



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η επίδραση του τιωτρόπιου στο πολλαπλασιασμό και το φαινότυπο των
λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών**

Ντζαμάρα Αθανασία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας,
Επιβλέπουσα
- Βασιλάκη Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φυσιολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2020



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**The effect of tiotropium on the proliferation and phenotype of airway
smooth muscle cells**

MASTER THESIS

By
Ntzamara Athanasia

Advisory Thesis Committee:

- Apostolia Hatziefthimiou, Associate Professor of Medical Physiology, Supervisor
- Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology
- Matthaios Speletas, Professor of Medical Immunology

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 Physiology

Larissa, October, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΑΦΙΕΡΩΣΗ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1. Λείες Μυϊκές Ίνες	12
1.1.1. Πλαστικότητα των ΛΜΚ	13
1.1.2. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ	15
1.1.2.1. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	17
1.2. Αναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών	18
1.3. Αυτόνομο νευρικό σύστημα και ΛΜΚ αεραγωγών	20
1.3.1. Υποδοχείς ακετυλοχολίνης	22
1.3.1.1. Νικοτινικοί υποδοχείς (nACh)	22
1.3.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς (mACh)	23
1.4. Μουσκαρινικοί υποδοχείς στο αναπνευστικό σύστημα	24
1.4.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τη διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ	26
1.4.1.1. Μουσκαρινικοί υποδοχείς και συστολή των ΛΜΚ	26
1.4.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ	28
1.4.2. Μουσκαρινικοί προσδέτες	30
1.4.2.1. Το φαινόμενο του αλλοστερισμού στους μουσκαρινικούς υποδοχείς	32
1.4.2.2. Αλλοστερικοί τροποποιητές	33
1.4.2.3. Τιτροπίο	35
1.4.2.4. Φαρμακευτική προσέγγιση του αλλοστερικού φαινομένου	36
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	39
2.1. Χειρισμός πειραματόζωων	39
2.1.1. Απομόνωση ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	39
2.2. Καθιέρωση πρωτογενούς καλλιέργειας ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	41
2.2.1. Διατήρηση κυττάρων και ανάπτυξη καλλιιεργειών	42
2.3. Κατεργασία των ΛΜΚ με παράγοντες που επηρεάζουν το πολλαπλασιασμό τους	43
2.3.1. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με χρήση αιμοκυτταρόμετρου, μετά τη χρώση με χρωστική Trypan Blue	43
2.4. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	44
2.5. Στατιστική ανάλυση	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
3.1. Η επίδραση του ορού στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	46
3.2. Η επίδραση του τιτροπίου στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	46
3.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μιτογόνο δράση του τιτροπίου	49
3.4. Η επίδραση του τιτροπίου στο φαινότυπο των ΛΜΚ	51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιατρικής Φυσιολογίας, κυρίας Χατζηευθυμίου Αποστολίας. Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χαίρομαι που έχω την ευκαιρία να ευχαριστήσω ολόψυχα όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της:

Αρχικά, ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Χατζηευθυμίου Αποστολία, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών και την ανάθεση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και τη προθυμία της να μοιραστεί τις επιστημονικές γνώσεις της μαζί μου.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ την κα. Βασιλάκη Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τη προθυμία της να με βοηθήσει όλες τις φορές που τη χρειάστηκα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Σταματίου Ροδόπη, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας, για την διαρκή παρακολούθηση, στήριξη και συμπαράσταση που μου έδειξε. Με υπομονή και επιμονή, μου μετέδωσε τις γνώσεις της και μου έμαθε από το μηδέν τη λειτουργία του εργαστηρίου και τα απαραίτητα βήματα για την διεκπεραίωση των πειραμάτων καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών εργασιών. Νιώθω τυχερή που τη γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον Επιστημονικό Υπεύθυνο του ΠΜΣ κ. Σπελέτα Ματθαίο, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας, για την προσπάθεια του να διατηρήσει το συγκεκριμένο πρόγραμμα ζωντανό, ενδιαφέρον και ωφέλιμο για τους σπουδαστές του, καθώς και όλους τους καθηγητές που συμμετέχουν σε αυτό και μεταλαμπαδεύουν τις γνώσεις τους με πάθος και αφοσίωση.

Λάρισα, 2020

Ντζαμάρα Αθανασία

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Αφιερώνω την εργασία αυτή στην οικογένεια μου και ειδικά στη γιαγιά μου, ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης για την αγάπη, την υποστήριξη και την κατανόηση τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Λάρισα, 2020

Ντζαμάρα Αθανασία

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AC: Adenylylcyclase, αδενυλική κυκλάση

ACh: Acetylcholine, ακετυλοχολίνη

AChE: Acetylcholinesterase, ακετυλοχολινεστεράση

ATCM: Allosteric Ternary Complex Model, μοντέλο αλλοστερικού τριμερούς συμπλέγματος

BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

cADPR: CyclicADP-ribose, κυκλική ADP ριβόζη

CAM: Calmodulin, καλμοδουλίνη

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

CD38: Cluster of differentiation 38, σύμπλεγμα διαφοροποίησης 38

CO₂: Carbon dioxide, διοξείδιο του άνθρακα

DAG: Diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη

DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham/F12, θρεπτικό υλικό για ΛΜΚ

DMSO: Dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

ECM: Extracellular Matrix, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

EDTA: Ethylenediamine, αιθυλενοδιαμίνη

EGF: Epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

ERK: Extracellular signal-regulated kinases, κινάσες που ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα

ET1: Endothelin, ενδοθηλίνη-1

FBS: Fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

GC: Guanyl cyclase, γουανυλική κυκλάση

GDP: Guanosine diphosphate, διφωσφορική γουανοσίνη

GEF: Guanine nucleotide exchange factor, παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης

G_i: Inhibitory G protein, ανασταλτική G πρωτεΐνη

GPCR: G protein-coupled receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνη

Grb: Growth factor receptor-bound protein, πρωτεΐνη που συνδέεται με υποδοχέα αυξητικού παράγοντα

G_s: Stimulatory G protein, διεγερτική G πρωτεΐνη

GSK: Glycogen synthase kinase, κινάση της συνθάση του γλυκογόνου

GTP: Guanosine-5'-triphosphate, 5-τριφωσφορική γουανοσίνη

IGF-1: Insulin-like growth factor-1, αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με ινσουλίνη

IFN: Interferon, ιντερφερόνη

InsR: Insulin Receptor, υποδοχέας ινσουλίνης

IP3: Inositol trisphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη

JAK: Janus tyrosine kinase, κινάση τυροσίνης Janus

JNK: c-Jun N-terminal kinase

mACh: Muscarinic acetylcholine receptor, μουσκαρινικός υποδοχέας

MAPK: Mitogen-activated protein kinase, κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα

MEK: MAPK kinase

MHC: Myosin heavy chain, βαριά αλυσίδα της μυοσίνης

MLC: Myosin light-chain, ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης

MLCK: Myosin light-chain kinase, κινάση ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης

MLCP: Myosin light chain phosphatase, φωσφατάση ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin, στόχος της ραπαμυκίνης σε θηλαστικά

nACh: Nicotinic acetylcholine receptor, νικοτινικός υποδοχέας

NADPH oxidase: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, νικοτιναμυδική αδενίνη δινουκλεοτιδική φωσφορική οξειδάση

NALs: Neutral allosteric ligands, ουδέτεροι αλλοστερικοί προσδέτες

NAMs: Negative allosteric modulators, αρνητικοί αλλοστερικοί προσδέτες

NANC: Non-adrenergic noncholinergic, μη αδρενεργικό μη χολινεργικό

NFκB: Nuclear factor κB, πυρηνικός παράγοντας κB

NK cells: Natural killer, φυσικά φονικά κύτταρα

NO: Nitric oxide, νιτρικό οξείδιο

PAMs: Positive allosteric modulators, θετικοί αλλοστερικοί τροποποιητές

PDGF: Platelet-derived growth factor, αιμοπεταλιακός παράγοντας

PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase, κινάση της πυρουβικής αφυδρογονάσης

PGE₂: Prostaglandin E₂, προσταγλαδίνη E₂

PI3K: Phosphatidylinositol 3 -kinase, κινάση της 3- φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη

PIP₃: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

PKA: Protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A

PKB/Akt: Protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B

PKC: Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

PLC: Phospholipase C, φωσφολιπάση C

PMSF: Phenylmethylsulfoxide, φαινυλμεθυλσουλφοξείδιο

PS: penicillin/streptomycin, διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης

RTK: Receptor tyrosine kinase, υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης

SDS PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, πηκτή ηλεκτροφόρησης με δωδεκυλ-θειϊκό νάτριο

SMC: Smooth muscle cells, λεία μυϊκά κύτταρα

Src: Non-receptor tyrosine kinase, κινάση μη-υποδοχέα τυροσίνης

SRF: Serum Response Factor, παράγοντας απόκρισης ορού

STAT: Signal transducer and activator of transcription, παράγοντας μετατροπής σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής

TGF: Transforming growth factor, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης

TGFR: Transforming growth factor Receptor, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης

TNF α : Tumor necrosis factor α , παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TXA $_2$: Thromboxane A $_2$, θρομβοξάνη A $_2$

VIP: Vasoactive intestinal peptide, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο

ΑΝΣ: Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΛΜΚ: Λεία μυϊκά κύτταρα

ΧΑΠ: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού, όπως άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) χαρακτηρίζονται, μεταξύ των άλλων, από βρογχόσπασμο και δομικές μεταβολές του τοιχώματος των αεραγωγών όπως βλάβη του επιθηλίου, πάχυνση της βασικής μεμβράνης, αύξηση του αριθμού των αγγείων και υπερπλασία/υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) των αεραγωγών.

