_3 που συνδέονται με την πρωτεΐνη Gq επάγουν την RhoA μέσω RhoGEFs και προωθούν τον Rho εξαρτώμενο πολυμερισμό της ακτίνης. Αντίθετα η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) ανταγωνίζεται το μονοπάτι των Rho/Rho κινασών επειδή προκαλεί αποπολυμερισμό των ινών ακτίνης και αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα SRF. Συνοπτικά φαίνεται ότι η επίδραση του μονοπατιού Rho/Rho κινασών και της PKC στον παράγοντα SRF ελέγχει την έκφραση του φαινότυπου των ΛΜΚ των αεραγωγών [70].

Ένα άλλο μονοπάτι που ελέγχει την λειτουργία του SRF είναι το μονοπάτι των ρυθμιστικών παραγόντων Smad. Το μονοπάτι των Smad ενεργοποιείται από τον αυξητικό παράγοντα TGF- β , ο οποίος αποτελεί επαγωγέα υπερτροφικού και υπερσυσταλού φαινοτύπου. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad από τον παράγοντα TGF- β προκαλεί την αλληλεπίδραση των ρυθμιστικών Smad -2, -3 και -4 με τον παράγοντα SRF και την αύξηση της μεταγραφής των ειδικών των ΛΜΚ γονιδίων, Ο αναστολέας των Smad, Smad-7, καταστέλλει την δράση των ρυθμιστικών Smad στον παράγοντα SRF [71].

Η μετάφραση των προϊόντων της μεταγραφής των γονιδίων ειδικών των ΛΜΚ απαιτεί την ενεργοποίηση μονοπατιών που εξαρτώνται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K (phosphatidyl inositide 3-kinase). Επίσης το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του ανασταλτικού μεταγραφικού παράγοντα Foxo4 με τον πυρηνικό παράγοντα SRF και κατά συνέπεια επηρεάζει και την μεταγραφή [72].

Εικόνα 10. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων ειδικών για τον φαινότυπο των ΛΜΚ.

Πηγή: Halayko και συν 2008



Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την μεταγραφή και μετάφραση των ειδικών γονιδίων των ΛΜΚ ελέγχονται από εξωκυττάριους παράγοντες όπως ακετυλοχολίνη, παράγοντας TGF-β, ινσουλίνη και αυξητικοί παράγοντες όπως PDGF. Τα σημαντικότερα μονοπάτια που έχουν συσχετιστεί με τον έλεγχο της μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων ειδικών των ΛΜΚ είναι τα μονοπάτια των Rho/Rho κινάσων και PI3K.

7.2.2 Μηχανισμοί που οδηγούν στην τροποποίηση των ΛΜΚ

Σε σύγκριση με την διαδικασία ωρίμανσης του φαινοτύπου των ΛΜΚ, για την διαδικασία μετατροπής σε συνθετικό φαινότυπο δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα. Οι μιτογόνοι παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης [receptor tyrosine kinase RTK, όπως ο PDGF], υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (όπως η θρομβίνη) ή γλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (όπως οι κυτταροκίνες που επάγουν την σηματοδότηση μέσω γλυκοπρωτεϊνικών συμπλόκων) και επάγουν

τον συνθετικό φαινότυπο στα ΛΜΚ. Το μόριο p21 Ras (εικόνα 11) φαίνεται να αποτελεί ένα κομβικό σημείο στα μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται. Τα μονοπάτια PI3K και ERK (p38^{MAPK}) που είναι επακόλουθα της ενεργοποίησης του παράγοντα P21 Ras είναι παράλληλα και αποτελούν τα βασικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την μίτωση των ΛΜΚ και την σύνθεση του DNA [73].

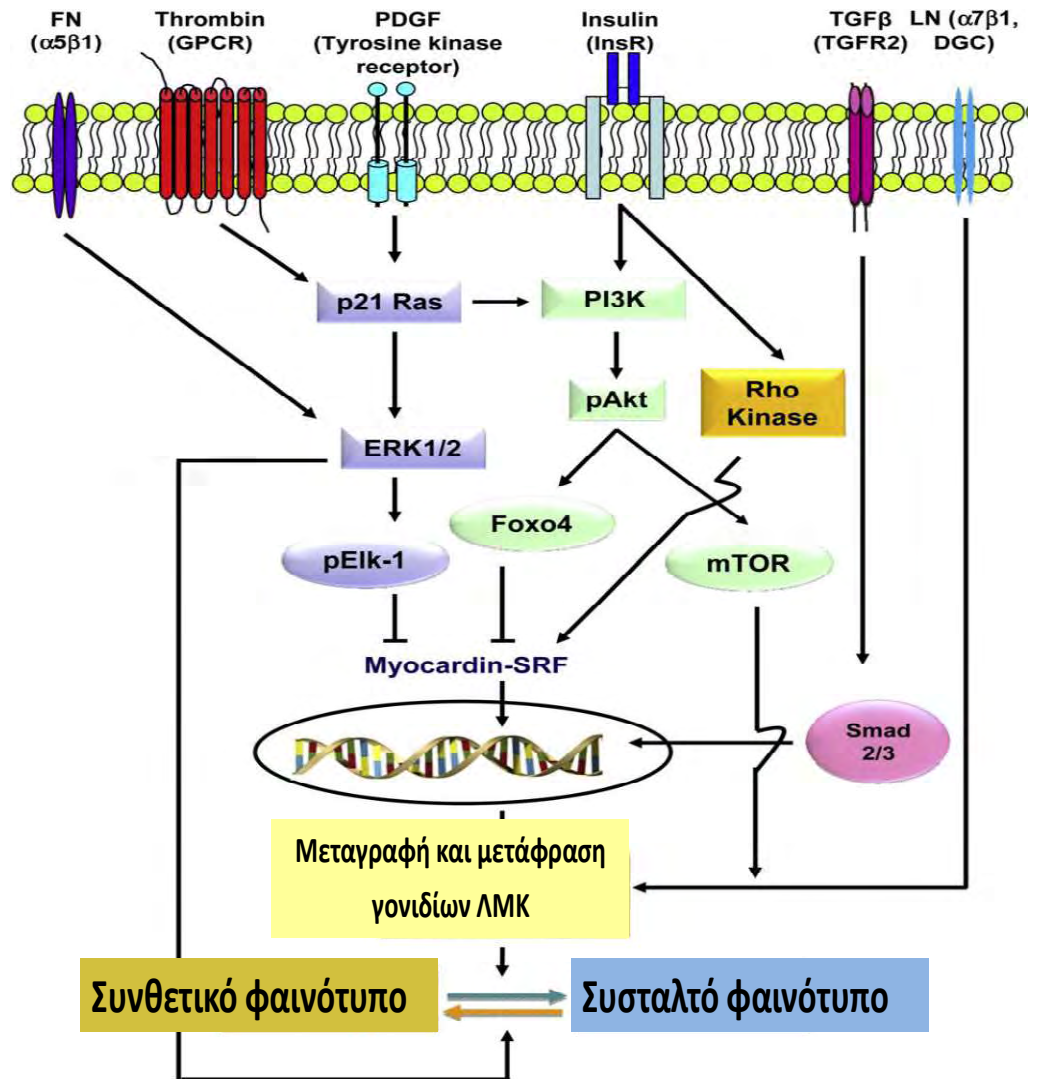
Παραδόξως η ενεργοποίηση του γονιδίου c-fos που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, απαιτεί την σύνδεση του παράγοντα SRF σε περιοχές CArG των εκκινητών του c-fos. Η ικανότητα του παράγοντα SRF να ενεργοποιήσει την μεταγραφή γονιδίων που συμβάλουν στην ανάπτυξη και των δύο φαινοτύπων, εξηγείται από την ύπαρξη πολλών μεταγραφικών συνενεργοποιητών που συνδέονται με τον SRF και προσδιορίζουν τα γονίδια που θα μεταγραφούν. Έτσι όταν συνδέεται με το myocardin ο SRF επάγει την μεταγραφή γονιδίων ειδικών για τον συσταλτό φαινότυπο. Αντιθέτως όταν συνδέεται με παράγοντες της ομάδας TCF (ternary complex factors) όπως οι φωσφο-Elk-1, ο SRF επάγει την μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως ο c-fos [74].

Ο παράγοντας Elk-1 φωσφορυλιώνεται από την p42/p44 MAP (mitogen activated protein) κινάση. Από αυτό προκύπτει ότι η ρύθμιση της p42/P44 MAP κινάσης παίζει σπουδαίο ρόλο στον προσδιορισμό του φαινότυπου των ΛΜΚ. Η τροποποίηση των ΛΜΚ παρεμποδίζεται από αναστολείς του μονοπατιού της p42/P44 MAP κινάσης [75]. Επίσης πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η caveolin-1 επηρεάζει την ενεργοποίηση της p42/P44 MAP κινάσης σε ΛΜΚ ανθρώπου [76].

Ένας άλλος εναλλακτικός μηχανισμός που οδηγεί τα ΛΜΚ να αποκτήσουν συνθετικό φαινότυπο είναι η διαταραχή της ισορροπίας μορίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως οι πρωτεΐνες C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins). Η πρωτεΐνη C/EBP είναι σημαντική για την καταστολή της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού. Ο Roth και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα φυσιολογικά ΛΜΚ, ενώ απουσιάζει σε ΛΜΚ αεραγωγών ασθενών με άσθμα ευνοώντας την αύξηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών [77].

Εικόνα 11. Ρύθμιση της πλαστικότητας του φαινότυπου από εξωτερικούς παράγοντες

Πηγή: Hirota και συν 2009



Εκτός όμως από τα παραπάνω μονοπάτια, οι ελεύθερες ρίζες και τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας μπορούν να οδηγήσουν τα ΛΜΚ σε πολλαπλασιασμό, όπως για παράδειγμα η Rac1, που αποτελεί μέρος του συμπλέγματος των NADPH οξειδασών και προκαλεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών όπως το H₂O₂. Οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν την μεταγραφή της κυκλίνης D1 αλλά και την δράση των JAK2 και STAT3, τα οποία απαιτούνται για την έκφραση της κυκλίνης D1. Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας φαίνεται ότι ενισχύουν την δράση των αυξητικών παραγόντων [78, 79].

8. Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο των ΛΜΚ

Στα αναπνευστικά ΛΜΚ φαίνεται από μελέτες πως οι αγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων επηρεάζουν τον φαινότυπό τους. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς, συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G, πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την έκφραση πρωτεϊνών υπεύθυνων για τις λειτουργίες των αναπνευστικών ΛΜΚ: συστολή, σύνθεση, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Επειδή ο μουσκαρινικός αγωνιστής ακετυλοχολίνη διεγείρει τους M_2 και M_3 μουσκαρινικούς υποδοχείς και η απελευθέρωσή της σε φλεγμονή των αεραγωγών είναι αυξημένη, θεωρείται ότι μπορεί να παίζει σημαντικό παθοφυσιολογικό ρόλο στον φαινότυπο των ΛΜΚ και στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών σε φλεγμονώδεις αποφρακτικές πνευμονοπάθειες. Η επιβεβαίωση αυτών των υποθέσεων απαιτεί περισσότερη έρευνα [80].

Οι επιδράσεις της ακετυλοχολίνης στα αναπνευστικά ΛΜΚ είναι πολύπλοκες καθώς οι μουσκαρινικοί υποδοχείς μπορεί να ενισχύσουν ή να εξασθενίσουν την ικανότητά των ΛΜΚ να συσπώνται, να συνθέσουν μοριακούς δείκτες χαρακτηριστικούς του φαινοτύπου ή/και να πολλαπλασιάζονται. Η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων από την ακετυλοχολίνη πυροδοτεί το μονοπάτι των RhoA/Rho κινάσης. Η δραστηριοποίηση της Rho κινάσης εκτός από την σύσπαση που προκαλεί στα ΛΜΚ, κατευθύνει και τον παράγοντα SRF στον πυρήνα, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων ειδικών για τα ΛΜΚ στους αεραγωγούς [81].

Η καρβαχόλη αναφέρεται ότι αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης MHC και SM22 στα ΛΜΚ τραχείας σκύλου μέσω των M_3 μουσκαρινικών υποδοχέων, που ενεργοποιούν το μονοπάτι RhoA/Rho κινάσης. Η χολινεργική διέγερση της PKC από την άλλη φαίνεται ότι μετριάζει την έκφραση της SM22 και MHC από τα ίδια ΛΜΚ υπό την επίδραση της καρβαχόλης [82].

Σε μία έρευνα των Gosens και συν η παρατεταμένη έκθεση (8 ημέρες) ΛΜΚ τραχείας βοός σε υψηλή συγκέντρωση μεταχολίνης οδήγησε σε μείωση της συσπαστικότητας των ΛΜΚ και της έκφρασης συσταλτών πρωτεϊνών (ακτίνη, μυοσίνη). Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα ΛΜΚ αποδείχθηκε ότι επιτελούνται μέσω M_3 υποδοχέων, εξαρτώνται μερικώς από τα μονοπάτια των p42/p44 MAP κινασών και PI3- κινάσης ενώ δεν εξαρτώνται από την πρωτεΐνη PKC. Σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στον φαινότυπο παρόμοια με την μετάπτωση που

προκαλείται από την δράση αυξητικών παραγόντων, επειδή δεν αυξήθηκε η ικανότητα των ΛΜΚ να πολλαπλασιαστούν. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η μεταβολή της ικανότητας σύσπασης των ΛΜΚ ή σύνθεσης συσταλών πρωτεϊνών από τα ΛΜΚ δεν πρέπει να ερμηνεύεται και ως αλλαγή “switching” φαινοτύπου. Ο μηχανισμός που ευθύνεται για την μείωση της συσπαστικότητας είναι πιθανώς η παρατεταμένη αύξηση ενδοκυττάρου Ca^{2+} , που είναι γνωστό ότι επιδρά αρνητικά στην σύσπαση ΛΜΚ [83].

Ο Gosens και οι συνάδελφοί του επίσης παρατήρησαν ότι η συσπαστικότητα των ΛΜΚ τραχείας από ινδικά χοιρίδια που βομβαρδίστηκαν με αλλεργιογόνα, αυξήθηκε. Ενώ όταν χρησιμοποίησαν τιotropio, ένα μακράς διάρκειας δράσης ανταγωνιστή μουσκαρινικών υποδοχέων, που χορηγείται σε ασθενείς με ΧΑΠ και άσθμα, η ικανότητα των ΛΜΚ να συστέλλονται και να συνθέτουν συσταλές πρωτεΐνες μειώθηκε. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν για πρώτη φορά ότι η ενδογενής ακετυλοχολίνη μπορεί να συμβάλλει στην επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών που προκαλείται από αλλεργιογόνα *in vivo* [84].

