



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ρόλος των ιοντικών διαύλων στην ανταποκρισιμότητα και τον
πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αγγείων**

Μαλαβάκη Χριστίνα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αηδονίδης Ισαάκ, Επίκουρος Καθηγητής
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος, 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

The implication of ion voltage in responsiveness and proliferation of vascular smooth muscle cells

By
Malavaki Christina

Examination Committee

- Apostolia Hatziefthimiou, Associate Professor (Supervisor)
- Isaak Aidonidis, Assistant Professor
- Anastasios Germenis, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications in Molecular Medicine

Larissa, October, 2015

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος-Ευχαριστίες	4
Συντμήσεις	6
Περίληψη	7
Abstract	8
Εισαγωγή	9
Γενικό μέρος.....	10
1. Λείος μυϊκός ιστός	10
2. Μοριακοί μηχανισμοί σύσπασης-χάλασης των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ).....	14
3. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ	21
4. Ιοντικοί διάλυτοι στα ΛΜΚ- Ο ρόλος τους στη φυσιολογία των ΛΜΚ	23
5. Νευροδιαβιβαστές που εμπλέκονται στη σύσπαση των ΛΜΚ	28
6. Ο ρόλος του ενδοθηλίου στον τόνο των ΛΜΚ	29
Ειδικό μέρος.....	32
Υλικά και μέθοδοι.....	32
1. Χειρισμός πειραματόζων	32
2. Απομόνωση αορτής και πειράματα συστολών	32
3. Δημιουργία και διατήρηση πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚ αορτής κονίκλων	38
4. Μελέτη του πολλαπλασιασμού λείων μυϊκών κυττάρων αορτής	39
5. Μελέτη της κινητικότητας λείων μυϊκών κυττάρων αορτής	40
6. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	40
Αποτελέσματα	42
1. Επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνη, στην επαγόμενη από φαινυλεφρίνη σύσπαση αορτικών δακτυλίων κονίκλου.....	42
2. Επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνη στην επαγόμενη από χλωριούχο κάλιο σύσπαση αορτικών δακτυλίων κονίκλου	45
3. Σύγκριση της δράσης της λιδοκαΐνης στην επαγόμενη από φαινυλεφρίνη ή χλωριούχο κάλιο σύσπαση αορτικών δακτυλίων κονίκλου	48
4. Επίδραση της λιδοκαΐνης, της νικαρδιπίνης και της γλιβενκλαμίδης στον πολλαπλασιασμό αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων.....	49
5. Επίδραση της λιδοκαΐνης, της νικαρδιπίνης και της γλιβενκλαμίδης στην κυτταρική κινητικότητα αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων.....	51
Συζήτηση	57
Βιβλιογραφία.....	63

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθηγήτριας κ. Απ. Χατζηευθυμίου. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Απ. Χατζηευθυμίου για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη στήριξη που μου προσέφερε, για την ανάθεση, την επίβλεψη και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεταπτυχιακής μου διατριβής, καθώς επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για τις συμβουλές της και τις συζητήσεις μας, πάνω από όλα, μου δίδαξε ένα νέο τρόπο ερευνητικής σκέψης, κάτι που αποτελεί πολύτιμο εφόδιο στην ζωή μου.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Ι. Αηδονίδη για την συνεργασία μας κατά την πορεία της μεταπτυχιακής μου διατριβής και για το ότι ήταν πάντα πρόθυμος να μου προσφέρει την επιστημονική του άποψη, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Α. Γερμενή μου με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια των σεμιναρίων και των παρουσιάσεων.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Στεφανίδη Ιωάννη, στην Αν. Καθηγήτρια κα Καρατζαφέρη Χριστίνα και στον Λέκτορα κ. Σακκά Γεώργιο για τη συνεργασία μας, την πολύτιμη ερευνητική τους καθοδήγηση και για τις επιστημονικές τους συμβουλές τους και συζητήσεις μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σταματίου Ροδόπη για την πολύτιμη βοήθειά της και στήριξή της σε οτιδήποτε χρειάστηκα στο εργαστήριο καθώς και να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους φίλους και συνεργάτες, Αρσενούλου Ζωή, Πέππα Βίκυ, Καραμπότση Νίκη, Τριανταφύλλου Ελένη, Jagirdar Ratz, Παπαδόπουλο Ελευθέριο και Μπόμπου Ευφροσύνη που μοιραστήκαμε τον ίδιο εργαστηριακό χώρο και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήσαν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, στον Τεχνικό κ. Μακαντάση Ιωάννη για τις πολύτιμες συμβουλές του, την σωστή τεχνική του καθοδήγηση που έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διατριβής, καθώς επίσης και στην κ. Νούτσου Βασιλική γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος για την πολύτιμη βοήθεια και την στήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, την οικογένειά μου, Ειρήνη, Ιωάννη, Γεώργιο, Μαρία και Χριστίνα για την στήριξη τους και την υπομονή τους, τις συμβουλές τους και γιατί σε κάθε βήμα της ζωής μου είναι κοντά μου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AC	αδενυλική κυκλάση
ADP	διφωσφορική αδενοσίνη
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cGMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
DAG	διάκυλογλυκερόλη
ERK	ρυθμιζόμενες από εξωκυττάριο σήμα κινάσες
FBS	ορός βόειου εμβρύου
GC	γουανυλική κυκλάση
G-proteins	GTP προσδετική πρωτεΐνη
Gi/s	ανασταλτική / διεγερτική πρωτεΐνη G
IP ₃	1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη
K _{ATP}	ATP-εξαρτώμενοι διάλυλοι καλίου
K _V	τασεο-εξαρτώμενοι διάλυλοι καλίου
MAPK	ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες
MLCK	κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
MLCP	φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
Phe	φαινυλεφρίνη
PKA	πρωτεϊνική κινάση A
PKC	πρωτεϊνική κινάση C
PIP ₂	διφωσφορική -4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
IP ₃	1,4,5 - τριφωσφορική ινοσιτόλη
RYR	υποδοχείς ρυανοδίνης
VDCC	τασεοεξαρτώμενοι διάλυλοι ασβεστίου
ΛΜΚ	λεία μυϊκά κύτταρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος των ιοντικών διαύλων στην ανταποκρισιμότητα και τον πολλαπλασιασμό/κινητικότητα των λείων μυϊκών ινών (ΛΜΚ) των αγγείων. Ειδικότερα μελετήθηκε η επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνης (10^{-9}M - 10^{-5}M) σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλου που βρίσκονταν σε σύσπαση με $2\mu\text{M}$ φαινυλεφρίνης ή 35mM KCl , καθώς και η επίδραση της λιδοκαΐνης, του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνης (10^{-7}M , 10^{-5}M) και του ανταγωνιστή των K_{ATP} διαύλων γλιβενκλαμίδης (10^{-8}M , 10^{-5}M) στον επαγόμενο από 10%FBS πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, και στην κινητικότητα των κυττάρων.

Η λιδοκαΐνη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη χάλαση των ΛΜΚ που βρίσκονται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη όσο ή KCl . Στα παρασκευάσματα που είναι σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη, η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου από το υγρό διαπότισης ελάττωσε σημαντικά τη χάλαση που προκάλεσε η λιδοκαΐνη. Οι τιμές της B_{max} ήταν $15.16 \pm 1.32\%$ και $11.64 \pm 0.69\%$ της επαγόμενης από την φαινυλεφρίνης σύσπασης παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου αντίστοιχα. Σε παρασκευάσματα που ήταν σε σύσπαση KCl , η προκαλούμενη από την λιδοκαΐνη (10^{-4}M) χάλαση ήταν μεγαλύτερη σε ιστό χωρίς ενδοθήλιο σε σύγκριση με την επίδρασή της σε ιστό με άθικτο ενδοθήλιο.

Η λιδοκαΐνη δεν επηρέασε τον επαγόμενο από 10%FBS πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Αντιθέτως τόσο η νικαρδιπίνη όσο και η γλιβενκλαμίδα σε συγκέντρωση 10^{-5}M τον ελάττωσαν σημαντικά. Η παρουσία λιδοκαΐνης στο υγρό της καλλιέργειας για 24h δεν μετέβαλλε την κινητικότητα των ΛΜΚ, ενώ μόνο τα 10^{-5}M λιδοκαΐνης αύξησαν την κινητικότητα των κυττάρων μετά από 48h σε σύγκριση με την κινητικότητα των ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία ορού και απουσία ανταγωνιστή. Αντιθέτως τόσο η νικαρδιπίνη όσο και η γλιβενκλαμίδα ελάττωσαν σημαντικά την κινητικότητα των ΛΜΚ.

Συμπερασματικά, οι τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι Na^+ φαίνεται να εμπλέκονται μόνο στην ανταποκρισιμότητα αλλά όχι στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Αντιθέτως οι τασεοεξαρτώμενοι διάυλοι Ca^{2+} και K_{ATP} διάυλοι είναι σημαντικοί για τον πολλαπλασιασμό και τη κινητικότητα των κυττάρων.

ABSTRACT

In this study we investigated the role of ion channels in the responsiveness and proliferation/migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs). Namely, we evaluated the effect of the antagonist of voltage dependent Na^+ channels, lidocaine (10^{-9} M- 10^{-5} M) on pre-contracted rabbit aortic rings with phenylephrine $2\mu\text{M}$ or 35mM KCl. Also, we studied the effect of lidocaine, the antagonist of voltage dependent Ca^{+2} channel blockers nicardipine (10^{-7}M , 10^{-5}M) and the K_{ATP} channel antagonist glibenclamide (10^{-8}M , 10^{-5}M) on the proliferation/migration of SMCs induced 10% FBS with MTT method and wound healing assay.

Lidocaine caused a dose-dependent relaxation of the rabbit aortic VSMCs pre-contracted with phenylephrine or KCl. In preparations pre-contracted with phenylephrine, the removal of calcium ions from extracellular fluid significantly decreased the lidocaine-induced relaxation of aortic rings. The values of the maximum relaxation (B_{max}) were $15.16\%\pm 1.32\%$ and $11.64\pm 0.69\%$ of the phenylephrine-induced contraction in the presence and absence of calcium ions, respectively. The relaxation of KCl pre-contracted aortic rings induced by lidocaine at the concentration of 10^{-4}M was greater in preparations without endothelium compared to its effect on endothelium intact.

Lidocaine did not affect the proliferation of SMCs induced by 10%FBS. Instead, both nicardipine and glibenclamide at the concentration of 10^{-5}M , significantly reduced proliferation of VSMCs. The presence of lidocaine in cell culture medium for 24h did not alter the migration of VSMCs and only the high concentration of lidocaine, 10^{-5}M , increased the cell motility after 48h compared with the mobility of VSMCs cultured only in the presence of 10%FBS. On contrary, both nicardipine and glibenclamide decreased significantly the migration of VSMCs induced by 10% FBS.

In conclusion, the voltage dependent Na^+ channels appear to be involved only in the responsiveness but not in the proliferation of VSMCs. On the other hand, both voltage dependent Ca^{+2} channels as well as K_{ATP} channels are important for the proliferation and mobility of VSMCs.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μετακίνηση των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι ένας σημαντικός μηχανισμός στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας ή στην ενεργοποίηση του κυττάρου. Τα ιόντα διαπερνούν τη μεμβράνη με την βοήθεια διαύλων. Οι διάυλοι των ιόντων ανοίγουν ή κλείνουν εξαρτώμενοι από διαφορετικούς παράγοντες και συμμετέχουν στη ρύθμιση πρωτεϊνών που ελέγχουν την ηλεκτρική δραστηριότητα κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών. Στη μεμβράνη των λείων μυϊκών ιών έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι διαύλων ασβεστίου: οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης και ονομάζονται δυναμικοευαίσθητοι διάυλοι ή τασεοεξαρτώμενοι διάυλοι ασβεστίου και οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση αγωνιστή με την πρωτεΐνη του.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) των αγγείων έχουν την ικανότητα διαίρεσης είτε στο πλαίσιο της φυσιολογικής λειτουργίας τους, είτε ως απάντηση σε βλάβη. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, που βρίσκονται στην υπενδοθηλιακή στιβάδα, παράγουν πληθώρα ουσιών: αυξητικούς παράγοντες, ανασταλτικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες. Στόχος των παραγόντων αυτών είναι τα ΛΜΚ του μέσου χιτώνα, τα οποία υπό την επίδρασή τους πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης, δηλαδή υπόκειται σε μια φαινοτυπική αλλαγή που τους προσδίδει μεταναστευτικό και εκκριτικό χαρακτήρα. Η αγγειακή βλάβη προάγει την ανάπτυξη των ΛΜΚ διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στη διέγερση και την αναστολή. Η κατευθυνόμενη μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ είναι γεγονότα κλειδιά στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης και επαναστένωσης. Νέα ΛΜΚ μπορούν να σχηματιστούν είτε από διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων του έξω χιτώνα των αγγείων, είτε και από τη διαφοροποίηση και άλλων μεσεγχυματογενών κυττάρων.

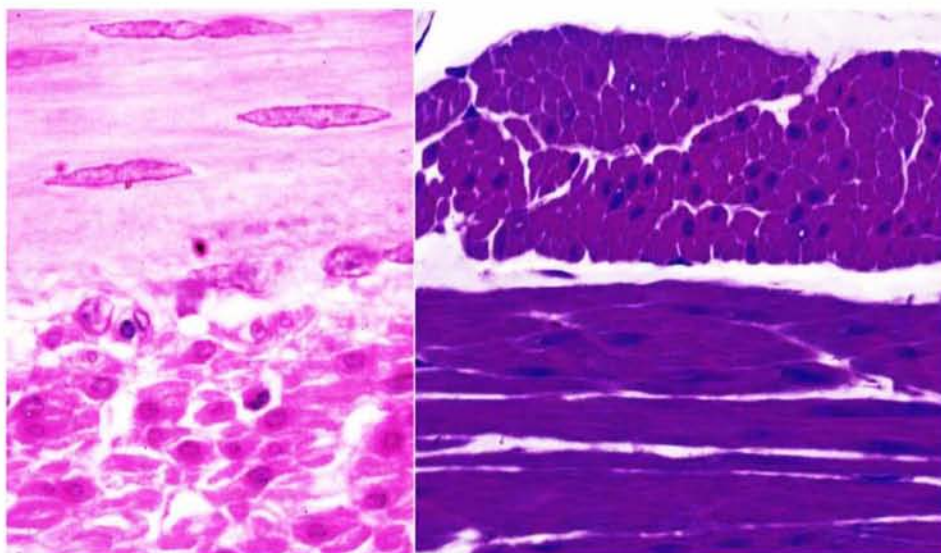
Η πιο γνωστή λειτουργία του ενδοθηλίου είναι η δράση του ως διαπερατός φραγμός ανταλλαγής και ενεργητικής μεταφοράς ουσιών. Οι σημαντικότερες λειτουργίες του ενδοθηλίου των αγγείων είναι εκκριτικές και στατικές. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν: η ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της μορφολογίας του αγγείου, ο έλεγχος της αιμόστασης και της φλεγμονής, η συμβολή στη ανάπτυξη νέων αγγείων καθώς και η ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας. Στην δεύτερη κατηγορία, στις στατικές, ανήκει η ενεργητική μεταφορά ουσιών (πρωτεϊνών, λιπιδίων) καθώς και η μεταβολική λειτουργία αγγειοτενσίνης I και κατεχολαμινών. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών με τροποποιητική δράση στον τόνο του υποκείμενου μυϊκού χιτώνα, καθώς και την παραγωγή νέων ουσιών που ασκούν αναβολική δράση στα μυοκύτταρα των αγγείων, με τελικό αποτέλεσμα την επαναδιαμόρφωση της αγγειακής δομής (vascular remodeling).

Η αυξημένη ανταποκρισιμότητα των ΛΜΚ των αγγείων σε συσπαστικούς παράγοντες όπως και ο πολλαπλασιασμός τους παρατηρείται συχνά σε παθήσεις όπως η υπέρταση ή ο διαβήτης. Στην θεραπεία των παθήσεων αυτών συχνά χρησιμοποιούνται ανταγωνιστές των ιοντικών διαύλων. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου των ιοντικών διαύλων στην ανταποκρισιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΚ με τη χρήση του ανταγωνιστή των διαύλων αυτών, λιδοκαΐνη, που ανήκει στην κατηγορία των αμινοαμιδίων και χρησιμοποιείται τόσο ως τοπικό αναισθητικό όσο και ως αντιαρρυθμικό φάρμακο. Με πειράματα συστολών μελετήθηκε η επίδραση της λιδοκαΐνης σε ΛΜΚ που είναι σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη (παρουσία και απουσία ασβεστίου), ή KCl (παρουσία και απουσία του ενδοθηλίου στους αορτικούς δακτυλίους). Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ και Ca^{2+} όπως και των K_{ATP} διαύλων στον πολλαπλασιασμό/κινητικότητα των ΛΜΚ. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλην της λιδοκαΐνης, ο ανταγωνιστής των διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνη και ο ανταγωνιστής των K_{ATP} διαύλων γλιβενκλαμίδη. Η νικαρδιπίνη ανήκει στην κατηγορία των διυδροπυριδινών, και ως φάρμακο χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των μορφών της στηθάγχης που σχετίζονται με σπασμό των στεφανιαίων αγγείων καθώς και ως αντι-υπερτασικό φάρμακο. Η γλιβενκλαμίδη, που ανήκει στις σουλφονυλουρίες, είναι αντιδιαβητικό φάρμακο που πιθανόν παρεμποδίζει και τους L-τύπου διαύλους Ca^{2+} .

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

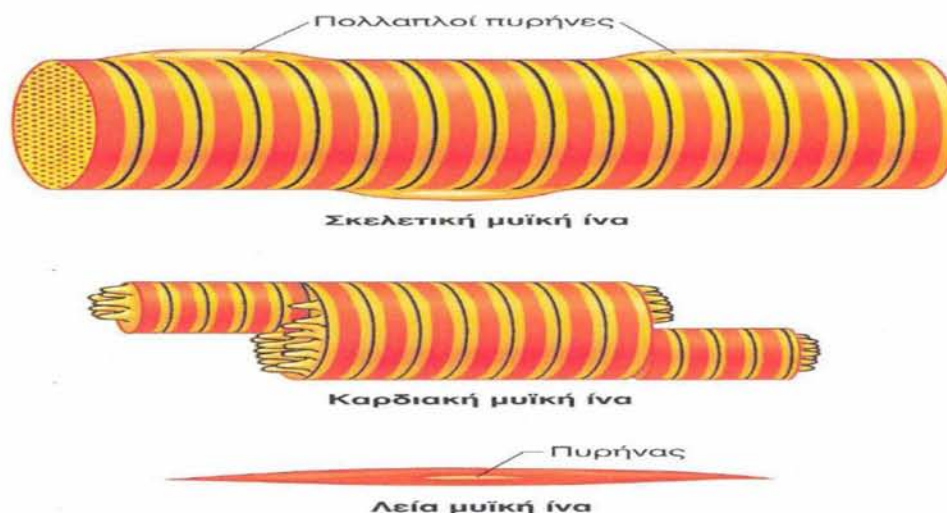
1. Λείος μυϊκός ιστός

Ο μυϊκός ιστός ταξινομείται με βάση την εμφάνιση των κυττάρων σε γραμμωτό και λείο μυϊκό ιστό. Στην πρώτη περίπτωση (Εικόνα 1) τα κύτταρα εμφανίζουν εγκάρσια γράμμωση στην παρατήρηση με φωτονικό μικροσκόπιο ενώ στη δεύτερη περίπτωση δεν παρατηρείται εγκάρσια γράμμωση (1). Επιπλέον, η κατηγορία του γραμμωτού μυϊκού ιστού διακρίνεται με βάση την εντόπιση σε σκελετικό, σπλαγγχνικό γραμμωτό μυϊκό ιστό και καρδιακό μυϊκό ιστό (Εικόνα 2).



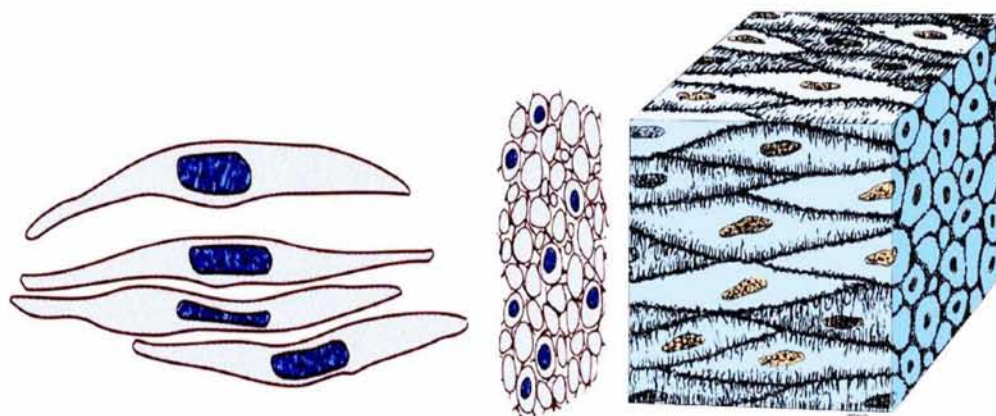
Εικόνα 1. Λείος μυϊκός ιστός σε επιμήκη και εγκάρσια διατομή, αριστερά με χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης και δεξιά με χρώση pararosaniline-toluidine blue. Διακρίνεται η ομοιόμορφη χρώση του κυτταροπλάσματος και η κεντρική θέση των πυρήνων των μυϊκών ινών. (Ανατύπωση από Ross MH., Pawlina W: Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5th edition, 2006)

Ο λείος μυϊκός ιστός νευρώνεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και δεν υπόκειται σε εθελούσιο έλεγχο (Guyton, Ιατρική φυσιολογία). Απαντά με τη μορφή στοιβάδων ή δεματίων επιμήκων, ατρακτοειδών κυττάρων, με λεπτά άκρα (λείες μυϊκές ίνες). Οι λείες μυϊκές ίνες έχουν διάμετρο 2-5μm και μήκος 20-500μm, σε αντίθεση με τις μυϊκές ίνες των γραμμωτών μυών, οι οποίες είναι μέχρι και 20 φορές μεγαλύτερες όσον αφορά τη διάμετρό τους και χιλιάδες φορές μεγαλύτερες όσον αφορά το μήκος τους (2). Το μήκος των λείων κυττάρων ποικίλλει από 20 μm στο τοίχωμα των μικρών αιμοφόρων αγγείων έως 200μm στο τοίχωμα της μήτρας κατά την κύηση. Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ακτίνης και μυοσίνης το κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων εμφανίζεται ομοιόμορφο με τις συνήθεις ιστοχημικές χρώσεις.



Εικόνα 2. Οι τρεις τύποι μυϊκών ινών. Υπογραμμίζεται η διαφορά στο μέγεθος. (Ανατύπωση από Vander A, Sherman J, Luciano D, Tsakopoulos M, Φυσιολογία του ανθρώπου, 8^η έκδοση, 2000)

Για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής επιστοίβαξης, το στενότερο τμήμα του ενός κυττάρου διατάσσεται κοντά στα ευρύτερα τμήματα γειτονικών του, με αποτέλεσμα σε κάθετη διατομή του ιστού να παρατηρείται μία σειρά περιμέτρων των κυττάρων, όπου μόνο οι μεγαλύτερες κατόψεις ινών περιέχουν πυρήνες (3). Οι πυρήνες εντοπίζονται στο κέντρο των κυττάρων και συχνά εμφανίζουν σπειροειδές σχήμα σε επιμήκη διατομή, που οφείλεται στη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη μονιμοποίηση του ιστού και διευκολύνει τη διάκρισή τους από παρακείμενους ινοβλάστες σε συνήθεις ιστολογικές τομές (Εικόνα 3).