Το τιotropio, κλασσικός M_2/M_3 μουσκαρινικός ανταγωνιστής, χρησιμοποιείται ως βρογχοδιασταλτικό ευρέως για τη θεραπεία κυρίως της ΧΑΠ, αλλά και στο άσθμα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του τιotropiou στο πολλαπλασιασμό και το φαινότυπο των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται μελετήθηκαν τη χρωστική Trypan Blue και ο φαινότυπος τους με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντισώματα για την α-ακτίνη και την βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (MHC) των ΛΜΚ.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το τιotropio, απουσία μουσκαρινικού αγωνιστή, επάγει το πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στις συγκεντρώσεις 1-10nM, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20nM ή 30nM) δεν έχει καμία επίδραση. Η μιτογόνο δράση του τιotropiou επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAPκινασών, καθώς οι ανταγωνιστές των μονοπατιών αυτών LY294002 και PD98059 αντίστοιχα αναστέλλουν την δράση του. 5nM τιotropiou αύξησαν τον αριθμό των ΛΜΚ είτε παρέμειναν στην καλλιέργεια για 4, είτε για 48 ώρες, αποτέλεσμα παρόμοιο με τον ορό που δεν διασαφηνίζει αν η δράση του τιotropiou επιτυγχάνεται μέσω M_2 ή/και M_3 υποδοχέων. Τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού, έδειξαν ότι η παρουσία 5nM τιotropiou για 48 ώρες στην καλλιέργεια, δεν μεταβάλλει την έκφραση της α-ακτίνης ή MHC στα ΛΜΚ, δηλαδή δεν μεταβάλλει τον φαινότυπο τους.

Συμπερασματικά, το τιotropio (1-10nM), απουσία αγωνιστή προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών, δράση που πιθανόν οφείλεται τόσο στους M_2 , όσο και στους M_3 υποδοχείς. Το τιotropio (5nM) δεν μεταβάλλει τον φαινότυπο των κυττάρων.

ABSTRACT

Chronic lung diseases, such as asthma or chronic pulmonary disease (COPD) are characterized, among others, from bronchospasm and structural modifications of airway walls, e.g. epithelium damage, thickness of the basal membrane, of vessel number and hyperplasia/hypertrophy of the airway smooth muscle cells (ASMCs).

Tiotropium, a classic M₂/M₃ muscarinic antagonist, is widely used as bronchodilator, mainly in COPD, but also of asthma. We studied the effect of tiotropium on ASMC proliferation and phenotype in primary cell culture from rabbit trachea. The cell proliferation and signaling pathways involved were studied with Trypan Blue staining and the effect of tiotropium on cell phenotype with indirect immunofluorescence and the use of antibodies for the a-actin and the heavy myosin chain (MHC) of ASMCs.

Our results show that in absence of muscarinic agonist, tiotropium in low concentrations (1-10nM) induces the proliferation of ASMCs in a dose-response, whereas in higher concentrations (20nM or 30nM) it has no effect. The mitogenic effect of tiotropium is being achieved through the activation of signaling PI3K and MAP kinases pathways, as the antagonists of those pathways, LY294002 and PD98059 respectively, abolish its effect. The incubation of ASMCs for 4 or 48 hours in the presence of 5nM of tiotropium, similarly to 10% FBS, increased the ASMC number, whether they remained in the culture for 4 or 48 hours, a result which does not clarify if tiotropium effect is being achieved via M₂ or/and M₃ receptors. The indirect immunofluorescence experiments reveal that similarly to 10% FBS, the presence of 5nM of tiotropium in the culture for 48 hours, does not alter a-actin or MHC expression in the ASMCs.

In conclusion, in the absence of agonist, tiotropium (1-10nM) has a mitogenic effect via the activation of PI3K and MAP kinases' signaling pathways while does not alter cell phenotype.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Λείες μυϊκές ίνες

Ο λείος μυϊκός ιστός απαντάται στα τοιχώματα κοίλων και σπλαχνικών οργάνων, όπως στα τοιχώματα των αγγείων, των ουρητήρων, της ουροδόχου κύστης, στο αναπαραγωγικό σύστημα ανδρών και γυναικών, στους αεραγωγούς, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στην ίριδα του ματιού. Τα βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των λείων μυϊκών κυττάρων είναι παρόμοια στα διάφορα όργανα που εντοπίζονται, ωστόσο τα ερεθίσματα που δέχονται είναι διαφορετικά και εξαρτώνται από τον εντοπισμό τους [1].

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) είναι ατρακτοειδή με λεπτά άκρα, συνδέονται κυρίως με χασματοσυνδέσμους (gap junctions) και βρίσκονται οργανωμένα σε στιβάδες. Έχουν ένα μόνο κεντρικό πυρήνα, διάμετρο 2 έως 5 μm και μήκος που ποικίλει από 20 έως 500 μm . Σε αντίθεση με τους σκελετικούς μύες, οι λείοι μύς στερούνται γράμμωσης και είναι υπεύθυνοι για τις ακούσιες κινήσεις. Η λειτουργία των ΛΜΚ ελέγχεται από διάφορα ερεθίσματα, π.χ. ορμονικά και από το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ). Η βασικότερη λειτουργία τους είναι η σύσπαση. Η ταχύτητα σύσπασης των ΛΜΚ είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους γραμμωτούς μύες, μπορεί όμως να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με μικρή κατανάλωση ενέργειας [1,2].

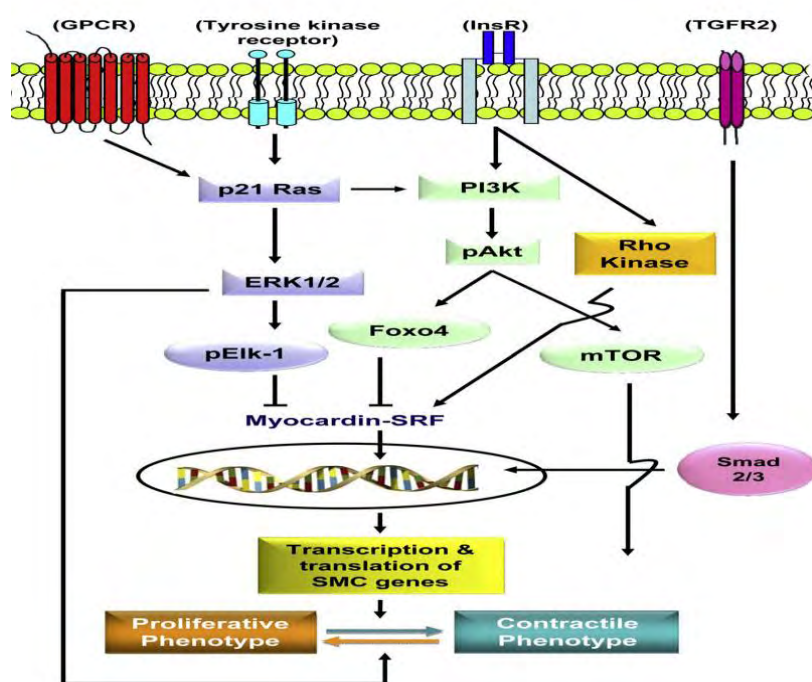
Οι αεραγωγοί ξεκινούν από το λάρυγγα και καταλήγουν στις κυψελίδες των πνευμόνων. Ο βασικός τους ρόλος είναι να λειτουργούν ως διάυλοι για τη διόδο του αέρα στους πνεύμονες. Στους αεραγωγούς, τα τοιχώματα της τραχείας και των βρόγχων, όπως και τα βρογχιόλια αποτελούνται κυρίως από ΛΜΚ. Στους ανώτερους αεραγωγούς, αποτελούν κατά προσέγγιση το 25% της κυτταρικής μάζας και εντοπίζονται στο οπίσθιο τμήμα του χόνδρου της τραχείας, ενώ στους κατώτερους αεραγωγούς, αποτελούν το 4-5% της κυτταρικής μάζας και είναι προσανατολισμένα σε ένα μοτίβο έλικας-αντιέλικας. Είναι γνωστό πως τα τελικά βρογχιόλια έχουν μικρότερο αριθμό ΛΜΚ [3].