Από την άλλη πλευρά η διέγερση των M_2 και M_3 μουσκαρινικών υποδοχέων που είναι συνδεδεμένοι αντίστοιχα με G_i και G_q πρωτεΐνες πυροδοτεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP και PI3 κινασών. Με την παρέμβαση αυτών των μονοπατιών η ενεργοποίηση των υποδοχέων από μουσκαρινικούς αγωνιστές μπορεί να προκαλέσει μίτωση στα ΛΜΚ. Παρόλα αυτά μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί ότι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές προκαλούν μίτωση στα ΛΜΚ μόνο σε συνδυασμό με αυξητικούς παράγοντες και η δράση αυτή εξασκείται μέσω M_3 υποδοχέων. Η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων από μουσκαρινικούς αγωνιστές δεν είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι δεν μπορούν να προκαλέσουν παρατεταμένη διέγερση της p42/p44 MAP κινάσης, η οποία απαιτείται για να οδηγήσει τα κύτταρα σε πολλαπλασιασμό. Έχει βρεθεί όμως ότι οι διεγερμένοι μουσκαρινικοί υποδοχείς αλληλεπιδρούν με μονοπάτια ενεργοποιημένα από αυξητικούς παράγοντες και προκαλούν συνεργική μιτογένεση στα ΛΜΚ αεραγωγών βοός και ανθρώπου [35, 85].

Συμπερασματικά η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων από μουσκαρινικούς αγωνιστές πυροδοτεί σηματοδοτικά μονοπάτια εξαρτώμενα από RhoA/Rho-kinase, PI3-kinase και MAP-kinase. Έτσι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές μέσω των συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών συμβάλλουν και επηρεάζουν τις λειτουργίες των ΛΜΚ κατά την επαναδιαμόρφωση, όπως την σύσπαση, την

έκφραση συσταλών πρωτεϊνών, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την συνθετική τους δραστηριότητα

Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διαλευκάνουν τον μηχανισμό με τον οποίο οι μουσκαρινικοί υποδοχείς και οι αγωνιστές τους συμβάλουν στην επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών και επηρεάζουν την συσπαστικότητα ή/και προκαλούν αύξηση της μάζας των ΛΜΚ. Για αυτό το λόγο, για να κατανοήσουμε και διαλευκάνουμε αυτούς τους μηχανισμούς, μελετήσαμε τη δράση μουσκαρινικών αγωνιστών, ακετυλοχολίνη και καρβαχόλη σε λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων ανθρώπου.

9. Χολινεργική διαβίβαση και μουσκαρινικοί υποδοχείς σε παθήσεις του αναπνευστικού (ΧΑΠ-άσθμα)

Σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος (ΧΑΠ-άσθμα), οι οποίες χαρακτηρίζονται από φλεγμονή, έχει βρεθεί ότι τόσο ο αριθμός και η λειτουργία των μουσκαρινικών υποδοχέων όσο και η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από νευρωνικά και μη κύτταρα μπορεί να αλλάξουν. Σε καταστάσεις φλεγμονής στους αεραγωγούς η νευρωνική και μη νευρωνική απελευθέρωση ακετυλοχολίνης είναι αυξημένη. Επίσης η έκφραση και η λειτουργία των μουσκαρινικών υποδοχέων σε αναπνευστικές παθήσεις άσθμα και ΧΑΠ μεταβάλλεται. Έχει ταυτοποιηθεί ότι οι M_2 υποδοχείς γίνονται δυσλειτουργικοί ενώ οι M_3 αυξάνουν σε αριθμό. Αυτές οι αλλαγές διευκολύνουν την δράση της ακετυλοχολίνης και συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία των αποφρακτικών αναπνευστικών παθήσεων [80, 86, 87].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφονται οι μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων.

Πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, με 10% ορό εμβρύου βοός (10% FBS), $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνη (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλη (CCh) για 3-15 ημέρες. Αρχικά παρατηρήθηκε η αλλαγή στον φαινότυπο των ΛΜΚ υπό την επίδραση των υπό μελέτη συνθηκών με ανάστροφο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών που εκφράζονται στον συσταλτό φαινότυπο, α-ακτίνη, δεσμίνη και βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (MHC) από τα κύτταρα. Τέλος, η έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων M_2 εξετάστηκε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) και η έκφραση των M_3 υποδοχέων εξετάστηκε με τη μέθοδο της δέσμευσης [*N*-methyl- 3H]scopolamine ($[^3H]NMS$) στις μεμβράνες των απομονωμένων ΛΜΚ.

1. Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων βρόγχων ανθρώπου

Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (cc-2576, Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα $75cm^2$, μαζί με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επώαστηκαν στους $37^\circ C$ παρουσία 5% CO_2 . Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό είχαν υποστεί 3-6 ανακαλλιέργειες.

2. Κατεργασία των ΛΜΚ με μουσκαρινικούς αγωνιστές

Τα κύτταρα που βρισκόταν σε καλλιέργεια πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1xPBS και στη συνέχεια επώαστηκαν για 3, 7, 15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% ορού, ή απουσία ορού (DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη), καθώς και σε θρεπτικό υλικό που περιείχε ακετυλοχολίνη $10^{-5}M$ ή καρβαχόλη $3 \times 10^{-7}M$, στους $37^\circ C$ παρουσία 5% CO_2 .

3. Παρατήρηση με ανάστροφο μικροσκόπιο της μορφολογίας ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών όταν επωάζονται με θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% FBS πολλαπλασιάζονται, γίνονται πεπλατυσμένα και αποκτούν συνθετικό φαινότυπο. Όταν επωάζονται χωρίς ορό αποκτούν επίμηκες σχήμα και συσταλτό φαινότυπο. Ενώ υπό την επίδραση της ACh ή της CCh τα ΛΜΚ αεραγωγών πολλαπλασιάζονται, γίνονται λιγότερο συσταλτά και το σχήμα τους μοιάζει με αυτό των κυττάρων που καλλιεργούνται με 10% FBS. Οι παραπάνω αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων παρατηρήθηκαν με ανάστροφο μικροσκόπιο Nikon Diaphot300 (Nikon Inc., Melville, NY, USA). Η παρατήρηση των ΛΜΚ έγινε στις 3, 7 και 15 ημέρες, σε όλες τις συνθήκες (απουσία ή παρουσία 10% FBS, 10^{-5} M ACh ή 3×10^{-7} M CCh) σε 3 ανεξάρτητα πειράματα.

4. Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό

4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Σε διάφορες περιοχές των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στην πλασματική, στην πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου ή ενδοκυττάρια. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες των κυττάρων, δρουν ως αντιγόνα για συγκεκριμένα ειδικά αντισώματα. Επομένως, τα κύτταρα επώαστηκαν με ειδικά αντισώματα τα οποία αλληλεπίδρασαν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με δεύτερα αντισώματα, τα οποία έφεραν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες, και συνδέθηκαν ειδικά με τα πρώτα, επιτρέποντας τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Όταν στα κύτταρα επέδρασε φως με κατάλληλο μήκος κύματος, επιτεύχθηκε φθορισμός. Στη συνέχεια έγινε παρατήρηση σε μικροσκόπιο, το οποίο έφερε κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA) και φωτογράφιση του παρασκευάσματος με ειδική ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany).

Αναλυτικά, ΛΜΚ (30.000 κύτταρα/2ml εναιωρήματος/3-4 καλυπτρίδες) καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm μέχρι που τα

κύτταρα να καλύπτουν το 50 με 60% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με διάλυμα 1xPBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 1xPBS-3% φορμαλδεΐδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα πλύση με διάλυμα 1xPBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα 1xPBS -1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4⁰C, έτσι ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές. Έπειτα, οι μη ειδικές θέσεις στις οποίες θα μπορούσε να συνδεθεί το αντίσωμα δεσμεύτηκαν από διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα ή για ολόκληρη τη νύχτα στους 4⁰C. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween-1% BSA, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1xPBS 0.1% Tween-1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με την φθορίζουσα ουσία σε διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween-1% BSA, για 30 λεπτά στους 4⁰C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε πάλι με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween-1% BSA. Στη συνέχεια η κάθε καλυπτρίδα εμβαπτίστηκε στιγμιαία σε H₂O και αφού απομακρύνθηκε το νερό τοποθετήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες είχαν στην επιφάνειά τους 2 μl vectashield (Vector laboratories) που περιείχε χρωστική DAPI για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Ακολούθησε σφράγισμα των καλυπτρίδων με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Πρώτο αντίσωμα	Αραίωση	Δεύτερο αντίσωμα	Πρωτεΐνη που ανιχνεύεται
a-actin	1: 1000	Anti-mouse IgG	α-ακτίνη ΛΜΚ
Desmin	1: 400	Anti-rabbit IgG	Δεσμίνη ΛΜΚ
MHC	1: 1000	Anti-mouse IgG	Βαριά αλυσίδα της μυοσίνης ΛΜΚ

Στην αρχή κάθε πειράματος τα κύτταρα καλύπτανε το 50-60% της επιφάνειας κάθε καλυπτρίδας. Σε κάθε πείραμα για την μελέτη της έκφρασης μίας πρωτεΐνης (α-ακτίνη, MHC ή δεσμίνη) χρησιμοποιήθηκαν 14 καλυπτρίδες. Για το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει την κάθε μια υπό μελέτη πρωτεΐνη μελετήθηκαν συνολικά 42 καλυπτρίδες. Από κάθε καλυπτρίδα ελήφθησαν τουλάχιστον τρεις φωτογραφίες για κάθε συνθήκη, από τη χρώση με φθορίζουσα ουσία CY3 και από τη χρώση με dapi. Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα κύτταρα που εξέφραζαν την πρωτεΐνη (α-ακτίνη, MHC ή δεσμίνη) σε κάθε φωτογραφία και οι πυρήνες που βάφτηκαν με dapi και αντιπροσωπεύουν τον συνολικό αριθμό των κυττάρων σε κάθε φωτογραφία. Ο λόγος των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη προς το σύνολο των κυττάρων εκφράζει το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει την υπό μελέτη πρωτεΐνη στο σύνολο των κυττάρων. Η έκφραση των πρωτεϊνών μελετήθηκε σε τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα.

5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western

5.1 Εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ

Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm με τις υπό μελέτη ουσίες για 3, 7 και 15 ημέρες. Σε κάθε μία από αυτές τις μέρες γινόταν αρχικά πλύση του τρυβλίου με διάλυμα 1xPBS, που περιείχε 100μg/ml PMSF, το οποίο είναι αναστολέας των πρωτεασών. Ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου με πίεση με ειδική σπάτουλα, με τη χρήση 50μl διαλύματος λύσης (Πίνακας 5). Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου erppendorf, και αφού επώαστηκε για 10 λεπτά σε πάγο, φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, 5μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, ενώ 150 μl του υπερκείμενου χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση.

5.2 Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

Η μέτρηση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιέχει τη χρωστική

Coomasie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Αυτή η δημιουργία συμπλόκων μεταβάλλει το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Τα 5 μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του πρωτεϊνικού λύματος αναμίχθηκαν με 795 μl νερό και 200μl από το αντιδραστήριο και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 595 nm. Οι τιμές της απορρόφησης από το φωτόμετρο μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA). Η ολική πρωτεΐνη που υπάρχει σε κάθε δείγμα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την ηλεκτροφόρηση προκειμένου να υπάρχει αρκετή πρωτεΐνη.

Πίνακας 5: Διάλυμα λύσης ευκαρυωτικών κυττάρων και εκχύλισης κυτταρικών πρωτεϊνών

Ουσία	Τελική συγκέντρωση
Tris-Cl pH 8.0	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
PMSF	100 μg/ml
DTT	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
β-glycerolphosphate	10 mM

5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες ενός δείγματος, που υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση, διαχωρίζονται καθώς κινούνται διαμέσου των πόρων μιας πηκτής. Ο διαχωρισμός

αυτός επιτυγχάνεται γιατί οι πρωτεΐνες ως φορτισμένα μόρια κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών (v) μέσα στην πηκτή, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται (E) και από το ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης (q). Τα μεγέθη αυτά συσχετίζονται με τη εξίσωση :

$$v = E * q / f$$

όπου f : ο παράγοντας που εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα στο χώρο της πρωτεΐνης, καθώς και το ιξώδες της πηκτής μέσα στην οποία κινείται η πρωτεΐνη.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Οι πηκτές αυτές σχηματίζονται καθώς το ακρυλαμίδιο ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και το N,N μεθυλενο-δισακρυλαμίδιο ή αλλιώς bis-ακρυλαμίδιο ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) συνπολυμερίζονται, καθώς το bis-ακρυλαμίδιο συνδέει τις σχηματιζόμενες αλυσίδες του ακρυλαμιδίου. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι ο σχηματισμός ενός πολυμερούς πλέγματος, του οποίου οι πόροι ποικίλουν σε μέγεθος, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Το πλέγμα δημιουργείται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10% APS), το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη του μηχανισμού, και της τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED), η οποία είναι ένας φωτοχημικός καταλύτης που χρειάζεται για τη διάδοση του μηχανισμού.

Στην ασυνεχή ηλεκτροφόρηση, η οποία χρησιμοποιήθηκε, δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικές πηκτές. Η πηκτή επιστοιβάξης δημιουργήθηκε, έτσι ώστε να συμπυκνωθούν οι πρωτεΐνες του κάθε δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, πριν αρχίσουν να διαχωρίζονται, ενώ η πηκτή διαχωρισμού ήταν η πηκτή στην οποία διαχωρίστηκαν τελικά οι πρωτεΐνες. Οι δύο πηκτές παρασκευάστηκαν από δύο διαφορετικά ως προς τη σύσταση και το pH τους διαλύματα, ενώ και το ρυθμιστικό διάλυμα των δοχείων ηλεκτροφόρησης ήταν διαφορετικό από αυτά των πηκτών.

Οι αποδιατακτικές συνθήκες της ηλεκτροφόρησης εξασφαλίστηκαν με τη χρήση του απορρυπαντικού sodium dodecyl sulfate (SDS), το οποίο αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα συνδέεται με αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης).

Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το SDS φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο και είναι επιμήκη. Επειδή όμως το φορτίο

ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό, η κίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεϊνών εξαρτάται αποκλειστικά μόνο από το μοριακό τους βάρος.