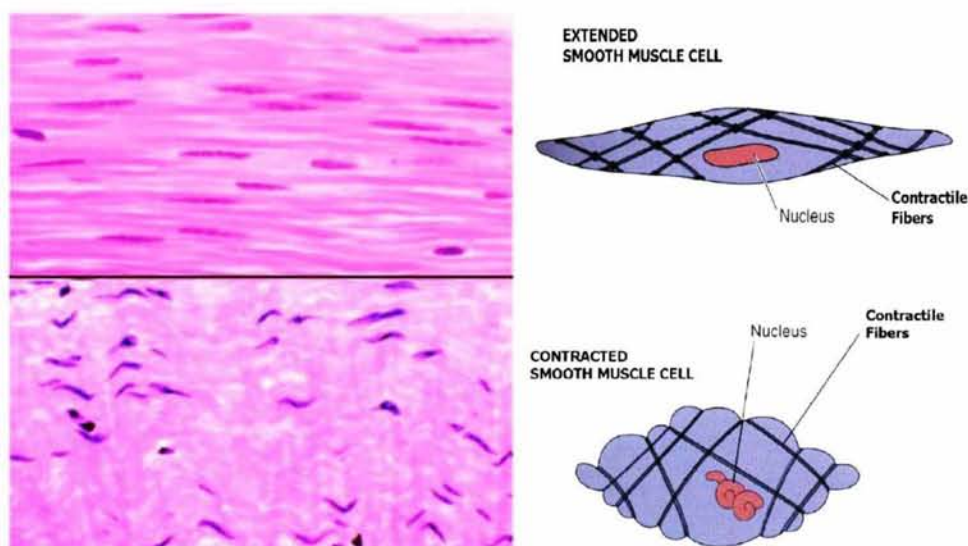
Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση μεμονωμένων λείων μυϊκών ινών (αριστερά), κάθετης τομής αυτών (κέντρο) και τρισδιάστατη απεικόνιση του λείου μυϊκού ιστού (δεξιά). (Ανατύπωση από Junqueira LC, Carneiro J: Basic Histology Text and Atlas, 11th edition, 2005)

Όταν τα κύτταρα δε βρίσκονται σε συστολή, οι πυρήνες εμφανίζονται ως επιμήκεις δομές με λεπτότερα άκρα που εντοπίζονται στο κεντρικό, μεγαλύτερο σε εύρος, τμήμα του κυττάρου. Η παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύπτει πως η πλειοψηφία των κυτταρικών οργανιδίων των λείων μυϊκών ινών είναι συγκεντρωμένη στους πόλους του πυρήνα. Σε αυτά

περιλαμβάνονται πολυάριθμα μιτοχόνδρια, δεξαμενές του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, ελεύθερα ριβοσώματα, κοκκία γλυκογόνου και μικρή συσκευή Golgi.

Οι λείοι μύες διακρίνονται σε πολυδύναμους και μονοδύναμους λείους μύες (μοναδιαία ή συγκυτιακά λεία μυϊκά κύτταρα) με βάση τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής μεμβράνης τους. Στους πολυδύναμους, χαρακτηριστικό είναι ότι η κάθε ίνα μπορεί να συστέλλεται ανεξάρτητα από τις άλλες και η ρύθμισή τους γίνεται κυρίως με νευρικές ώσεις. Λείοι μύες, όπως αυτοί της ίριδας του οφθαλμού, που έχουν πλούσια νεύρωση και μπορούν να παράγουν απόλυτα ακριβείς και διαβαθμισμένες κινήσεις και είναι πολυδύναμοι ή πολύνευροι λείοι μύες. Οι μονοδύναμοι ή μοναδιαίοι ή συγκυτιακοί λείοι μύες αποτελούνται από εκατοντάδες έως εκατομμύρια λείες μυϊκές ίνες που το χαρακτηριστικό τους είναι ότι συστέλλονται όλες μαζί σαν μία μόνο μονάδα (4). Τα κύτταρα στα τοιχώματα των κοίλων σπλάχνων (π.χ. έντερο, μήτρα, ουρητήρες) διαθέτουν άφθονες χασματικές συνάψεις και σχετικά φτωχή νεύρωση, ούτως ώστε οι συγκεκριμένοι μύες να αποτελούν ένα λειτουργικό συγκύτιο και να αποκαλούνται σπλαχνικοί λείοι μύες.

Χαρακτηριστική είναι η μεταβολή του σχήματος των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη συστολή όπου εμφανίζεται πτύχωση του κυττάρου και σπειροειδής εμφάνιση του πυρήνα (Εικόνα 4). Η συσταλτική συσκευή των λείων μυϊκών κυττάρων απαρτίζεται από τα παχιά και τα λεπτά νημάτια (μυοϊνίδια), ενώ εξίσου απαραίτητος για τη λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων είναι ο κυτταροσκελετός τους, ο οποίος αποτελείται από ακτίνη και ενδιάμεσα νημάτια (1). Τα ενδιάμεσα νημάτια έχουν διαμέτρου 10 nm και αποτελούνται κυρίως από δεσμίνη, ενώ στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα απαντά επιπλέον και η πρωτεΐνη βιμεντίνη ως συστατικό τους. Τα παχιά σωματίδια (dense bodies) έχουν κύριο συστατικό την πρωτεΐνη α-ακτινίνη (α-actinin) και ανάλογα με την εντόπιση διακρίνουμε δύο τύπους πυκνών σωματίων, τα κυτταροπλασματικά και τα συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη. Η παρουσία ακτίνης και μυοσίνης, εγκάρσιων γεφυρών με αλληλοεπικάλυψη παχέων και λεπτών νηματίων και της σχέσης μήκους-δύναμης αποδεικνύουν ότι η συστολή στο λείο μυ επιτελείται από έναν μηχανισμό διολίσθησης νηματίων όμοιο με αυτόν που υπάρχει στο σκελετικό και καρδιακό μυ. Το εύρος μήκους μέσα στο οποίο η παραγόμενη τάση είναι μέγιστη είναι μεγαλύτερο από το εύρος του σκελετικού μυός.



Εικόνα 4. Η χαρακτηριστική μεταβολή του σχήματος των λείων μυϊκών κυττάρων κατά τη συστολή. Επιμήκης ιστολογική τομή με χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης (αριστερά) και σχηματική απεικόνιση μεμονωμένου λείου μυϊκού κυττάρου (δεξιά). Διακρίνεται το ατρακτοειδές σχήμα των κυττάρων και ο επιμήκης άξονας σε ηρεμία (πάνω), καθώς και η πτύχωση του κυττάρου και η σπειροειδής εμφάνιση του πυρήνα κατά τη συστολή (κάτω). (Ανατύπωση από Ross MH., Pawlina W: Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5th edition, 2006)

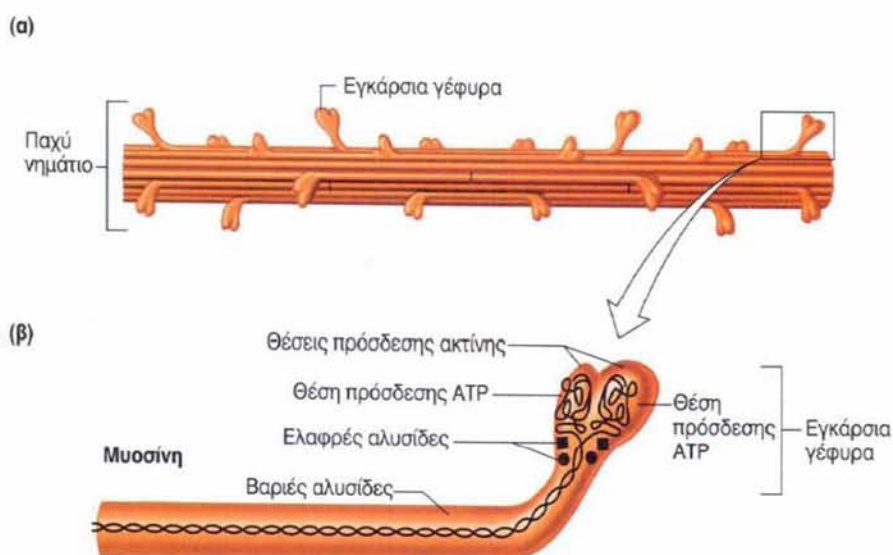
Η κυτταρική μεμβράνη των λείων μυϊκών κυττάρων έχει την ικανότητα να μεταδίδει δυναμικά ενέργειας από το ένα κύτταρο στο άλλο μέσω χασματικών συνδέσεων οι οποίες διευκολύνουν τη διάδοση της συστολής από κύτταρο σε κύτταρο, παράγοντας συντονισμένη συστολική δραστηριότητα εντός ενός δεματίου ή μιας στοιβάδας λείων μυϊκών ινών. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των λείων μυϊκών κυττάρων αποτελεί η παρουσία μεγάλου αριθμού εγκολπώσεων της κυτταρικής μεμβράνης (caveolae). Κάτω από την κυτταρική μεμβράνη παρατηρούνται κυτταροπλασματικά κυστίδια. Τα κυστίδια και το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο συγκεντρώνουν ιόντα Ca^{+2} από τον εξωκυττάριο χώρο και τα απελευθερώνουν κατά την εκπόλωση του κυττάρου. Τα ιόντα Ca^{+2} συνδέονται στην καλμοδοουλίνη, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και πυροδοτεί την έναρξη της συστολής (1, 3)

Παραδείγματα μονοδύναμων λείων αποτελούν ο λείος μυς αιμοφόρων αγγείων μικρής διαμέτρου, ο λείος μυς του εντερικού σωλήνα, ενώ παραδείγματα πολυδύναμων λείων μυών αποτελούν ο λείος μυς της ίριδας του οφθαλμού, αεραγωγών πνευμόνων και δέρματος.

2.Μοριακοί μηχανισμοί σύσπασης –χάλασης των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ)

Μυϊκή τάση είναι η δύναμη που ασκείται πάνω σε ένα αντικείμενο από έναν συστελλόμενο μυ και φορτίο είναι η δύναμη που ασκείται από το βάρος ενός αντικειμένου πάνω σε έναν μυ. Η

τάση και το φορτίο είναι δυνάμεις αντίθετες. Ο όρος συστολή αναφέρεται κυρίως στην ενεργοποίηση των σημείων δυναμογένεσης των εγκάρσιων γεφυρών σε μια μυϊκή ίνα (Εικόνα 5) (2). Στατική ονομάζεται η συστολή στην οποία ο μυς αναπτύσσει τάση αλλά ούτε επιμηκύνεται ούτε βραχύνεται και η αντίστοιχη συστολή μίας απομονωμένης ίνας ονομάζεται ισομετρική επειδή έχει σταθερό μήκος. Κατά την ισομετρική συστολή, οι προσδεμένες γέφυρες είναι αδύνατο να κινήσουν τα λεπτά νημάτια αφού το φορτίο είναι υψηλό αλλά εξασκούν δύναμη πάνω στα λεπτά νημάτια. Η συστολή κατά την οποία το φορτίο παραμένει σταθερό και ο μυς βραχύνεται λέγεται ισοτονική. Στην ισοτονική συστολή οι εγκάρσιες γέφυρες προσδεμένες στην ακτίνη κινούνται υπό γωνία, προκαλώντας βράχυνση των σαρκομερίων (2). Όταν η παραγόμενη τάση είναι μέγιστη τότε το μήκος ονομάζεται βέλτιστο. Οι λείοι μύες έχουν μεγάλο εύρος μήκους στο οποίο παράγουν τάση και αυτή η ιδιότητα τους προσδίδει υψηλή προσαρμοστικότητα σε διάφορες μεταβολές όγκου στα κοίλα όργανα, χωρίς να αλλάζει ιδιαίτερα η πίεση στα τοιχώματά τους.



Εικόνα 5. Οι βαριές αλυσίδες των μορίων μυοσίνης σχηματίζουν τον πυρήνα ενός παχέος νηματίου (α). Τα μόρια της μυοσίνης διατάσσονται σε αντίθετες κατευθύνσεις και στα δύο ημίσεα του παχέος νηματίου. Η δομή ενός μορίου μυοσίνης (β). Οι δύο σφαιρικές κεφαλές του κάθε μορίου μυοσίνης προέχουν από τα πλάγια του παχέος νηματίου, σχηματίζοντας μια εγκάρσια γέφυρα. (Ανατύπωση από Vander A, Sherman J, Luciano D, Tsakopoulos M, Φυσιολογία του ανθρώπου, 8^η έκδοση, 2000)

Η σύζευξη της διέγερσης με την συστολή στα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) αποτελεί ένα αρκετά πολύπλοκο φαινόμενο εξαιτίας της συμμετοχής ποικιλίας ερεθισμάτων για τη διέγερση και μεγάλου αριθμού δευτέρων διαβιβαστών. Πιο συγκεκριμένα οι λείοι μύες μπορούν να διεγείρονται για συστολή από διάφορα ερεθίσματα όπως ορμόνες, νευρικές ώσεις κτλ (αντίθετα

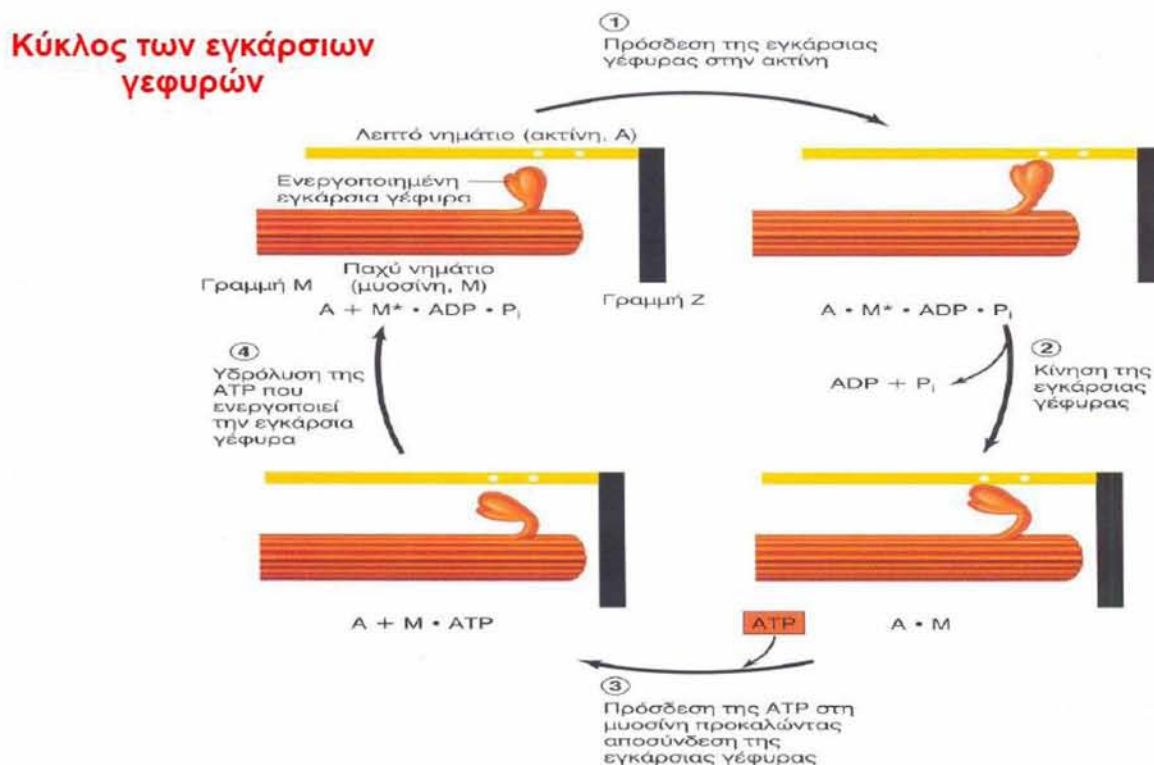
με τους σκελετικούς μύες, οι οποίοι ενεργοποιούνται αποκλειστικά από το νευρικό σύστημα (5). Ο λείος μυς χρησιμοποιεί για τη διαδικασία της συστολής την κίνηση των εγκάρσιων γεφυρών μεταξύ των νηματίων ακτίνης και μυοσίνης για την παραγωγή τάσης. Η δραστηριότητα των νηματίων αυτών ελέγχεται από το σύμπλοκο Ca^{+2} -καλμοδοουλίνης. Υπάρχουν δύο είδη νηματίων τα οποία δεν είναι οργανωμένα σε μυοϊνίδια και δεν υπάρχει κανονική ευθυγράμμιση αυτών των νηματίων σε σαρκομέριο όπως συμβαίνει στο γραμμωτό μυ. Είναι τα νημάτια της μυοσίνης και τα νημάτια της ακτίνης και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των ινών του λείου μυός (6).

Κεντρικό ρόλο στη συστολή των ΛΜΚ παίζει η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{+2} ($[\text{Ca}^{+2}]_i$). Η αύξηση της $[\text{Ca}^{+2}]_i$ προκαλεί μια σειρά αντιδράσεων στα ΛΜΚ που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μηχανισμού διολίσθησης των νηματίων της μυοσίνης και ακτίνης. Καθώς τα νημάτια της ακτίνης των ΛΜΚ δεν έχουν τροπονίνη C η πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο και ενεργοποιείται είναι η καλμοδοουλίνη. Έτσι η $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ρυθμίζει τόσο τον αριθμό των εγκάρσιων γεφυρών της μυοσίνης που θα συνδεθούν με τα νημάτια της ακτίνης, όσο και το ρυθμό εναλλαγής σύνδεσης-απελευθέρωσης των κεφαλών της μυοσίνης.

Η αλληλουχία των γεγονότων μετά την αύξηση του $[\text{Ca}^{+2}]_i$ στα ΛΜΚ περιλαμβάνει: την πρόσδεση αρχικά του Ca^{+2} στην καλμοδοουλίνη και στη συνέχεια την ενεργοποίηση της κινάσης των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης (MLC) από το σύμπλοκο καλμοδοουλίνης- Ca^{+2} . Η MLC καταναλώνει ATP για να φωσφορυλιώσει τις ελαφρές αλυσίδες στην κεφαλή της μυοσίνης. Η φωσφορυλιωμένη εγκάρσια γέφυρα προσδένεται στην ακτίνη και ο μηχανισμός διολίσθησης τίθεται σε λειτουργία για την πρόκληση σύσπασης (2). Οι φωσφορυλιωμένες ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης αποφωσφορυλιώνονται από τη φωσφατάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης (MLCP) και αυτό έχει σαν συνέπεια την χάλαση. Η ισορροπία μεταξύ κινάσης και φωσφατάσης των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης μεταβάλλεται από την παρουσία δευτέρων αγγελιοφόρων όπως είναι το cAMP και το cGMP.

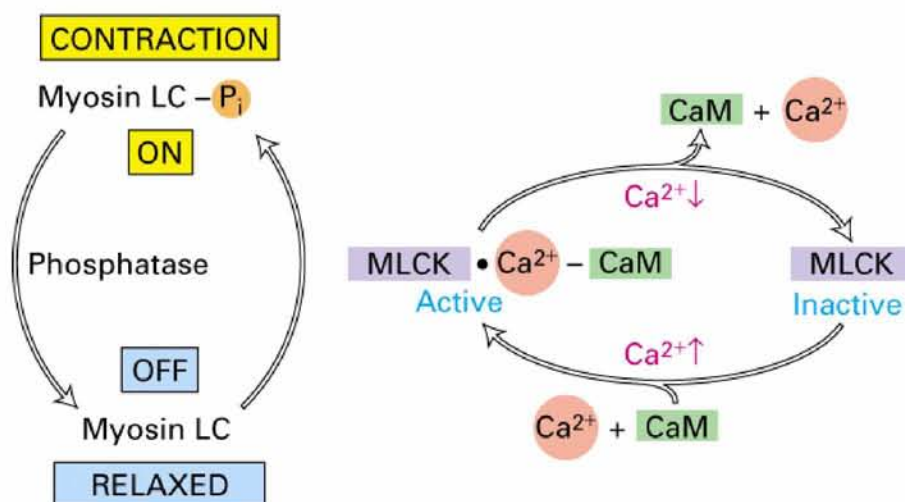
Η αύξηση της $[\text{Ca}^{+2}]_i$ μπορεί να συμβεί είτε με την είσοδο Ca^{+2} από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω διαύλων Ca^{+2} (πχ τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης, Ca^{+2} από διαύλους συνδεδεμένους με υποδοχείς και οι οποίοι ενεργοποιούνται μετά από σύνδεση του υποδοχέα με νευροδιαβιβαστές, ορμόνες), με την απελευθέρωση Ca^{+2} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (μέσω της διάσπασης της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης και της παραγωγής IP_3), με την πυροδότηση απελευθέρωσης Ca^{+2} από την ίδια την αύξηση της $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ή με την αντίστροφη της λειτουργία του ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ της κυτταρικής μεμβράνης (2). Από την άλλη πλευρά μείωση της $[\text{Ca}^{+2}]_i$ συμβαίνει με την απομάκρυνση του Ca^{+2} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την έξοδό του από την αντλία Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης και την ανταλλαγή $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$.

Ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας (Εικόνα 6) στο λείο μυ αποτελείται από 4 στάδια: 1) πρόσδεση της εγκάρσιας γέφυρας στο λεπτό νημάτιο, 2) κίνηση της εγκάρσιας γέφυρας που προκαλεί κίνηση του λεπτού νηματίου, 3) αποδέσμευση της εγκάρσιας γέφυρας από το λεπτό νημάτιο, και 4) κίνηση της εγκάρσιας γέφυρας σε μια θέση όπου είναι δυνατόν η επανασύνδεσή της με ένα λεπτό νημάτιο και η επανάληψη του κύκλου (2).



Εικόνα 6. Χημικές και μηχανικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των τεσσάρων σταδίων ενός κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας. (Ανατύπωση από Vander A, Sherman J, Luciano D, Tsakopoulos M, Φυσιολογία του ανθρώπου, 8^η έκδοση, 2000)

Μόνο η φωσφορυλιωμένη μυοσίνη των ΛΜΚ έχει την ικανότητα να προσδένει ακτίνη και να υπόκειται σε ανακύλιση εγκάρσιων γεφυρών (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση της φωσφορυλίωσης της μυοσίνης παρουσία του συμπλόκου ασβεστίου-καλμοδουλίνης. (Ανατύπωση από Lodish H., et al., Molecular Cell Biology, 5th edition, 2004)

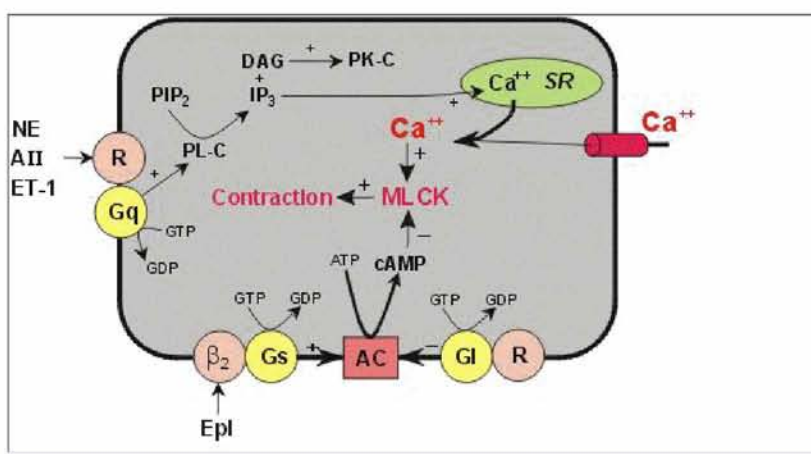
Οι παραπάνω μηχανισμοί χρησιμοποιούν ενέργεια που παράγεται κυρίως από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και μερικώς από την αερόβια γλυκόλυση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση προμηθεύει ATP κυρίως στα συστατικά στοιχεία ενώ η αερόβια γλυκόλυση προμηθεύει ATP κυρίως στις αντλίες ιόντων της μεμβράνης (7).

Η διαδικασία της συστολής περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται πρόσδεση ουσιών (νευροδιαβιβαστές, ορμόνες) σε ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη των λείων μυϊκών κυττάρων. Οι υποδοχείς διακρίνονται σε δύο είδη: τους ιονοτροπικούς, που είναι ιοντικοί διάυλοι και η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε μετακίνηση ιόντων (πχ νικοτινικοί υποδοχείς) και σε μεταβοτροπικούς, που η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην δημιουργία δευτερογενών μηνυμάτων (π.χ μουσκαρινικοί υποδοχείς). Ως επί το πλείστον οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς συνδέονται με G-πρωτεΐνες και η ενεργοποίησή τους μπορεί είτε άμεσα να οδηγήσει σε διάνοιξη ιοντικών διαύλων ή να ενεργοποιήσει ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) και της αδενυλικής κυκλάσης (AC). Η ενεργοποίηση της PLC μπορεί να συμβεί μετά από διέγερση των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων οι οποίοι προσδένονται σε G_q πρωτεΐνες και ενεργοποιούν την PLC. Η PLC μεταβολίζει την φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη της μεμβράνης και παράγονται τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και διάκυλο-γλυκερόλη (DAG). Η μεν IP_3 προκαλεί απελευθέρωση Ca^{+2} από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου, η δε DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) που αναστέλλει τους υποδοχείς της IP_3 και κατά συνέπεια την απελευθέρωση Ca^{+2} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα την χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου (8).