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπνευστική λειτουργία. Εκφράζουν, εκτός των άλλων, αδρενεργικούς και χολινεργικούς υποδοχείς και ελέγχονται από το ΑΝΣ. Μέσω της σύσπασης και της χάλασης τους ρυθμίζουν τη διάμετρο των αεραγωγών και ελέγχουν την ποσότητα του αέρα που μπορεί να φτάσει τελικά στους πνεύμονες. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία αυτή, παίζει ο αριθμός των ΛΜΚ. Τα ΛΜΚ είναι επίσης ικανά εκτός από τη συστολή, να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύσουν και να εκκρίνουν ουσίες, ενώ αποτελούν σημεία μηχανικής πρόσδεσης συστατών πρωτεϊνών. Μέσω της δυνατότητας που έχουν να συνθέτουν και να εκκρίνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και άλλους παράγοντες, όπως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix, ECM), αυξητικούς παράγοντες και

ακετυλοχολίνη, έχει βρεθεί, ότι τα ΛΜΚ συντηρούν και ενισχύουν την φλεγμονή που παρατηρείται στους αεραγωγούς σε παθολογικές καταστάσεις [4,5].

1.1.1. Πλαστικότητα των ΛΜΚ

Η φαινοτυπική πλαστικότητα των ώριμων ΛΜΚ αναγνωρίστηκε αρχικά σε πρωτογενή καλλιέργεια μυοκυττάρων μεγάλων αρτηριών και τώρα είναι γνωστό ότι αποτελεί χαρακτηριστικό και των ΛΜΚ των αεραγωγών. Διάφορα ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες, προφλεγμονώδεις ουσίες ή/και παράγοντες που προκαλούν συστολή των ΛΜΚ, μπορούν να επάγουν μια αναστρέψιμη φαινοτυπική αλλαγή των κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών με τελικό αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση ή αναστολή της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με το φαινότυπο των κυττάρων, ή της μετάφρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια (Εικόνα 1) [6].



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στις φαινοτυπικές μεταβολές των ΛΜΚ (Ανατύπωση από: Hirota et al., 2009).

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase; *GPCR:* G protein-coupled receptor; *InsR:* insulin Receptor; *mTOR:* mammalian target of rapamycin; *PI3K:* phosphatidyl inositide 3-kinase; *SMC:* smooth muscle cells; *SRF:* serum response factor; *TGFR:* Transforming growth factor Receptor.

Τα ΛΜΚ παρουσιάζουν δύο διακριτούς φυσιολογικούς φαινοτύπους: α) το *συνθετικό φαινότυπο*, όπου τα κύτταρα είναι πεπλατυσμένα και διαιρούνται με φυσιολογικό ρυθμό. Στο κυτταρόπλασμα των ΛΜΚ με *συνθετικό φαινότυπο* συσσωρεύονται οργανίδια για την σύνθεση

πρωτεϊνών και λιπιδίων και πολλά μιτοχόνδρια. β) το *συσταλτό φαινότυπο*, όπου τα κύτταρα είναι επιμήκη, εκφράζουν συσταλτές πρωτεΐνες όπως α-ακτίνη και βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (MHC, myosin heavy chain) και έχουν ως κύρια λειτουργία τη σύσπαση, ενώ εμφανίζουν μειωμένο πολλαπλασιασμό. Η μετατροπή των ΛΜΚ από συσταλτά σε συνθετικά κύτταρα ονομάζεται *τροποποίηση (modulation)*, ενώ το αντίστροφο ονομάζεται *ωρίμανση (maturation)* [6].

Ο φαινότυπος ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, κυτταροκίνες, μιτογόνες ουσίες, συστατικά της ECM ή/και μηχανικά ερεθίσματα [4]. Για παράδειγμα, συστατικά της ECM της βασικής μεμβράνης όπως η λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV, καθυστερούν την 'τροποποίηση' των ΛΜΚ, ενώ το κολλαγόνο τύπου I και III προάγουν τη διαμόρφωση του συνθετικού φαινοτύπου των ΛΜΚ [7]. Παρομοίως μιτογόνες ουσίες όπως ο αιμοπεταλιακός παράγοντας (Platelet-derived growth factor, PDGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal growth factor, EGF), ο ορός και η φιμπρονεκτίνη, είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση των ΛΜΚ. Αντιθέτως, ωρίμανση τους προκαλούν συσπαστικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β₁ (Transforming growth factor, TGF-β₁), η ινσουλίνη και η στέρηση ορού στο υλικό της καλλιέργειας [8,9,10].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση των M₃ μουσκαρινικών υποδοχέων αυξάνει στα ΛΜΚ όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν σε συνθήκες στέρησης ορού, οπότε και αποκτούν τον συσταλτό φαινότυπο. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς επηρεάζει άμεσα τη σύσπαση των ΛΜΚ και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτή [11].

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το άσθμα, έχει βρεθεί ότι τα ΛΜΚ μπορεί να εκφράσουν και ένα τρίτο φαινότυπο, τον *υπερσυσταλτό*. Για παράδειγμα, σε καλλιέργειες ΛΜΚ σκύλου, ο υπερσυσταλτός φαινότυπος έγινε εμφανής, ύστερα από μακρόχρονη στέρηση ορού (περισσότερες από 20 μέρες) των κυττάρων. Τα κύτταρα με τον υπερσυσταλτό φαινότυπο είναι πιο επιμήκη από αυτά με τον συσταλτό χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση συσταλτών πρωτεϊνών και μεγαλύτερη ταχύτητα βράχυνσης. Τα ΛΜΚ δεν εκφράζουν αποκλειστικά έναν φαινότυπο αλλά φαίνεται πως έχουν την ικανότητα να μεταπίπτουν από τον ένα φαινότυπο στον άλλον ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του κυττάρου. Το πιθανότερο είναι να ότι εκφράζουν τον συσταλτό φαινότυπο, ο οποίος μπορεί να εύκολα στον υπερσυσταλτό χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο στάδιο τον συνθετικό φαινότυπο [12].

Η φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών (remodeling), και στη παθοφυσιολογία διαφόρων νόσων του αναπνευστικού. Για παράδειγμα, η αυξημένη περιεκτικότητα του τοιχώματος των αεραγωγών σε λείο μυϊκό ιστό που παρατηρείται στο χρόνια άσθμα, προκαλεί απόφραξη των αεραγωγών, λόγω πάχυνσης του τοιχώματος τους και φαίνεται να περιλαμβάνει επιπλέον και μια αναστρέψιμη φαινοτυπική μεταβολή των ΛΜΚ από

τον συστατικό στον συνθετικό φαινότυπο καθώς και παραγωγή/απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών [8,12]

1.1.2. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ

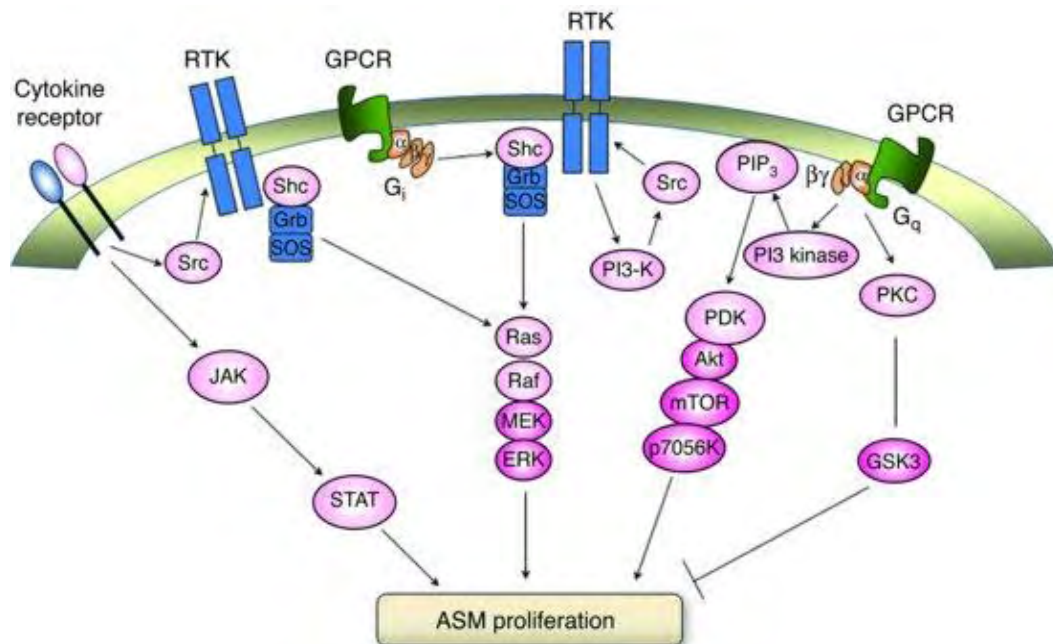
Τα κύτταρα ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό τους ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται από το εξωτερικό τους περιβάλλον [12].