5.4 Δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Η πηκτή στην οποία έγινε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων, αποτελούνταν από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία είχε ύψος 7.5 cm και πάχος 1 mm και την πηκτή επιστοιβαξης με ύψος 2.5 cm. Στην πηκτή επιστοιβαξης δημιουργήθηκαν θέσεις, στις οποίες προστέθηκε το κάθε δείγμα, καθώς τοποθετήθηκε στην πηκτή πλαστική οδοντωτή μήτρα, η οποία και αφαιρέθηκε μόλις ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός των μονομερών της πηκτής.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης, pH 8.9

ΟΥΣΙΑ	TRIS	ΓΛΥΚΙΝΗ	EDTA	SDS
Συγκέντρωση	50 mM	0.38 M	2 mM	0.1%

	ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ: BIS ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ	SDS	TRIS- HCl	EDTA	APS	TEMED
	<i>Πηκτή επιστοιβαξης, pH 6.8</i>					
Συγκέντρωση	4.5%	0.1%	0.125 M	2 mM	0.08%	0.04%
	<i>Πηκτή διαχωρισμού, pH 8.8</i>					
Συγκέντρωση	8-12%	0.1%	0.375 M	2 mM	0.04%	0.04%

5.5 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων

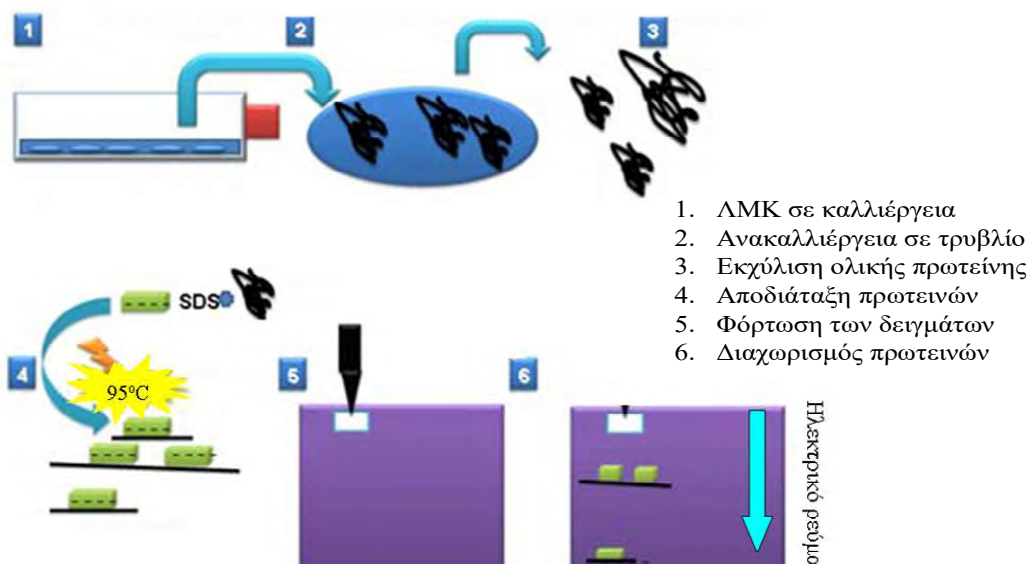
Τα 150 μ l δείγματος που είχαν ληφθεί από τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναμίχθηκαν με ένα διάλυμα επιφόρτωσης (Tris-HCl pH6.8 62.5mM, SDS 2.3%, γλυκερόλη 10%, μπλε-βρωμοφαινόλης 0.05% w/v, DTT 25mM) σε αναλογία 1:3 και ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 95° C. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν με σύριγγα τύπου Hamilton, στις ειδικές θέσεις της πηκτής επιστοιβάξης που είχαν δημιουργηθεί με τη χρήση της ειδικής μήτρας κατά την κατασκευή της πηκτής. Σε κάθε θέση τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος που περιείχε 30 ή 40 μ g πρωτεΐνης. Στην πρώτη θέση επιφορτώθηκε μίγμα πρωτεϊνών-μαρτύρων με συγκεκριμένα μοριακά βάρη.

5.6 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

Η ηλεκτροφορητική συσκευή συνδέθηκε με τροφοδοτικό μηχάνημα και η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε σε 200Volt, 400mA, για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ηλεκτροφόρηση θεωρήθηκε ολοκληρωμένη όταν το «μέτωπο» (μπλε γραμμή της χρωστικής) έφτασε στο χαμηλότερο άκρο της πηκτής (Εικόνα 12).

Εικόνα 12. Ανάλυση κατά Western.

Πηγή: Προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.westernblotinfo.com



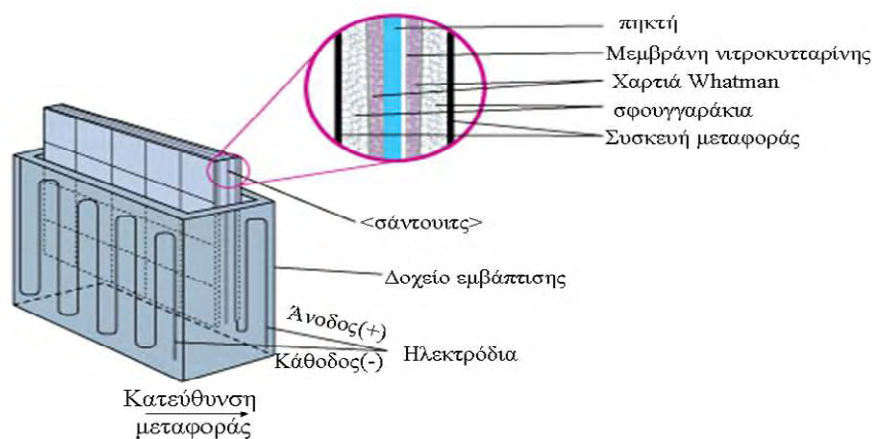
5.7 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες που υπήρχαν πάνω στην πηκτή και είχαν διαχωριστεί με την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε καθώς το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόστηκε μετακίνησε τις πρωτεΐνες που είναι μόρια αρνητικά φορτισμένα από την πηκτή πάνω στη μεμβράνη. Η μεταφορά αυτή έγινε σε υγρή φάση (Wet transfer), ως εξής :

Η πηκτή διαχωρισμού, έξι διηθητικά χαρτιά 3mm Whatman στο μέγεθος της πηκτής και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα μεταφοράς προκειμένου να εξισορροπηθούν. Έπειτα, δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» στη συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών, το οποίο περιείχε διαδοχικά 3 χαρτιά Whatman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, την πηκτή και άλλα 3 χαρτιά Whatman. Η διάταξη αυτή τοποθετήθηκε στη συσκευή και η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα μεταφοράς (Tris 48mM, glycine 39mM, SDS 1.3mM, methanol 20%) (Εικόνα 13).

Εικόνα 13. Μεταφορά πρωτεϊνών

Πηγή: Προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.westernblotinfo.com



Στη συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 100 Volt, 350mA για 55 λεπτά, με συνεχή ανάδευση του διαλύματος, παρουσία πάγου για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του διαλύματος. Όταν η μεταφορά ολοκληρώθηκε, η μεμβράνη χρωματίστηκε προσωρινά με χρωστική Ponceau S 0,2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μεταφορά ήταν επιτυχής καθώς η συγκεκριμένη

χρωστική χρωματίζει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη και επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών πάνω σε αυτή. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό και κατόπιν αποχρωματίστηκε με πλύση με διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20

5.8 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρουν ως αντιγόνα και μπορούν να συνδεθούν ειδικά με κατάλληλα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με της ανοσοσφαιρίνης IgG του πρώτου και παράλληλα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη (συνήθως το HRP). Το ένζυμο αυτό αντιδρά με υπόστρωμα που προστίθεται εξωγενώς και εκλύει φωταύγεια ή δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χρώματος.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες, επώαστηκε για 20 λεπτά σε διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20, που περιείχε 5% γάλα σε σκόνη, προκειμένου να κορεσθούν οι θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Με την δέσμηση αυτή αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, έγινε 1 πλύση της μεμβράνης με διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20, που διήρκεσε 10 λεπτά, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος κορεσμού.

Η μεμβράνη επώαστηκε για 16 ώρες στους 4° C με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση (Πίνακας 7) και κατόπιν ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμία με διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου, με συνεχή ανάδευση της μεμβράνης. Οι πλύσεις έγιναν προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα συνδέεται ειδικά με το πρώτο, όπως προαναφέρθηκε. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος ακολούθησε η διαδικασία των πλύσεων που περιγράφηκε παραπάνω.

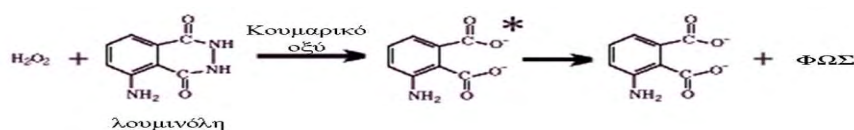
Το τελικό στάδιο της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών είναι ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη με χημειοφωταύγεια. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 10ml λουμινόλης (1.25 mM σε 0.1M Tris-Cl pH

8.5), που περιείχε 10μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM σε DMSO), για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 14).

Πίνακας 7: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Πρώτο αντίσωμα	Αραίωση	Δεύτερο αντίσωμα	Αραίωση	Πρωτεΐνη που ανιχνεύεται
α-actin	1:1000	Anti mouse IgG	1:3000	α-ακτίνη ΛΜΚ
desmin	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	δεσμίνη ΛΜΚ
MHC	1:1000	Anti mouse IgG	1:3000	MHC ΛΜΚ
β-actin	1:3000	Anti mouse IgG	1:3000	β-ακτίνη ΛΜΚ

Εικόνα 14. Αντίδραση χημειοφωταύγειας



Ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ (ECL Hyperfilm, Amersham). Προκειμένου να εμφανιστεί η εικόνα της πρωτεΐνης στο φιλμ ακολούθησε εμβάπτιση του φιλμ σε αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά εμβάπτιση

στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak film developer), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak film fixer) και 3 λεπτά σε νερό. Με την τεχνική αυτή πάνω στο φιλμ αποτυπώθηκε το φως που εκλύθηκε από την αντίδραση φωταύγειας που πραγματοποιήθηκε, άρα κατ' επέκταση και η θέση της μεμβράνης όπου υπήρχε σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος,. Δηλαδή στο σημείο όπου βρισκόταν καθηλωμένη η πρωτεΐνη.

Η ανάλυση των εικόνων που ελήφθησαν από τα φιλμ όπου αποτυπώθηκε το φως έγινε με το πρόγραμμα MacBiotronics Image J for Light Microscopy (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών. Ο λόγος της έντασης του φωτός και κατ' επέκταση της ποσότητας της πρωτεΐνης που μελετάμε (α-ακτίνη, δεσμίνη ή MHC) προς αυτή της β-ακτίνης σε κάθε συνθήκη εκφράζει την ποσοτικοποίηση της κάθε πρωτεΐνης. Έγιναν τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και σε κάθε πείραμα οι πρωτεΐνες αποτυπώθηκαν εις διπλούν.

6. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT- PCR)

6.1 Απομόνωση RNA από ΑΜΚ αναπνευστικού

Μετά την κατεργασία των κυττάρων, πρώτη φάση της μεθόδου ήταν η απομόνωση RNA από τα κύτταρα. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό είναι αυτή της σταδιακής εκχύλισης του RNA με οργανικούς διαλύτες και απαρτίστηκε από τα παρακάτω στάδια:

Ομογενοποίηση των κυττάρων: Προκειμένου να επιτευχθεί λύση των κυττάρων προστέθηκε αρχικά στα κύτταρα της κάθε υπό μελέτη συνθήκης 1 ml διαλύματος μετουσίωσης TRIzol (Invitrogena). Ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων και το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια 1,5 ml. Το κάθε σωληνάριο φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση RNA.

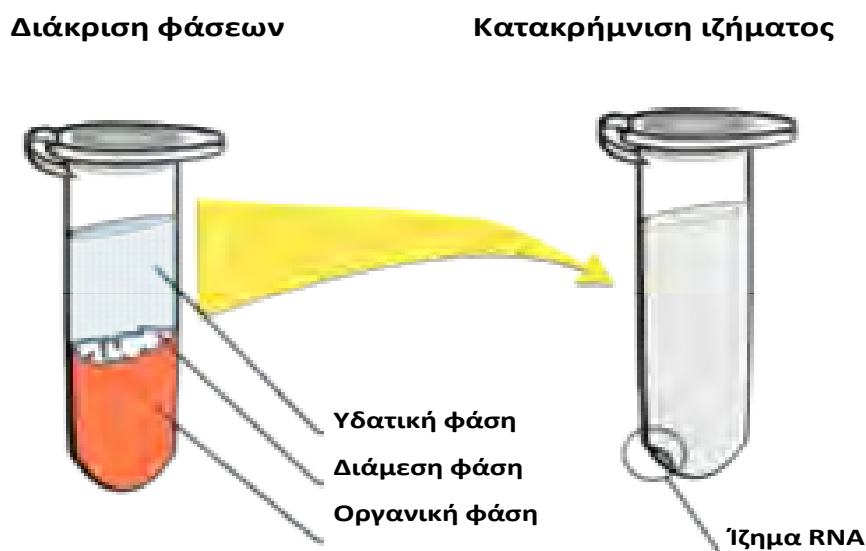
Λύση κυττάρων: Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8°C. Το υπερκείμενο μετά την προσθήκη 0.2 ml χλωροφόρμιο ανακινήθηκε γρήγορα στο χέρι για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Για τον πλήρη

διαχωρισμό των φάσεων τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 rpm σε θερμοκρασία 4°C για 15 λεπτά.

Εκχύλιση RNA: Μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση των δειγμάτων, σε κάθε σωληνάριο εντοπίστηκαν 3 διακριτές φάσεις (εικόνα 15), εκ των οποίων, η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα όπου εντοπίζεται το RNA) περίπου 600μl, συλλέχθηκε προσεκτικά με πιπέττα και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια (1,5ml).

Κατακρήμνιση RNA: για την κατακρήμνιση του RNA, ακολούθησε σε κάθε δείγμα προσθήκη 500 μl ισοπροπανολόλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η κατακρήμνιση επιτεύχθηκε με φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 12000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε προσεκτικά με απόχυση. Ακολούθησε πλύση του ιζήματος RNA με 1 ml διαλύματος αιθανόλης 75%. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύτηκαν έντονα (Vortex) για 10-20 δευτερόλεπτα και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στις 7500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

Εικόνα 15. Εκχύλιση RNA



Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης του προηγούμενου σταδίου τα δείγματα RNA απομονώθηκαν με απόχυση της υπερκείμενης αιθανόλης και στέγνωμα στον αέρα.

Διάλυση και διατήρηση δειγμάτων RNA: Τα προκύπτοντα δείγματα RNA μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, διαλύθηκαν σε 40 μl αποστειρωμένου ddH₂O, και φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

6.2 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA

Μετά την απομόνωση των δειγμάτων RNA, ακολουθούσε ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O και στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων RNA, μετά από αραιώση ποσού δείγματος σε αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O. Τυπικά οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε φασματοφωτομετρήσεις είναι 2 μl RNA σε 98 μl αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O.

Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρήθηκε σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, ενώ ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ καταγράφηκε για το προσδιορισμό της καθαρότητας των δειγμάτων. Από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων RNA σύμφωνα με το τύπο: 1OD= 40 μg/ml. Στη συνέχεια, με βάση τις καταγεγραμμένες τιμές του λόγου OD₂₆₀/OD₂₈₀ του φασματοφωτομέτρου, προσδιορίστηκε η καθαρότητα του κάθε δείγματος.

6.3 Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή (RT).