Η AC μεταβολίζει το ATP και παράγεται cAMP. Το σύστημα της AC που ρυθμίζει τη σύνθεση cAMP, περιλαμβάνει διεγερτικούς και ανασταλτικούς υποδοχείς οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα μέσω δύο G πρωτεϊνών οι οποίες είναι γνωστές σαν G_s και G_i λόγω της ικανότητάς

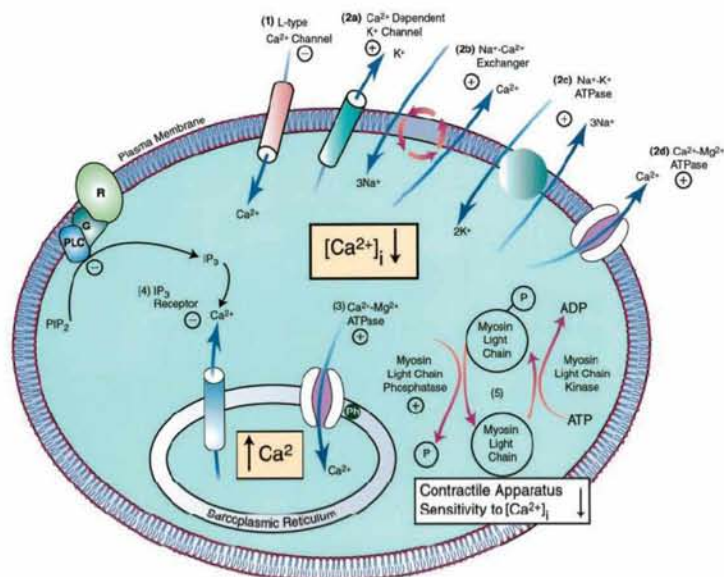
τους να διεγείρουν ή να αναστέλλουν αντίστοιχα την καταλυτική μονάδα της AC (6). Το cAMP ενεργοποιεί την PKA η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί την MLCK με αποτέλεσμα τη χάλαση των ΛΜΚ. Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση των M_2 υποδοχέων που οδηγεί σε αναστολή της AC, μέσω σύνδεσης με ανασταλτική G- πρωτεΐνη, ελάττωση του cAMP και επομένως χάλαση των ΛΜΚ (9).

Στο δεύτερο στάδιο γίνονται αλλαγές στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου ($[Ca^{+2}]_i$). Κατά τη διαδικασία της συστολής γίνεται απότομη αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου. Με την αύξηση του κυτταροπλάσματικού ασβεστίου στις ΛΜΚ σηματοδοτείται η έναρξη της συστολής (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί σύσπασης των λείων μυϊκών ινών. Η νορεπινεφρίνη από τις συμπαθητικές νευρικές απολήξεις και οι ενδοθηλίνες από το ενδοθήλιο ενεργοποιούν υποδοχείς στις λείες μυϊκές ίνες για την έναρξη μιας σειράς αντιδράσεων που οδηγούν στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρια Ca^{+2} και στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών. (Ανατύπωση από <http://www.oucom.ohiou.edu/cvphysiology/>)

Εξωγενείς και ενδογενείς ενώσεις, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), μυοχαλαρωτικοί παράγοντες που παράγονται στο ενδοθήλιο (προστακυκλίνη) και το νατριοδιουρητικό πεπτίδιο, προκαλούν διαστολή των αγγείων μέσω αύξησης της $[cGMP]_i$ που προκαλεί ελάττωση των επιπέδων του $[Ca^{+2}]_i$. Το cGMP μπορεί να επιδράσει στο $[Ca^{+2}]_i$ με 4 τρόπους (10) (Εικόνα 9):



Εικόνα 9. Οι τέσσερις τρόποι με τους οποίους το cGMP ελαττώνει τη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού Ca^{+2} προκαλώντας χύλαση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. (Ανατύπωση από Lucas K.A., et al., 2000, Pharmacological Reviews)

1. *Ελαττώνοντας την είσοδο του Ca^{+2} στο κύτταρο:* Το cGMP ενεργοποιεί την PKG, η οποία φωσφορυλιώνει και κλείνει τους L-τύπου διαύλους Ca^{+2} .
2. *Αυξάνοντας την έξοδο του Ca^{+2} από το κύτταρο:* Ενεργοποίηση της $\text{Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$ ΑΤΡάσης και της αντλίας ανταλλαγής $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{+2}$ αυξάνουν την έξοδο Ca^{+2} από το κύτταρο. Η έξοδος Ca^{+2} δια μέσου της αντλίας ανταλλαγής $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{+2}$ εξαρτάται από δύο παράγοντες που επηρεάζονται από το cGMP: τη μείωση του ενδοκυτταρικού Na^{+} μετά από ενεργοποίηση της $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ -ΑΤΡάσης και την υπερπόλωση της πλασματικής μεμβράνης μετά από ενεργοποίηση των διαύλων K^{+} . Η $\text{Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$ ΑΤΡάσης και η $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ -ΑΤΡάσης ενεργοποιούνται από τη cGMP μέσω PKG.
3. *Βοηθώντας την είσοδο του Ca^{+2} στο σαρκοπλασματικό δίκτυο:* Το cGMP προκαλεί αύξηση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων Ca^{+2} με την ενεργοποίηση της Ca^{+2} -ΑΤΡάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου. Ο βασικός μοριακός μηχανισμός αυτής της λειτουργίας αποδείχτηκε ότι είναι η φωσφορυλίωση από την PKG της φωσφολαμπάνης.
4. *Παρεμποδίζοντας την έξοδο του Ca^{+2} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο:* Το cGMP αναστέλλει τη δράση της IP_3 που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση $[\text{Ca}^{+2}]_i$. Το cGMP μέσω της PKG προκαλεί φωσφορυλίωση του υποδοχέα του IP_3 στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα την αναστολή της εξόδου του Ca^{+2} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα

Όταν ο λείος μυς έχει αναπτύξει την πλήρη του συστολή, ο βαθμός ενεργοποίησής του μπορεί να ελαττώνεται πολύ κάτω από το αρχικό του επίπεδο και παρόλα αυτά ο μυς να εξακολουθεί να διατηρεί την ολική δύναμη της συστολής του. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μηχανισμός μάνταλου (2). Με αυτόν τον τρόπο, με ελάχιστη κατανάλωση ενέργειας γίνεται δυνατή η παρατεταμένη συστολή των λείων μυών. Όταν η MLCK και η MLCP ενεργοποιηθούν έντονα, τότε η συχνότητα της ανακύκλησης των κεφαλών της μυοσίνης είναι πολύ μεγάλη και συνεπώς και η ταχύτητα της συστολής. Όσο η ενεργοποίηση των ενζύμων περιορίζεται, η συχνότητα της ανακύκλησης ελαττώνεται. Παράλληλα όμως η ελαττωμένη ενεργοποίηση συντελεί στην ολοένα και μεγαλύτερη παράταση του χρόνου σύνδεσης των κεφαλών της μυοσίνης με τα ινίδια της ακτίνης, ώστε αυτός ο χρόνος να καταλαμβάνει όλο και μεγαλύτερο ποσοστό της περιόδου ανακύκλησης. Επομένως, ο αριθμός των κεφαλών που συνδέονται με τα ινίδια της ακτίνης, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή εξακολουθεί να είναι ακόμα πολύ μεγαλύτερος. Επειδή ο αριθμός των κεφαλών που είναι συνδεδεμένες με την ακτίνη είναι ο παράγοντας που καθορίζει την δύναμη της συστολής, διατηρείται ακόμα η τάση, δηλαδή εκδηλώνεται ο μηχανισμός του μάνταλου. Το αίτιο του μηχανισμού μάνταλου αναμφισβήτητα σχετίζεται με την μακρόχρονη προσήλωση των εγκάρσιων γεφυρών της μυοσίνης στα ινίδια της ακτίνης (2).

3. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ

Τα ΛΜΚ των αγγείων έχουν την ικανότητα διαίρεσης είτε στο πλαίσιο της φυσιολογικής λειτουργίας τους, είτε ως απάντηση σε βλάβη (11). Για παράδειγμα τα ΛΜΚ της μήτρας, πολλαπλασιάζονται τόσο κατά τον καταμήνιο κύκλο όσο και κατά την κύηση. Επίσης στα ενήλικα άτομα, ο πολλαπλασιασμός ΛΜΚ πιθανότατα συμβαίνει για την αντικατάσταση γερασμένων κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη (12).

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, που βρίσκονται στην υπενδοθηλιακή στιβάδα, παράγουν πληθώρα ουσιών : αυξητικούς, ανασταλτικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες. Στόχος των παραγόντων αυτών είναι τα ΛΜΚ του μέσου χιτώνα, τα οποία υπό την επίδρασή τους πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης, δηλαδή υπόκειται σε μια φαινοτυπική αλλαγή που τους προσδίδει μεταναστευτικό και εκκριτικό χαρακτήρα. Οι κυριότεροι παράγοντες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι ο PDGF (platelet derived growth factor) αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, TGF-β (transforming growth factor beta) αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β, FGF (fibroblast growth factor) αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, κυτταροκίνες, ιντερλευκίνη-1 (IL-1), TNF-α (tumor necrosis factor alpha) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α. Δηλαδή η μεταναστευτική και πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των ΛΜΚ καθορίζεται από τους παραπάνω παράγοντες, οι οποίοι χωρίζονται σε διεγέρτες και αναστολείς της ανάπτυξης. Στους διεγέρτες περιλαμβάνονται

οι PDGF, bFGF και IL-1 και στους αναστολείς η θειϊκή ηπαράνη, το NO, η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο TGF-β.

Η αγγειακή βλάβη προάγει την ανάπτυξη των ΛΜΚ διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στη διέγερση και την αναστολή. Η κατευθυνόμενη μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ είναι γεγονότα κλειδιά στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης και επαναστένωσης των αγγείων. Νέα ΛΜΚ μπορούν να σχηματιστούν είτε από διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων του έξω χιτώνα των αγγείων, είτε και από τη διαφοροποίηση και άλλων μεσεγχυματογενών κυττάρων (13).

Η αναδιαμόρφωση (remodeling) του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος συμπεριλαμβανομένου και του ενδοθηλίου, συνιστά μια φυσιολογική αντίδραση επούλωσης που περικλείει τις ακόλουθες παραμέτρους: μετανάστευση των ΛΜΚ από το μέσο στον έσω χιτώνα, επακόλουθο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του έσω χιτώνα, σύνθεση και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας. Τα ΛΜΚ που μεταναστεύουν από το μέσο στον έσω χιτώνα χάνουν την ικανότητα για συστολή, αποκτούν τη δυνατότητα για διαίρεση και αυξάνουν τη σύνθεση μορίων εξωκυττάριας ουσίας. Δηλαδή, γίνεται αλλαγή από ένα «συσταλτικό» σε έναν «πολλαπλασιαστικό – συνθετικό» φαινότυπο. Δομικά, παρατηρείται μείωση των παχίων ινιδίων που περιέχουν μυοσίνη και αύξηση του ποσού των οργανιδίων που ενέχονται στην πρωτεϊνοσύνθεση (1).

Το ασβέστιο, εκτός από τις επιδράσεις του στις πρωτεΐνες που προσδένονται στην ακτίνη, μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορα ένζυμα όπως την PKC, CamKII (calcium / calmodulin-dependent protein kinase II) και καλσινευρίνη τα οποία ρυθμίζουν αρκετές παραμέτρους στη μετανάστευση των ΛΜΚ. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή κατέχουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Η έκφραση των ενζύμων αυτών οδηγεί σε αποδόμηση αρκετών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διόδος των ΛΜΚ από το μέσο στον έσω (14). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) έχουν πρωτεολυτική δράση και ένα από τα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους είναι ότι αρκετά από τα γονίδιά τους είναι «επαγόμενα». Οι ενεργοποιητές τους περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες ενώ οι καταστολείς τους τον TGF-β και τα γλυκοκορτικοειδή (15). Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη δραστηριότητα MMPs μετά από τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων και για το λόγο αυτό έχει προταθεί η εμπλοκή τους στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ΛΜΚ. Εκτός από τον ρόλο των MMPs στην μετανάστευση των ΛΜΚ φαίνονται ότι εμπλέκονται και στον πολλαπλασιασμό/αύξηση των κυττάρων αυτών (16). Η διακοπή των κυτταρικών επαφών N-καντχερίνης μέσω MMPs προκαλεί την απελευθέρωση β-κατενίνης μέσα στο κυτταρόπλασμα και έναν καταρράκτη ενδοκυττάριας σηματοδότησης που οδηγεί σε κυτταρική αύξηση (17). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες 2 και 9 (MMP-2, MMP-9) προάγουν τη μετανάστευση και τον

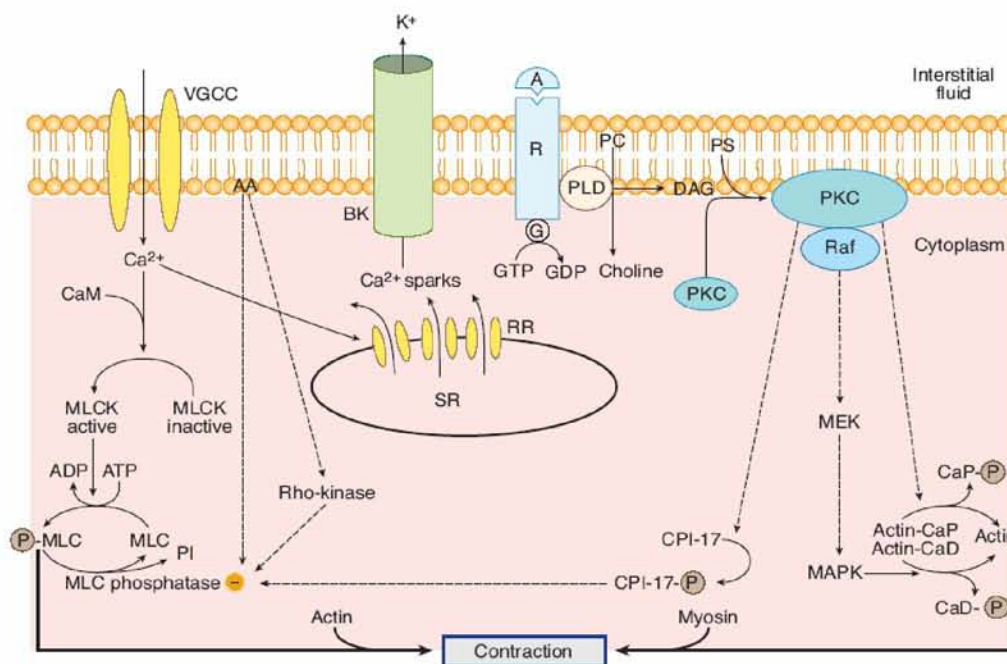
πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, ενώ τα μονοκύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα προσφυόμενα στο ενδοθήλιο διεγείρουν την έκφρασή τους. Αυτό οδηγεί σε αποδόμηση της υπενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης. Κατά την ανάπτυξη των αθηροσκληρυντικών πλακών, το remodeling των αγγείων και ο συνοδός πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των ΛΜΚ, πιστεύεται ότι διευκολύνεται από τη δράση των MMPs, διαδικασία που καλείται «πάχυνση του έσω χιτώνα» (18).

Εκτός από το ρόλο των MMPs, στα ΛΜΚ του αγγειακού τοιχώματος έχει δειχθεί ότι η κυτταρική σηματοδότηση μέσω ινωδεκτίνης (19), ιντεγκρίνης (20) ή τενασκίνης-C (tenascin C) (21) φαίνεται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Επίσης, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο PDGF-BB, δρουν ως παράγοντες επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Για τη δημιουργία τοιχωματικών κυττάρων στα αναπτυσσόμενα αγγεία διαμεσολαβούν σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον PDGF-BB και TGF-β. Με την απελευθέρωση του PDGF-BB, τα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρουν την αύξηση μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων και τα προσελκύουν γύρω από τα αναπτυσσόμενα αγγεία. Ο TGF-β προάγει την ωρίμανση των αγγείων διεγείροντας την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και επάγει τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων σε αγγειακά ΛΜΚ(22).

4.Ιοντικοί διάλυλοι στα ΛΜΚ - Ο ρόλος τους στη φυσιολογία των ΛΜΚ

Η μετακίνηση των ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι ένας σημαντικός μηχανισμός στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας ή στην ενεργοποίηση του κυττάρου. Τα ιόντα διαπερνούν τη μεμβράνη με την βοήθεια διαύλων. Οι ιοντικοί διάλυλοι είναι εκλεκτικοί. Οι διάλυλοι των ιόντων ανοίγουν ή κλείνουν εξαρτώμενοι από διαφορετικούς παράγοντες και συμμετέχουν στη ρύθμιση πρωτεϊνών που ελέγχουν την ηλεκτρική δραστηριότητα κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών (23). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι διαδικασίες σύσπασης-χάλασης επιτελούνται μέσω ειδικών μεταφορέων ασβεστίου και διαύλων ιόντων που εδράζονται στην μεμβράνη και μεταφέρουν το ασβέστιο (2).

Στη μεμβράνη των ΛΜΚ έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι διαύλων ασβεστίου : οι διάλυλοι που ενεργοποιούνται από το δυναμικό της μεμβράνης και ονομάζονται δυναμικοευαίσθητοι διάλυλοι ή τάσεοεξαρτώμενοι διάλυλοι ασβεστίου (Potential Operating Channels, POC ή Voltage Gated Channels, VGC) (Εικόνα 10) και οι διάλυλοι που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση κάποιου αγωνιστή με την πρωτεΐνη το διαύλου ή με μια άλλη συζευγμένη με αυτόν πρωτεΐνη (υποδοχέα) (receptor-operated channels-ROCs).



Εικόνα 10. Διάλυοι και μηχανισμοί που εμπλέκονται στη σύσπαση και τη χαλάρωση των λείων μυών. (Ανατύπωση από Ganong's Review of Medical Physiology, 23rd edition, 2009)

Έχουν αναγνωριστεί δύο κύριοι τύποι τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{+2} ανάλογα με τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες : α) οι L (long-lasting)-τύπου διάλυοι (βραδείς) ή μακράς διάρκειας) ή large conductance (εκτεταμένης αγωγιμότητας), και οι β) οι T (transient)-τύπου διάλυοι (ταχείς) ή παροδική αγωγιμότητα.

Ο L-τύπου διάλυος αρχικά ονομάστηκε βραδύς διάλυος εισροής και για αρκετό καιρό ήταν γνωστός ως διάλυος ευαίσθητος στη διϋδροπυριδίνη (dihydropyridine, DHP) λόγω της ειδικής δέσμευσης των διϋδροπυριδινών, όπως νικαρδιπίνης ή νιφεδιπίνης στους διαύλους αυτούς (24) (25). Η δέσμευση των διϋδροπυριδινών, στους διαύλους αυτούς οδηγεί σε αναστολή της λειτουργίας τους. Χαρακτηριστικό των διαύλων αυτών είναι ότι ανοίγουν ως απάντηση στην εκπόλωση του κυττάρου προκαλώντας είσοδο ιόντων Ca^{+2} στο κύτταρο και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Είναι υπεύθυνοι για τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που προκαλείται από διάλυμα KCl. Από την άλλη πλευρά πάλι η εισόδος Ca^{+2} στο κύτταρο μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση των L-τύπου διαύλων ασβεστίου (26). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρακινούμενη από τους διαύλους ασβεστίου απελευθέρωση Ca^{+2} (Calcium Channel Induced Ca^{+2} Release, CCICR), που απαιτεί μεν την ενεργοποίηση των διαύλων αλλά είναι ανεξάρτητος από την εξωκυττάρια εισροή ιόντων ασβεστίου (27) (28). Αυτός ο μηχανισμός απελευθέρωσης Ca^{+2} απαιτεί δομική προσαρμογή των διαύλων, με συνέπεια την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PLC, που καταλήγει στη σύνθεση IP_3 και απελευθέρωση Ca^{+2} από το σαρκοπλασματικό (29). Θεωρείται, ότι πρόκειται για μηχανισμό ο οποίος θα μπορούσε

σε παθολογικές καταστάσεις να εμπλέκεται στην παρατεταμένη αγγειοσύσπαση που παρατηρείται στις περιπτώσεις αυτές.

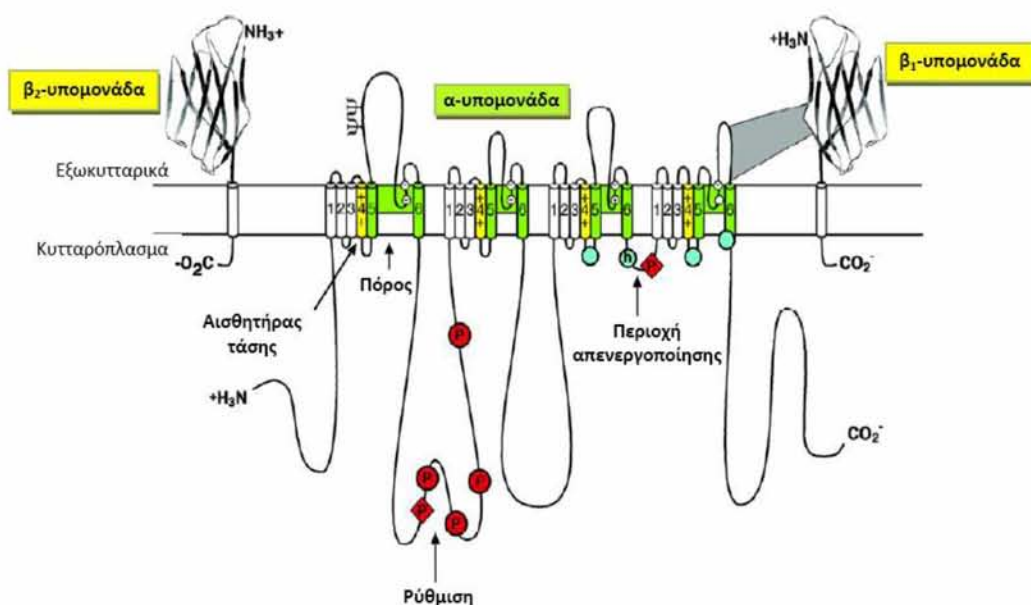
Οι T- τύπου διάυλοι παρουσιάζουν μικρή αγωγιμότητα και σύντομα αδρανοποιούνται. Ανοίγουν με μικρές μεταβολές του δυναμικού και προάγουν την είσοδο των Ca^{+2} ή/και των Na^{+} (30).

Η είσοδος Ca^{+2} μέσω των διαύλων που ενεργοποιούνται από νευροδιαβιβαστές (ισταμίνη, ακετυλοχολίνη) (Receptor Operated Channels-ROC) είναι σημαντική για την επαναφόρτιση των ενδοκυττάρων αποθηκών Ca^{+} (31) .

Για να προκληθεί χάλαση των συσταλτών στοιχείων των λείων μυϊκών ινών απαιτείται η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου. Η απομάκρυνση αυτή επιτελείται με τις αντλίες ασβεστίου, μέσω των οποίων αντλούνται ιόντα ασβεστίου έξω από το λείο μυϊκό κύτταρο προς τον εξωκυττάριο χώρο ή προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Οι διάυλοι στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου που ανήκουν στην κατηγορία των ROC-διαύλων κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτούς που ανοίγουν μετά τη διέγερση των υποδοχέων από δεύτερο αγγελιοφόρο όπως η IP_3 στη μεμβράνη του οργανιδίου αυτού και β) και σε αυτούς που ανοίγουν υπό την επίδραση του εξωγενώς αυξανόμενου κυτταροπλασματικού ασβεστίου ύστερα από τη διέγερση των υποδοχέων της ρυανοδίνης στην ίδια μεμβράνη (32) (33) .

Τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι Na^{+} (VGSG)

Οι τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι Na^{+} (VGSG) είναι μεγάλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες α , β_1 και β_2 (Εικόνα 11). Περιέχουν τέσσερις εσωτερικές επαναλήψεις (I, II, III, IV) ή αλλιώς α υπομονάδες και τις βοηθητικές υπομονάδες (β_1 - β_4). Οι τέσσερις υδρόφοβες S6 διαμεμβρανικές α -έλικες δημιουργούν τον πόρο (ή πύλη h) του καναλιού, οι 4 P-βρόχοι το φίλτρο της εξειδίκευσης, ενώ οι S4 αισθητήρες τάσης ελέγχουν το άνοιγμα του διαύλου μετά από εκπόλωση (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Δομή της κύριας α-υπομονάδας ενός διαύλου νατρίου καθώς και των υπομονάδων β1 και β2. (Ανατύπωση από Yu et al., Pharmacol. Reviews, 2005)

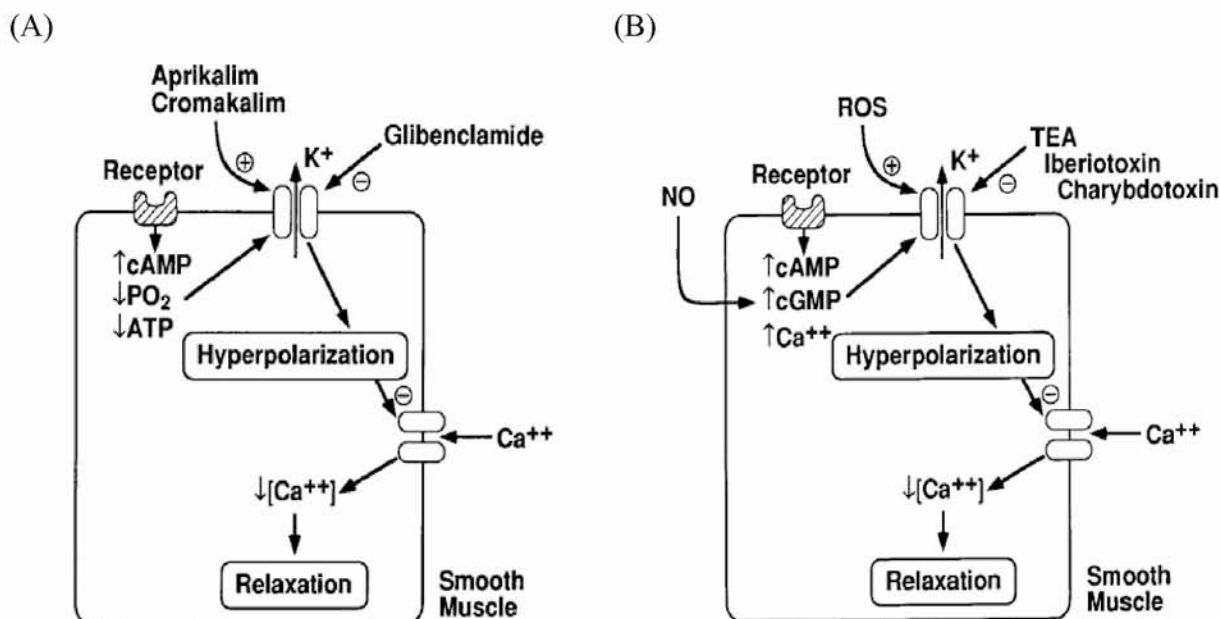
Στην πύλη των διαύλων αυτών συνδέονται αναστρέψιμα τοπικά αναισθητικά, όπως η λιδοκαΐνη, όπως και πολλές νευροτοξίνες με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λειτουργίας των διαύλων αυτών και αναστολή της μετάδοσης των ώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί εννέα διαφορετικοί τύποι της α υπομονάδας των διαύλων Na^+ ($\text{Na}_V1.1$ - $\text{Na}_V1.9$). Στα ΛΜΚ εντοπίζονται κυρίως οι υπότυποι $\text{Na}_V1.1$, $\text{Na}_V1.2$ και $\text{Na}_V1.3$ (34). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαύλοι αυτοί πιθανόν εμπλέκονται στη σύσπαση των ΛΜΚ της αορτής (34).