Ειδικότερα, αυξητικοί παράγοντες όπως ο PDGF, EGF και άλλοι, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης (Receptor tyrosine kinase, RTK) που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τόσο το μονοπάτι της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), όσο και των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinase, MAPK). Η απόκριση είναι μεγαλύτερη σε ταυτόχρονη δράση διαφόρων αυξητικών παραγόντων [13]. Επίσης, ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ επάγεται με την ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων (κυρίως των M_3 , αλλά και των M_2) από τους αγωνιστές τους (π.χ. ακετυλοχολίνη, ACh) [14,15].

Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές δρουν μόνοι τους ή συνηθέστερα συνεργικά με τους αυξητικούς ή φλεγμονώδεις παράγοντες και οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ [15,16,17]. Η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων εμπλέκεται στην αντιγραφή/μεταγραφή του DNA και την είσοδο των ΛΜΚ στον κυτταρικό κύκλο, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAPK [18, 19]. Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), όπως και η πρωτεΐνη Ras, φαίνεται να αποτελούν μόρια κλειδιά στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά με την ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων, από τους αγωνιστές τους και οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (Εικόνα 2) [12,20].

Άλλος μιτογόνος παράγοντας των ΛΜΚ αποτελούν οι κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες, συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς, στην επιφάνεια των ΛΜΚ και επάγουν πολλαπλασιασμό τους. Οι υποδοχείς κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την στερεοδομή τους και την κυτταροκίνη που δεσμεύουν. Έτσι υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς για ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, χημειοκίνες, καθώς και για τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων α (tumor necrosis factor α , TNF- α) [4,21]. Όταν οι υποδοχείς συνδεθούν με την κυτταροκίνη παίρνουν τη μορφή τριμερούς και ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται περιλαμβάνουν την p38, p42/44 MAPK, PI3K/Akt, τον πυρηνικό παράγοντα κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) και των κινασών που σχετίζονται με τον TGF- β [4]. Μέσω του TNF- α και της ιντερλευκίνης 13 (IL-13) ενεργοποιείται και ο μεταγραφικός παράγοντας STAT1 (signal

transducer and activator of transcription 1), που εμπλέκεται σε μονοπάτια των MAPK, καθώς και η κινάση Src (non-receptor tyrosine kinase). Τέλος, έχει βρεθεί πως στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ εμπλέκεται και η ενεργοποίηση του JAK2/STAT3 μονοπατιού [22,23].



Εικόνα 2: Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (Ανατύπωση από: William T., Gerthoffer, 2012).

GPCR: G protein-coupled receptor; RTK: Receptor tyrosine kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; PI3K: phosphatidyl inositide 3-kinase; Src: non-receptor tyrosine kinase; Grb: Growth factor receptor-bound protein; SOS: Son of Sevenless; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; JAK: janus tyrosine kinase; STAT: signal transducer and activator of transcription; MEK: MAPK kinase; ERK: extracellular signal regulated kinase; PKC: protein kinase C; GSK: glycogen synthase kinase; PDK: pyruvate dehydrogenase kinase.

Παρομοίως, συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως η φιμπρονεκτίνη, συνδεδεμένα σε υποδοχείς ιντεγκρίνης, ασκούν μιτογόνο δράση στα ΛΜΚ κυρίως σε συνέργεια με τους μουσκαρινικούς αγωνιστές ή/και τους αυξητικούς παράγοντες [24].

Αντίθετα, παράγοντες που ενεργοποιούν υποδοχείς που συνδέονται με G_s πρωτεΐνες, όπως η προσταγλαδίνη E_2 (PGE_2) ή αγωνιστές των β_2 αδρενεργικών υποδοχέων, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, μέσω αύξησης της 3'-5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) [25].

1.1.2.1. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ.

Μονοπάτι της PI3K

Η οικογένεια των PI3K αποτελείται από 3 κατηγορίες πρωτεϊνών, την I (με δύο υποομάδες, την IA και IB), την II και III. Τα ΛΜΚ εκφράζουν μόνο τις IA, II και III πρωτεΐνες. Η IA είναι η κύρια ομάδα που συμμετέχει στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων [26]. Οι κινάσες της ομάδας I και II ενεργοποιούνται από την διέγερση των υποδοχέων RTK ή των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Οι PI3K είναι ετεροδιμερείς και αποτελούνται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική υπομονάδα, η οποία φωσφορυλιώνει το υδροξύλιο στη τρίτη θέση του δακτυλίου της ινοσιτόλης δημιουργώντας τα φωσφατιδιλοϊνοσιτίδια PI_3P, PIP_2, PIP_3 [27]. Είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση μορίων όπως η πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B, PKB), γνωστή και ως Akt, ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide exchange factor, GEF) κ.α. Η PI3K μέσω Akt και mTOR, ενεργοποιεί τη κινάση p70S6K και αναστέλλει την κινάση GSK3. Και οι δύο αυτές διεργασίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση και σύνθεση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ [20].

Μονοπάτι των MAP κινασών

Ένα άλλο βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά από εξωγενή ερεθίσματα και εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ είναι το μονοπάτι των MAP κινασών. Οι MAP κινάσες είναι ειδικές πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα. Η ενεργοποίησή τους γίνεται με φωσφορυλίωση κατάλοιπων τυροσίνης και θρεονίνης σε ένα μοτίβο Thr-X-Tyr (TXY) που βρίσκεται στη βρόγχο ενεργοποίησής τους [28,29]. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί έξι διαφορετικές ομάδες MAP κινασών σε κύτταρα θηλαστικών, όμως οι τρεις από αυτές είναι οι πιο καλά μελετημένες [30]:

1. *Κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια μηνύματα (extracellular signal-regulated kinases, ERK1, ERK2).*

Οι συγκεκριμένες κινάσες είναι γνωστές και ως κλασικές MAP κινάσες, βασικό μέλος τους είναι η p42/44 και το μονοπάτι τους ενεργοποιείται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Ο ενεργοποιημένος RTK ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη «αντάπτορα», την Shc, η οποία στρατολογεί το παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων Sos που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της Ras [31]. Η Ras ενεργοποιεί τη κινάση Raf και αυτή φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη κινάση MEK. Στη συνέχεια, η MEK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη p42/44 κινάση ή τη p38. Η p42/p44

(ERK/MAPK) ενεργοποιεί αφενός το p70S6K και αφετέρου παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή παραγόντων μεταγραφής που καθορίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων [32].

2. *c-Jun N-terminal* κινάσες (JNKs).

Οι JNKs χαρακτηρίζονται και ως MAPK8, MAPK9, MAPK10 και ανήκουν στο μονοπάτι που ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες του κυττάρου [33].

3. Κινάσες p38

Οι p38 κινάσες εμφανίζονται σε τέσσερις ισομορφές και το σηματοδοτικό μονοπάτι τους ενεργοποιείται, όπως και το μονοπάτι των JNK, ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως είναι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η υψηλή θερμοκρασία και το ωσμωτικό σοκ [34].