Μετά την απομόνωση των δειγμάτων RNA του προηγούμενου σταδίου, ακολουθούσε τη δεύτερη φάση – η σύνθεση του αντίστοιχου cDNA με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (reverse transcription). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό είναι η ανάστροφη μεταγραφάση (Superscript™ II RNA H-Reverse Transcriptase), ενώ τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκαν είναι αυτά του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας (Invitrogen™). Χρησιμοποιήθηκε 1μg ολικού RNA σε τελικό όγκο 10 μl για την σύνθεση cDNA.

Στη συνέχεια μετά την ανάμειξη του διαλύματος RNA, ακολούθησε η προσθήκη 10 μl του μείγματος των άλλων αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA

Συστατικά	Ποσότητα	Ποσότητα χωρίς RT
10 x RT buffer	2 μl	2 μl
25 x dNTPs	0,8 μl	0,8 μl
10 x Random primers	2 μl	2 μl
Reverse Transcriptase	1μl	-
H ₂ O	4,2μl	5,2μl
Σύνολο	10 μl	10 μl

Στην αντίδραση που δεν προστέθηκε ανάστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων σύνθεσης cDNA ήταν 20 μl.

Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών σε κάθε δείγμα, ακολούθησε φυγοκέντρηση έως 3000 rpm και η σύνθεση του cDNA σε Θερμοκυκλοποιητή με τις παρακάτω φάσεις:

- 25°C για 10 λεπτά
- 37°C για 120 λεπτά
- 85°C για 5 sec
- ψύξη στους 4°C

Στα προκύπτοντα δείγματα cDNA συνολικού όγκου 20 μl, προστέθηκαν 80μl H₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου qRT-PCR.

6.4 Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου qRT-PCR

Η τρίτη φάση - η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου qRT-PCR είναι μία εργαστηριακή τεχνική, που βασίζεται στην κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) κατά την οποία πολλαπλασιάζεται και ποσοτικοποιείται ένα μόριο DNA στόχο. Η διαφορά με την συμβατική PCR είναι ότι ενώ σ' εκείνη αξιολογείται μόνο το τελικό προϊόν σε πηκτή αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση, στην qReal-time PCR, όπως φανερώνει και η ονομασία της γίνεται ποσοτικοποίηση του DNA σε κάθε κύκλο ξεχωριστά με τη βοήθεια χρωστικών που φθορίζουν και laser που είναι προσαρμοσμένα στον θερμοκυκλοποιητή. Η πραγματικού χρόνου-ποσοτική PCR διεξήχθη με τη βοήθεια ενός συστήματος Miniopticon RT-PCR (Biorad), χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR Kit

(KapaBiosystems) και εκκινητές (primers) μουσκαρινικών υποδοχέων M1, M2 και M3.

Σε 5 μl δείγματος cDNA προστέθηκαν 15 μl μείγματος που περιείχε:

Συστατικά	Ποσότητα
H ₂ O	3,3 μl
Primer F	1,1 μl
Primer R	1,1 μl
Syber Green Mix	11 μl
Σύνολο	16,5 μl

Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή. Ως μάρτυρας ελέγχου αναλύθηκε η έκφραση της β-ακτίνης. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν. Επίσης ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις στις οποίες στη θέση του cDNA προστέθηκε H₂O, ή το προϊόν της αντίδρασης cDNA που πραγματοποιήθηκε απουσία ενζύμου.

Το cDNA τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων αναλύθηκε εις διπλούν. Η σχετική έκφραση του M₂ υποδοχέα στις διάφορες συνθήκες αναλύθηκε με τη μέθοδο ΔΔCT και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως σχετικές μονάδες (mean ±SEM). Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε είναι:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} \text{ όπου}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ γονίδιο } M_2 - Ct \text{ β-actin})_{\text{δείγματος}} - (Ct \text{ γονίδιο } M_2 - Ct \text{ β-actin})_{\text{δείγμα μάρτυρα}}$$

Η αλληλουχία των εκκινητών φαίνεται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Εκκινητές DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την qRT-PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
HS Actin F	CCAACCGCGAGAAGATGA
HS Actin R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
HS Muscarinic acetylcholine receptor M2 f	AAAGGACTCCTCGCTCCTTC
HS Muscarinic acetylcholine receptor M2 r	TCAGTAGCCAAGTAGCAAATAAACA

7. Δέσμευση [*N*-methyl-³H]scopolamine (³H]NMS) σε μεμβράνες απομονωμένων ΛΜΚ αεραγωγών

Πρωτογενή ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm με τις υπό μελέτη ουσίες (παρουσία ή απουσία 10%FBS ή 10⁻⁵M ACh) για 7 ημέρες. Σε κάθε μία από αυτές τις μέρες έγινε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου, μετά τη προσθήκη 50μl διαλύματος λύσης (25mM Tris-HCl, 2.5mM CaCl₂, 1mM PMSF, 1mM Pefabloc and 10μg/ml aprotinin).

Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου eppendorf, και αφού ομογενοποιήθηκε 3 φορές σε ένα ομογενοποιητή Heidolph Silent Crusher S (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany), φυγοκεντρήθηκε στις 10000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο διαλύθηκε σε 11ml ρυθμιστικό διάλυμα (10mM HEPES, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂) και φυγοκεντρήθηκε στις 15000rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Στο ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντρωση προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα και υποβλήθηκε σε 5 επαναλήψεις εφαρμογής υπερήχων μικρής διάρκειας για 5 δευτερόλεπτα συνολικά. Η μέτρηση της ποσότητας της μεμβρανικής πρωτεΐνης στα παραπάνω δείγματα έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Οι τιμές της απορρόφησης από το φωτόμετρο μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA). Σε 30 μg πρωτεΐνης προστέθηκαν 5nM [³H]NMS και επώαστηκαν για 80 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τα 80 λεπτά επώασης τα δείγματα διηθήθηκαν σε μία συσκευή Millipore vacuum filtration system (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) και τα φίλτρα, μέσα από τα οποία έγινε η διήθηση, αφέθηκαν να στεγνώσουν για 16 ώρες όλη νύχτα. Την επόμενη μέρα προστέθηκε στα φίλτρα διάλυμα Ultimate gold XR (Perkin Elmer) και ακολούθησε επώαση 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε Wallac β-counter. Για να επιβεβαιωθεί ότι οι κρούσεις ραδιενεργού που μετρήθηκαν οφειλόταν στην ειδική δέσμευση, κάθε πείραμα επαναλήφθηκε με την επιπρόσθετη παρουσία 100 μM ατροπίνης. Οι μονάδες cpm μετατράπηκαν σε fmol/mg πρωτεΐνης με την εφαρμογή από την ιστοσελίδα www.graphpad.com/quickcalcs/radcalcform.cfm. Έγιναν τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα (N=4). Τα δείγματα που εξετάστηκαν για κάθε συνθήκη ήταν τρία σε κάθε πείραμα.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο ετοιμάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της “In Vitro Muscarinic Receptor Radioligand-Binding Assays” Tod Steinfeld, M. Teresa Pulido-Rios, Scott Armstrong, and Sharath S. Hegde, *Current Protocols in Pharmacology* 1.33.1-1.33.18, March 2010.

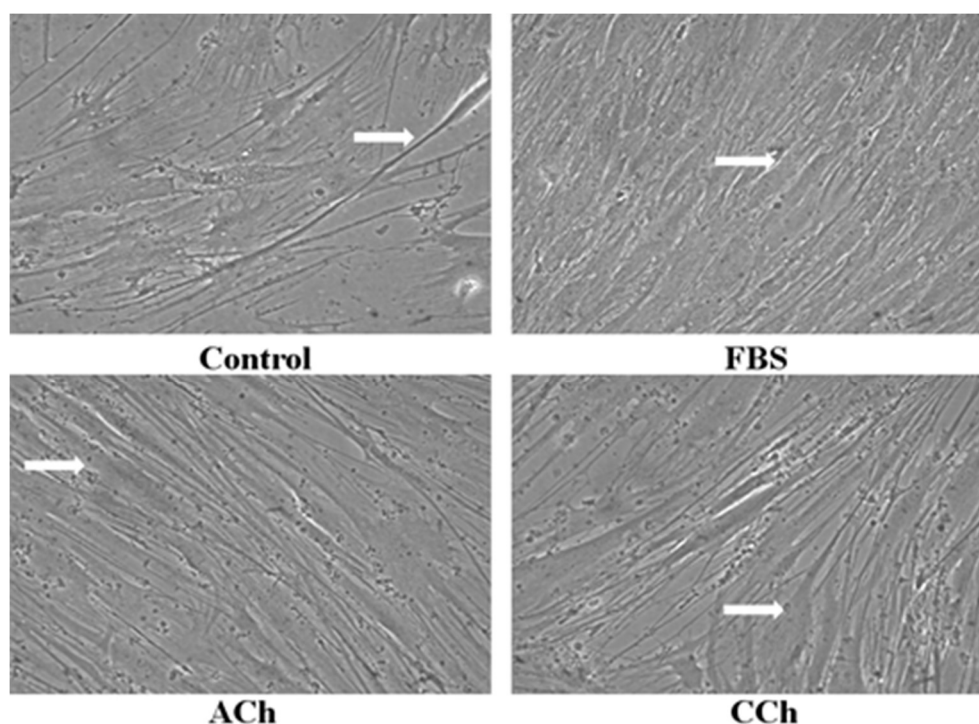
8. Ανάλυση των δεδομένων από τα πειράματα

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με Unpaired t test και την εφαρμογή του προγράμματος GraphPrism. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το $P < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην μορφολογία ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων

ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επωάστηκαν για 3-15 ημέρες με θρεπτικό διάλυμα χωρίς ορό (control), με 10% FBS, 3×10^{-7} M καρβαχόλη (CCh) ή 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh). Η συγκέντρωση της ACh και της CCh επιλέχθηκε με βάση πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο Φυσιολογίας στο παρελθόν. Συγκεκριμένα, η ACh σε συγκέντρωση 10^{-5} M και η CCh σε συγκέντρωση 3×10^{-7} M είναι οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται το μισό της μέγιστης επίδρασης των ουσιών στη σύσπαση των ΛΜΚ. Από την παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων με ανάστροφο μικροσκόπιο στις 3, 7 και 15 ημέρες φάνηκε ότι η επώαση των ΛΜΚ με μουσκαρινικό αγωνιστή (ACh, CCh) άλλαξε την μορφολογία των κυττάρων (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στην μορφολογία των ΛΜΚ.

Τα ΛΜΚ επωάστηκαν για 15 ημέρες απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλη (CCh).

Η παρατήρηση έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο στη μεγέθυνση 20.

Οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι εμφανέστερες την 7^η και 15^η ημέρα. Συγκεκριμένα, τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου σε αυτές τις συνθήκες φαίνονται πεπλατυσμένα και η μορφολογία τους μοιάζει με τα κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Τα κύτταρα που επώαστηκαν απουσία 10% FBS (control) εμφανίζουν πιο επίμηκες σχήμα.

2. Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών, ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου α-ακτίνη, βαριά αλύσου της μυοσίνης (MHC) και δεσμίνη σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων

Η έκφραση των πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (α-ακτίνη, MHC και δεσμίνη), υπό την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών (ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη) μελετήθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

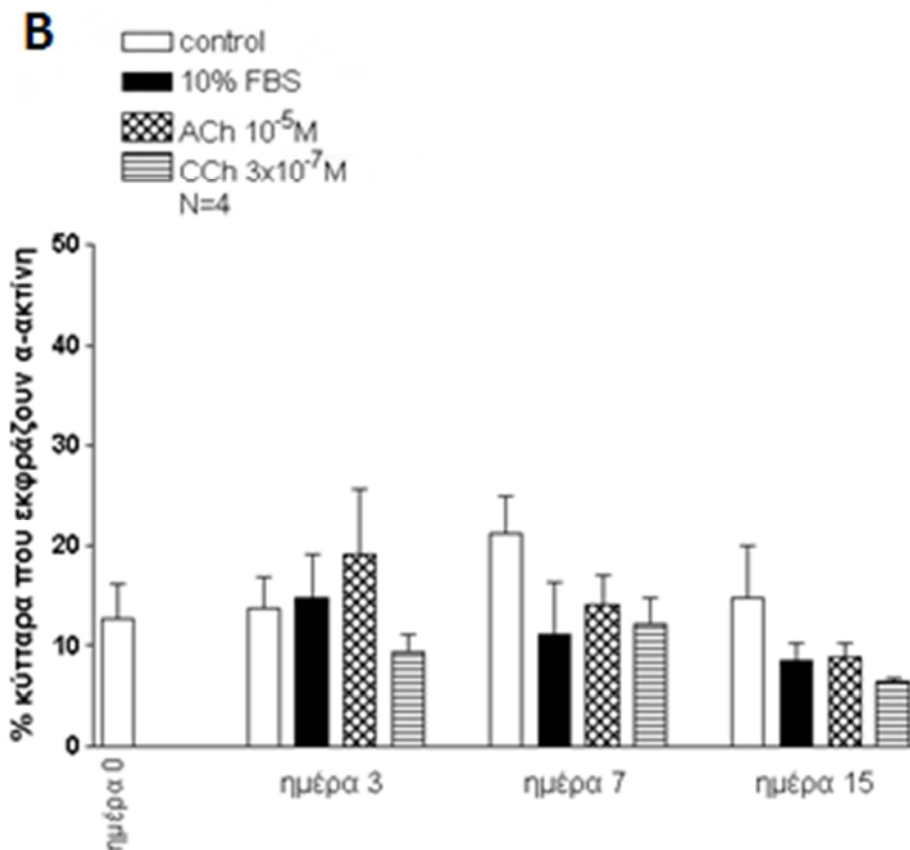
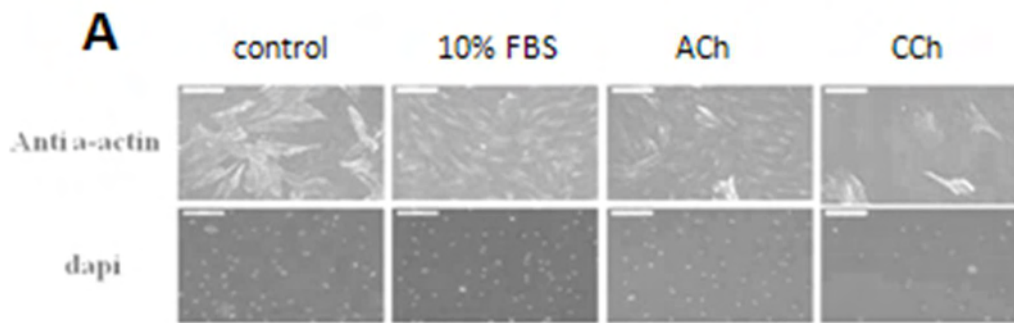
ΛΜΚ βρόγχων καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού, ή παρουσία 10% FBS, ACh 10^{-5} M ή CCh 3×10^{-7} M για 3 έως 15 ημέρες. Αναλυτικά τα πειράματα αυτά έδειξαν:

2.1 Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της α-ακτίνης σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν α-ακτίνη, σε συνθήκες στέρησης ορού (control), δεν μεταβλήθηκε μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 3-15 μέρες. Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν α-ακτίνη, όταν τα ΛΜΚ επώαστηκαν παρουσία μουσκαρινικού αγωνιστή, ACh (10^{-5} M) ή CCh (3×10^{-7} M) για 7-15 μέρες μειώθηκε σε σύγκριση με το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν α-ακτίνη απουσία ορού τις ίδιες μέρες αλλά η ελάττωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (διάγραμμα 1).