Δίαυλοι K^+

Στην μεμβράνη των λείων μυϊκών κυττάρων ανευρίσκονται όχι μόνον τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι K^+ (K_V) αλλά και άλλοι τύποι διαύλων K^+ . Οι K_V διάυλοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης και της κυτταρικής διέγερσης και επομένως στον έλεγχο της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών. Άλλοι δύο σημαντικοί τύποι διαύλων καλίου που έχουν αναγνωριστεί στους λείους μύες είναι:

1. Οι διάυλοι K_{ATP} (Εικόνα 12Α). Ενεργοποιούνται από την πτώση του ενδοκυττάρου ATP και από την αύξηση της αδενοσινοδιφωσφατάσης (ADP) ή της γουανοσινοδιφωσφατάσης (GDP). Η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε έξοδο ιόντων καλίου από το κύτταρο, αύξηση της αρνητικότητας εντός του κυττάρου και τελικά υπερπόλωση του κυττάρου.
2. Οι διάυλοι BK_{Ca} (Εικόνα 12Β). Ενεργοποιούνται από την αύξηση της $[\text{Ca}^{+2}]_i$ αλλά και από την εκπόλωση της μεμβράνης με αποτέλεσμα να λειτουργούν σαν ένας μηχανισμός αρνητικής παλινδρόμησης ρύθμισης του δυναμικού της μεμβράνης που οδηγεί σε μείωση της διέγερσης του κυττάρου)

Η διέγερση των διαύλων καλίου οδηγεί σε έξοδο K^+ από το κύτταρο, υπερπόλωση της μεμβράνης, ελάττωση της διεγερσιμότητας και τελικά χάλαση των λείων μυϊκών ινών (35) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Η ενεργοποίηση των K_{ATP} (A) και των $BKCa$ (B) διαύλων, οδηγεί σε έξοδο K^+ από το κύτταρο, υπερπόλωση της μεμβράνης, ελάττωση της διεγερσιμότητας και τελικά χάλαση των λείων μυϊκών ινών (Ανατύπωση από Frank M. Faraci and Donald D. Heistad, Physiological Reviews, 1998)

Επίσης, στα λεία μυϊκά κύτταρα υπάρχει μηχανισμός ανταλλαγής Na^+/Ca^{+2} μέσω αντλίας όπου ανταλλάσσονται 3 ιόντα Na^+ με 1 ιόν Ca^{+2} . Η γλιβενκλαμίδη εκτός από ανταγωνιστής των K_{ATP} διαύλων αναστέλλει και την αντλία Na^+/Ca^{+2} . Η κατεύθυνση μετακίνησης των ιόντων καθορίζεται από τη διαφορά στη συγκέντρωση των ιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης και από το δυναμικό της. Μέσου αυτού του μηχανισμού μεταφέρονται ιόντα ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον (7). Όταν για κάποιο λόγο σταματήσει να λειτουργεί η αντλία Na^+/K^+ , αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Na^+ και τότε η αντλία Na^+/Ca^{+2} εξάγει Na^+ και εισάγει Ca^{+2} με αποτέλεσμα την αύξηση της συσταλτικότητας (36).

5.Νευροδιαβιβαστές που εμπλέκονται στη σύσπαση των ΛΜΚ

Μεταξύ των δεματίων των λείων μυϊκών ινών παρατηρούνται νευρικές απολήξεις που σχηματίζουν διευρύνσεις πλησίον των μυϊκών κυττάρων που νευρώνουν. Οι διευρύνσεις αυτές περιέχουν συναπτικά κυστίδια με νευροδιαβιβαστές. Η περιοχή της νευρομυϊκής σύναψης δεν είναι συγκρίσιμη με αυτή που παρατηρείται στους γραμμωτούς μύες. Αντίθετα, ικανή απόσταση

της τάξης των 10-20 μm (και σε μερικές περιπτώσεις έως 200 μm) ενδέχεται να χωρίζει τη νευρική απόληξη από το λείο μυ, απόσταση την οποία πρέπει να καλύψει ο νευροδιαβιβαστής διαχεόμενος, προκειμένου να φτάσει και να διεγείρει τις λείες μυϊκές ίνες.

Ο λείος μυϊκός ιστός εκτελεί αργή και παρατεταμένη συστολή χωρίς να επέρχεται κάματος. Η συστολή του λείου μυϊκού ιστού μπορεί να συμβαίνει είτε με κυματοειδή τρόπο είτε μπορεί να αφορά τη σύσπαση ολόκληρου του μυϊκού τοιχώματος ενός οργάνου. Ελέγχεται από μετααγγλιακούς νευρώνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά νεύρα. Ο λείος μυς εμφανίζει αυτόματη συσταλτική δραστηριότητα ακόμα και απουσία νευρικών ερεθισμάτων, επομένως η νευρώση κατέχει κυρίως ρυθμιστικό ρόλο στις λείες μυϊκές, παρά συμβάλλει στην εκκίνηση της σύσπασης.

Οι λείοι μύες δέχονται τόσο αδρενεργικές όσο και χολινεργικές νευρικές απολήξεις, που συνήθως δρουν ανταγωνιστικά, δηλαδή σε ορισμένα όργανα οι χολινεργικές απολήξεις ευοδώνουν τη μυϊκή σύσπαση και οι αδρενεργικές την καταστέλλουν, ενώ σε άλλα όργανα ισχύει το αντίθετο. Τα αδρενεργικά νεύρα απελευθερώνουν νορεπινεφρίνη στη σύναψη τους με το όργανο στόχο, ενώ η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη απελευθερώνονται από το μυελό των επινεφριδίων. Οι αδρενεργικοί υποδοχείς διακρίνονται σε α και β και υποδιαιρούνται στους α_1 οι οποίοι είναι μετασυναπτικοί υποδοχείς και μεσολαβούν στη σύσπαση των λείων μυών, στους α_2 οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στην προσυναπτική μεμβράνη και ρυθμίζουν την απελευθέρωση της νορεπινεφρίνης, στους β_1 οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στον καρδιακό ιστό και στους β_2 οι οποίοι μεσολαβούν στη χάλαση των λείων μυών σε ορισμένα όργανα. Έχει βρεθεί ότι το άνοιγμα των BK_{Ca} διαύλων μπορεί να συμβεί με την εκπόλωση της μεμβράνης μετά από τη διέγερση των β -αδρενεργικών υποδοχέων (37). Επιπλέον, η ενεργοποίηση των β -αδρενεργικών υποδοχέων στις λείες μυϊκές ίνες διεγείρει την AC και οδηγεί σε αύξηση του cAMP, που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA προκαλεί φωσφορυλίωση ειδικών πρωτεϊνών όπως ρυθμιστικές πρωτεΐνες, κανάλια ιόντων και ένζυμα εντός του κυττάρου.

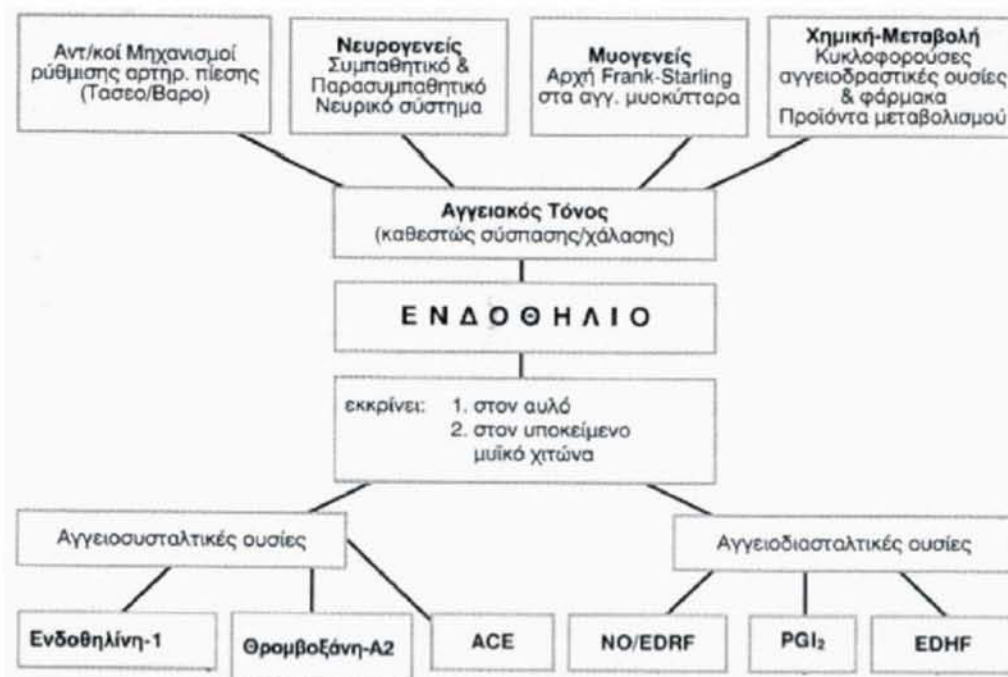
Οι α_1 αδρενεργικοί υποδοχείς εκφράζονται σε αφθονία στα αγγεία και θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές της συσταλτικότητας και του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Η διέγερση των α_1 υποδοχέων οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLC και στη δημιουργία IP_3 και την απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Εκτός από την κλασσική αυτή δράση των α_1 -υποδοχέων φαίνεται ως υποδοχείς αυτοί εμπλέκονται και στην υπερπλασία- υπερτροφία των αγγειακών ΛΜΚ (38). Για παράδειγμα, υπέρμετρη διέγερση των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων στα ΛΜΚ μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στην οργάνωση και διάταξη στα ΛΜΚ στη μεσαία στιβάδα των αρτηριών (arterial remodeling), σύμφωνα με μελέτες σε πειραματικά συστήματα ζώων με αθηρωμάτωση ή με επαναστένωση μετά από αρτηριακό τραυματισμό (39).

6.Ο ρόλος του ενδοθηλίου στον τόνο των ΑΜΚ

Το ενδοθήλιο είναι μονήρης χιτώνας κυττάρων που καλύπτει το εσωτερικό όλων των αιμοφόρων αγγείων. Η πιο γνωστή λειτουργία του είναι η δράση του ως διαπερατός φραγμός ανταλλαγής και ενεργητικής μεταφοράς ουσιών. Το 1980 οι Furchgott και Zawadzki διαπίστωσαν ότι η χορήγηση της ακετυλοχολίνης σε παρασκευάσματα αορτής κουνελιών, προκαλούσε χάλαση όταν υπήρχε ενδοθήλιο και σύσπαση όταν αυτό δεν υπήρχε (40). Με βάση αυτήν την παρατήρηση αλλά και με επιπλέον μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αγγειακό ενδοθήλιο είναι ένα καθοριστικής σημασίας για τον οργανισμό αυτοδύναμο ενδοκρινικό όργανο, με μια τεράστια ποικιλία αλληλένδετων λειτουργιών, που παίζουν σημαντικό ενεργό ρόλο στην φυσιολογική λειτουργία των αγγείων και στην ομαλή καρδιαγγειακή λειτουργία.

Οι σημαντικότερες λειτουργίες του ενδοθηλίου των αγγείων είναι εκκριτικές και στατικές. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν: η ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της μορφολογίας του αγγείου, ο έλεγχος της αιμόστασης και της φλεγμονής, η συμβολή στη ανάπτυξη νέων αγγείων καθώς και η ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας. Στην δεύτερη κατηγορία, στις στατικές, ανήκει η ενεργητική μεταφορά ουσιών (πρωτεϊνών, λιπιδίων) καθώς και η μεταβολική λειτουργία αγγειοτενσίνης I και κατεχολαμινών (41).

Το ενδοθήλιο είναι όργανο που παράγει και εκκρίνει διάφορες ουσίες που δρουν τοπικά αλλά και απομακρυσμένα, επηρεάζοντας το βαθμό του αγγειακού τόνου (Εικόνα 13). Οι ουσίες αυτές είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η προστακυκλίνη και η αδενοσίνη, που είναι παράγοντες χάλασης. Επίσης, παράγει και παράγοντες αγγειοσύσπασης, όπως ενδοθηλίνη και αγγειοτενσίνη II (41).



Εικόνα 13. Παράγοντες που επηρεάζουν το ενδοθήλιο και ουσίες που εκκρίνονται από αυτό. (Ανατύπωση από Ράμμος Κ. και Κούλιας Γ., Ο ρόλος του ενδοθηλίου στη στεφανιαία νόσο, 1997)

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες του ενδοθηλίου είναι η ρύθμιση του αγγειακού τόνου και επιτελείται με την έκκριση αγγειοδιασταλτικών ουσιών (Εικόνα 13) όπως του παράγοντα που απελευθερώνεται από το ενδοθήλιο (Endothelial Derived Relating Factor – EDRF, που σε πολλές περιπτώσεις πρόκειται για το NO, προστακυκλίνη και αγγειοσυσπαστικών ουσιών πχ ενδοθηλίνη-1 ή αγγειοτενσίνη II. Οι ουσίες αυτές παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από τη διέγερση των ειδικών υποδοχέων που διαθέτουν από κατάλληλα ερεθίσματα και στη συνέχεια οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στα ΛΜΚ, μεταβάλλοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{+2} (42). Ουσίες που προκαλούν με διάφορους μηχανισμούς αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{+2} στο ενδοθηλιακό κύτταρο αυξάνουν την παραγωγή NO. Το παραγόμενο NO αναστέλλει τη δράση του ίδιου του ενζύμου παραγωγής του, της συνθετάσης του NO (cNOS), αποτελώντας αρνητικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό ελέγχου της. Η παραγωγή των αγγειοσυσπαστικών ουσιών επιτελείται με τη διέγερση ειδικών υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, αναλόγων με αυτούς που ευθύνονται για την παραγωγή των αγγειοδιασταλτικών ουσιών (43). Η ρύθμιση του αγγειακού τόνου είναι τελικά το αποτέλεσμα της διατήρησης της ισορροπίας μεταξύ όλων των παραγόμενων από το ενδοθήλιο αγγειοχαλαρωτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών.

Η παθολογικά τροποποιημένη ενδοθηλιακή λειτουργία ονομάζεται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Είναι αποτέλεσμα μεταβολικών (δυσλιπιδαιμία) και φυσικών επιβαρύνσεων (αρτηριακή υπέρταση) και χαρακτηρίζεται μεταξύ των άλλων και από διαταραχή της ισορροπίας των προερχόμενων από το ενδοθήλιο αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών.

Το ενδοθήλιο, όταν βρεθεί υπό την επίδραση βλαπτικών παραγόντων, τότε οδηγείται σε μια σειρά αλυσιδωτών επανορθωτικών αντιδράσεων ως απάντηση στο βλαπτικό ερέθισμα και αλλάζει συμπεριφορά (41). Συγκεκριμένα, το πάσχον ενδοθήλιο κινητοποιεί προθρομβωτικούς και αγγειοσυσπαστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του δομή και τη λειτουργικότητά του και δημιουργούν συνθήκες αυξημένης διαβατότητας πρωτεϊνών και κυττάρων αίματος που διεισδύουν μέσω των οπών αλληλοσύνδεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στον έσω χιτώνα των αγγείων. Οι κυριότερες παθολογικές καταστάσεις που συνδυάζονται με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία και η στεφανιαία νόσος. Στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή στις στεφανιαίες αρτηρίες είναι μειωμένη (44). Αυτό πιθανόν να οφείλεται απενεργοποίηση του NO από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Σε υπερτασικούς ασθενείς η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή είναι μειωμένη (45), ενώ η επαναφορά της αρτηριακής πίεσης στα φυσιολογικά επίπεδα μέσω φαρμάκων, δεν συνοδεύεται από επιδιόρθωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Σε στεφανιαίες αρτηρίες οι οποίες είναι αθηρωματικές, τόσο η ακετυλοχολίνη όσο και η σεροτονίνη προκαλούν παθολογική αγγειοσύσπαση (αντί για αγγειοδιαστολή) (43). Στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια έχει διαπιστωθεί επίσης ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και συγκεκριμένα μειωμένη ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιασταλτική απάντηση στην ακετυλοχολίνη (41). Πιθανοί μηχανισμοί της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια είναι η ελάττωση της βασικής παραγωγής NO από τις αρτηρίες λόγω της περιορισμένης καρδιακής παροχής, η μείωση της παραγωγής του NO από το πνευμονικό ενδοθήλιο λόγω της πνευμονικής συμφόρησης, η αύξηση της έκκρισης ενδοθηλίνης και η μείωση της σταθερής συνθετάσης του NO (cNOS) με παράλληλη αύξηση της επαγωγίσιμης μορφής της συνθετάσης του NO (iNOS) στα ΛΜΚ των αγγείων (46). Η διατήρηση φυσιολογικής της ενδοθηλιακής λειτουργίας ή η βελτίωση της στους ασθενείς, καθώς και στα άτομα εκείνα που παρουσιάζουν τους ανωτέρω παράγοντες κινδύνου αποτελεί μείζονα στόχο για την αποτροπή της εξέλιξης των καρδιαγγειακών παθήσεων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

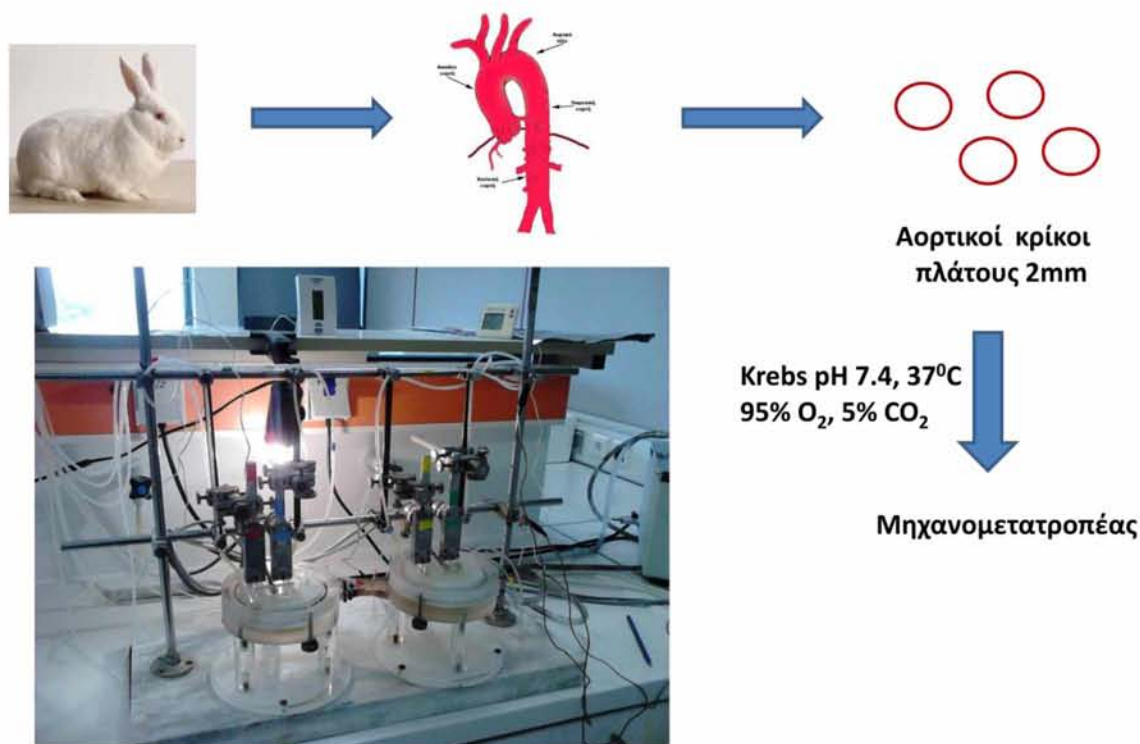
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Χειρισμός πειραματόζων

Ενήλικα αρσενικά κουνέλια (ηλικίας 6 εβδομάδων και βάρους περίπου 2,5 kg) θανατώθηκαν με ενδοφλέβια χορήγηση πεντοθάλης (Abbott, Illinois, USA) σε δόση 20 mg/kg. Ο χειρισμός των πειραματόζων πραγματοποιήθηκε με βάση τις ηθικές και συνταγματικές οδηγίες.

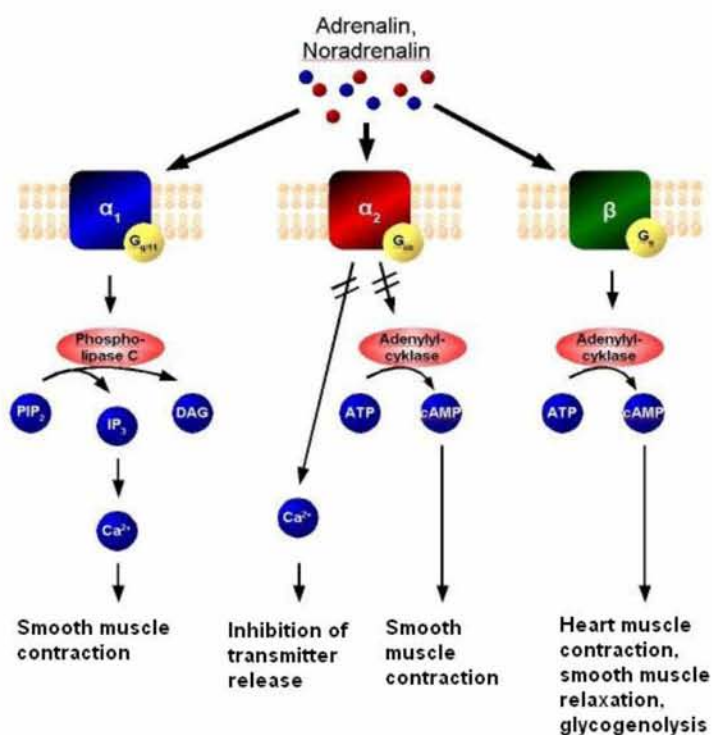
2.Απομόνωση αορτής και πειράματα συστολών

Μετά τη θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκε η αορτή, καθαρίστηκε και τοποθετήθηκε σε διάλυμα Krebs σύστασης σε mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 2.5 KHPO₄, 11.1 γλυκόζη και 25 NaHCO₃, pH 7.4 και με συνεχή παροχή 95% O₂ και 5% CO₂. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (SZ3 Olympus, Japan) η αορτή τεμαχίστηκε σε κρίκους πλάτους 2 mm και στη συνέχεια κάθε αορτικός κρίκος τοποθετήθηκε σε λουτρό διαπότισης με διάλυμα Krebs pH 7.4 στους 37°C και υπό συνεχή παροχή μείγματος 95% O₂ και 5% CO₂. Στα πειράματα χωρίς ενδοθήλιο, η στοιβάδα του ενδοθηλίου απομακρύνθηκε από τον ιστό με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας το παρασκεύασμα στερεώθηκε μεταξύ σταθερού σημείου του λουτρού διαπότισης και το άκρο του μηχανομετατροπέα (Grass FT03C Astro Med, Inc, USA). Στα παρασκευάσματα εφαρμόστηκε χειροκίνητα αρχικό φορτίο (τάση) 2 g και αφέθηκαν στη συνέχεια να ισορροπήσουν για τουλάχιστον 60 min, πριν αρχίσει η πειραματική διαδικασία. Η πειραματική διάταξη και η μεθοδολογία παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 14.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης και της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία

Μελετήθηκε η δράση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na⁺, λιδοκαΐνη σε συγκεντρώσεις 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ και 10⁻⁴M σε ιστό που βρίσκεται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνης (phe) 2μM ή KCl (35 mM). Οι παράγοντες αυτοί επιλέχτηκαν γιατί προκαλούν σύσπαση των ΛΜΚ των αγγείων με διαφορετικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, η φαινυλεφρίνη αποτελεί κλασικό αγωνιστή των α₁ αδρενεργικών υποδοχέων –οι οποίοι είναι μεμβρανικοί και συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Οι α₁ υποδοχείς εκφράζονται σε αφθονία στα αγγεία και θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές της συσταλτικότητας, του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Η διέγερση των α₁ υποδοχέων οδηγεί στον σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) στην απελευθέρωση Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο και στην μυϊκή συστολή (Εικόνα 15).