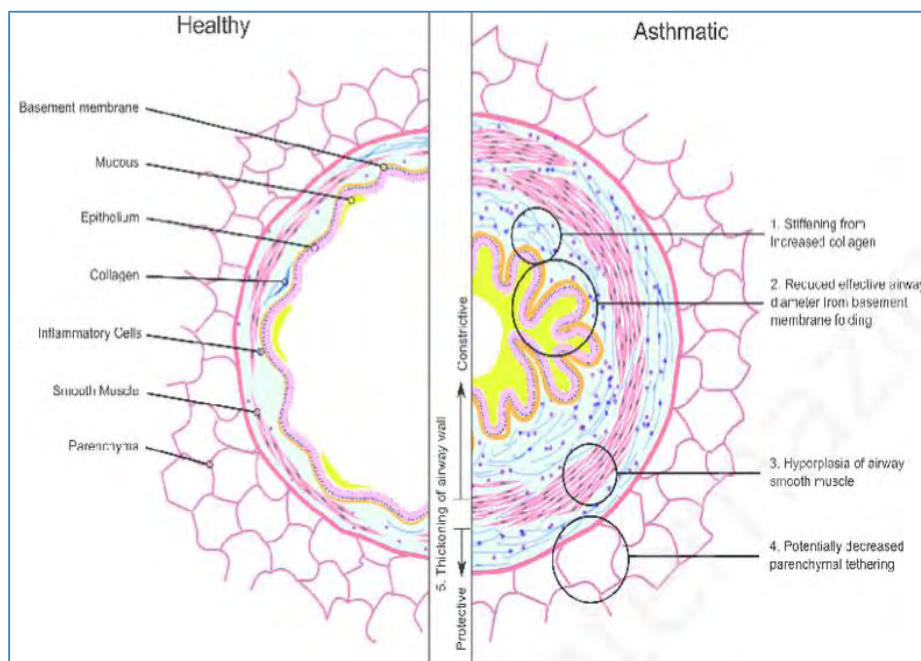
1.2. Αναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών

Οι χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι του αναπνευστικού, όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), χαρακτηρίζονται από φλεγμονή, απόφραξη και αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών (remodeling). Το remodeling είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που περιλαμβάνει ποικίλες δομικές αλλαγές, όπως πάχυνση της βασικής μεμβράνης, αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των αγγείων και υπερτροφία (αύξηση του μεγέθους) ή/και υπερπλασία (αύξηση του αριθμού) των ΛΜΚ (Εικόνα 3) [35,36]. Ειδικότερα, στη ΧΑΠ, οι δομικές αλλαγές περιλαμβάνουν μεταπλασία του επιθηλίου, ίνωση, υπερτροφία βλεννωδών αδένων και αύξηση της μάζας των ΛΜΚ στους αεραγωγούς και στα αγγεία [35,37].

Σε αντίθεση με τη ΧΑΠ, στο άσθμα παρόλο που παρατηρείται πάχυνση της βασικής μεμβράνης και εύθραυστο επιθήλιο, δεν αναπτύσσεται εμφύσημα. Στη περίπτωση του άσθματος, παρατηρείται διήθηση των αεραγωγών με λευκοκύτταρα, επιθηλιακή βλάβη, αγγειογένεση, υπερτροφία και υπερπλασία των ΛΜΚ, αυξημένη παραγωγή βλέννας, καθώς και αυξημένη εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και διαφοροποίηση στη σύσταση της [37,38].

Σε μια προσπάθεια αποκατάστασης της ακεραιότητας του επιθηλίου, εμφανίζεται αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων. Στους φλεγμονώδεις παράγοντες συμπεριλαμβάνονται οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες, ενώ στους αυξητικούς παράγοντες ο PDGF, ο EGF, ο αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη (insulin-like growth factor-1, IGF-1) και ο TGF-β1 [4,39]. Όλα τα παραπάνω, ευθύνονται για την συνεχή φλεγμονή που παρατηρείται στους αεραγωγούς στις παθήσεις αυτές. Η επίδραση των ουσιών που αναφέρθηκαν παραπάνω στους αεραγωγούς, εξαρτάται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούν, αλλά είναι γνωστό, ότι ευθύνονται κυρίως για το πολλαπλασιασμό ή/και την διαφοροποίηση των

ΛΜΚ μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPKs ή/και της PI3K [40,41,42].



Εικόνα 3: Αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών σε ασθενείς με άσθμα. (Ανατύπωση από: Gijb Ijzma, 2014).

Κατά την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών, μία από τις σημαντικότερες αλλαγές που παρατηρείται, είναι η υπερτροφία/υπερπλασία των ΛΜΚ, και αυτό έχει πολλές επιπτώσεις στους αεραγωγούς, όπως για παράδειγμα την προοδευτική απόφραξη τους [36]. Η υπερπλασία των ΛΜΚ στο άσθμα παρατηρείται στους μεγάλους, ενώ στη ΧΑΠ στους μικρούς αεραγωγούς [43].

Τα ΛΜΚ έχουν και επιπλέον λειτουργίες εκτός από τη βασική τους, που είναι η ρύθμιση του βρογχοκινητικού τόνου στους αεραγωγούς, όπως να πολλαπλασιάζονται και να εκκρίνουν διάφορες ουσίες συμμετέχοντας έτσι ενεργά στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών [4]. Τα ΛΜΚ των αεραγωγών αποκτούν τις προαναφερόμενες ιδιότητες μετατρέποντας τον φαινότυπό τους από συστατικό σε συνθετικό. Ο συνθετικός φαινότυπος, επάγεται από πολλούς παράγοντες που απελευθερώνονται στους αεραγωγούς σε περιπτώσεις νόσων του αναπνευστικού, όχι μόνο από το επιθήλιο ή τα κύτταρα φλεγμονής, αλλά και από τα ίδια τα ΛΜΚ. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι αυξητικοί παράγοντες (π.χ. PDGF, TGFβ, κ.α.), μεσολαβητές της φλεγμονής (π.χ. βραδυκίνη, λευκοτριένια, ισταμίνη), κυτταροκίνες Th1 και Th2 κυττάρων (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL-1β, IL-13), διάφορες χημειοκίνες (eotaxin, IL-6, IL-8), συστατικά εξωκυττάριας ουσίας (π.χ. λαμίνη) και μουσκαρινικοί αγωνιστές (π.χ. ACh) [43,44].

Έχει βρεθεί ότι τα ΛΜΚ με την εκκριτική τους ιδιότητα, αποτελούν μια σπουδαία πηγή προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και

συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Οι παράγοντες αυτοί εκτός της παρακρινής τους δράσης για ενίσχυση της φλεγμονής, μπορούν να δράσουν αυτοκρινώς επάγοντας την έκφραση υποδοχέων επιφανείας και ρυθμίζοντας έτσι το πολλαπλασιασμό των κυττάρων [45]. Ο καταρράκτης σηματοδότησης ξεκινά με τη πρόσδεση ενός παράγοντα σε υποδοχείς που βρίσκονται στη κυτταρική μεμβράνη. Τα ΛΜΚ έχουν στην επιφάνεια τους RTK υποδοχείς, GPCRs, καθώς και υποδοχείς κυτταροκινών, ενώ τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν γενικά είναι αυτό των MAP κινασών και της PI3K [15].

Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, γιατί η διαδικασία της φλεγμονής και η λειτουργική έκπτωση των αεραγωγών δεν μπορούν πλέον να εξηγήσουν όλες τις παθοφυσιολογικές αλλαγές που παρατηρούνται σε παθήσεις όπως η ΧΑΠ και το άσθμα. Επιπλέον, σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα έχει δείχθει ότι συμβατικές θεραπείες με εισπνεόμενα γλυκοκορτικοειδή, βρογχοδιασταλτικά ή/και αντιφλεγμονώδη, αδυνατούν να αναστρέψουν πλήρως τις βλάβες που παρατηρούνται στη νόσο [38,46,47].

1.3. Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα και ΛΜΚ αεραγωγών

Το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) είναι ο κύριος υπεύθυνος για τη ρύθμιση του τόνου των ΛΜΚ των αεραγωγών. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί τρία τμήματα του ΑΝΣ που ελέγχουν τα ΛΜΚ (Πίνακας 1) και η ισορροπία μεταξύ αυτών καθορίζει τη διάμετρο των αεραγωγών [48]:

- Το **παρασυμπαθητικό** που είναι υπεύθυνο για τη σύσπαση των ΛΜΚ μέσω της ενεργοποίησης κυρίως των M₃μουσκαρινικών υποδοχέων από την ACh.
- Το **συμπαθητικό** που είναι υπεύθυνο για τη χάλαση των ΛΜΚ μέσω της ενεργοποίησης των β₂-αδρενεργικών υποδοχέων από την επινεφρίνη.
- Το **μη χολινεργικό-μη αδρενεργικό** (non-adrenergic non-cholinergic, NANC), το οποίο μπορεί να λειτουργήσει είτε ανασταλτικά, είτε διεγερτικά. Στην ανασταλτική επίδραση του NANC εμπλέκεται το πνευμονογαστρικό κέντρο και οι νευροδιαβιβαστές που συμμετέχουν είναι το VIP (vasoactive intestinal peptide) ή/και το NO (nitric oxide) που είναι υπεύθυνοι για τη πρόκληση βρογχοδιαστολής. Στην διεγερτική επίδραση του NANC εμπλέκονται τα αισθητήρια νεύρα του πνευμονογαστρικού, που όταν δεχτούν κάποιο ερέθισμα, εκλύουν ταχυκινίνες (ουσία P, νευροκινίνη A) που προκαλούν σύσπαση των ΛΜΚ [49].