Στη συνέχεια έγινε μελέτη με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και υπολογισμός του λόγου α-ακτίνης/β-ακτίνη στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επώαστηκαν απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, ACh (10^{-5} M), CCh (3×10^{-7} M). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η έκφραση της

α-ακτίνης στα κύτταρα control δεν μεταβλήθηκε μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 3-15 μέρες (διάγραμμα 2). Αντιθέτως η παρουσία 10% FBS, ACh ($10^{-5}M$) ή CCh ($3 \times 10^{-7}M$) στο υλικό καλλιέργειας μείωσε την έκφραση της α-ακτίνης στα ΛΜΚ την 7^η και 15^η ημέρα σε σχέση με τα κύτταρα control των αντίστοιχων ημερών (διάγραμμα 2). Η μείωση της ποσότητας της α-ακτίνης ήταν στατιστικά σημαντική μετά την 7^η μέρα επώασης των ΛΜΚ με μουσκαρινικό αγωνιστή ($P < 0.05$, διάγραμμα 2) ενώ στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην έκφραση της α-ακτίνης στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού για 15 μέρες ($P < 0.001$, διάγραμμα 2).

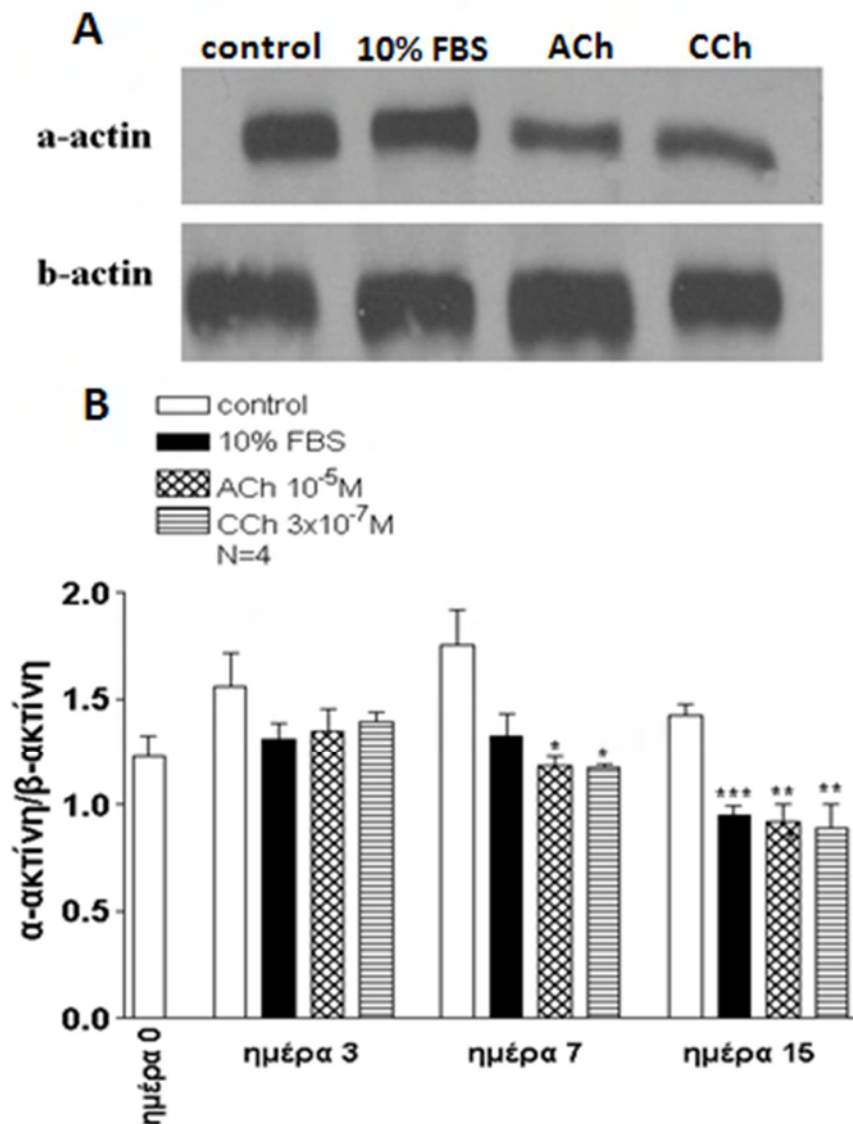


Διάγραμμα 1:

A. Μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό της έκφρασης της α -ακτίνης σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων που επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

B. Ποσοστά ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που εκφράζουν α -ακτίνη μετά από επώαση για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4).



Διάγραμμα 2:

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western της α-ακτίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επωάστηκαν για 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

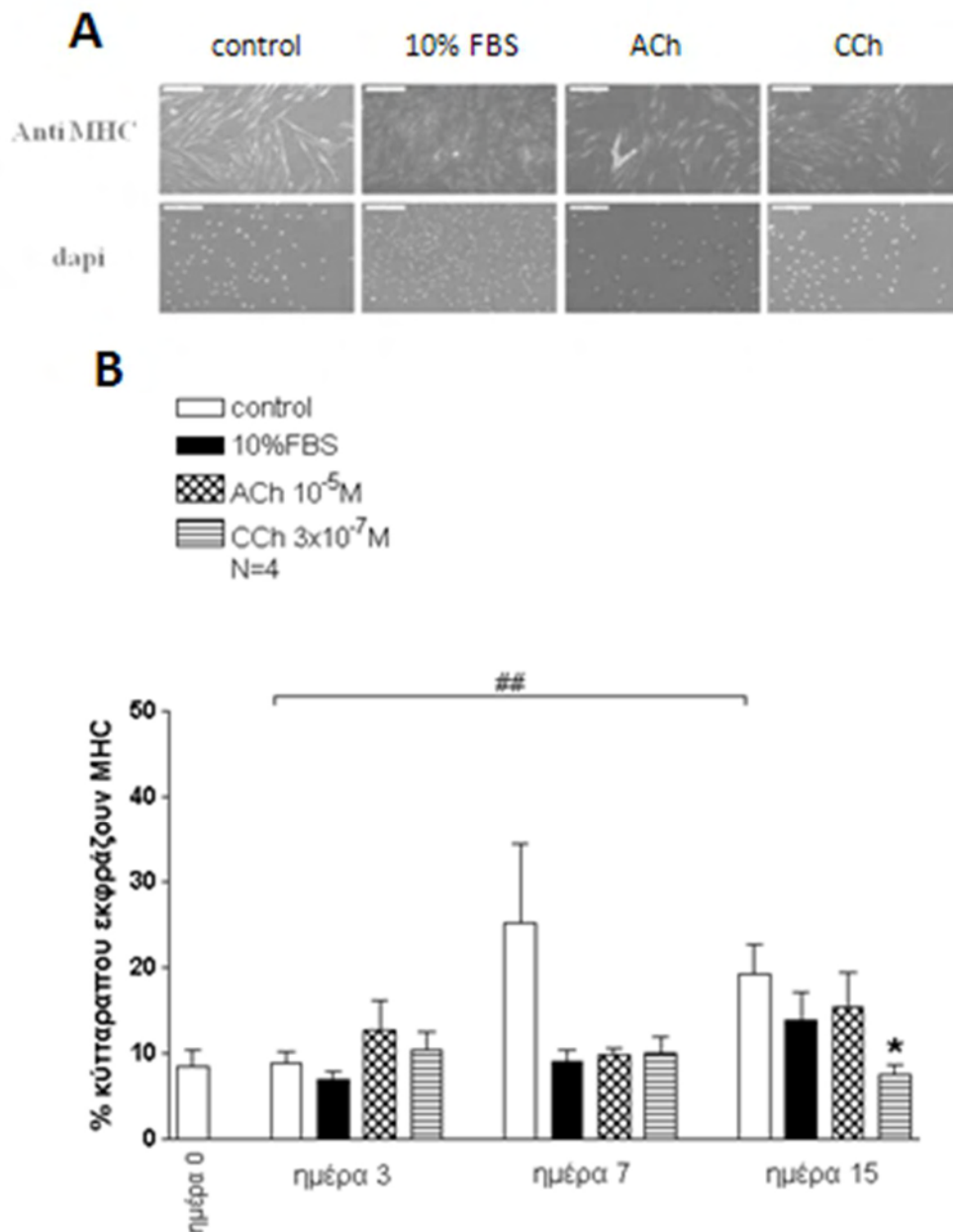
B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της α-ακτίνης εκφρασμένη ως λόγος α-ακτίνης /β-ακτίνη σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επωάστηκαν για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο control της ίδιας μέρας.

2.2 Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν MHC, σε συνθήκες στέρησης ορού (control) αυξήθηκαν μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 15 μέρες ($P < 0.05$, διάγραμμα 3). Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν MHC, όταν τα ΛΜΚ επώαστηκαν παρουσία μουσκαρινικού αγωνιστή, ACh (10^{-5} M) ή CCh (3×10^{-7} M), για 7-15 μέρες μειώθηκε σε σύγκριση με το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν MHC αλλά η ελάττωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική παρά μόνο για τα ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν παρουσία CCh για 15 μέρες ($P < 0.05$, διάγραμμα 3).

Στη συνέχεια έγινε μελέτη με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και υπολογισμός του λόγου MHC/ β -ακτίνη στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επώαστηκαν απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, ACh (10^{-5} M), CCh (3×10^{-7} M). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η έκφραση της MHC στα κύτταρα control δεν μεταβλήθηκε μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 3-15 μέρες (διάγραμμα 4). Αντιθέτως, η παρουσία 10% FBS στο υλικό της καλλιέργειας μείωσε την έκφραση της MHC στα ΛΜΚ την 7^η και την 15^η ημέρα σε σχέση με τα κύτταρα control των αντίστοιχων ημερών ($P < 0.05$, διάγραμμα 4). Παρόμοια με τον ορό, η παρουσία μουσκαρινικού αγωνιστή, ACh (10^{-5} M) ή CCh (3×10^{-7} M) στο υλικό καλλιέργειας μείωσε την έκφραση της MHC στα ΛΜΚ από την 3^η ημέρα καλλιέργειας ($P < 0.05$, διάγραμμα 4).

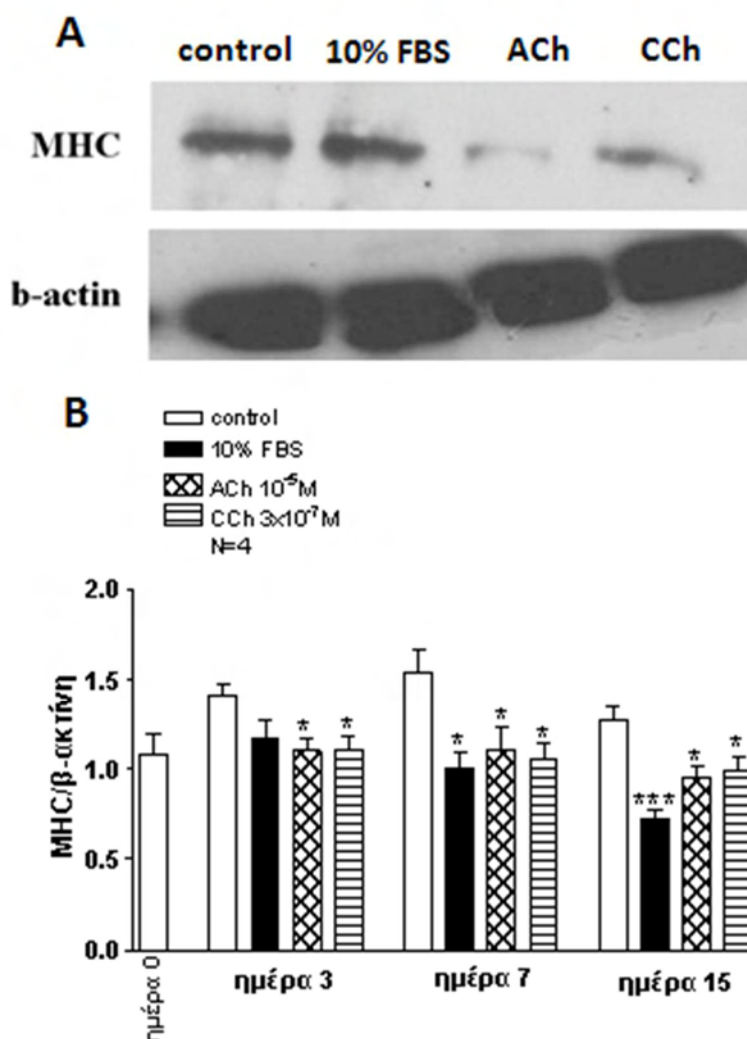


Διάγραμμα 3:

A. Μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό της έκφρασης της MHC σε ανθρώπινα AMK βρόγχων που επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

B. Ποσοστά AMK βρόγχων ανθρώπου που εκφράζουν MHC μετά από επώαση για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4). * $P < 0,05$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο (control) και $^{##}P < 0,01$ σε σύγκριση με το control της ημέρας 3.