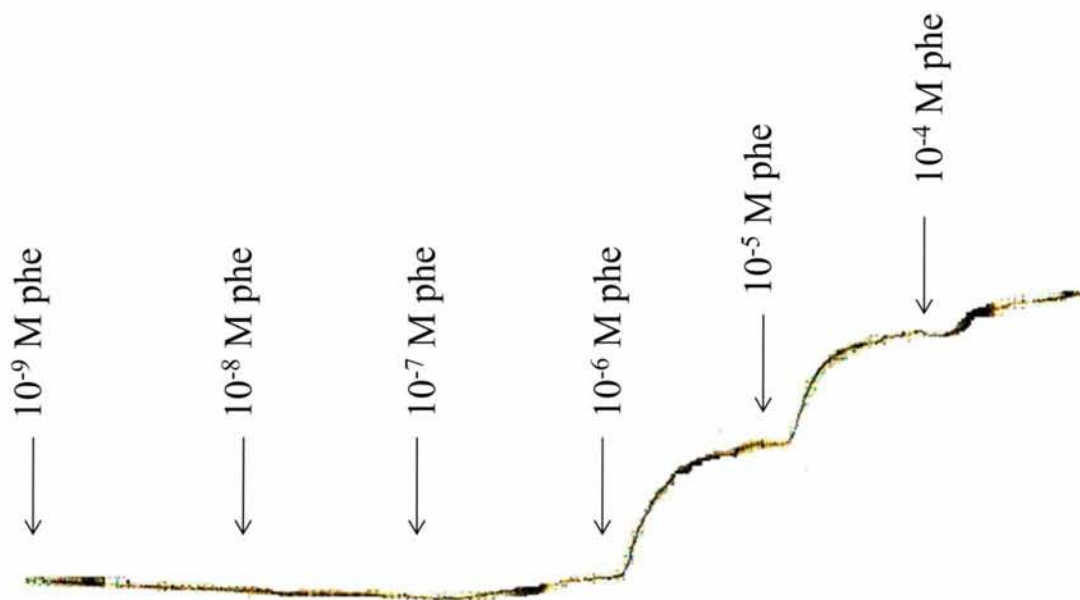


Εικόνα 15 . Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων. (Ανατύπωση από https://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor)

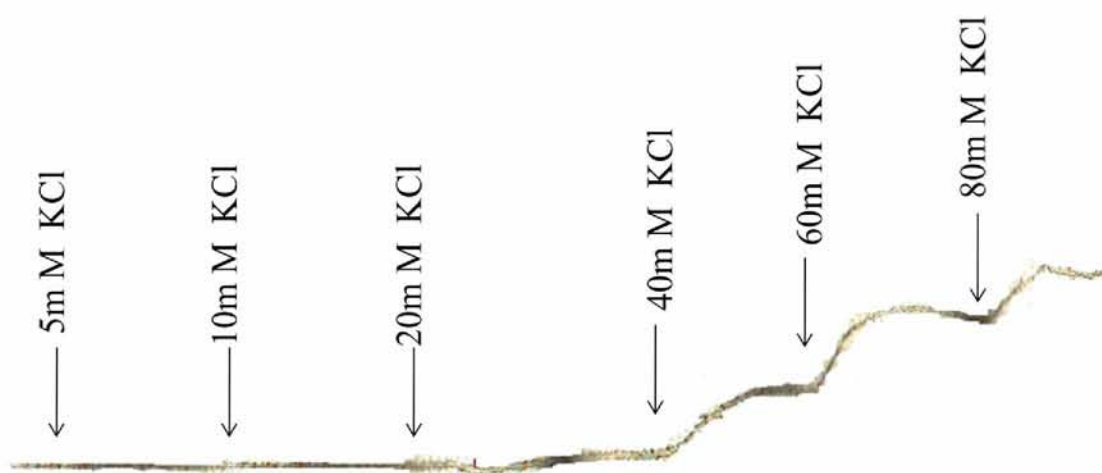
Το KCl προκαλεί δόσοεξαρτώμενη σύσπαση των ΛΜΚ των αγγείων (31). Η αυξημένη συγκέντρωση του εξωκυττάριου καλίου προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων με αποτέλεσμα την είσοδο ασβεστίου μέσα στο κύτταρο. Η είσοδος ασβεστίου στα ΛΜΚ οδηγεί σε συστολή ενώ στις νευρικές ίνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος, που βρίσκονται στο παρασκεύασμα σε απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή. Στα παρασκευάσματα κρίκων αορτής που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συστολών, υπάρχουν γάγγλια και μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού όπως και τμήματα των μεταγαγγλιακών ινών του συμπαθητικού. Οι ίνες του συμπαθητικού δεν φαίνεται να εμπλέκονται στην δράση του KCl καθώς γρήγορα «απογυμνώνονται» από το νευροδιαβιβαστή. Αντιθέτως οι ίνες του παρασυμπαθητικού, καθώς διατηρούν την ακεραιότητά τους, μπορούν να εκπολωθούν με την αυξημένη συγκέντρωση του KCl με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης που προκαλεί σε μερικά αγγεία προκαλεί αγγειοδιαστολή με άμεση δράση στα ΛΜΚ αλλά κυρίως η δράση της είναι έμμεση μέσω πρόσδεσης σε M_3 μουσκαρινικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων και απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου (NO) (47). Το διάλυμα KCl συγκέντρωσης 35 mM είχε την ίδια σύσταση με το διάλυμα Krebs, εκτός από την ισομοριακή αντικατάσταση του NaCl από KCl. Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω συσπαστικών παραγόντων επιλέχθηκαν καθώς προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι

βρίσκονται κοντά στη συγκέντρωση που προκαλούν το 50% της μέγιστης σύσπασης (EC_{50}), όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 και το Διάγραμμα 1.

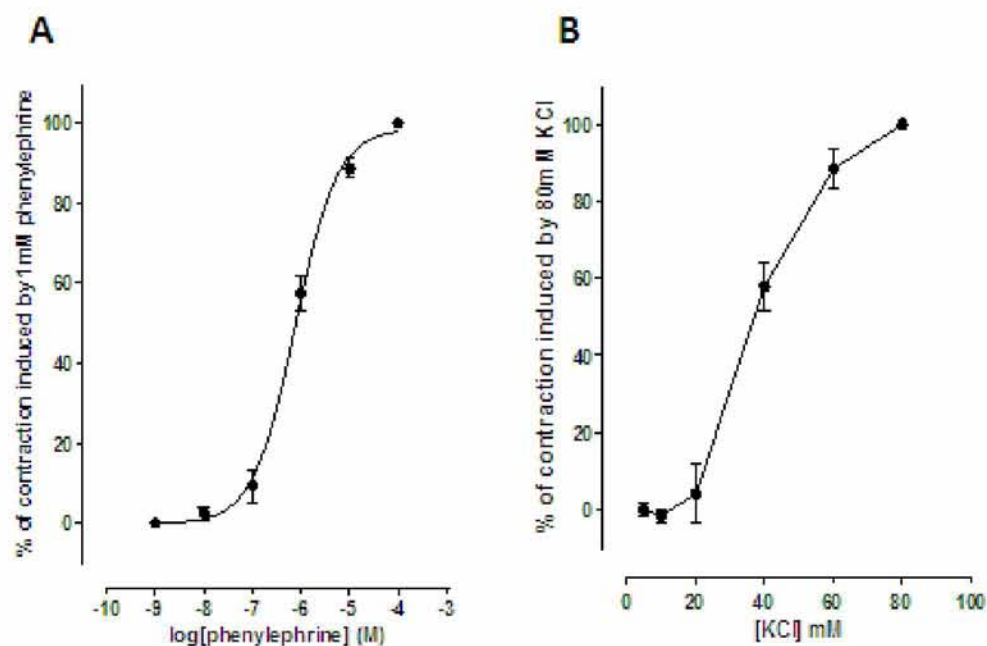
(A)



(B)



Εικόνα 16. Αντιπροσωπευτικές καταγραφές που δείχνουν την επίδραση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων (A) φανυλεφρίνης (phe) και (B) KCl στον τόνο των λείων μυϊκών ινών αορτής κονίκλου με άθικτο ενδοθήλιο



Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση της καμπύλης δόσης-απάντησης παρασκευασμάτων αορτής κονίκλου με άθικτο ενδοθήλιο, στη φαινυλεφρίνη (A) και στο KCl (B). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $MO \pm SEM$ από 5 ανεξάρτητα πειράματα

Μετά την σύσπαση του ιστού με 2 μM φαινυλεφρίνης ή 35 mM KCl αναμένονταν ο ιστός να αναπτύξει σταθερή τάση πλατό (Εικόνα 17) και τότε στο υγρό διαπότισης προστέθηκε η λιδοκαΐνη αθροιστικά σε συγκεντρώσεις από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη. Απουσία της λιδοκαΐνης η φαινυλεφρίνη ή το KCl προκάλεσε σταθερή σύσπαση των ΛΜΚ σε σχέση με το χρόνο (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτική καταγραφή που δείχνει ότι η φαινυλεφρίνη (phe) σε συγκέντρωση 2 μM προκαλεί σταθερή σύσπαση των λείων μυϊκών ινών αορτής κονίκλου με άθικτο ενδοθήλιο

Τα πειράματα στα οποία ως συσπαστικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε η φαινυλεφρίνη, έγιναν σε παρασκευάσματα με άθικτο ενδοθήλιο παρουσία και απουσία Ca^{+2} στο υγρό διαπότισης, ενώ τα πειράματα στα οποία ως συσπαστικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το KCl έγιναν σε αορτικούς δακτυλίους με άθικτο ενδοθήλιο και σε παρασκευάσματα που το ενδοθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά. Η επιβεβαίωση της αφαίρεσης του ενδοθηλίου έγινε με την προσθήκη 2mM ακετυλοχολίνης και την απουσία εμφάνισης χάλασης του ιστού (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Αντιπροσωπευτική καταγραφή που δείχνει ότι η ακετυλοχολίνη (ACh) σε συγκέντρωση 2mM προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών αορτής κονίκλου όταν το ενδοθήλιο είναι άθικτο

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα συσταλτικότητας προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich Chemical (Germany), εκτός από τη λιδοκαΐνη που ήταν από την εταιρεία Astra Zeneca. Τα διαλύματα παρασκευάζονται φρέσκα κατά την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος.

3. Δημιουργία και διατήρηση πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚ αορτής κονίκλων

Μετά την θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκε η αορτή κάτω από άσηπτες συνθήκες και τοποθετήθηκε σε κρύο (4°C) αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου (0.2 mM). Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις του ιστού, αφαιρέθηκε το λίπος και τα υπολείμματα ιστών που περιέβαλαν την αορτή και με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού απομακρύνθηκε το ενδοθήλιο.

Οι λείες μυϊκές ίνες μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού (0.25% αλβουμίνης ορού βοός, 2mg/ml κολλαγενάση I και 10U/ml ελαστάση IV) και επώαστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε νέο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου. Ακολούθησε, μεταφορά του εναιωρήματος στο δεύτερο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού (0.25% αλβουμίνης ορού βοός, 1mg/ml κολλαγενάση I και 20U/ml ελαστάση IV)

και επώαση στους 37°C για 60 λεπτά. Έπειτα, το εναιώρημα των λείων μυϊκών ινών φυγοκεντρήθηκε, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12 (DMEM-F12, Biosera), το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10 % βόειο ορό (FBS), καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100 IU/ml) και στρεπτομυκίνη (100 µg/ml). Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε με ελαφριά ανάδευση προκειμένου να αποκολληθούν τα χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών.

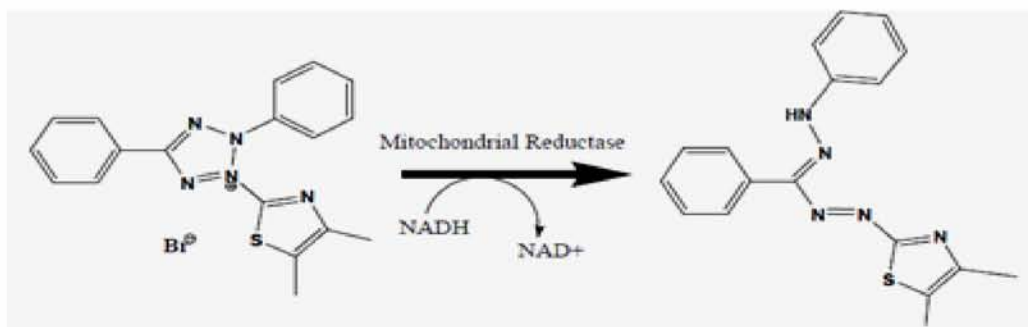
Μετά την απομόνωση των ΛΜΚ τα ζωντανά κύτταρα καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon YS2T, (Nikon Inc., Melville New York, USA), με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε φλάσκα των 75 cm² (περίπου 5x10⁴ κύτταρα ανά 2 ml θρεπτικού υλικού), σε 5 % CO₂ στους 37°C. Μετά από 48 h το μεγαλύτερο ποσοστό των ΛΜΚ είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας, οπότε το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από νέο και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες, με περιοδική αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανά 2 ημέρες. Όταν τα κύτταρα δημιουργήσαν μονοστιβάδα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη, ακολούθησαν επανακαλλιέργειες των κυττάρων σε φλάσκες ή σε τρυβλία. Τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην 3^η με 5^η ανακαλλιέργεια.

Η διατήρηση των κυττάρων της πρωτογενούς καλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία -80°C. Τα κύτταρα προς αποθήκευση, τα οποία ήταν προσκολλημένα ως μονοστιβάδα στην επιφάνεια φλάσκας, ξεπλύθηκαν με διάλυμα PBS (Phosphate buffered saline). Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.2% θρυψίνης-0.05% EDTA σε PBS και η φλάσκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 5ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 με 10% FBS, φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12, με 10% FBS, που περιείχε επιπλέον 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο, Sigma-Aldrich). Τέλος μεταφέρθηκαν σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιέργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Γρήγορο ξεπάγωμα των παγωμένων κυττάρων σε υδατόλουτρο στους 37°C, προσθήκη 6ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 που περιείχε 10% FBS, φυγοκέντρωση των κυττάρων και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση σε 5% CO₂ στους 37°C.

4.Μελέτη του πολλαπλασιασμού λείων μυϊκών κυττάρων αορτής (Χρωματομετρική δοκιμή MTT)

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εκτιμήθηκε με την χρωματομετρική δοκιμή MTT. Η δοκιμασία MTT βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών (μεταβολικά ενεργών) κυττάρων να ανάγουν το άλας του τετραζολίου (3{4,5-διμέθυλθιαζολ-2-yl}-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου) με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση σε φορμαζάνιο (formazan) σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση.



Το φορμαζάνιο είναι μωβ χρώματος και η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη με την βιωσιμότητα των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού. Επομένως μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης: όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος 490nm με αναφορά στα 630nm. Επομένως η δοκιμασία MTT αντανakλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Η MTT είναι τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του χαμηλού κόστους, ακρίβειας, ταχύτητας και της έλλειψης χρήσης ραδιοϊσοτόπων. Ως τεχνική έχει βελτιστοποιηθεί για διάφορα είδη κυττάρων.

Στα πειράματα αυτά η ομάδα ελέγχου (control), ήταν κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS εμφάνιζαν το μέγιστο πολλαπλασιασμό. Η επίδραση της λιδοκαΐνης, νικαρδιπίνης και γλιβενκλαμίδης στον πολλαπλασιασμό των ΔΜΚ έγινε με την προσθήκη των παραπάνω παραγόντων στο υγρό της καλλιέργειας, παρουσία 10% FBS, για 48 ώρες. Συγκεκριμένα, σε πλάκες κυτταρικών καλλιεργειών 96 κελίων καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα σε πυκνότητα 2000 κύτταρα ανά θέση για 24 h σε θρεπτικό υλικό παρουσία ορού και την επόμενη μέρα έγιναν πλύσεις με PBS και αλλαγή σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού για 24h. Την επόμενη μέρα μια ομάδα κυττάρων καλλιεργήθηκαν απουσία ορού, μία ομάδα παρουσία 10%FBS και μια ομάδα παρουσία 10% FBS και λιδοκαΐνης (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M) ή νικαρδιπίνης (10^{-7} , 10^{-5} M) ή γλιβενκλαμίδης (10^{-8} , 10^{-5} M) σε θρεπτικό παρουσία ορού για

48h, καθώς και απουσία ορού (control). Μετά από 48h επίδρασης των παραγόντων, προστέθηκε διάλυμα MTT για 2h και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της κάθε πλάκας κυτταρικών καλλιιεργειών 96 κελίων.

5.Μελέτη της κινητικότητας λείων μυϊκών κυττάρων αορτής

(Δοκιμή επούλωσης πληγής ,wound healing assay)

Η κινητικότητα των κυττάρων μετρήθηκε με την δοκιμή επούλωσης πληγής. Σε πλάκες κυτταρικών καλλιιεργειών 24 κελίων καλλιιεργήθηκαν τα κύτταρα σε πυκνότητα 1.5×10^5 κύτταρα για 24 h παρουσία ορού, ώστε να επιτευχθεί προσκόλληση στη στερεά επιφάνεια και στη συνέχεια, έγινε ανανέωση του υλικού καλλιιεργειας. Ύστερα από 24 h δημιουργήθηκε σχισμή με insert (ρύγχος συγκεκριμένου μήκους και πλάτους) κατά μήκος της επιφάνειας της καλλιιεργειας και στο υλικό της καλλιιεργειας προστέθηκε λιδοκαΐνη (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M) ή νικαρδιπίνη (10^{-7} , 10^{-5} M) , ή γλιβενκλαμίδη (10^{-8} , 10^{-5} M) παρουσία 10% ορού. Η κυτταρική κινητικότητα μετρήθηκε αναλύοντας την εικόνα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0, 24 και 48 ώρες) με την βοήθεια του προγράμματος Image J Software (NIH).

6.Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Στα πειράματα συστολών ή χάλαση των ΛΜΚ εκφράστηκε ως ποσοστό (%)της αρχικής σύσπασης των ΛΜΚ που προκλήθηκε από τα 2 μ M φαινυλεφρίνης ή τα 35 mM KCl και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (MO) \pm τυπικό σφάλμα (standard error, SEM) από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

Στα πειράματα μελέτης της επίδρασης των διαφόρων παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό της οπτικής πυκνότητας που μετρήθηκε στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού. Σε κάθε πείραμα η εκτίμηση του πολλαπλασιασμού έγινε σε τριπλέτα και υπολογίστηκε ο MO. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO \pm SEM από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

Στα πειράματα μελέτης της επίδρασης των διαφόρων παραγόντων στην κινητικότητα των ΛΜΚ οι μετρήσεις εκφράστηκαν ως % ποσοστό επούλωσης πληγής η εκτίμηση της κινητικότητας έγινε σε τριπλέτα και υπολογίστηκε ο MO. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO \pm SEM από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

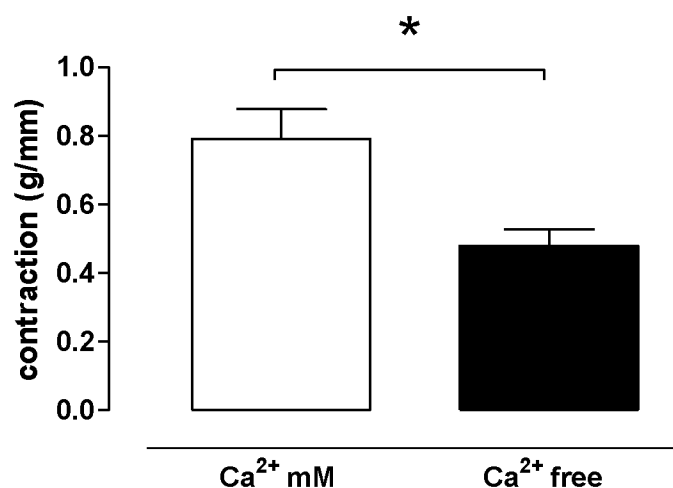
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπως και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5. Στην ομάδα των πειραμάτων που μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων της λιδοκαΐνης στους αορτικούς δακτυλίους κονίκλου χρησιμοποιήθηκε nonlinear regression για τον υπολογισμό της μέγιστης τάσης (B_{max}) και για της συγκέντρωσης που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης (EC_{50}). Για τη σύγκριση τιμών που

αφορούν διαφορετικούς ιστούς ή διαφορετικές κυτταροκαλλιέργειες έγινε αρχικά η μελέτη της κατανομής των τιμών (normality test, Kolmogorov-Smirnov) και σε περίπτωση κανονικής κατανομής των τιμών έγινε σύγκριση των τιμών με unpaired t-test. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των τιμών η σύγκριση έγινε με Mann-Whitney test (non-parametric). Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε, για κάθε είδος στατιστικής ανάλυσης, η τιμή $P < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνη, στην επαγόμενη από την φαινυλεφρίνη σύσπαση αορτικών δακτυλίων κονίκλου

Αρχικά, σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων μελετήθηκε η επίδραση του ασβεστίου σε παρασκευάσματα που βρίσκονται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη $2\mu\text{M}$ (διάγραμμα 2). Η τάση που προκλήθηκε από την φαινυλεφρίνη στα παρασκευάσματα παρουσία ιόντων ασβεστίου στο υγρό διαπότισης ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την τάση που αναπτύχθηκε απουσία ιόντων ασβεστίου. Ειδικότερα οι τιμές της τάσης (gr/mm) που υπολογίστηκαν ήταν 0.791 ± 0.086 και 0.479 ± 0.048 παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P=0.019$)

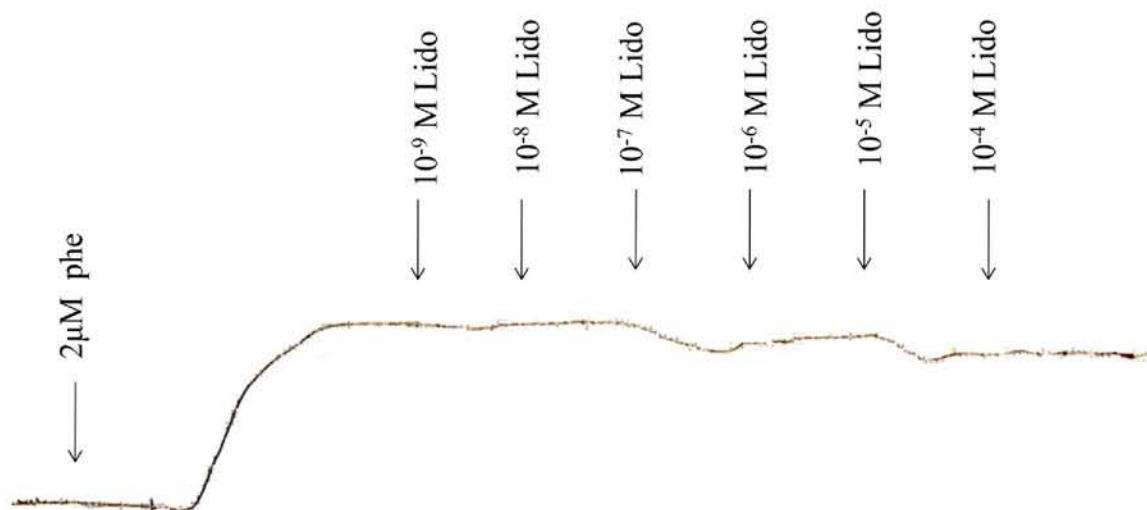


Διάγραμμα 2. Η τάση που προκάλεσε η φαινυλεφρίνη ($2\mu\text{M}$) σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλου (gr/mm) παρουσία ($\text{Ca}^{2+} \text{ mM}$) και απουσία ($\text{Ca}^{2+} \text{ free}$) ιόντων ασβεστίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. $*P < 0.05$

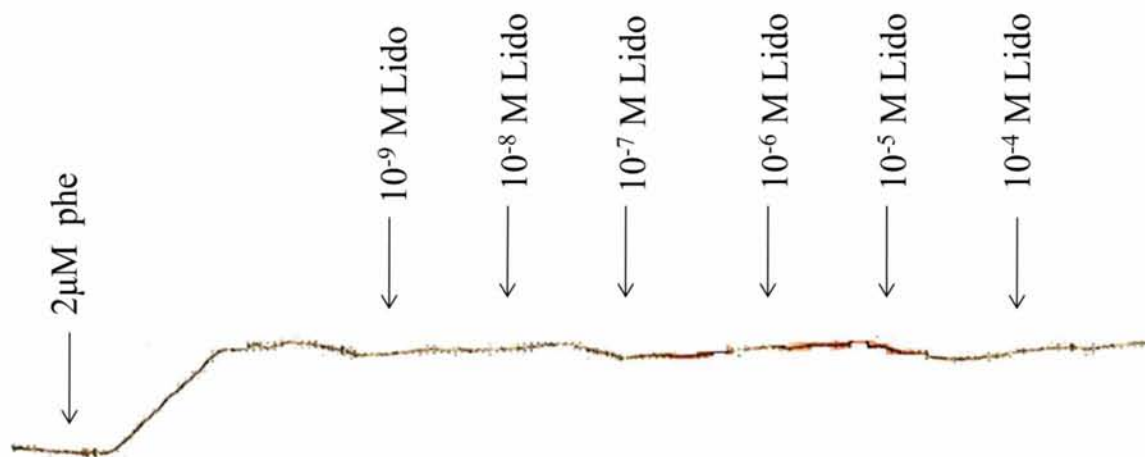
Σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων μελετήθηκε η επίδραση της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα αορτής που βρίσκονται σε σύσπαση με $2\mu\text{M}$ φαινυλεφρίνης παρουσία (Εικόνα 19) ή απουσία ιόντων Ca^{+2} (Εικόνα 20). Η λιδοκαΐνη προστέθηκε στο υγρό διαπότισης αθροιστικά σε συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M , ξεκινώντας από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη συγκέντρωση και η χάλαση υπολογίστηκε ως ποσοστό της αρχικής σύσπασης του ιστού από την φαινυλεφρίνη.