Πίνακας 1: Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα και διέγερση των ΛΜΚ των αεραγωγών.

<i>ΑΝΣ</i>	<i>Νευροδιαβιβαστής</i>	<i>Υποδοχείς</i>	<i>Απόκριση ΛΜΚ</i>
<i>Παρασυμπαθητικό</i>	Ακετυλοχολίνη	M ₃ /M ₂	Σύσπαση
<i>Συμπαθητικό</i>	Επινεφρίνη	β ₂ -αδρενεργικός	Χάλαση
	VIP/NO	Υποδοχέας VIP, γουανυλική κυκλάση (GC)	Χάλαση
<i>Μη αδρενεργικό-μη χολινεργικό</i>	Ταχυκινίνες	NK (Natural killer)	Σύσπαση

Η διέγερση του παρασυμπαθητικού συστήματος προκαλεί σύσπαση των ΛΜΚ των αεραγωγών. Η ACh είναι ο νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται από τις προαγγλιακές ίνες τόσο του συμπαθητικού όσο και του παρασυμπαθητικού, καθώς και από τις μετααγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος. Οι μετααγγλιακές χολινεργικές νευρικές ίνες καταλήγουν στα ΛΜΚ, στους υποβλεννογόνιους αδένες και τα αγγεία των βρόγχων. Στο παρασυμπαθητικό σύστημα, η ACh που απελευθερώνεται από τους προαγγλιακούς νευρώνες δεσμεύεται σε νικοτινικούς υποδοχείς, ενώ μετααγγλιακά δεσμεύεται κατά κύριο λόγο σε μουσκαρινικούς υποδοχείς. Η απελευθέρωση της ACh είναι υπεύθυνη για τη συστολή των ΛΜΚ, την έκκριση βλέννας και την αγγειοδιαστολή. Η απελευθέρωση ACh ελέγχεται από διάφορους παράγοντες. Η διέγερση των M₂ προσυναπτικών υποδοχέων και των α-αδρενεργικών υποδοχέων καθώς και η δράση της PGE₂ και της ενδοθηλίνης-1 (ET1), ελαττώνουν την απελευθέρωση της ACh, ενώ φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η θρομβοξάνη A₂ (TXA₂) και οι ταχυκινίνες την αυξάνουν [48,49,50]. Τέλος το NO έχει ένα διττό ρόλο, καθώς φαίνεται άμεσα να αναστέλλει την απελευθέρωση της ACh, ενώ την επάγει εμμέσως με την απελευθέρωση ταχυκινινών, οι οποίες συνδέονται στους NK₂ υποδοχείς [51,52]. Η δράση της ACh τερματίζεται από την ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που τη διασπά σε οξικό οξύ και χολίνη [50].

Η ACh επηρεάζει επίσης την έκκριση παραγόντων και την μετανάστευση των ΛΜΚ. Μπορεί έτσι, να διαμορφώνει την υπεραντιδραστικότητα και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, αφού εμπλέκεται τόσο στη φλεγμονώδη απόκριση όσο και στον τόνο των ΛΜΚ. Έτσι, εξηγείται το

ευεργετικό αποτέλεσμα των αντιχολινεργικών φαρμάκων στην πάχυνση των λείου μυϊκού χιτώνα των αεραγωγών [37,53].

Σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος (ΧΑΠ-άσθμα), οι οποίες χαρακτηρίζονται από φλεγμονή, η παρασυμπαθητική δραστηριότητα είναι αυξημένη. Έχει βρεθεί ότι τόσο ο αριθμός όσο και η λειτουργία των μουσκαρινικών υποδοχέων μεταβάλλονται. Για παράδειγμα, οι M₂ υποδοχείς (αυτούποδοχείς της ACh) γίνονται δυσλειτουργικοί, κυρίως στο άσθμα. Κατά τη διάρκεια φλεγμονής στους αεραγωγούς διάφοροι μηχανισμοί οδηγούν σε αυξημένη απελευθέρωση ACh από το παρασυμπαθητικό. με συνέπεια την απόφραξη των αεραγωγών που παρατηρείται σε ασθένειες με άσθμα ή ΧΑΠ. Για τον λόγο αυτό, στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται ως βρογχοδιασταλτικά ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων, όπως το τιοτρόπιο, μόνοι ή σε συνδυασμό με β₂-αδρενεργικούς αγωνιστές [37,50,54]

1.3.1. Υποδοχείς ακετυλοχολίνης

Η ACh, μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει δύο τύπους υποδοχέων: τους νικοτινικούς και τους μουσκαρινικούς υποδοχείς. Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι ιοντικοί διάλυτοι (ιοντοτροπικοί), ενώ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς συνδέονται με G πρωτεΐνες (μεταβοτροπικοί).

1.3.1.1. Νικοτινικοί υποδοχείς (*nACh*)

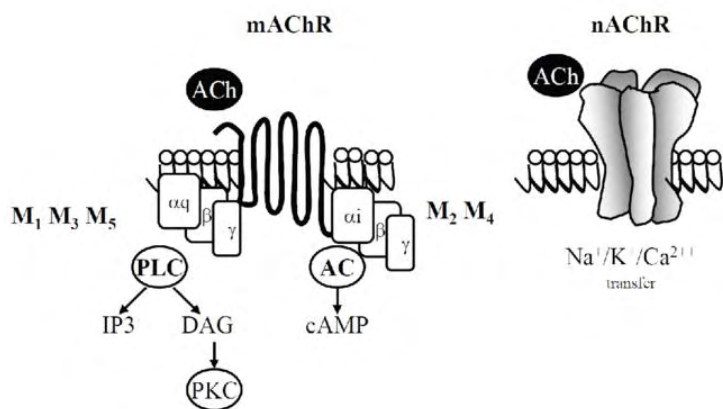
Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ACh είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από πέντε ομόλογες υπομονάδες, ενεργοποιούνται με τη σύνδεση προσδέτη και λειτουργούν ως ιοντικοί διάλυτοι.

Στο αναπνευστικό σύστημα νικοτινικοί υποδοχείς, ανευρίσκονται στα γάγγλια του ΑΝΣ, σε φλεγμονώδη κύτταρα των αεραγωγών, αλλά και στα ΛΜΚ. Οι νικοτινικοί υποδοχείς σε αντίθεση με τη προφλεγμονώδη δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων, φαίνεται να παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση στους αεραγωγούς περιορίζοντας την έκκριση διαφόρων κυτταροκινών. Στα ΛΜΚ των αεραγωγών εκφράζονται κυρίως οι υπότυποι α₃ και α₇ νικοτινικών υποδοχέων [50,54].

1.3.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς (mACh)

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς ανήκουν στην Α ομάδα των GPCR υποδοχέων και έχουν 5 διαφορετικούς υποτύπους, M_1 - M_5 . Οι mAChs συνδέονται με G πρωτεΐνες που αποτελούνται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες α , β , γ , οι οποίες συνδέονται με μόρια GTP (Guanosine-5'-triphosphate) και ενεργοποιούν δεύτερους διαβιβαστές όπως την αδενυλική κυκλάση (Adenylylcyclase, AC), φωσφολιπάση C (PLC) αλλά και ιοντικούς διαύλους. Η σηματοδότηση ξεκινάει με τη σύνδεση της ACh (ο κύριος αγωνιστής τους) στον υποδοχέα. Στη συνέχεια, το μόριο GDP (Guanosine diphosphate) που βρίσκεται συνδεδεμένο με την α υπομονάδα της G πρωτεΐνης, ανταλλάσσεται με ένα μόριο GTP. Η α μονάδα διαχωρίζεται από τη $\beta\gamma$ μονάδα και υδρολύει το GTP σε GDP επαναφέροντας την αρχική διάταξη της G πρωτεΐνης και τερματίζοντας τη δράση της ACh. Η $\beta\gamma$ μονάδα λειτουργεί ως σύμπλοκο [55]. Οι υποδοχείς διαφέρουν ως προς τη τοπολογία και τη μεταγωγή του σήματος (Εικόνα 4) [56]:

- Οι M_1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε εξωκρινείς αδένες. Συνδέονται με την G_q πρωτεΐνη, ωστόσο σε ορισμένους ιστούς μπορεί να συνδέονται με την G_s (stimulatory-διεγερτική) ή την G_i (inhibitory-ανασταλτική) πρωτεΐνη, οι οποίες τροποποιούν τα επίπεδα του cAMP.
- Οι M_2 υποδοχείς υπάρχουν προσυναπτικά, στις παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, τη καρδιά και τα ΛΜΚ και συνδέονται με την G_i πρωτεΐνη, μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP.
- Οι M_3 υποδοχείς εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος, αλλά κυρίως σε λείους μυς και αδένες. Συνδέονται με την G_q , η α -μονάδα της οποίας ενεργοποιεί την PLC. Η ενεργοποίηση της PLC δραστηριοποιεί δύο ενδοκυττάριους αγγελιοφόρους: την τριφωσφορική ινοσιτόλη (Inositol trisphosphate, IP_3) που προκαλεί την απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυττάρια αποθήκες αλλά και την διακυλογλυκερόλη (DAG) που ενεργοποιεί την PKC.
- Οι M_4 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συνδέονται με την G_i πρωτεΐνη.
- Η ακριβής θέση των M_5 υποδοχέων δεν είναι ακόμη γνωστή, ενώ μοιάζουν λειτουργικά με τους M_1 και M_3 υποδοχείς [55,56].