Διάγραμμα 4:

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western της MHC σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων επωάστηκαν για 7 ημέρες με θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

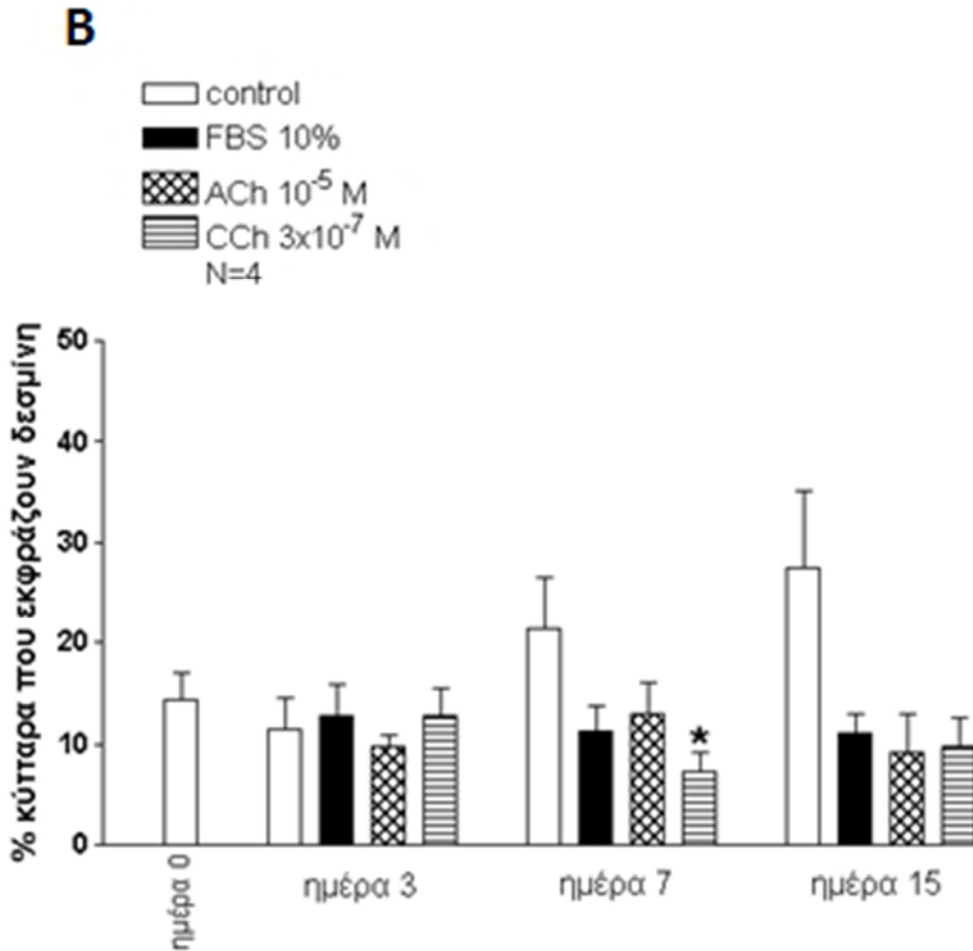
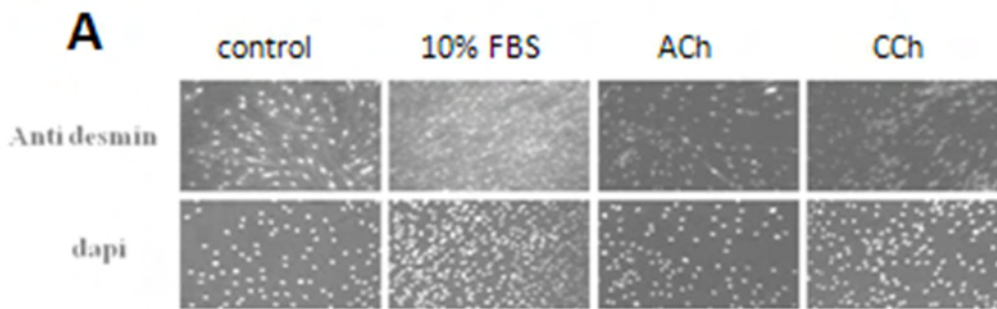
B. Ποσοτικοποίηση της MHC εκφρασμένη ως λόγος MHC/β-ακτίνη σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων που επωάστηκαν για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4). * $P < 0.05$ και *** $P < 0,001$ σε σύγκριση με αντίστοιχο control της ίδιας μέρας.

2.3 Επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση της δεσμίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων του έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν δεσμίνη αυξήθηκε την 7^η και την 15^η ημέρα σε σχέση με την ημέρα 3 στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού αν και τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Αντιθέτως το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν δεσμίνη όταν η καλλιέργεια έγινε παρουσία 10% FBS, ACh (10^{-5} M) ή CCh (3×10^{-7} M) μειώθηκε την 7^η και την 15^η ημέρα σε σχέση με το control της αντίστοιχης μέρας (διάγραμμα 5). Στατιστική σημαντική ελάττωση παρουσιάζει μόνο την 7^η ημέρα το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν δεσμίνη παρουσία CCh (3×10^{-7} M), σε σχέση το αντίστοιχο control ($P < 0.05$).

Στη συνέχεια έγινε μελέτη με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και υπολογισμός του λόγου δεσμίνης/ β -ακτίνη στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επώστηκαν απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, ACh (10^{-5} M), CCh (3×10^{-7} M). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η έκφραση της δεσμίνης στα κύτταρα control δεν μεταβλήθηκε μετά από καλλιέργεια των κυττάρων για 3-15 μέρες (διάγραμμα 6). Αντιθέτως η παρουσία 10% FBS ή μουσκαρινικού αγωνιστή, ACh (10^{-5} M) ή CCh (3×10^{-7} M) στο υλικό καλλιέργειας μείωσε την έκφραση της MHC στα ΛΜΚ από την 3^η ημέρα καλλιέργειας ($P < 0.05$, διάγραμμα 6).

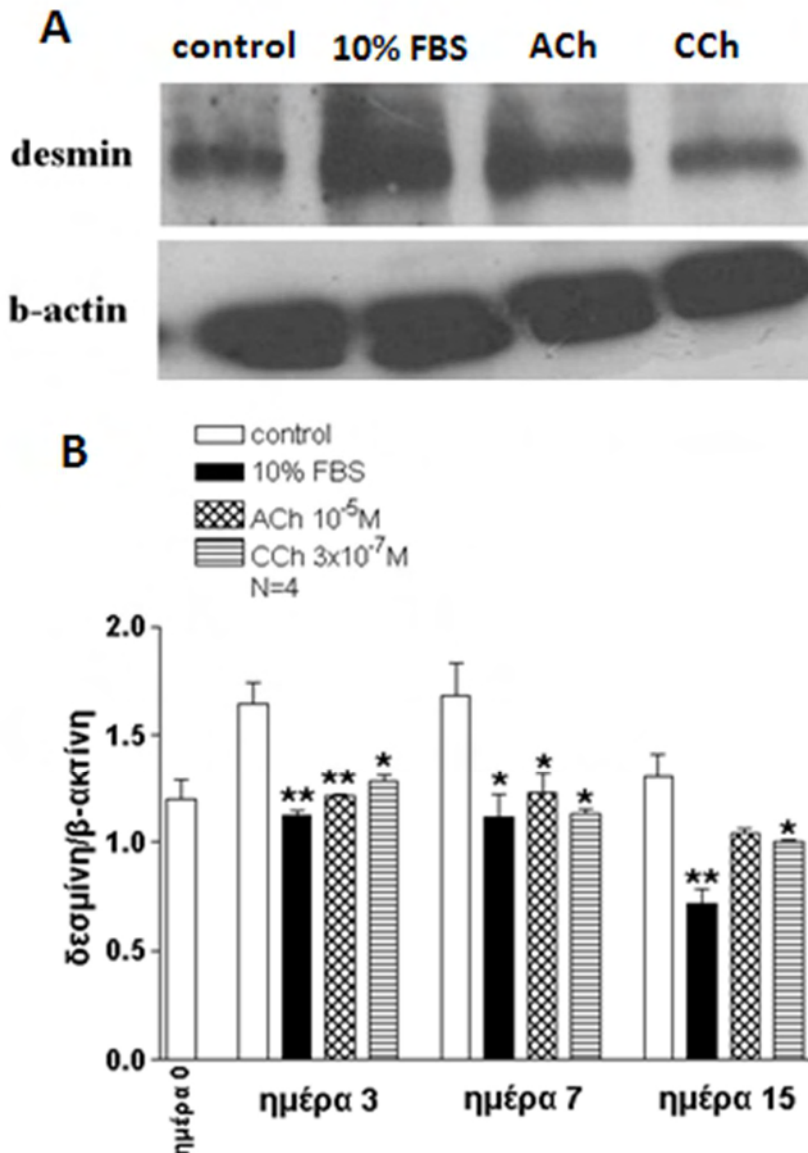


Διάγραμμα 5:

A. Μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό της έκφρασης της δεσμίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, 10^{-5} M ακετυλοχολίνης (ACh) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλης (CCh).

B. Ποσοστά ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που εκφράζουν δεσμίνη μετά από επώαση για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, 10^{-5} M ακετυλοχολίνης (ACh) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4). * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο control.



Διάγραμμα 6:

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western της δεσμίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν για 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

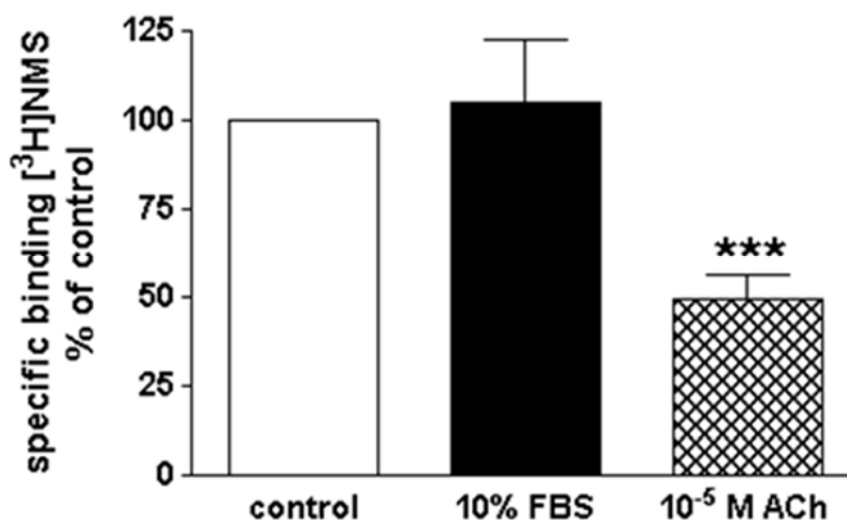
B. Ποσοτικοποίηση της δεσμίνης εκφρασμένη ως λόγος δεσμίνης/β-ακτίνη σε ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων που επώαστηκαν για 3-15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία 10% FBS, $10^{-5}M$ ακετυλοχολίνης (ACh) ή $3 \times 10^{-7}M$ καρβαχόλης (CCh).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων (N=4). * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με αντίστοιχο control της ίδιας μέρας.

3. Επίδραση των μускаρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των μускаρινικών υποδοχέων M₂ και M₃ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

3.1 Επίδραση του μускаρινικού αγωνιστή ακετυλοχολίνη στην έκφραση των μускаρινικών υποδοχέων M₃ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Για να μελετήσουμε την επίδραση του μускаρινικού αγωνιστή ακετυλοχολίνη στην έκφραση των M₃-μускаρινικών υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου εφαρμόστηκε η μέθοδος της δέσμευσης [*N*-methyl-³H]scopolamine (³H]NMS) σε μεμβράνες απομονωμένων ΛΜΚ.



Διάγραμμα 7:

Η επίδραση του μускаρινικού αγωνιστή ακετυλοχολίνη (ACh) στην ειδική δέσμευση του [³H]NMS.

Τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (control), με ορό (10% FBS) ή ACh (10⁻⁵M) για 7 ημέρες. Η ειδική δέσμευση υπολογίστηκε με επώαση μεμβρανών με 5nM [³H]NMS.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό της ειδικής δέσμευσης του [³H]NMS του control και παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SEM τεσσάρων (N=4) ανεξάρτητων πειραμάτων. ***P<0.001.

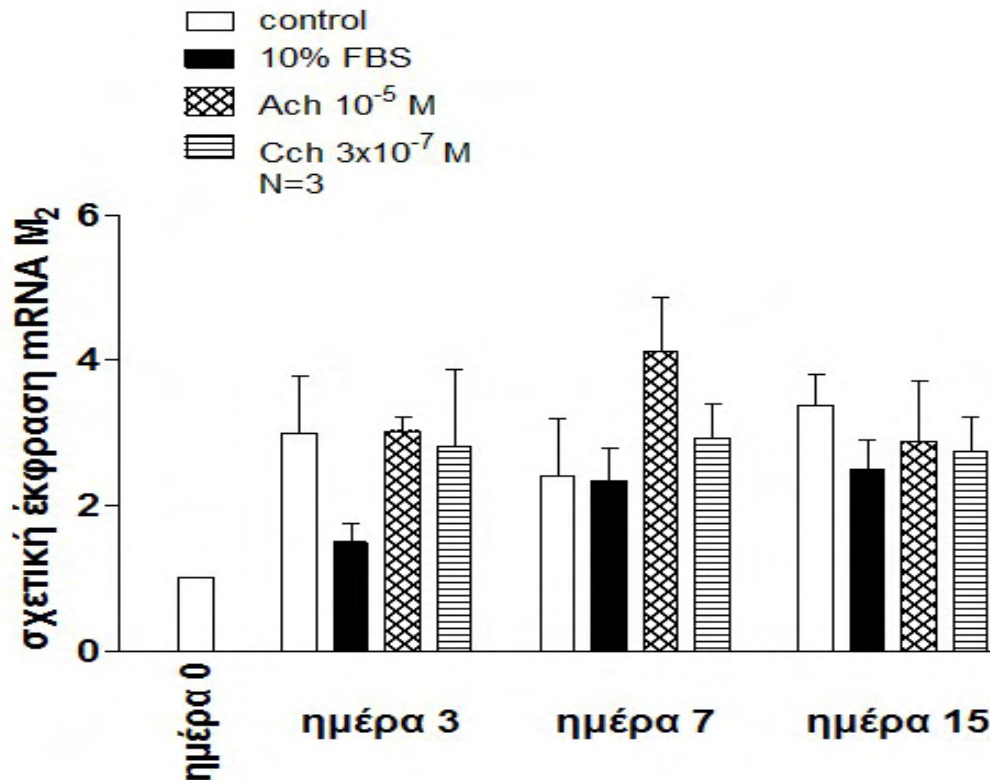
Οι M₃ υποδοχείς στην μεμβράνη των ΛΜΚ που επώαστηκαν για 7 ημέρες με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (control), με 10% FBS ή ACh (10⁻⁵M) εντοπίστηκαν μετά από επώαση κλασμάτων κυτταρικής μεμβράνης (30 μg) από κάθε συνθήκη με 5nM [³H]NMS, για 80 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία και απουσία 100μM ατροπίνης. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ειδική δέσμευση του [³H]NMS από τους M₃ υποδοχείς.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η ειδική δέσμευση του [³H]NMS στις μεμβράνες των ΛΜΚ μειώθηκε μετά από 7 ημέρες επώασης των κυττάρων με ACh (διάγραμμα 7). Συγκεκριμένα η ειδική δέσμευση του [³H]NMS ήταν 897±323 fmol/mg πρωτεΐνης στα control κύτταρα, 892±283 fmol/mg πρωτεΐνης στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS και 376±77 fmol/mg πρωτεΐνης στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία ACh.

3.2 Επίδραση των μουςκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη στην έκφραση των μουςκαρινικών υποδοχέων M₂ σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Για να εξετάσουμε την επίδραση των μουςκαρινικών αγωνιστών, ακετυλοχολίνη – καρβαχόλη, στην μεταγραφή του γονιδίου του M₂ υποδοχέα στα ΛΜΚ των αεραγωγών, προσδιορίσαμε τα επίπεδα του mRNA του M₂ υποδοχέα με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η επώαση των ΛΜΚ με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη, όπως και η παρουσία ορού στο υλικό της καλλιέργειας δεν μετέβαλαν τα επίπεδα του mRNA του M₂ υποδοχέα στα κύτταρα (διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8:

Καθορισμός των επιπέδων mRNA M₂ υποδοχέα, με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, σε AMK βρόγχων ανθρώπου μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό απουσία (control) ή παρουσία ορού (10% FBS) ή 10⁻⁵M ακετυλοχολίνη (ACh) ή 3x10⁻⁷M καρβαχόλη (CCh) για 7 ημέρες. Το γονίδιο της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου για την κανονικοποίηση του M₂ υποδοχέα.

Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την σχετική έκφραση του mRNA M₂ και αποτελούν μέσους όρους ± SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (N=3).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών είναι πολυδύναμα και παρουσιάζουν πολλές λειτουργικές ικανότητες όπως, συστολή, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, σύνθεση φλεγμονωδών μεσολαβητών, αυξητικών παραγόντων, συστατικών εξωκυττάριας ουσίας και ορμονών όπως ακετυλοχολίνη. Αυτές οι λειτουργίες προσδίδουν στα ΛΜΚ ενεργό ρόλο στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών, στην φλεγμονή στους αεραγωγούς, στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματός των αεραγωγών και κατ' επέκταση στην παθοφυσιολογία των χρόνιων φλεγμονωδών πνευμονοπαθειών, ΧΑΠ και άσθμα.

Η πολύπλευρη λειτουργικότητα των ΛΜΚ φαίνεται να συνδέεται με την πλαστικότητα που παρουσιάζει ο φαινότυπός τους. Η πλαστικότητα αποτελεί μία ιδιότητα που επιτρέπει στα ΛΜΚ αεραγωγών, υπό την επίδραση εσωτερικών ή/και εξωτερικών παραγόντων, να μεταπίπτουν με αναστρέψιμο τρόπο από τον πολλαπλασιαστικό/συνθετικό στον συσταλτό φαινότυπο και αντίστροφα [8]. Τα ΛΜΚ αποκτούν συνθετικό φαινότυπο υπό την επίδραση μιτογόνων ουσιών (π.χ PDGF, EGF, ο ορός, ή η φιβρονεκτίνη) και συσταλτό φαινότυπο υπό την επίδραση συσπαστικών παραγόντων (π.χ TGF- β , η ινσουλίνη, η λαμίνη ή η στέρηση ορού στο υλικό της καλλιέργειας). Ο ρόλος των μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο των ΛΜΚ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς [54, 56].

Η ιδιαίτερη σημασία της ακετυλοχολίνης και των μουσκαρινικών υποδοχέων της στην παθοφυσιολογία των χρόνιων αποφρακτικών πνευμονοπαθειών, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ, καθιστούν την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των μουσκαρινικών αγωνιστών στο φαινότυπο των ΛΜΚ των αεραγωγών ιδιαίτερα σημαντική [80].

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς συνδέονται με G πρωτεΐνες και η διέγερση τους ενεργοποιεί τα μονοπάτια των Rho, PI3 και MAP κινασών, τα οποία ρυθμίζουν όχι μόνο την σύσπαση των ΛΜΚ αλλά και λειτουργίες τους όπως τον πολλαπλασιασμό και την σύνθεση και έκκριση ουσιών [61]. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K έχει ιδιαίτερη σημασία στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση των ΛΜΚ των αεραγωγών, η p42/p44 MAP κινάση καθορίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ενώ η Rho κινάση ενεργοποιεί παράγοντες μεταγραφής των ειδικών γονιδίων των ΛΜΚ και οδηγεί στη συσσώρευση συσταλών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την συστολή στα ΛΜΚ [75, 89]. Είναι ήδη

γνωστό ότι τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια, που ενεργοποιούνται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές, εμπλέκονται στην ωρίμανση/τροποποίηση των ΛΜΚ του αναπνευστικού και κατά συνέπεια μπορούν να επηρεάσουν τον φαινότυπο των ΛΜΚ [7, 8].

Η παρούσα μελέτη εξετάζει την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στο φαινότυπο των ΛΜΚ. Η μελέτη έγινε σε καλλιέργειες ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της ακετυλοχολίνης και καρβαχόλης στη μορφολογία των ΛΜΚ, στην έκφραση των πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου α-ακτίνη, MHC και δεσμίνη όπως και στην έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων M_2 και M_3 στα απομονωμένα ΛΜΚ. Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά τις αλλαγές που υφίσταται ο φαινότυπος των ΛΜΚ των αεραγωγών, υπό την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών (ακετυλοχολίνη-καρβαχόλη) σε καλλιέργειες ΛΜΚ του αναπνευστικού.

Από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα φαίνεται ότι η στέρηση ορού από το υλικό καλλιέργειας «στρέφει» τα ΛΜΚ προς τον συσταλτό φαινότυπο ενώ η παρουσία ορού «στρέφει» τα ΛΜΚ προς τον συνθετικό [75, 90]. Για τον λόγο αυτό, στα πειράματά μας τα ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ή παρουσία 10% FBS όπως και παρουσία των μουσκαρινικών αγωνιστών ακετυλοχολίνη (ACh $10^{-5}M$) ή καρβαχόλη (CCh $3 \times 10^{-7}M$) για 3-15 ημέρες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η ACh ή η CCh άλλαξε την μορφολογία των ΛΜΚ. Σε αυτές τις συνθήκες τα ΛΜΚ εμφανίζονται πεπλατυσμένα και μοιάζουν με τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS, εμφανίζουν δηλαδή συνθετικό φαινότυπο. Οι αλλαγές ήταν εμφανέστερες την 7^η και 15^η ημέρα. Η μεταβολή στη μορφολογία των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων που επάγεται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές συνοδεύτηκε από ελαττωμένη έκφραση των συσταλών πρωτεϊνών α-ακτίνη, MHC και δεσμίνη, όπως έδειξε η εφαρμογή των μεθόδων του έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western στα ΛΜΚ (διαγράμματα 1-6). Τα αποτελέσματα της μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα μελέτης των Gosens και συν., που έγινε σε παρασκευάσματα τραχείας βούς και έδειξαν ελάττωση της έκφρασης των συσταλών πρωτεϊνών MHC και ακτίνη, μετά από 8 μέρες επώασης των παρασκευασμάτων με τον μουσκαρινικό αγωνιστή μεταχολίνη [83, 91].

Όσο αφορά την έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων, μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνθετικός φαινότυπος των ΛΜΚ συνοδεύεται από αύξηση των M_2 και

ελάττωση των M_3 υποδοχέων στη μεμβράνη των κυττάρων [35]. Στην παρούσα μελέτη η έκφραση των M_3 υποδοχέων μελετήθηκε με πειράματα δέσμησης ραδιενεργής [^3H]NMS σε μεμβράνες ΛΜΚ. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν μειωμένη έκφραση των M_3 στα ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες παρουσία ACh (10^{-5}M) στο θρεπτικό υλικό. Παρόμοια ελάττωση δεν παρατηρήθηκε και στα ΛΜΚ κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού, όπως έχει δείξει μελέτη άλλων ερευνητών σε κύτταρα με συνθετικό φαινότυπο. Σε αυτή τη μελέτη λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας βοός καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ορό και η έκφραση των M_3 υποδοχέων εξετάστηκε έμμεσα προσδιορίζοντας τα επίπεδα της φωσφορικής ινοσιτόλης [35]. Η διαφορά που προκύπτει από την σύγκριση των αποτελεσμάτων αποδίδεται ίσως στα κύτταρα που προέχονται από διαφορετικά είδη και στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της έκφρασης των υποδοχέων.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων μελετών που έχουν δείξει ότι η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών στους μουσκαρινικούς αγωνιστές μειώνεται είτε σε κύτταρα με συνθετικό φαινότυπο από ασθματικά μοντέλα είτε σε κύτταρα από καλλιέργειες κυττάρων που έχουν επωαστεί με μουσκαρινικό αγωνιστή. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί εξασθένηση της ανταπόκρισης των λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας βοός, στη μεταχολίνη, όταν επώαστηκαν με ορό και μεταχολίνη για 8 ημέρες [91]. Επίσης στα *in vitro* ασθματικά μοντέλα από ανθρώπους ή ζώα (επίμυες, βόα ή ινδικά χοιρίδια) έχει παρατηρηθεί ότι η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών, στην οποία αυξάνει η μάζα των ΛΜΚ και τα ΛΜΚ αποκτούν συνθετικό φαινότυπο, προστατεύει από την υπερβολική στένωση των αεραγωγών, λόγω της μειωμένης ανταποκρισιμότητας των ΛΜΚ στους μουσκαρινικούς αγωνιστές (π.χ ακετυλοχολίνη, καρβαχόλη, ισταμίνη) [92, 93, 94, 95].

Η έκφραση των M_2 εξετάστηκε προσδιορίζοντας τα επίπεδα του M_2 mRNA με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT - PCR) στα ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων που καλλιεργήθηκαν για 15 ημέρες απουσία ή παρουσία FBS 10%, ACh ή CCh. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η επώαση των ΛΜΚ με ακετυλοχολίνη ή ορό δεν μετέβαλε τα επίπεδα του mRNA των M_2 υποδοχέων. Τα αποτελέσματα αυτά δεν βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά μελετών σε καλλιέργειες ανθρώπινων ΛΜΚ αναπνευστικού [96] και σε καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας σκύλου [97], που έδειξαν ελάττωση των M_2 υποδοχέων όταν τα κύτταρα επώαστηκαν

απουσία ορού. Η έκφραση των M₂ υποδοχέων εξετάστηκε στην πρώτη μελέτη προσδιορίζοντας τα επίπεδα της φωσφορικής ινοσιτόλης και στη δεύτερη μελέτη με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας με τις προαναφερόμενες μελέτες μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει διαφορά στα επίπεδα του mRNA και της τελικής ποσότητας της πρωτεΐνης. Η τελική έκφραση των πρωτεϊνών εξαρτάται από τα επίπεδα του mRNA, την σταθερότητα του mRNA και τους μετά-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Οι παραπάνω διαδικασίες υπόκεινται σε ρύθμιση από εσωτερικούς ή/και εξωτερικούς παράγοντες [98, 99].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές (ακετυλοχολίνη και καρβαχόλη) προκαλούν μετάπτωση του φαινότυπου των ΛΜΚ των αεραγωγών σε λιγότερο συσταλτό φαινότυπο που συνοδεύεται από μείωση στην έκφραση των M₃ υποδοχέων των ΛΜΚ.

Σύμφωνα με αυτό το συμπέρασμα, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές στρέφουν τα ΛΜΚ σε λιγότερο συσταλτά και ίσως προκαλούν και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ενώ, έως πρόσφατα στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές, μέσω της διέγερσης των M₃ μουσκαρινικών υποδοχέων παρόλο που οδηγούν στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP και PI3 κινασών, έχουν μιτογόνο δράση στα ΛΜΚ μόνο σε συνδυασμό με αυξητικούς παράγοντες [35]. Με την μεταφορά του παρόντος συμπεράσματος στην παθοφυσιολογία της αναδιαμόρφωσης προκύπτει ότι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές συμβάλλουν στην παθογένεια της αναδιαμόρφωσης στις χρόνιες φλεγμονώδεις πνευμονοπάθειες ΧΑΠ και άσθμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), χαρακτηρίζονται από αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών. Η ακετυλοχολίνη στους αεραγωγούς, αποτελεί παρασυμπαθητικό νευροδιαβιβαστή όπως και αυτοκρινή/παρακρινή ορμόνη που εκκρίνεται από μη νευρωνικά κύτταρα: κύτταρα της φλεγμονής και δομικά κύτταρα των αεραγωγών. Η σύσπαση των αεραγωγών και η έκκριση βλέννης στους αεραγωγούς είναι βασικές γνωστές λειτουργίες, που ελέγχονται από την ακετυλοχολίνη. Επιπροσθέτως, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ακετυλοχολίνη μέσω της διέγερσης των μουσκαρινικών υποδοχέων ρυθμίζει την χημειοταξία και την διέγερση των κυττάρων της φλεγμονής και συμμετέχει στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών.

Μία από τις σημαντικότερες παθολογικές δομικές αλλαγές που συμβαίνει κατά την διαδικασία της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος των αεραγωγών είναι η υπερπλασία/υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ), η οποία οδηγεί σε αύξηση της μάζας του μυϊκού χιτώνα. Κατά την αναδιαμόρφωση τα ΛΜΚ απαντούν σε ερεθίσματα από το φλεγμονώδες περιβάλλον και μεταβάλλουν τον φαινότυπό τους σε λιγότερο συσταλτό ή συνθετικό. Επομένως τα ΛΜΚ εκτός από την κύρια λειτουργική τους ιδιότητα την συστολή (συσταλτό φαινότυπο), μπορούν με την μετάπτωση του φαινότυπου σε συνθετικό να πολλαπλασιάζονται, να συνθέτουν και να εκκρίνουν ουσίες (συνθετικό φαινότυπο), που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και συντήρηση της φλεγμονής στους αεραγωγούς.

Επειδή η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων μπορεί να ενεργοποιήσει σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ωρίμανση/τροποποίηση των ΛΜΚ, θεωρήθηκε σημαντική η μελέτη της επίδρασης των μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο των ΛΜΚ των αεραγωγών. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα ΛΜΚ επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, με 10% ορό εμβρύου βοός (10% FBS), 10^{-5} M ακετυλοχολίνη (ACh) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλη (CCh) για 3-15 ημέρες. Οι μεταβολές στην μορφολογία των ΛΜΚ παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Η έκφραση των πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν τον συσταλτό φαινότυπο, α-ακτίνη, βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (MHC) και δεσμίνη, μελετήθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τέλος, η έκφραση των μουσκαρινικών M_2 υποδοχέων διερευνήθηκε με

ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) και η έκφραση των M_3 υποδοχέων εξετάστηκε με τη μέθοδο της δέσμευσης της [*N*-methyl- 3 H]scopolamine ($[^3$ H]NMS) στις μεμβράνες των απομονωμένων ΛΜΚ.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι τα ΛΜΚ υπό την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών (ακετυλοχολίνη και καρβαχόλη) αποκτούν πεπλατυσμένο σχήμα, παρόμοιο με αυτό των ΛΜΚ που καλλιεργούνται παρουσία 10%FBS. Η έκφραση των πρωτεϊνών α-ακτίνη, δεσμίνη και MHC ελαττώνεται στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία ACh και CCh κυρίως μετά την 7^η ημέρα καλλιέργειας όπως και στα ΛΜΚ που καλλιεργούνται παρουσία 10% FBS. Τέλος, ελαττώθηκε η έκφραση των M_3 στα ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες παρουσία ACh, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην έκφραση του mRNA των M_2 υποδοχέων.

Συμπερασματικά, η μακροχρόνια (έως 15 μέρες) καλλιέργεια των ΛΜΚ βρόγχου ανθρώπου με μουσκαρινικούς αγωνιστές οδηγεί σε μετάπτωση του φαινότυπου των ΛΜΚ σε λιγότερο συσταλτό φαινότυπο και η μετάπτωση αυτή συνοδεύεται από μείωση στην έκφραση των M_3 υποδοχέων.