Η λιδοκαΐνη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη χάλαση των AMK της αορτής κονίκλου που βρίσκονται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη τόσο παρουσία (Εικόνα 19, διάγραμμα 3) όσο και απουσία (Εικόνα 20, διάγραμμα 3) ιόντων ασβεστίου στο υγρό διαπότισης. Απουσία ιόντων ασβεστίου, η χάλαση που προκαλεί η λιδοκαΐνη είναι μικρότερη σε σύγκριση με τη χάλαση που προκαλεί παρουσία ασβεστίου στο υγρό διαπότισης. Ειδικότερα οι τιμές της μέγιστης χάλασης

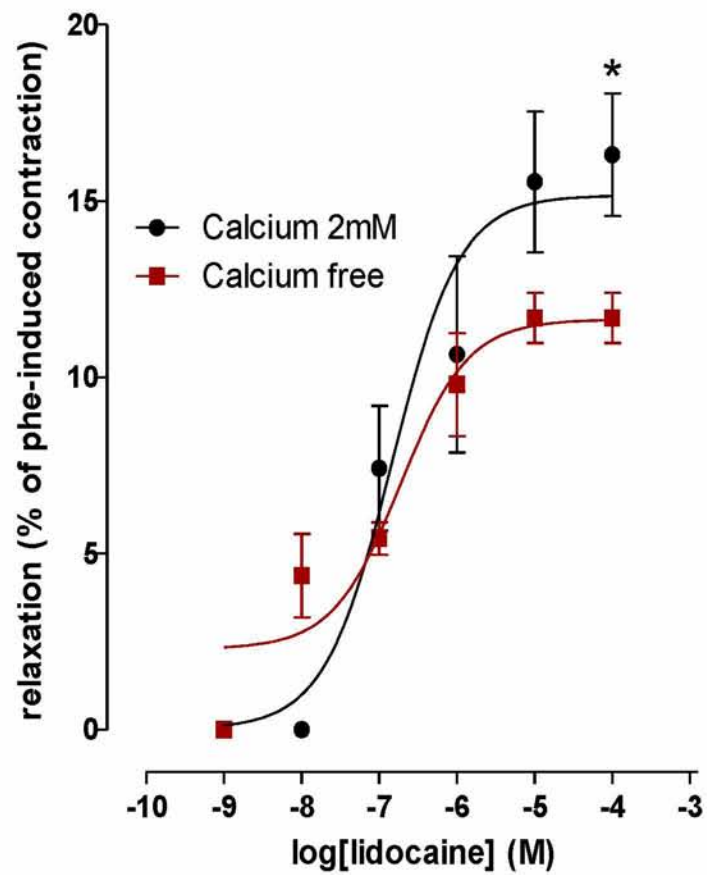
(B_{max}) που υπολογίστηκαν ήταν $15.16 \pm 1.32\%$ και $11.64 \pm 0.69\%$ παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου στο υγρό διαπότισης αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P=0.045$). Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0.079$) στις τιμές της συγκέντρωσης της λιδοκαΐνης που προκαλούν το 50% της μέγιστης χάλασης (EC_{50}) στα παρασκευάσματα της αορτής. Οι τιμές αυτές ήταν 1.463×10^{-7} M και 1.881×10^{-7} M παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου αντίστοιχα.



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτική καταγραφή της επίδρασης της λιδοκαΐνης (Lido) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε παρασκευάσματα αορτής κόνικλου που βρίσκονται σε σύσπαση με 2 μ M φαινυλεφρίνης (phe) παρουσία ιόντων Ca^{+2}



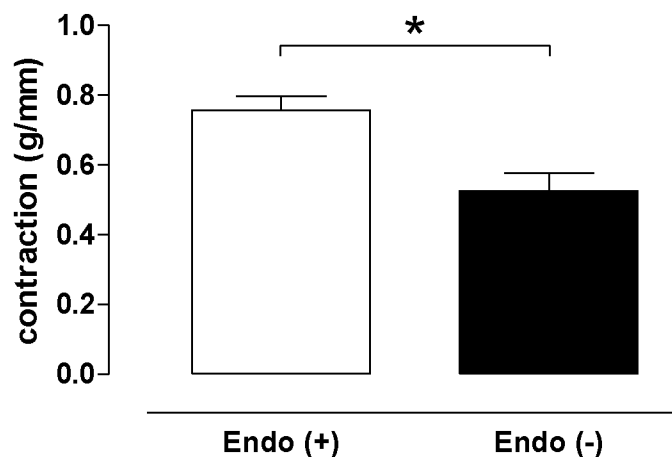
Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτική καταγραφή της επίδρασης της λιδοκαΐνης (Lido) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε παρασκευάσματα αορτής κόνικλου που βρίσκονται σε σύσπαση με 2 μ M φαινυλεφρίνης (phe) απουσία ιόντων Ca^{+2}



Διάγραμμα 3. Γραφική παράσταση της επίδρασης της λιδοκαΐνης (lidocaine) σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου που βρίσκονται σε σύσπαση με 2μM φαινυλεφρίνης (phe) παρουσία (calcium 2mM) ή απουσία (calcium free) ιόντων Ca^{+2} . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 5 ανεξάρτητα πειράματα. * $P < 0.05$

2. Επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνη στην επαγόμενη από χλωριούχο κάλιο σύσπαση αορτικών δακτυλίων κονίκλου

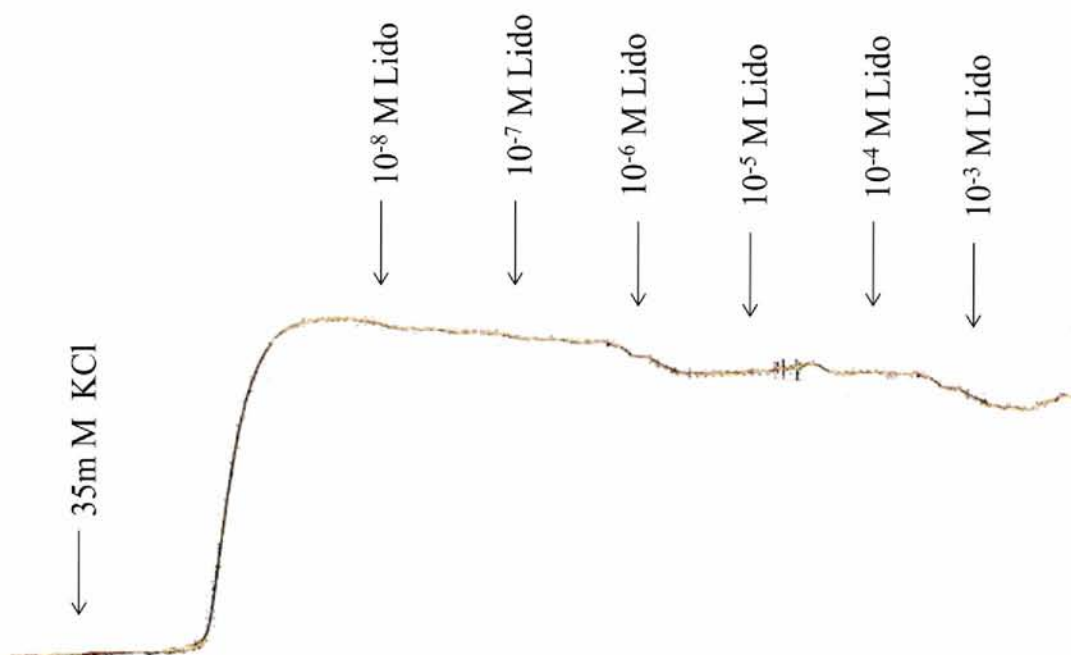
Αρχικά, σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων μελετήθηκε η επίδραση του ενδοθηλίου στη σύσπαση που προκαλείται με χλωριούχο κάλιο 35mM στους αορτικούς δακτυλίους (διάγραμμα 4). Η τάση που προκλήθηκε παρουσία ενδοθηλίου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την τάση που αναπτύχθηκε στα παρασκευάσματα απουσία ενδοθηλίου. Ειδικότερα οι τιμές της τάσης (gr/mm) που υπολογίστηκαν ήταν 0.756 ± 0.53 και 0.526 ± 0.051 παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P=0.0124$)



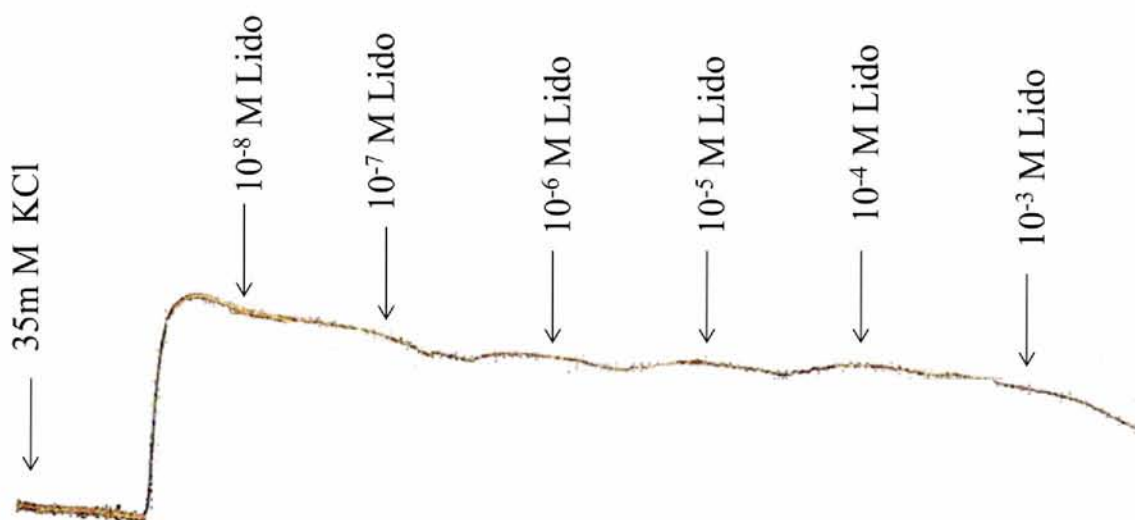
Διάγραμμα 4. Η τάση που προκάλεσε το KCl (2mM) σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλου (gr/mm) σε παρασκευάσματα αορτής με άθικτο ενδοθήλιο (Endo +) ή παρασκευάσματα των οποίων το ενδοθήλιο έχει αφαιρεθεί μηχανικά (Endo -). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 4-ανεξάρτητα πειράματα.

* $P < 0.05$

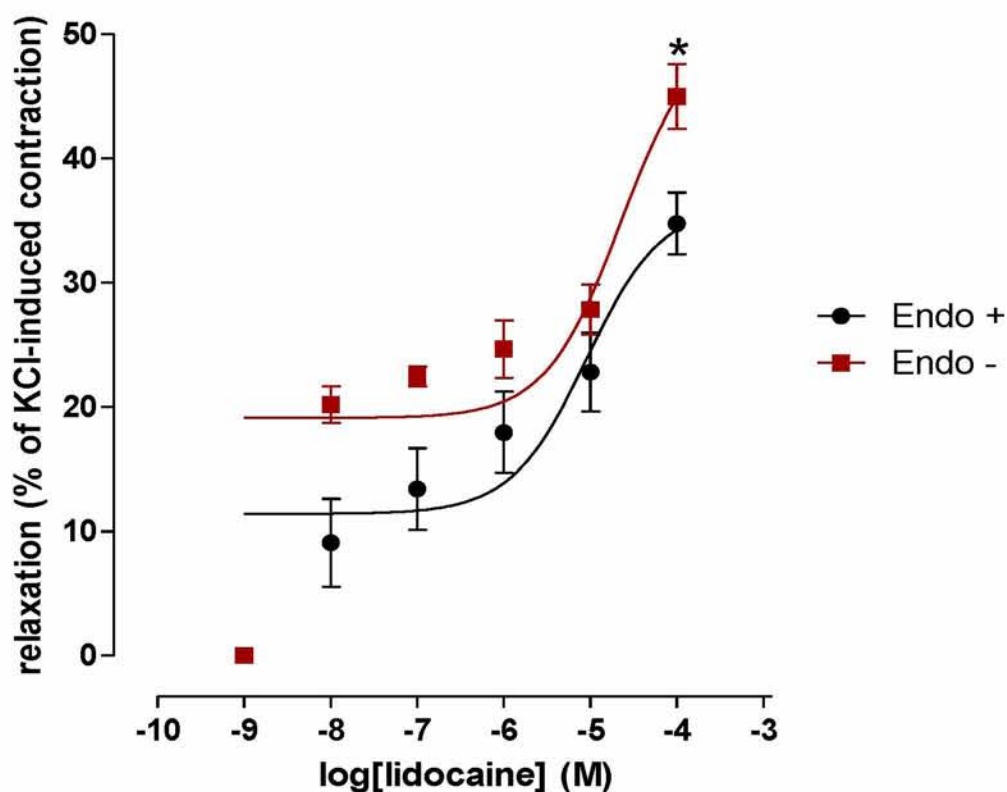
Σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων μελετήθηκε η επίδραση της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα που βρίσκονται σε σύσπαση 35mM KCl παρουσία και απουσία ενδοθηλίου. Η λιδοκαΐνη προστέθηκε στο υγρό διαπότισης αθροιστικά σε συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M, ξεκινώντας από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη συγκέντρωση και η χάλαση υπολογίστηκε ως ποσοστό της αρχικής σύσπασης του ιστού με 35mM KCl. Η λιδοκαΐνη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη χάλαση των ΛΜΚ της αορτής κονίκλου που βρίσκονται σε σύσπαση με 35mM KCl σε παρασκευάσματα που έχουν άθικτο ενδοθήλιο (Εικόνα 21, διάγραμμα 5) όπως και σε παρασκευάσματα που το ενδοθήλιο έχει αφαιρεθεί μηχανικά (Εικόνα 22, διάγραμμα 5).



Εικόνα 21. Αντιπροσωπευτική καταγραφή της επίδρασης της λιδοκαΐνης (Lido) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου με άθικτο ενδοθήλιο, που βρίσκονται σε σύσπαση με 35mM χλωριούχου καλίου (KCl)



Εικόνα 22. Αντιπροσωπευτική καταγραφή της επίδρασης της λιδοκαΐνης (Lido) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου που το ενδοθήλιο έχει αφαιρεθεί μηχανικά και βρίσκονται σε σύσπαση με 35mM χλωριούχου καλίου (KCl)

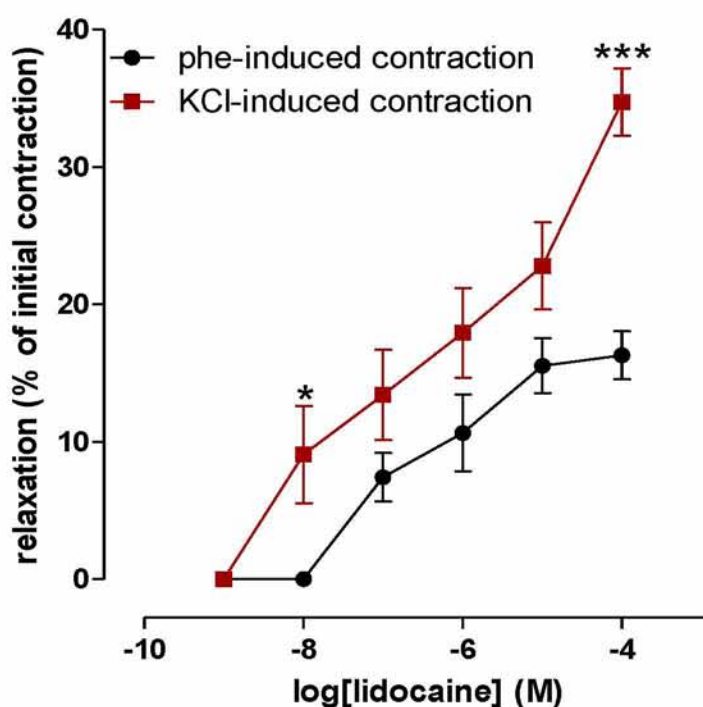


Διάγραμμα 5. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου με άθικτο ενδοθήλιο (Endo +) η σε παρασκευάσματα που το ενδοθήλιο έχει αφαιρεθεί μηχανικά (Endo -) και βρίσκονται σε σύσπαση με 35mM χλωριούχου καλίου (KCl). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 5 ανεξάρτητα πειράματα. * $P < 0.05$

Η λιδοκαΐνη σε συγκέντρωση 10^{-4} M προκαλεί στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$) μεγαλύτερη χάλαση σε ιστό που βρίσκεται σε σύσπαση με 35mM KCl και το ενδοθήλιο του έχει αφαιρεθεί μηχανικά σε σύγκριση με τη χάλαση που προκαλεί σε ιστό με άθικτο ενδοθήλιο (Διάγραμμα 5). Εντούτοις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.1$) στις τιμές της μέγιστης χάλασης (B_{max}) που υπολογίστηκαν, $36.30 \pm 4.53\%$ και $50.68 \pm 6.73\%$ της αρχικής σύσπασης παρουσία και απουσία ενδοθηλίου αντίστοιχα. Παρόμοια δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.4$) στις τιμές της συγκέντρωσης της λιδοκαΐνης που προκαλούν το 50% της μέγιστης χάλασης (EC_{50}) στα παρασκευάσματα της αορτής παρουσία και απουσία ενδοθηλίου. Η EC_{50} ήταν 9.014×10^{-6} M στα παρασκευάσματα παρουσία ενδοθηλίου και 2.264×10^{-5} M στα παρασκευάσματα απουσία ενδοθηλίου.

3. Σύγκριση της δράσης της λιδοκαΐνης στην επαγόμενη από φαινyleφρίνη ή χλωριούχο κάλιο σύσπαση σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου

Σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων έγινε σύγκριση της επίδρασης της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα αορτής που βρίσκονται σε σύσπαση με 2μM φαινyleφρίνης (παρουσία ιόντων ασβεστίου) ή με 35mM KCl (παρουσία ενδοθηλίου) (Διάγραμμα 6). Η λιδοκαΐνη προστέθηκε στο υγρό διαπότισης αθροιστικά σε συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} και 10^{-4} M, ξεκινώντας από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη συγκέντρωση και η χάλαση υπολογίστηκε ως ποσοστό της αρχικής σύσπασης του ιστού από την φαινyleφρίνη ή το KCl.



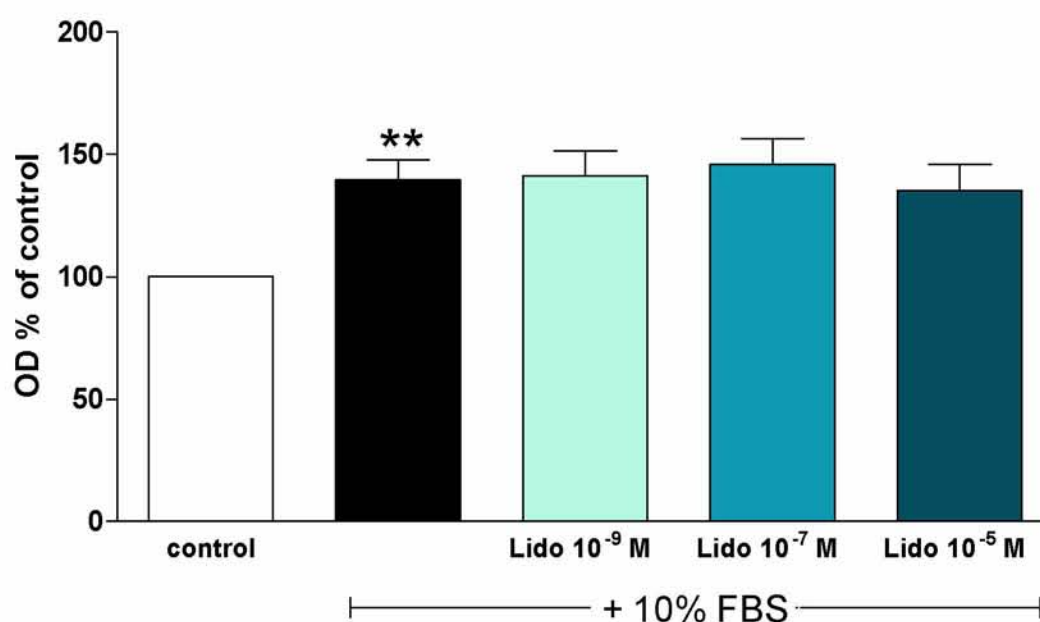
Διάγραμμα 6. Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλου που βρίσκονται σε σύσπαση με 2μM φαινyleφρίνης ή με 35mM KCl. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO±SEM από 5 ανεξάρτητα πειράματα. *P<0.05, ***P<0.001

Η λιδοκαΐνη προκαλεί στατιστικά σημαντική ($P<0.05$) μεγαλύτερη χάλαση στην επαγόμενη από χλωριούχο κάλιο σύσπαση (Διάγραμμα 6) στις συγκεντρώσεις 10^{-8} M και 10^{-4} M σε σύγκριση με τη χάλαση που προκαλεί σε ιστό που βρίσκεται σε σύσπαση με φαινyleφρίνη. Ενδεικτικά, 10^{-4} M λιδοκαΐνης, προκαλεί χάλαση $16.31\pm3.9\%$ και $34.75\pm5.52\%$ της αρχικής σύσπασης από φαινyleφρίνη ή KCl αντίστοιχα ($P<0.001$, Διάγραμμα 6).