Εικόνα 4: Κατηγορίες υποδοχέων ακετυλοχολίνης (Τροποποιημένη από: Sales, 2013).

cAMP: 3'-5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης; *DAG*: Diacylglycerol; *AC*: Adenylylcyclase; *IP3*: Inositol trisphosphate; *PKC*: Πρωτεϊνική κινάση C; *PLC*: Φωσφολιπάση C; *mACh*: Μουσκαρινικός υποδοχέας; *nACh*: Νικοτινικός υποδοχέας; *ACh*: Ακετυλοχολίνη

1.4. Μουσκαρινικοί υποδοχείς στο αναπνευστικό σύστημα

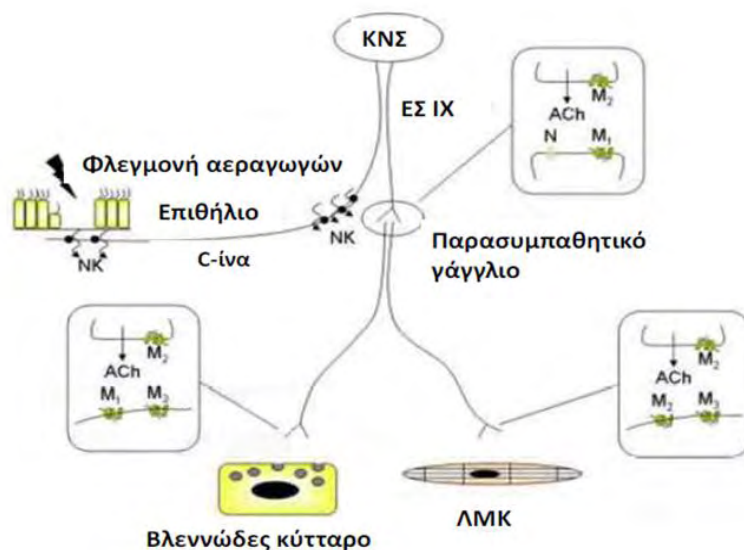
Στους αεραγωγούς οι μουσκαρινικοί υποδοχείς εκφράζονται από νευρωνικά και μη κύτταρα. Μη νευρωνικά κύτταρα αποτελούν τα κύτταρα της φλεγμονής και τα δομικά κύτταρα, όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες. Η έκφραση των διαφόρων μουσκαρινικών υποδοχέων εξαρτάται από το είδος του οργανισμού και τον φαινότυπο του κυττάρου. Στο αναπνευστικό σύστημα έχουν βρεθεί M_1 , M_2 και M_3 υποδοχείς. Ειδικότερα, στα ΛΜΚ, έχουν βρεθεί M_2 και M_3 υποδοχείς, με τους M_2 να είναι περισσότεροι. Ωστόσο, στο τοίχωμα κυψελίδων κουνελιού έχουν βρεθεί επίσης και M_4 υποδοχείς, ο ρόλος των οποίων δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί [57,58].

- Οι M_1 υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στα τοιχώματα των κυψελίδων, στους υποβλεννογόνους αδένες και στα παρασυμπαθητικά γάγγλια. Ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πιθανότατα, υποβοηθούν στη νευροδιαβίβαση και τη δράση των νικοτινικών υποδοχέων [57].

- Οι M_2 υποδοχείς εντοπίζονται τόσο στις προγαγγλιακές όσο και στις μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού. Λειτουργούν ως ανασταλτικοί αυτό-υποδοχείς, καθώς όταν η ACh συνδέεται σε αυτούς εμποδίζει τη περαιτέρω απελευθέρωση της. Στους πνεύμονες, συμμετέχουν στη σύσπαση των ΛΜΚ, της τραχείας και των βρόγχων [57,59].

- Οι M_3 υποδοχείς των ΛΜΚ του αεραγωγού είναι υπεύθυνοι για τη σύσπαση καθώς και τον πολλαπλασιασμό τους σε συνθήκες φλεγμονής, ενώ οι M_3 υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι υπεύθυνοι για την απελευθέρωση NO που οδηγεί σε χάλαση των βρόγχων. Επίσης, ρυθμίζουν και την παραγωγή βλέννας, από τους υποβλεννογόνιους αδένες [57].

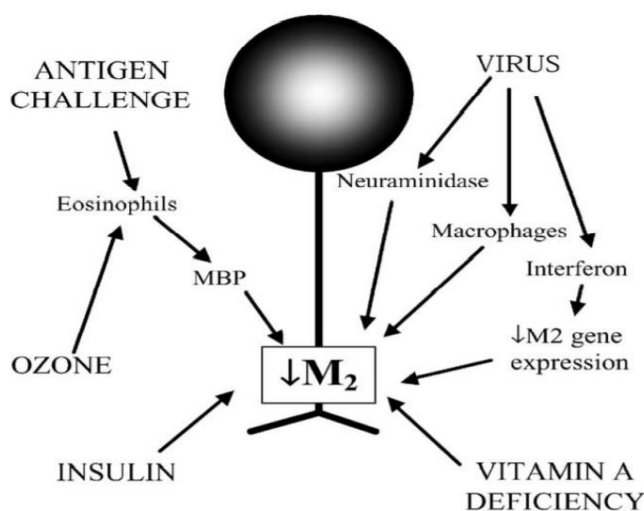
Σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος έχουν βρεθεί διαφοροποιήσεις ως προς την έκφραση και τη λειτουργία των μουσκαρινικών υποδοχέων [60]. Οι M₂ υποδοχείς έχει βρεθεί ότι δυσλειτουργούν σε ασθματικούς ασθενείς, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αυξημένος βρογχόσπασμο εξαιτίας της μη ελεγχόμενης απελευθέρωσης της ACh. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση ACh μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη απελευθέρωσή της λόγω ενεργοποίησης αντανεκλαστικών από τη φλεγμονή που παρατηρείται στους αεραγωγούς κατά τη πάθηση (Εικόνα 5). Επιπλέον τόσο στη ΧΑΠ, όσο και στο άσθμα παρατηρείται αυξημένη δράση του παρασυμπαθητικού συστήματος [37,58,61].



Εικόνα 5: Δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. (Ανατύπωση από Gosens et al., 2006).

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα; ΛΜΚ: Λεία μυϊκά κύτταρα; ACh: Ακετυλοχολίνη

Δεν έχουν εντοπιστεί αλλαγές στη λειτουργία ή τον αριθμό των M₃ υποδοχέων, ενώ, η μειωμένη λειτουργικότητα των M₂ αυτό-υποδοχέων έχει βρεθεί πως είναι αποτέλεσμα της αλλοστερικής δέσμευσης πρωτεϊνών που εκκρίνονται από ηωσινόφιλα (Εικόνα 6) [37,58].



Εικόνα 6: Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των M_2 υποδοχέων. (Ανατύπωση από: Coulson, 2003).

1.4.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την διέγερση των μωσκαρινικών υποδοχέων στα ΛΜΚ

Η δράση των μωσκαρινικών υποδοχέων των ΛΜΚ είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σύσπαση τους αλλά και το πολλαπλασιασμό, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAPK.