ABSTRACT

Chronic airway diseases, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exhibit some common features like increased parasympathetic activity and acetylcholine release, and airway remodeling. Acetylcholine is the primary parasympathetic neurotransmitter in the airways and an autocrine/paracrine secreted hormone from non-neuronal origins, including inflammatory cells and airway structural cells. In addition to the well-known functions of acetylcholine bronchoconstriction and mucus secretion, it is increasingly evident that acetylcholine regulates inflammatory cell chemotaxis and activation, and also participates in signaling events leading to chronic airway wall remodeling in chronic obstructive airway diseases. Increased airway smooth muscle mass is one of the most important pathological features of remodeling.

Airway smooth muscle (ASM) instead of solely being a contractile partner, is capable of interacting dynamically with its environment, especially under inflammatory conditions. Airway smooth muscle cells (ASMCs) are able to proliferate, to migrate, and to secrete chemokines, cytokines, extracellular matrix proteins and growth factors, and most important to adapt to these functions by changing its phenotype from contractile to proliferative/synthetic.

As muscarinic receptors are activated by acetylcholine in the ASMCs and acetylcholine appear to be related to inflammation and remodeling in airways, we assume that muscarinic agonists could affect ASMC phenotype. To test this hypothesis we investigate the effect of muscarinic agonists acetylcholine or carbachol on ASMC phenotype, obtained from human bronchi and cultured in the presence or absence of 10% FBS, acetylcholine or carbachol for 3 to 15 days. Cell phenotype was studied by reverse optical microscopy. Indirect immunofluorescence optical microscopy and Western blot analysis, using smooth muscle α -actin, desmin and Myosin Heavy Chain (MHC) antibodies were used to study the expression of contractile phenotype proteins (α -actin, MHC and desmin). qRT-PCR and binding of [*N*-methyl-³H]scopolamine in isolated ASMCs were performed to investigate the expression of M₂ and M₃ receptors respectively. The results showed that the ASMCs incubated in the presence of FBS, acetylcholine or carbachol appear flat and reduce the expression of α -actin, MHC or desmin in contrast to the culture in serum free

medium. Treatment of ASMCs with acetylcholine for 3-15 days decreased M₃ receptor expression.

In conclusion, in ASM obtained from human bronchi muscarinic agonists induce a shift toward a less contractile phenotype. This shift was accompanied by downregulation of M₃ receptors.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **McGeown JG, Μολυβδάς ΠΑ, Γουργουλιάνης Κ, Χατζηευθυμίου Α.** Συνοπτική Φυσιολογία του ανθρώπου. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη.
2. **Junqueira LC, Carneiro J.** Basic Histology Text and Atlas, 11th edition 2005, chapter 8.
3. **André Schmitz, Markus Bö.** On a phenomenological model for active smooth muscle contraction. *J of Biomech* 2011. 44, (11): 2090–2095.
4. **Reisseisen FD, Hecker JFC.** Uber den bau der lungen. Eine von der Koniglichen akademie der wissenschaften zu Berlin gekronte preisschrift... Mit 6 colorirten kupfertafeln. Berlin, 1822.
5. **James A, Carroll N.** Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J* 2000. 15(4): 782-789.
6. **Berne RM, Levy MN.** Αρχές Φυσιολογίας. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
7. **Halayko AJ, Tran T, Gosens R.** Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc* 2008. 5: 80-88.
8. **Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T.** Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther* 2009. 22: 370-378.
9. **Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R.** Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009. 6(8): 683-92.
10. **Postma DS, Timens W.** Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006. 3(5): 434-9.
11. **Q Gu, L-Y Lee.** Neural control of airway smooth muscle, *Neurophysiology* 2006, 138-144.
12. **Amrani Y, Panettieri RA.** Airway smooth muscle: contraction and beyond. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003. 35(3): 272–276.
13. **Barnes PJ.** Autonomic Control of the Lower Airways. *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)* 2012, 41. 201–204.
14. **Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC.** Neural and Humoral Control of the Airways. *Asthma and COPD, Basic Mechanisms and Clinical Management, Second Edition* 2009. 381–397.

15. **Improgo MR, Tapper AR, Gardner PD.** Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. *Biomech Pharm* 2011. 82(8): 1015-1021.
16. **Bianca M. Conti-Fine DN, Sijin Lei, Arno DJ.** Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells. New mediators of tobacco toxicity? *Europ J Pharmacol* 2000. 393(1-3): 279-294.
17. **Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P.** Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 2008. 29(3): 151-158.
18. **Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG.** The cholinergic anti-inflammatory pathway: A missing link in Neuroimmunomodulation. *Molec Med* 2003. 9(5-8): 125-134.
19. **Kolahian S, Gosens R.** Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. *J Allergy* 2012. 2012: 1-9.
20. **Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, Spindel ER.** Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 2004. 145(5): 2498–506.
21. **Nathanson NM.** Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2004, volume 2: 775-777.
22. **Richelson C, Elliot H.** Cholinergic Transduction. *Psychopharmacology. The Fourth Generation of progress.* American College of Neuropsychopharmacology 2002. [http:// acnp.org](http://acnp.org).
23. **Deshpande DA, Penn RB.** Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cell Signal* 2006. 18(12): 2105–2120.
24. **Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ.** Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006. 7(1): 1-15.
25. **Roffel AF, Meurs H, Zaagsma J.** Identification, localization and function of muscarinic receptor subtypes in the airways. In *Muscarinic Receptors in Airways Diseases*. Volume 2001:63-87.
26. **Belmonte KE.** Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005. 2(4): 297-304.

27. **Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racké K.** Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006. 35(6): 621-7.
28. **Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, Racké K.** MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation. *Life Sci.* 2007. 80(24-25): 2259-62.
29. **Barnes PJ.** The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 2004. 117(12A): 24S-32S.
30. **Mak JCW, Haddad EB, Buckley NJ, Barnes PJ.** Visualization of muscarinic M4 mRNA and M4 receptor subtype in rabbit lung. *Life Sci* 1993. 53 (19): 1501–1508.
31. **Meurs H, Roffel AF, Elzinga CR, Zaagsma J.** Muscarinic receptor-beta-adrenoceptor cross-talk in airways smooth muscle. *Muscarinic Receptors in Airways Diseases* 2001: 121– 157.
32. **Hirshman CA, Lande B, Croxton TL.** Role of M2 muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction. *Life Sci* 1999. 64(6, 7): 443-448.
33. **Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T.** The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* 2005. 280(12): 11134-11139.
34. **Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA Jr, Penn RB.** Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000. 23(4): 546-554.
35. **Gosens R, Nelemans SA, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Zaagsma J, Meurs H.** Muscarinic M3-receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003. 28(2): 257-262.
36. **Ediger TL, Schulte NA, Murphy TJ, Toews ML.** Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2003. 21(5): 759-769.
37. **Halayko AJ, Solway J.** Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001, 90(1): 358-368.

38. **Kelleher MD, Abe MK, Chao TSO, Jain M, Green JM, Solway J, Rosner MR, Hershenson MB.** Role of MAP kinase activation in bovine tracheal smooth muscle mitogenesis. *Am J Physiol* 1995. 268(6): L894-L901.
39. **Wessler I, Kirkpatrick CJ.** Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008. 154(8): 1558–71.
40. **Kummer W, Lips KS, Pfeil U.** The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 2008. 130(2): :219–34.
41. **Mitchelson FM, Ziegler A.** The effect of gallamine, gallopamil and nifedipine on responses to acetylcholine and carbachol in the taenia of the guinea pig caecum. *Br J Pharmacol* 1984, 83(1): 145-155.
42. **Amrani Y, Panettieri RA.** Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 2003. 35(3):272-6.
43. **Vignola A, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G.** Airway Remodeling in Asthma. *Chest* 2003, 123:417-422.
44. **Rennard S.** Repair mechanisms in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(6): S278-S286.
45. **Kim V, Rogers TJ, Criner GJ.** New concept in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008. 5(4): 478-485.
46. **Hirst SJ.** Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003. 137(2-3), 309– 326.
47. **Jeffery PK.** Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001. 164(2): 28S– 38S.
48. **Bentley JK, Hershenson MB.** Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 2008. 5:89-96.
49. **Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri Jr RA, Johnson M.** Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004. 114(2):S32–50.
50. **Stewart AG, Bonacci JV, Chan V, Quan L.** Factors controlling airway smooth muscle proliferation in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004. 4(2):109-15.
51. **Halayko AJ, Amrani Y.** Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003. 137(2-3): 209– 222.

52. **Munakata M.** Airway Remodeling and Airway Smooth Muscle in Asthma. *Allergol Internation* 2006. 55:235-243.
53. **Ma X, Li W, Stephens NL.** Heterogeneity of airway smooth muscle at tissue and cellular levels. *Can J Physiol Pharmacol* 1997. 75(7): 930–9355.
54. **Owens GK.** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995. 75: 487–517.
55. **Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.** The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979. 59(1): 1–61.
56. **Wright DB, Trian T, Siddiqui S, Pascoe CD, Johnson JR, Dekkers BGJ, Bagchi R, Burgess JK, Kanabar V, Ojo OO.** Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulm Pharmacol & Therap* 2012. Online.
57. **Halayko AJ, Salari H, Ma X, Stephens NL.** Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996. 270(6): L1040–1051.
58. **Halayko AJ, Tran T, Gosens R.** Phenotype and Functional Plasticity of Airway Smooth Muscle Role of Caveolae and Caveolins. *Proc Am Thorac Soc* 2008. 5(1): 80-88.
59. **Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, McNeill KD, Yamasaki A, Gerthoffer WT, Unruh H, Soussi-Gounni A, Zaagsma J, Halayko AJ.** Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006. 291(3): L523–L534.
60. **Mitchell RW, Halayko AJ, Kahraman S, Solway J, Wylam ME.** Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes. *Am J Physiol* 2000. 278(5): L1091–L1100.
61. **Gosens, R., Meurs, H., Grootte Bromhaar, M.M., McKay, S., Nelemans, S.A., Zaagsma, J.** Functional characterization of serum- and growth factor-induced phenotypic changes in intact bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002. 137(4): 459– 466.
62. **Hirst SJ, Walker TR, Chilvers ER.** Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation asthma. *Eur Respir J* 2000. 16: 159-177.
63. **Hirst SJ, Twort CH, Lee TH.** Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000. 23: 335–344.

- 64. Dekkers BG, Schaafsma D, Nelemans SA, Zaagsma J, Meurs H.** Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007. 292(6): L1405–L1413.
- 65. Gosens R, Nelemans SA, Hiemstra M, Grootte Bromhaar MM, Meurs H, Zaagsma J.** Insulin induces a hypercontractile airway smooth muscle phenotype. *Eur J Pharmacol* 2003. 481(1): 125–131.
- 66. Tran T, McNeill KD, Gerthoffer WT, Unruh H, Halayko AJ.** Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation. *Respir Res* 2006. 7(117): 1-15.
- 67. Solway J, Forsythe SM, Halayko AJ, Vieira JE, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B.** Transcriptional regulation of smooth muscle contractile apparatus expression. *Am J Respir Crit Care Med* 1998. 158(5): S100–S108.
- 68. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R.** Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 2003. 113(3): 329–342.
- 69. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK.** Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 2001. 276(1): 341–347.
- 70. Wheaton K, Riabowol K.** Protein kinase C delta blocks immediate-early gene expression in senescent cells by inactivating serum response factor. *Mol Cell Biol* 2004. 24(16): 7298-311.
- 71. Qiu P, Feng XH, Li L.** Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF-beta1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol* 2003. 5(12): 1407-20
- 72. Liu ZP, Wang Z, Yanagisawa H, Olson EN.** Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* 2005. 9(2) :261–270.
- 73. Stewart AG, Bonacci JV, Quan L.** Factors controlling airway smooth muscle proliferation in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004. 4(2) :109–15.
- 74. Wang Z, Wang DZ, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN.** Myocardin and ternary complex factors complete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 2004. 428(6979): 185-189.

75. **Roy J, Kazi M, Hedin U, Thyberg J.** Phenotype modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differentiation* 2001. 67(1-2): 50-58.
76. **Gosens R, Dueck G, Gerthoffer WT, Unruh H, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ.** p42/p44 MAP kinase activation is localized to caveolae-free membrane domains in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007. 292(5): L1163–L1172.
77. **Borger P, Tamm M, Black JL, Roth M.** Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006. 174(4): 367–372.
78. **Simon AR, Takahashi S, Severgnini M, Fanburg BL, Cochran BH.** Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002. 282(6), L1296-1304.
79. **Nguyen TT, Ward JP, Hirst SJ.** Beta1-integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. 171(3): 217-223.
80. **Gosens R, Zaagsma J, Bromhaar MG, Nelemans A, Meurs H.** Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodeling? *Europ J Pharmacol* 2004. 500: 193-201.
81. **Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Solway J.** The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003. 29(1): 39–47.
82. **Liu HW, Kassiri K, Voros A, Hillier CT, Wang L, Solway J, Halayko AJ.** Gq receptor coupled signaling induces RHO-dependent transcription of smooth muscle specific genes in cultured canine airway myocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002. 165: A670-675.
83. **Gosens R, Grootte Bromhaar MM, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, Meurs H.** Muscarinic M3 receptordependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype. *Br J Pharmacol* 2004. 141(6): 943– 950.

- 84. Gosens R, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H.** Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. 171(10): 1096-102.
- 85. Orsini MJ, Krymskaya VP, Eszterhas AJ, Benovic JL, Panettieri JR, Penn RB.** MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle cell: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am J Physiol* 1999. 277: L479-488.
- 86. Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ.** A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1989. 67(6): 2461-5.
- 87. Coulson FR, Fryer AD.** Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 2003. 98(1): 59-69.
- 88. Steinfeld T, Pulido-Rios T, Armstrong S, Hegde SS.** In Vitro Muscarinic Receptor Radioligand-Binding Assays. *Curr Protoc Pharmacol* 2010. Chapter 1: Unit 1.33.
- 89. Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K.** Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1999. 145(4): 727–740.
- 90. Ma X, Wang Y, Stephens NL.** Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998. 274(5 Pt1): C1206-14.
- 91. Gosens R, Schaafsma D, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA.** Role of Rho-kinase in maintaining airway smooth muscle contractile phenotype. *Eur J Pharmacol* 2004. 483(1): 71-78.
- 92. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burges JK, Black JL.** Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001. 164(3): 474–477.
- 93. Ma X, Cheng Z, Kong H, Wang Y, Unruh H, Stephens NL, Laviolette M.** Changes biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002. 283(6): L1181–1189.

- 94. Meurs H, Gosens R, Zaagsma J.** Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from *in vitro* model systems and animal models. *Eur Respir J* 2008. 32(2): 487-502.
- 95. Bai TR.** Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. A comparison between trachea and bronchus. *Am Rev Respir Dis* 1991. 143(2). 441-443.
- 96. Widdop S, Daykin K, Hall IP.** Expression of muscarinic M2 receptors in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993. 9 (5): 541–546. Abstract.
- 97. Mitchell RW, Halayko AJ, Kahraman S, Solway J, Wylam ME.** Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M3 receptors in contractile cultured airway myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000. 278(5): L1091-1100.
- 98. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M.** Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale . *Genome Biol* 2003. 4(9): 117.
- 99. Baldi P, Long AD.** A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 2001. 17(6): 509-519.