4. Επίδραση της λιδοκαΐνης, της νικαρδιπίνης και της γλιβενκλαμίδης στον πολλαπλασιασμό αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων

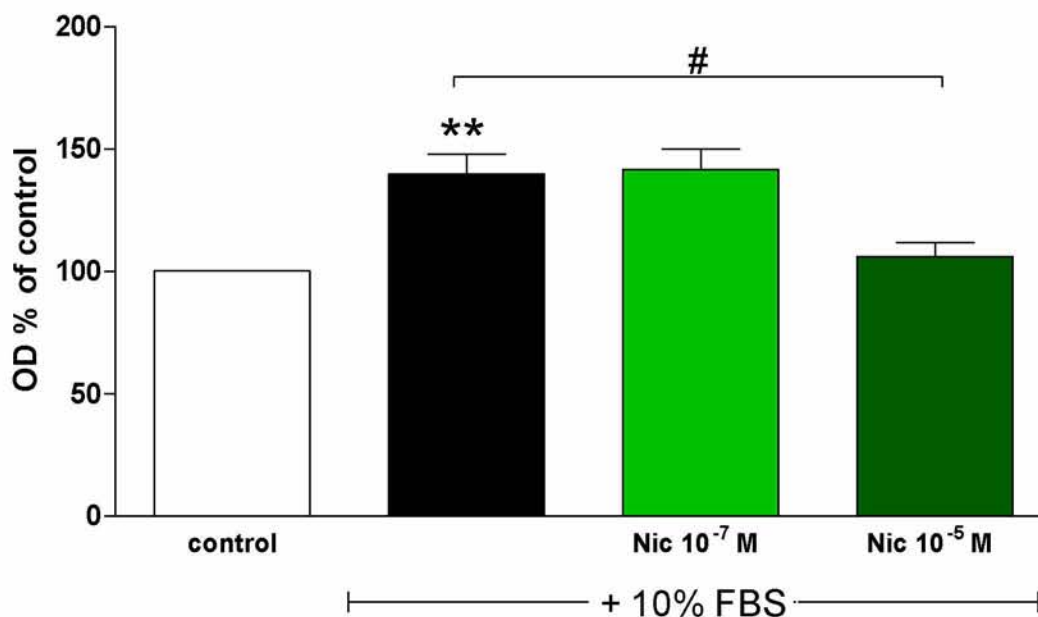
Χρησιμοποιώντας την τεχνική MTT-assay όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος, εκτιμήθηκε η επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνης (στις συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-7} και 10^{-5} M), του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνης (στις συγκεντρώσεις 10^{-7} και 10^{-5} M) και του ανταγωνιστή των K_{ATP} διαύλων, γλιβενκλαμίδης (στις συγκεντρώσεις 10^{-8} και 10^{-5} M) στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αορτής κονίκλου. Στα πειράματα αυτά ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ επιτεύχθηκε με την καλλιέργεια των κυττάρων για 48 ώρες σε υλικό παρουσία 10% FBS απουσία ή παρουσία του ανταγωνιστή. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) της οπτικής πυκνότητας που μετρήθηκε στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού για 48 ώρες (control). Η παρουσία 10% FBS στο υλικό της καλλιέργειας για 48 ώρες, επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (Διάγραμμα 7). Συγκεκριμένα παρουσία ορού η οπτική πυκνότητα που μετρήθηκε ήταν $139 \pm 8.1\%$ του control ($P=0.003$).

Η λιδοκαΐνη (Lido) σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκε δεν επηρέασε τον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (Διάγραμμα 7).



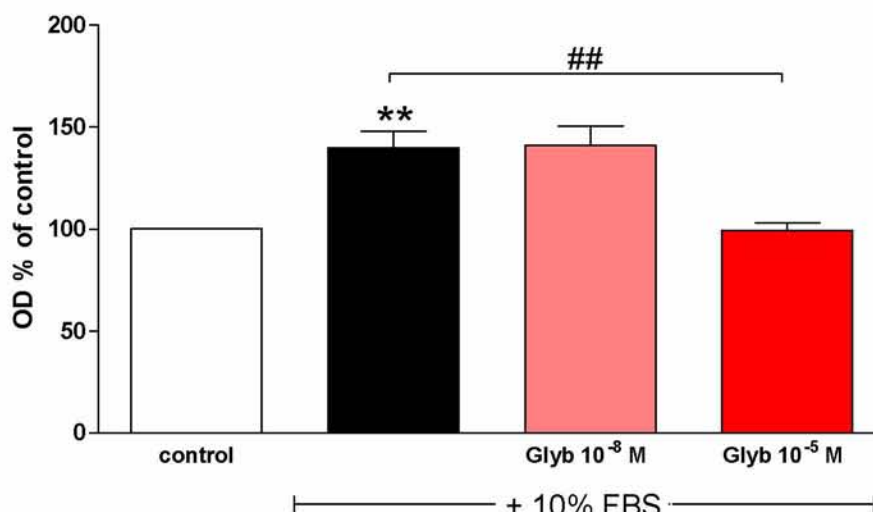
Διάγραμμα 7. Η επίδραση της λιδοκαΐνης (Lido) στον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (%) της οπτικής πυκνότητας (OD) που μετρήθηκε στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού για 48 ώρες (control) και παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το control

Η νικαρδιπίνη στη συγκέντρωση 10^{-7} M δεν επηρέασε τον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ενώ αντιθέτως τον μείωσε στατιστικά σημαντικά στη συγκέντρωση 10^{-5} M ($P < 0.05$, Διάγραμμα 8). Συγκεκριμένα, παρουσία ορού η οπτική πυκνότητα που μετρήθηκε ήταν $139 \pm 8.1\%$ του control στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS και $106.1 \pm 5.7\%$ του control στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS και 10^{-5} M νικαρδιπίνης.



Διάγραμμα 8. Η επίδραση της νικαρδιπίνης (Nic) στον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών αορτής κονίκλου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (%) της οπτικής πυκνότητας (OD) που μετρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 48 ώρες (control) και παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. $**P < 0.01$ σε σύγκριση με το control και $^{\#}P < 0.05$ σε σύγκριση με την τιμή της OD (% του control) στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο παρουσία 10% FBS

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9, η γλιβενκλαμίδα στη συγκέντρωση 10^{-7} M δεν επηρέασε τον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Αντιθέτως στη συγκέντρωση 10^{-5} M μείωσε τον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των κυττάρων, από $139 \pm 8.1\%$ του control στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS σε $99.10 \pm 3.7\%$ του control στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS και 10^{-5} M γλιβενκλαμίδης ($P < 0.004$, Διάγραμμα 9).

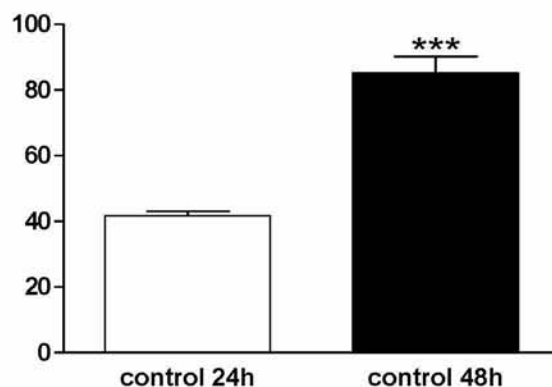


Διάγραμμα 9. Η επίδραση της γλιβενκλαμίδης (Glyb) στον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (%) της οπτικής πυκνότητας (OD) που μετρήθηκε στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού για 48 ώρες (control) και παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. $**P < 0.01$ σε σύγκριση με το control και $^{##}P < 0.01$ σε σύγκριση με την τιμή της OD (% του control) στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν μόνο παρουσία 10% FBS

5. Επίδραση της λιδοκαΐνης, της νικαρδιπίνης και της γλιβενκλαμίδης στην κινητικότητα αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων

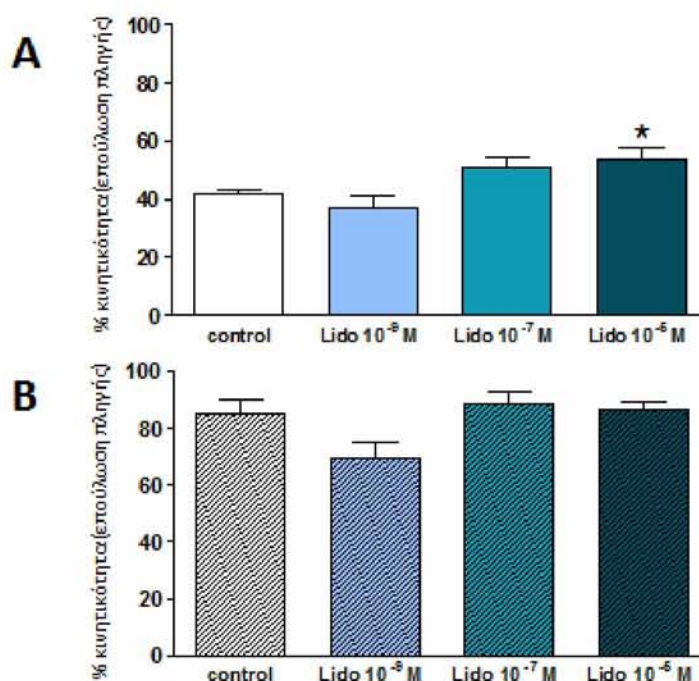
Χρησιμοποιώντας την μέθοδο επούλωσης πληγής (wound healing assay) όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος, εκτιμήθηκε η επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνης (στις συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-7} και 10^{-5} M), του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνης (στις συγκεντρώσεις 10^{-7} και 10^{-5} M) και του ανταγωνιστή των K_{ATP} διαύλων, γλιβενκλαμίδης (στις συγκεντρώσεις 10^{-8} και 10^{-5} M) στην κινητικότητα των ΛΜΚ αορτής κονίκλου. Στα πειράματα αυτά η κινητικότητα των ΛΜΚ μελετήθηκε με την καλλιέργεια των κυττάρων για 24 και 48h ώρες σε υλικό παρουσία 10% FBS απουσία (control) ή παρουσία του ανταγωνιστή.

Απουσία ανταγωνιστή, η κινητικότητα των ΛΜΚ ήταν στατιστικά μεγαλύτερη μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων παρουσία 10% FBS (Διάγραμμα 10). Το πρώτο 24ωρο η % κινητικότητα (επούλωση πληγής) ήταν 41.7 ± 1.3 και μετά από 48 ώρες 85.2 ± 10 ($P < 0.0001$).



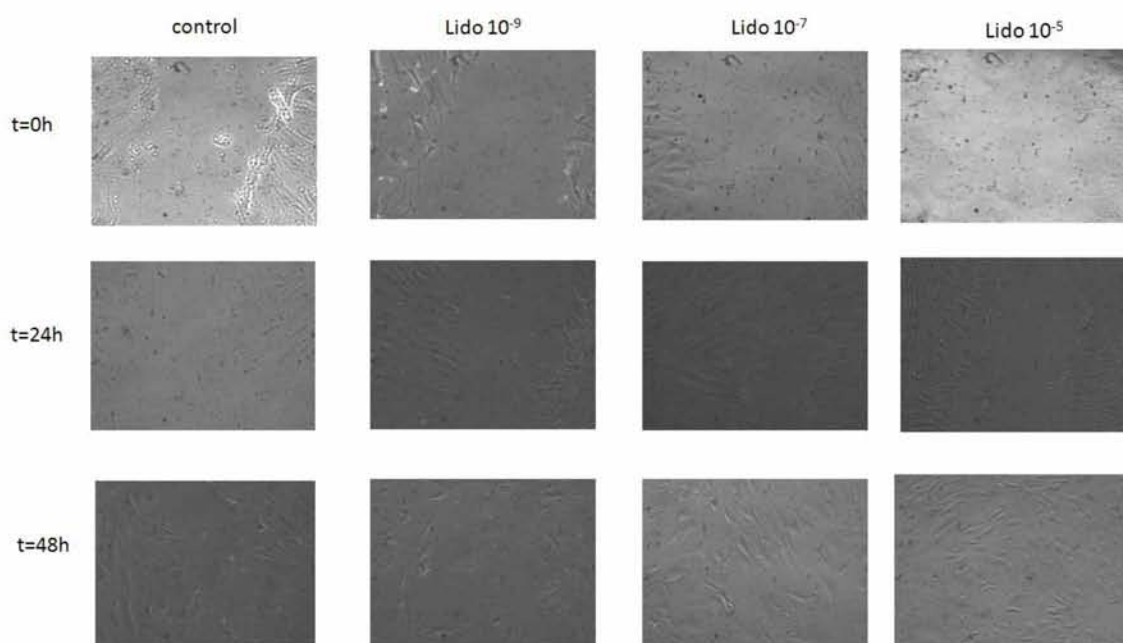
Διάγραμμα 10. Η επαγόμενη από την παρουσία 10% FBS κινητικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h και στις 48h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με την κινητικότητα των κυττάρων στις 24h

Η παρουσία λιδοκαΐνης, στη συγκέντρωση 10^{-9} M ή 10^{-7} M, τόσο για 24 όσο και για 48 ώρες δεν επηρεάζει την κινητικότητα των ΛΜΚ σε σύγκριση με την κινητικότητα που παρουσιάζουν οι ΛΜΚ όταν καλλιεργούνται απουσία του ανταγωνιστή (διάγραμμα 11, Εικόνα 23). Η παρουσία, για 24 ώρες, στο υγρό επώασης της λιδοκαΐνης σε συγκέντρωση 10^{-5} M αύξησε σημαντικά την % κινητικότητα (% επούλωση πληγής) των ΛΜΚ από 41.7 ± 1.3 σε 53.4 ± 4.5 ($P < 0.05$). Η επίδραση αυτή της λιδοκαΐνης (10^{-5} M) δεν παρατηρήθηκε μετά από 48 ώρες επώασης των ΛΜΚ (διάγραμμα 11, Εικόνα 23).



Διάγραμμα 11. Η επίδραση της λιδοκαΐνης (Lido) στην επαγόμενη από 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h (A) και στις 48h (B) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4

ανεξάρτητα πειράματα. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με την κινητικότητα των κυττάρων που καλλιεργούνται μόνο παρουσία 10% FBS (control)



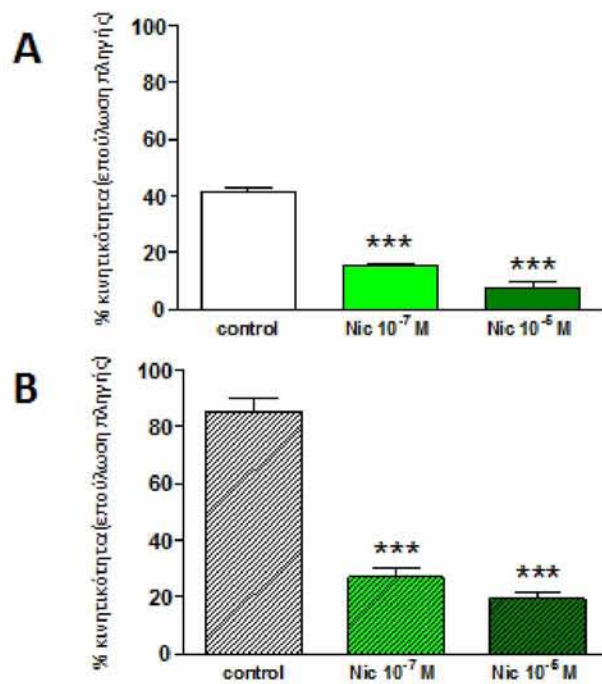
Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση της λιδοκαΐνης (Lido) στην επαγόμενη από την παρουσία 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h και στις 48h

Η παρουσία νικαρδιπίνης για 24 ή 48 ώρες στο υλικό της καλλιέργειας ελάττωσε σημαντικά την κινητικότητα των ΛΜΚ σε σύγκριση με την κινητικότητα που παρουσίασαν τα κύτταρα παρουσία μόνο ορού (Διάγραμμα 12, Εικόνα 24). Οι τιμές της κινητικότητας των ΛΜΚ παρουσιάζονται στον πίνακα 1 .

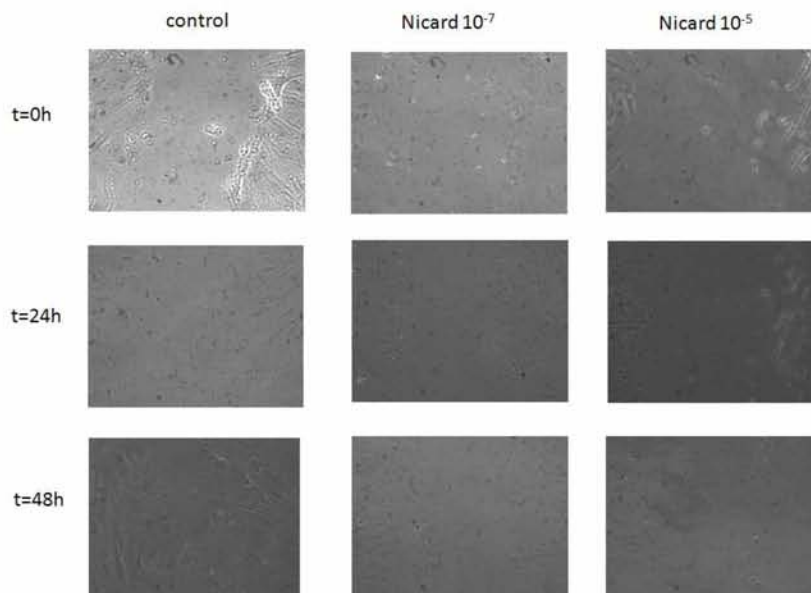
Πίνακας 1 Κινητικότητα των λείων μυϊκών ινών που καλλιεργήθηκαν για 24 ή 48 ώρες παρουσία μόνο 10% FBS (control) ή και νικαρδιπίνης. Η κινητικότητα των κυττάρων εκφράζεται ως % επούλωση της πηλγής

	24 ώρες	48 ώρες
Control	41.7±1.34	85.2±5
Νικαρδιπίνη 10^{-7} M	15.41±0.5	27±2.9
Νικαρδιπίνη 10^{-5} M	7.6±1.7	19.4±2.6

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα



Διάγραμμα 12. Η επίδραση της νικαρδιπίνης (Nic) στην επαγόμενη από 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h (A) και στις 48h (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με την κινητικότητα των κυττάρων που καλλιεργούνται μόνο παρουσία 10% FBS (control)



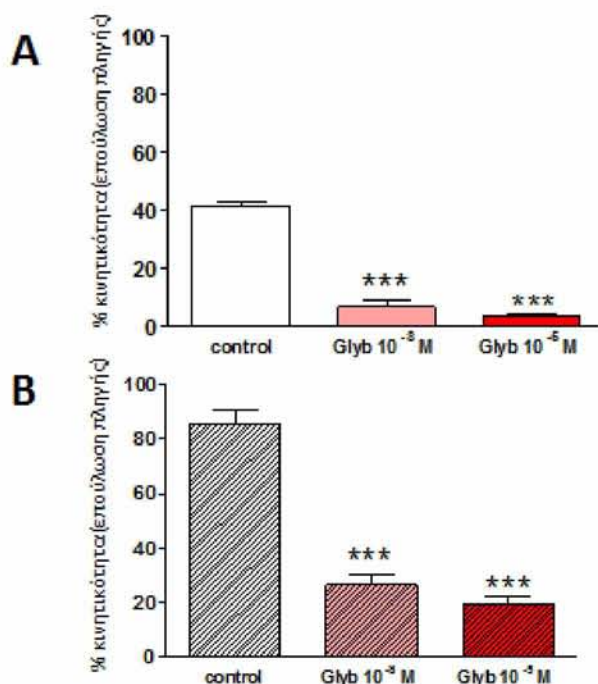
Εικόνα 24. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση της νικαρδιπίνης (Nicard) στην επαγόμενη από 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h και στις 48h

Όπως και με την νικαρδιπίνη, η παρουσία της γλιβενκλαμίδης στο υλικό της καλλιέργειας για 24 ή 48 ώρες ελάττωσε σημαντικά την κινητικότητα των ΛΜΚ σε σύγκριση με την κινητικότητα που παρουσίασαν τα κύτταρα παρουσία μόνο ορού (Διάγραμμα 13, Εικόνα 25). Οι τιμές της κινητικότητας των ΛΜΚ παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

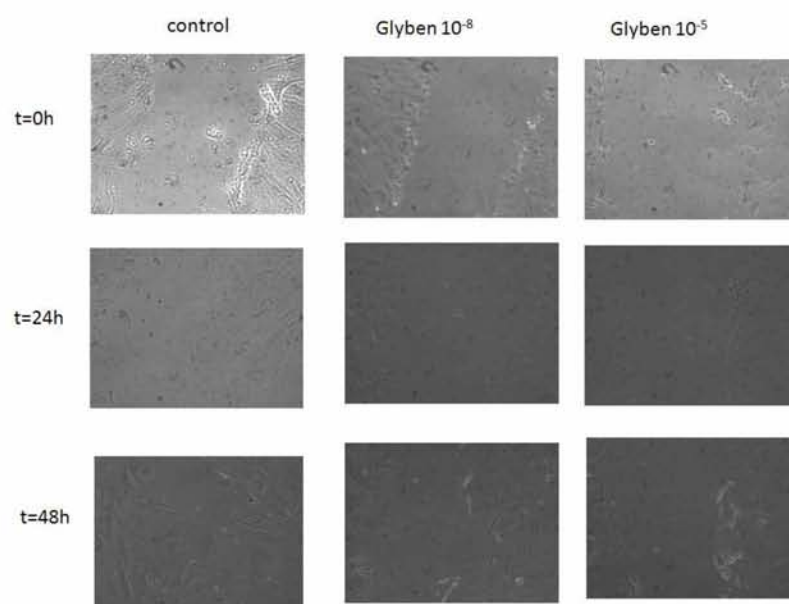
Πίνακας 2. Κινητικότητα λείων μυϊκών ινών που καλλιεργήθηκαν για 24 ή 48 ώρες παρουσία μόνο 10% FBS (control) ή και γλιβενκλαμίδης. Η κινητικότητα των κυττάρων εκφράζεται ως % επούλωσης πληγής

	24 ώρες	48 ώρες
Control	41.7±1.34	85.2±5
Γλιβενκλαμίδη 10^{-8} M	6.8±2.1	26.4±4.0
Γλιβενκλαμίδη 10^{-5} M	3.6±0.6	19.2±2.8

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα.



Διάγραμμα 13. Η επίδραση της γλιβενκλαμίδης (Glyb) στην επαγόμενη από την παρουσία 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h (A) και στις 48h (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με την κινητικότητα των κυττάρων που καλλιεργούνται μόνο παρουσία 10% FBS (control)



Εικόνα 25. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που δείχνουν την επίδραση της γλιβενκλαμίδης (Glyben) στην επαγόμενη από την παρουσία 10% FBS κινητικότητα λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κονίκλου στις 24h και στις 48h

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε ο ρόλος των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ στην ανταποκρισιμότητα και τον πολλαπλασιασμό / κινητικότητα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων όπως και ο ρόλος των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} και των K_{ATP} διαύλων στον πολλαπλασιασμό/κινητικότητα των κυττάρων.

Για την μελέτη του ρόλου των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ στα πειράματα που διενεργήθηκαν χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής των διαύλων αυτών, λιδοκαΐνη που ανήκει στην κατηγορία των αμινοαμιδίων και χρησιμοποιείται τόσο ως τοπικό αναισθητικό όσο και ως αντιαρρυθμικό φάρμακο (48). Στην μελέτη του ρόλου των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής των διαύλων αυτών νικαρδιπίνη που ανήκει στην κατηγορία των διυδροπυριδινών, και ως φάρμακο χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των μορφών της στηθάγχης που σχετίζονται με σπασμό των στεφανιαίων αγγείων καθώς και ως αντι-υπερτασικό φάρμακο (49). Τέλος η εμπλοκή των K_{ATP} διαύλων στον πολλαπλασιασμό/κινητικότητα των κυττάρων μελετήθηκε με την χρήση του κλασσικού ανταγωνιστή αυτών των διαύλων γλιβενκλαμίδης, που ανήκει στις σουλφονυλουρίες και είναι αντιδιαβητικό φάρμακο. Η γλιβενκλαμίδα φαίνεται ότι πέραν της δράσης της ως ανταγωνιστής των K_{ATP} διαύλων δρα και ως ανταγωνιστής των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου (L-type) (50).

Όσον αφορά τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, υπάρχουν δύο μοντέλα για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής: το ηλεκτρομηχανικό και το φαρμακομηχανικό μοντέλο. Σύμφωνα με το ηλεκτρομηχανικό μοντέλο, η εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης ανοίγει τασεο-εξαρτώμενους διαύλους Ca^{+2} , οδηγώντας σε είσοδο Ca^{+2} από τον εξωκυττάριο χώρο και επομένως αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου με τελικό αποτέλεσμα τη μυϊκή συστολή. Το φαρμακομηχανικό μοντέλο θεωρείται μη τασεοεξαρτώμενο. Στην περίπτωση αυτή, η είσοδος Ca^{+2} από τον εξωκυττάριο χώρο γίνεται ή μέσω διαύλων που ενεργοποιούνται από κάποιο μεταβιβαστή (51) ή το Ca^{+2} απελευθερώνεται από ενδοκυττάρια αποθήκες. Η ενδοκυττάρια απελευθέρωση Ca^{+2} γίνεται, ή μέσω δευτερογενών μηνυμάτων που επάγονται από τον μεταβιβαστή ($\text{Gaq-PLC-PIP}_2\text{-IP}_3$) (52) είτε μέσω της άμεσης δράσης του μεταβιβαστή στις ενδοκυττάρια αποθήκες Ca^{+2} του σαρκοπλασματικού δικτύου. Στην ηρεμία η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{+2} είναι μεταξύ 0.05 και 0.35 μM , ενώ η εξωκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{+2} είναι 1-2 mM . Σε κατάσταση ηρεμίας παρατηρείται παθητική μετακίνηση ιόντων Ca^{+2} . Η μετακίνηση αυτή δεν μεταβάλλει ούτε την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του, ούτε την κατάσταση του κυττάρου) (7). Στα πειράματά μας η προσέγγιση αυτών των δύο μοντέλων συστολής που περιγράφεται παραπάνω έγινε με τη χρήση ως συσπαστικών παραγόντων της

φαινυλεφρίνης, που εμπίπτει στο φαρμακομηχανικό μοντέλο και του KCl (35mM), που κυρίως εμπίπτει στο ηλεκτρομηχανικό μοντέλο.

Η φαινυλεφρίνη δρα ως αγωνιστής α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων. Οι α_1 αδρενεργικοί υποδοχείς εκφράζονται σε αφθονία στα αγγεία και θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές της συσταλτικότητας, του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Μεσολαβούν μια πληθώρα λειτουργιών στο αγγειακό σύστημα με πιο γνωστή αυτή στο μηχανισμό της συστολής. Στις δράσεις αυτές εμπλέκονται ιόντα ασβεστίου όπως και η ενεργοποίηση κλασικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως σχηματισμού PLC ή/και IP_3 (53). Στην παρούσα μελέτη, η λιδοκαΐνη προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη χάλαση των ΛΜΚ της αορτής κονίκλου που βρίσκονται τόσο σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη όσο και 35mM KCl. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έγιναν σε παρασκευάσματα αορτής κονίκλων) (54) όπως και αορτικούς δακτυλίους ποντικών (55). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι Na^+ πιθανόν εμπλέκονται στη σύσπαση των ΛΜΚ των αγγείων. Μελέτες σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα δείχνουν ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τους τασεο-εξαρτώμενους διαύλους νατρίου (Na_V channel) (34). Συγκεκριμένα, σε απομονωμένα κύτταρα από αορτή αρουραίου βρέθηκε ότι εκφράζονται τα γονίδια για τις ισομορφές $Na_{V1.2}$, $Na_{V1.3}$ και $Na_{V1.5}$ καθώς και πρωτεϊνική έκφραση της ισομορφής $Na_{V1.2}$ (34). Επίσης, χρησιμοποιώντας τον αγωνιστή τασεο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου, βερατριδίνη προκλήθηκε δόσοεξαρτώμενη σύσπαση της αορτής αρουραίου (34). Παρόμοια οι Ho και συν (2013) μελέτησαν την δράση του αγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου βερατριδίνη στον τόνο των αγγείων (μεσεντέριες αρτηρίες) αρουραίων. Τα πειράματά τους έδειξαν ότι η βερατριδίνη προκαλεί συστολή των αγγείων που μελετήθηκαν και η δράση της αυτή αναστέλλεται από την τετραδοτοξίνη (TTX) που αποτελεί ανταγωνιστή των $Na_{V1.2}$ και $Na_{V1.3}$ διαύλων (56). Πιο συγκεκριμένα, μελέτησαν τον τόνο σε μεσεντέριες αρτηρίες χρησιμοποιώντας τον διεγέρτη των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων νατρίου, βερατριδίνη με αποτέλεσμα την ύξηση της συστολής και έναν αναστολέα των διαύλων αυτών, τετραδοτοξίνη (TTX), ο οποίος εμπόδισε κυρίως τις ισομορφές $Na_{V1.2}$ και $Na_{V1.3}$ με αποτέλεσμα μείωση του αγγειακού τόνου (56).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας η δράση της λιδοκαΐνης σε παρασκευάσματα που βρίσκονται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη φαίνεται πως εξαρτάται εν μέρει από την παρουσία του εξωκυττάριου ασβεστίου. Μελέτες δείχνουν ότι είναι πιθανόν η λιδοκαΐνη εκτός από ανταγωνιστής των διαύλων Na^+ μπορεί να δρα και ως ανταγωνιστής των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου (55). Η πιθανή αυτή δράση της λιδοκαΐνης θα μπορούσε να ερμηνεύσει την μεγαλύτερη χάλαση που προκαλεί στα παρασκευάσματα που είναι σε συστολή με KCl σε σύγκριση με την επίδραση της στον ιστό που βρίσκεται σε σύσπαση με φαινυλεφρίνη (διάγραμμα 6 αποτελεσμάτων), καθώς κατά την σύσπαση των αορτικών

δακτυλίων με το KCl ενεργοποιούνται κυρίως οι τασεο-εξαρτώμενοι διάυλοι ασβεστίου. Παρόμοια, αν και η φαινυλεφρίνη κυρίως προκαλεί σύσπαση των ΛΜΚ μέσω διέγερσης των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων και τελικής κινητοποίησης ενδοκυττάριου ασβεστίου είναι πιθανόν η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου να οδηγεί σε εκπόλωση των κυττάρων διάνοιξη τασεο-εξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου και είσοδο ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο. Η πιθανή είσοδος ασβεστίου μέσω τασεο-εξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου κατά τη σύσπαση των αορτικών δακτυλίων θα μπορούσε να ερμηνεύσει και την διαφορά στην τάση που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, όπου η σύσπαση με φαινυλεφρίνη παρουσία ιόντων ασβεστίου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την σύσπαση απουσίας ιόντων ασβεστίου (διάγραμμα 2 αποτελεσμάτων) . Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την μελέτη των Turan και συν (2000) σχετικά με την επίδραση της λιδοκαΐνης στην ανταποκρισιμότητα της αορτής κονίκλων (54).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ενδοθήλιο αποτελεί άριστο προστατευτικό φραγμό, αλλά όταν βρεθεί υπό την επίδραση βλαπτικών παραγόντων, όπως η αυξημένη αρτηριακή πίεση, η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, οδηγείται σε μια σειρά αλυσιδωτών επανορθωτικών αντιδράσεων ως απάντηση στο βλαπτικό ερέθισμα και αλλάζει συμπεριφορά. Λειτουργεί ως διαπερατός φραγμός, παράγει και εκκρίνει διάφορες ουσίες που δρουν τοπικά αλλά και απομακρυσμένα, επηρεάζοντας το βαθμό του αγγειακού τόνου. Οι ουσίες αυτές είναι το οξειδίο του αζώτου (NO), η προστακυκλίνη και η αδενοσίνη, που είναι παράγοντες χάλασης. Επίσης, παράγει και παράγοντες αγγειοσύσπασης, όπως η ενδοθηλίνη και η αγγειοτενσίνη II (41). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μεταβολικώς ενεργά, διότι προσλαμβάνουν και μεταφέρουν προσταγλανδίνες. Οι πολύ σημαντικές αυτές λειτουργίες του ενδοθηλίου είναι ευάλωτες σε τραύμα οφειλόμενο στην υποξία, στην έκθεση σε κυτοκίνες, χοληστερόλη και σε κάθε είδους στρες. Συγκεκριμένα, το πάσχον ενδοθήλιο κινητοποιεί προθρομβωτικούς και αγγειοσυσπαστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του δομή και τη λειτουργικότητά του και δημιουργούν συνθήκες αυξημένης διαβατότητας πρωτεϊνών και κυττάρων αίματος που διεισδύουν μέσω των οπών αλληλοσύνδεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στον έσω χιτώνα των αγγείων. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών με τροποποιητική δράση στον τόνο του υποκείμενου μυϊκού χιτώνα, καθώς και την παραγωγή νέων ουσιών που ασκούν αναβολική δράση στα μυοκύτταρα των αγγείων, με τελικό αποτέλεσμα την επαναδιαμόρφωση της αγγειακής δομής (vascular remodeling) (54).

Καθώς λοιπόν το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των αγγείων τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή του στη χάλαση που προκαλεί η λιδοκαΐνη σε αορτικούς δακτυλίους που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το KCl φαίνεται

να προκαλεί μεγαλύτερη σύσπαση σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλου που το ενδοθήλιο είναι άθικτο σε σύγκριση με τη δράση του σε ιστό που το ενδοθήλιο είχε αφαιρεθεί μηχανικά (διάγραμμα 4 αποτελεσμάτων). Παρόμοια αποτελέσματα που υποδεικνύουν πιθανή ενδοθηλιοεξαρτώμενη του KCl δείχνουν και άλλες μελέτες (57). Φαίνεται λοιπόν ότι το KCl δρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οδηγεί στην απελευθέρωση κάποιου αγγειοσυσπαστικού παράγοντα. Σύμφωνα με τους Roberts και συν (1996) ο παράγοντας αυτός είναι κυκλο-οξυγονο-εξαρτώμενος (cyclo-oxygenase-derived contractile factor) από το ενδοθήλιο (57).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι η δράση της λιδοκαΐνης σε προσυστελλόμενους με χλωριούχο κάλιο (KCl) αορτικούς δακτυλίους, μόνο στην υψηλή συγκέντρωση των 10^{-4} M φαίνεται να εξαρτάται από την ακεραιότητα του ενδοθηλίου (διάγραμμα 5 αποτελεσμάτων). Παρόμοιες μελέτες σε αορτικούς δακτυλίους κονίκλων έχουν δείξει ότι η δράση της λιδοκαΐνης (10^{-5} M- 10^{-2} M) δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ακεραιότητα του ενδοθηλίου (54).

Στην παρούσα μελέτη δεν διερευνήθηκε ο ρόλος των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} και των K_{ATP} διαύλων στον τόνο των αγγείων. Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας έχει δείξει ότι ο ανταγωνιστής των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνη προκαλεί χάλαση των ΛΜΚ της αορτής κονίκλου (58). Παρόμοια ευρήματα υπάρχουν και σε άλλες μελέτες όπου παρατηρήθηκε χάλαση σε ανθρώπινα αγγεία χρησιμοποιώντας τη νικαρδιπίνη (59), όπως επίσης χάλαση προκλήθηκε από τον αναστολέα K_{ATP} διαύλων, γλιβενκλαμίδα σε καρωτιδική αρτηρία κονίκλων σε control και σε υπερλιπιδαιμικά ζώα (60).

Τα ΛΜΚ των αγγείων έχουν την ικανότητα διαίρεσης είτε στο πλαίσιο της φυσιολογικής λειτουργίας τους, είτε ως απάντηση σε βλάβη (11). Στα ενήλικα άτομα, ο πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί πιθανότατα να συμβαίνει για την αντικατάσταση γερασμένων κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη (12). Νέα ΛΜΚ μπορούν να σχηματιστούν είτε από διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων του έξω χιτώνα των αγγείων, είτε και από τη διαφοροποίηση και άλλων μεσεγχυματογενών κυττάρων (13) (1). Στα ΛΜΚ του αγγειακού τοιχώματος, η ινώδεκτίνη ((19), η ιντεγκρίνη (20), αλλά και η τενασκίνη-C (tenascin C) (21) φαίνεται ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ΛΜΚ. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF-BB), της ινσουλίνης (IGF-1) και των ινοβλαστών (FGF-2) δρουν ως παράγοντες επιβίωσης. Η μετανάστευση των λείων μυϊκών ινών και η διαφοροποίησή τους γίνεται με την επίδραση κυτταροκινών και της ιντερφερόνης- γ των λεμφοκυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να απαντούν διαφορετικά στα ερεθίσματα. Ένα από αυτά τα ερεθίσματα είναι η μεταβολή του διάμεσου ιστού (matrix) από την κολλαγενάση των μακροφάγων που τους επιτρέπει να διαιρούνται και να μεταναστεύουν (61).

Καθώς ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ των αγγείων φαίνεται να εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις μελετήθηκε η επίδραση του ανταγωνιστή των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ , λιδοκαΐνης, του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , νικαρδιπίνης και του ανταγωνιστή των K_{ATP} διαύλων γλιβενκλαμίδης στον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό και στη κινητικότητα των ΛΜΚ. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η λιδοκαΐνη δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ενώ αυξάνει την κινητικότητά των κυττάρων μόνο σε υψηλή συγκέντρωση (10^{-5}M) και μετά από 24 ώρες επώασης. Φαίνεται λοιπόν ότι οι διάλυοι Na^+ δεν εμπλέκονται ιδιαίτερα στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Ευρήματα προηγούμενων μελετών δείχνουν ότι η λιδοκαΐνη λειτουργεί προστατευτικά στον επαγόμενο από κυτταροκίνες (TNF- α , ιντερφερόνη- γ , ιντερλευκίνη- 1β) τραυματισμό σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα αλλά αυτό φαίνεται να συμβαίνει κυρίως μέσω αύξησης της δράσης των μιτοχονδριακών διαύλων καλίου (K_{ATP}) και όχι των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων Na^+ (62).

Αντίθετα με τη λιδοκαΐνη, τόσο η νικαρδιπίνη όσο και η γλιβενκλαμίδα ελαττώνουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα των ΛΜΚ. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι τόσο οι τασεοεξαρτώμενοι διάλυοι Ca^{2+} , όσο και K_{ATP} διάλυοι παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα των ΛΜΚ των αγγείων. Μέχρι σήμερα δεν φαίνεται να υπάρχουν αρκετές μελέτες που να δείχνουν τη δράση της νικαρδιπίνης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Οι Kaneko και οι συν (1992) έδειξαν σε ενδοθηλιακά κύτταρα πως η νικαρδιπίνη μπορεί να αναστείλει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την αγγειογένεση, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό μικροσωλινίσκων και την κυτταρική κινητικότητα (63). Παρόμοια δράση με αυτή στις ΛΜΚ φαίνεται να έχει η νικαρδιπίνη σε νευρογλοιακά κύτταρα καθώς αναστέλλει την κινητικότητά τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας η γλιβενκλαμίδα αναστέλλει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την κινητικότητα των αγγειακών λείων μυϊκών ινών. Μέχρι σήμερα δεν φαίνεται να υπάρχουν αρκετές μελέτες που να δείχνουν τη δράση της γλιβενκλαμίδης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Οι Liu και οι συν (2015) έδειξαν ότι σε λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών η αναστολή των K_{ATP} διαύλων με γλιβενκλαμίδα ανέστειλε τον επαγόμενο από PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB) πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς και την κινητικότητά τους (64). Οι de Klaver και συν προτείνουν ότι η πιθανή αναστολή του κυτοχρώματος-c από τους K_{ATP} διαύλους μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της σηματοδότησης των κασπασών με αποτέλεσμα αναστολή της απόπτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

Συμπερασματικά, οι τασεο-εξαρτώμενοι διάλυοι Na^+ φαίνεται πως εμπλέκονται μόνο στην ανταποκρισιμότητα αλλά όχι στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αγγείων. Αντιθέτως τόσο οι τασεοεξαρτώμενοι διάλυοι Ca^{2+} όσο και K_{ATP} διάλυοι είναι σημαντικοί για τον πολλαπλασιασμό

και τη κινητικότητα των κυττάρων. Οι αναστολείς των διαύλων αυτών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικό εργαλείο σε παθολογικές καταστάσεις στις οποίες παρατηρείται αυξημένη αγγειοσύσπαση και αυξημένη αγγειογένεση των λείων μυϊκών κυττάρων όπως για παράδειγμα στον διαβήτη, την υπέρταση και την αθηρωμάτωση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ross MH, Pawlina W. A text and atlas with correlated cell and molecular biology. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. Vander A, Sherman J, Luciano D, Tsakopoulos M. Φυσιολογία του ανθρώπου. 8th ed. Αθήνα: Πασχαλίδης; 2000.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology text and atlas. 11th ed 2005.
4. Boron WF, Boulpaep EL. Ιατρική Φυσιολογία. Αθήνα: Πασχαλίδης; 2011.
5. Hall JE, Guyton AC. Ιατρική Φυσιολογία. 12η ed: Παρισσιανού ΑΕ; 2013.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of Cell. 5th ed 2007.
7. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. Pharmacological reviews. 1997 Jun;49(2):157-230. PubMed PMID: 9228665.
8. Fleischmann BK, Wang YX, Pring M, Kotlikoff MI. Voltage-dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes. The Journal of physiology. 1996 Apr 15;492 (Pt 2):347-58. PubMed PMID: 9019534. Pubmed Central PMCID: 1158832.
9. Kume H, Kotlikoff MI. Muscarinic inhibition of single KCa channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G protein. The American journal of physiology. 1991 Dec;261(6 Pt 1):C1204-9. PubMed PMID: 1767821.
10. Lucas KA, Pitari GM, Kazeronian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacological reviews. 2000 Sep;52(3):375-414. PubMed PMID: 10977868.
11. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. Acta medica Indonesiana. 2007 Apr-Jun;39(2):86-93. PubMed PMID: 17933075.
12. Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horaist C, et al. Aging, oxidative responses, and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2001 Jun;280(6):H2779-88. PubMed PMID: 11356636.
13. Caplice NM, Doyle B. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. Stem cells and development. 2005 Apr;14(2):122-39. PubMed PMID: 15910239.
14. Bornfeldt KE. Intracellular Signaling in Arterial Smooth Muscle Migration versus Proliferation. Trends in cardiovascular medicine. 1996 Jul;6(5):143-51. PubMed PMID: 21232288.
15. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. The Journal of biological chemistry. 1999 Jul 30;274(31):21491-4. PubMed PMID: 10419448.
16. Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinases. Current opinion in chemical biology. 1998 Aug;2(4):466-71. PubMed PMID: 9736919.
17. George SJ, Dwivedi A. MMPs, cadherins, and cell proliferation. Trends in cardiovascular medicine. 2004 Apr;14(3):100-5. PubMed PMID: 15121157.
18. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2003;10(5):267-74. PubMed PMID: 14718743.
19. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamaziere JM, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1998 Feb;18(2):168-76. PubMed PMID: 9484980.
20. Zheng B, Clemmons DR. Blocking ligand occupancy of the alphaVbeta3 integrin inhibits insulin-like growth factor I signaling in vascular smooth muscle cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Sep 15;95(19):11217-22. PubMed PMID: 9736716. Pubmed Central PMCID: 21622.
21. Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. The Journal of cell biology. 1997 Oct 6;139(1):279-93. PubMed PMID: 9314546. Pubmed Central PMCID: 2139818.
22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960.

23. Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of applied physiology*. 2001 Sep;91(3):1438-49. PubMed PMID: 11509546.
24. Yamakage M, Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. 2002 Feb;49(2):151-64. PubMed PMID: 11823393.
25. Triggie DJ. 1,4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures. *Cellular and molecular neurobiology*. 2003 Jun;23(3):293-303. PubMed PMID: 12825828.
26. Yagami T, Kohma H, Yamamoto Y. L-type voltage-dependent calcium channels as therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(28):4816-27. PubMed PMID: 22834820.
27. Altamirano J, Bers DM. Voltage dependence of cardiac excitation-contraction coupling: unitary Ca^{2+} current amplitude and open channel probability. *Circulation research*. 2007 Sep 14;101(6):590-7. PubMed PMID: 17641229.
28. Del Valle-Rodriguez A, Calderon E, Ruiz M, Ordonez A, Lopez-Barneo J, Urena J. Metabotropic Ca^{2+} channel-induced Ca^{2+} release and ATP-dependent facilitation of arterial myocyte contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Mar 14;103(11):4316-21. PubMed PMID: 16537528. Pubmed Central PMCID: 1449690.
29. Araya R, Liberona JL, Cardenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell JA, et al. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP_3R -mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *The Journal of general physiology*. 2003 Jan;121(1):3-16. PubMed PMID: 12508050. Pubmed Central PMCID: 2217318.
30. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews*. 2003 Jan;83(1):117-61. PubMed PMID: 12506128.
31. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001 Feb;12(1):3-10. PubMed PMID: 11162741.
32. Thrower EC, Hagar RE, Ehrlich BE. Regulation of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends in pharmacological sciences*. 2001 Nov;22(11):580-6. PubMed PMID: 11698102.
33. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase . *Annual review of biochemistry*. 2002;71:511-35. PubMed PMID: 12045105.
34. Fort A, Cordaillat M, Thollon C, Salazar G, Mechaly I, Villeneuve N, et al. New insights in the contribution of voltage-gated $\text{Na}(\text{v})$ channels to rat aorta contraction. *PloS one*. 2009;4(10):e7360. PubMed PMID: 19809503. Pubmed Central PMCID: 2752992.
35. Nielsen-Kudsk JE. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. *Studies on isolated airways and arteries. Danish medical bulletin*. 1996 Dec;43(5):429-47. PubMed PMID: 8960816.
36. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological reviews*. 1999 Apr;79(2):387-423. PubMed PMID: 10221985.
37. Johnson M. The beta-adrenoceptor. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Nov;158(5 Pt 3):S146-53. PubMed PMID: 9817738.
38. Zhang H, Faber JE. Trophic effect of norepinephrine on arterial intima-media and adventitia is augmented by injury and mediated by different α_1 -adrenoceptor subtypes. *Circulation research*. 2001 Oct 26;89(9):815-22. PubMed PMID: 11679412.
39. Erami C, Zhang H, Tanoue A, Tsujimoto G, Thomas SA, Faber JE. Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005 Aug;289(2):H744-53. PubMed PMID: 15849236.
40. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6. PubMed PMID: 6253831.
41. Ράμμος Κ, Κούλιας Γ. Ο ρόλος του ενδοθηλίου στη στεφανιαία νόσο. *Θεσσαλονίκη: Φιλώτας*; 1997.
42. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *The American journal of physiology*. 1993 Sep;265(3 Pt 2):H828-33. PubMed PMID: 8105699.

43. Τεντολούρης Ρ, Γκούμας Γ. Καρδιολογικά θέματα: Ενδοθήλιο και καρδιά 1999.
44. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes*. 1993 Jul;42(7):1017-25. PubMed PMID: 8513969.
45. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993 Apr;21(5):1145-51. PubMed PMID: 8459069.
46. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*. 1991 Oct;84(4):1589-96. PubMed PMID: 1914099.
47. Zhang Y, Hoover DB. Signaling mechanisms for muscarinic receptor-mediated coronary vasoconstriction in isolated rat hearts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000 Apr;293(1):96-106. PubMed PMID: 10734158.
48. MacIntyre PD, Lloyd EL. Potentially reversible causes of non-ventricular fibrillation/ventricular tachycardia (VF/VT). *British journal of sports medicine*. 2000 Aug;34(4):312-3. PubMed PMID: 10953909. Pubmed Central PMCID: 1724236.
49. Peacock WFT, Hilleman DE, Levy PD, Rhoney DH, Varon J. A systematic review of nicardipine vs labetalol for the management of hypertensive crises. *The American journal of emergency medicine*. 2012 Jul;30(6):981-93. PubMed PMID: 21908132.
50. Lee SY, Lee CO. Inhibition of Na⁺-K⁺ pump and L-type Ca²⁺ channel by glibenclamide in Guinea pig ventricular myocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005 Jan;312(1):61-8. PubMed PMID: 15365090.
51. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological reviews*. 1996 Oct;76(4):967-1003. PubMed PMID: 8874491.
52. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological reviews*. 1977 Jan;57(1):71-108. PubMed PMID: 13441.
53. Pesic A, Madden JA, Pesic M, Rusch NJ. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels: is membrane depolarization the signal? *Circulation research*. 2004 May 28;94(10):e97-104. PubMed PMID: 15131006.
54. Turan NN, Demiryurek AT, Celebi H. Effects of lidocaine on rabbit isolated thoracic aorta. *Pharmacological research*. 2000 Nov;42(5):453-8. PubMed PMID: 11023707.
55. Shan QX, Lin DS, Jin HF, Gao Q, Lu Y, Xia Q. Endothelium-independent vasorelaxant effect of lidocaine in rat aortic rings. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference*. 2004;5:3753-6. PubMed PMID: 17271111.
56. Ho WS, Davis AJ, Chadha PS, Greenwood IA. Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *American journal of physiology Cell physiology*. 2013 Apr 15;304(8):C739-47. PubMed PMID: 23364266. Pubmed Central PMCID: 3625810.
57. Roberts RE, Kendall DA, Wilson VG. $\alpha(2)$ -adrenoceptor and NPY receptor-mediated contractions of porcine isolated blood vessels: evidence for involvement of the vascular endothelium. *British journal of pharmacology*. 1999 Dec;128(8):1705-12. PubMed PMID: 10588926. Pubmed Central PMCID: 1571814.
58. Malavaki C, Hatziefthimiou A, Daskalopoulou SS, Stefanidis I, Karatzaferi C, Aidonidis I. Ranolazine enhances nicardipine-induced relaxation of $\alpha(1)$ -adrenoceptor-mediated contraction on isolated rabbit aorta. *Acta cardiologica*. 2015 Apr;70(2):157-62. PubMed PMID: 26148375.
59. He GW, Yang CQ. Comparative study on calcium channel antagonists in the human radial artery: clinical implications. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2000 Jan;119(1):94-100. PubMed PMID: 10612766.
60. Taguchi H, Faraci FM, Kitazono T, Heistad DD. Relaxation of the carotid artery to hypoxia is impaired in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995 Oct;15(10):1641-5. PubMed PMID: 7583538.

61. Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Bondjers G. Lipid mediators that modulate the extracellular matrix structure and function in vascular cells. *Current atherosclerosis reports*. 1999 Sep;1(2):142-9. PubMed PMID: 11122703.
62. de Klaver MJ, Buckingham MG, Rich GF. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesthesia and analgesia*. 2003 Aug;97(2):465-70, table of contents. PubMed PMID: 12873936.
63. Kaneko T, Nagata I, Miyamoto S, Kubo H, Kikuchi H, Fujisato T, et al. Effects of nicardipine on tube formation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1992 Nov;23(11):1637-42. PubMed PMID: 1279843.
64. Liu W, Kong H, Zeng X, Wang J, Wang Z, Yan X, et al. Iptakalim inhibits PDGF-BB-induced human airway smooth muscle cells proliferation and migration. *Experimental cell research*. 2015 Aug 15;336(2):204-10. PubMed PMID: 26160451.