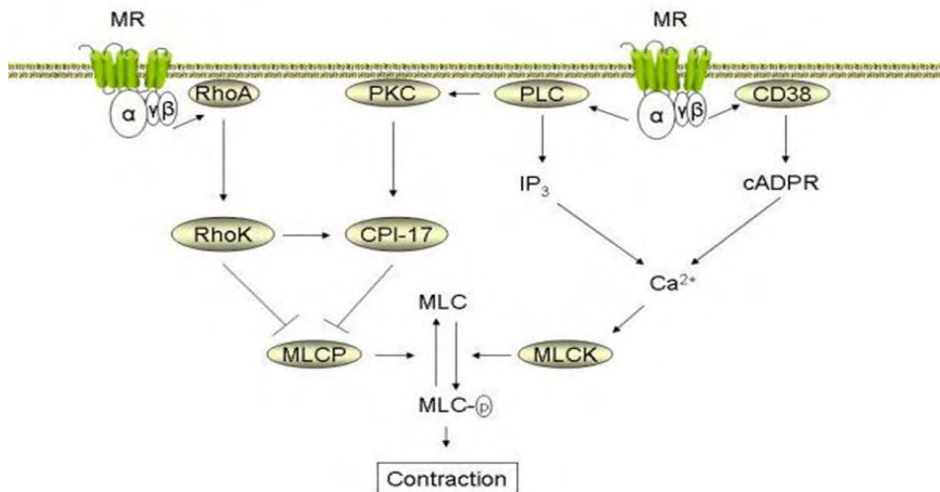
1.4.1.1. Μωσκαρινικοί υποδοχείς και συστολή των ΛΜΚ

Για την συστολή των ΛΜΚ, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC). Ca^{2+} εξαρτώμενα και μη Ca^{2+} εξαρτώμενα μονοπάτια μπορούν να ρυθμίσουν τη συστολή των ΛΜΚ [38,62].

Ca^{2+} εξαρτώμενα μονοπάτια: Η συστολή επέρχεται ύστερα από αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} το οποίο συνδέεται με τη καλμοδουλίνη (CAM) και το σύμπλοκο που δημιουργείται ενεργοποιεί την κινάση της MLC, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης. Ως αποτέλεσμα, αλλάζει η διαμόρφωση της κεφαλής της μυοσίνης, είναι πλέον σε θέση να αλληλοεπιδράσει με την ακτίνη και να προκληθεί συστολή. Η διέγερση των M_3 υποδοχέων ενεργοποιεί τη PLC η οποία υδρολύει την διφωσφορική 4,5 φωσφατιδινοσιτόλη (PIP_2) σε τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη (IP_3) και DAG. Η DAG ενεργοποιεί την PKC. Η IP_3 οδηγεί σε απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο δεσμεύεται στη CAM [60].

Οι M_3 υποδοχείς μπορούν να συνδεθούν επίσης στον παράγοντα CD38 (cluster of differentiation 38), με άγνωστο μηχανισμό, ο οποίος συμβάλλει στην παραγωγή της κυκλικής

ADP ριβόζης (cADPR). Η cADPR προκαλεί απελευθέρωση Ca^{2+} αλληλεπιδρώντας μέσω υποδοχέων ρυανοδίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ως τελικό αποτέλεσμα, η MLC ενεργοποιείται και προκαλείται συστολή. Κυτταροκίνες όπως TNF- α , Ιντερφερόνη γ (IFN- γ) επάγουν την έκφραση CD38, cADPR ενισχύοντας την απόκριση Ca^{2+} σε χολινεργική διαβίβαση (Εικόνα 7) [38,61,62].



Εικόνα 7: Τα κεντρικά μονοπάτια των μουσκαρινικών υποδοχέων που μεσολαβούν στη συστολή των λείων μυών των αεραγωγών. (Ανατύπωση από: Gosens et al., 2006).

MLCP: Myosin light chain phosphatase; PKC: Πρωτεϊνική κινάση C; PLC: Φωσφολιπάση C; IP3: Inositol trisphosphate; CD38: Cluster of differentiation 38; MLCK: Myosin light-chain kinase; cADPR: Κυκλική ADP ριβόζη

Μη Ca^{2+} εξαρτώμενα μονοπάτια: έχουν ως στόχο δράσης την φωσφατάση της μυοσίνης (myosin light chain phosphatase, MLCP), την οποία αναστέλλουν και προκαλείται έτσι συστολή των ΛΜΚ σε σταθερές συγκεντρώσεις ενδοκυττάρου Ca^{2+} [62].

Η DAG ενεργοποιεί την PKC, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον παράγοντα CPI-17 που αναστέλλει τη MLCP. Η RhoA ενεργοποιείται είτε από τους M_2 , είτε από τους M_3 υποδοχείς και ενεργοποιεί την Rho κινάση. Η Rho, επάγει τη σύσπαση ενεργοποιώντας τον παράγοντα CPI-17 ή αναστέλλοντας απευθείας τη MLCP. Έχει βρεθεί επίσης ότι παίζει κάποιο ρόλο στην αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης (Εικόνα 7) [63].

Οι M_3 υποδοχείς του παρασυμπαθητικού και οι β_2 αδρενεργικοί του συμπαθητικού συστήματος δρουν ανταγωνιστικά, αφού οι μεν εμπλέκονται στο μηχανισμό συστολής και οι δε στο μηχανισμό χάλασης των ΛΜΚ. Οι β_2 αδρενεργικοί υποδοχείς διεγείρουν τη δράση της AC αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cAMP και τελικά η ενεργοποίηση της PKA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση την MLCP και τη χάλαση των ΛΜΚ. Αντίθετα οι M_2 υποδοχείς μέσω της G_i

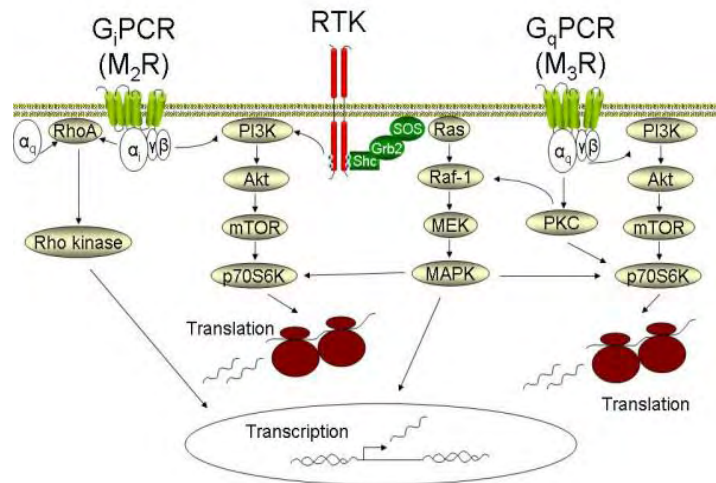
πρωτεΐνης αναστέλλουν τη δράση της AC και ανταγωνίζονται τους β_2 -αδρενεργικούς υποδοχείς. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συστολή των ΛΜΚ μπορεί να είναι αποτέλεσμα συγχρονισμένης ενεργοποίησης τόσο των M_2 , όσο και των M_3 υποδοχέων [59,61,64].

1.4.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ

Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές συνδέονται στους μουσκαρινικούς υποδοχείς και μπορούν να μεταβάλλουν τον φαινότυπο των ΛΜΚ και να επάγουν τον πολλαπλασιασμό τους κυρίως μέσω των μονοπατιών της PI3K, των MAPKs και των Rho κινασών. Έχει βρεθεί, ότι η αλλαγή του συνθετικού φαινοτύπου σε συστατό φαινότυπο ακολουθείται από αύξηση των M_3 υποδοχέων, ενώ η μετατροπή των ΛΜΚ σε συνθετικά, συνοδεύεται από τη μείωση τους [15,65].

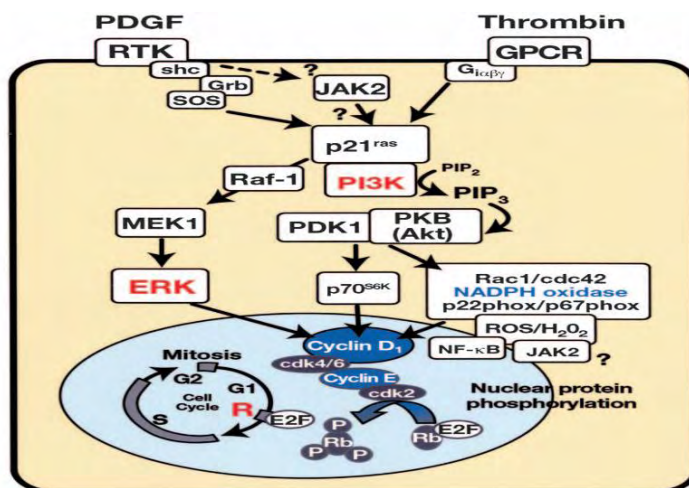
Αν και στους αεραγωγούς, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές επάγουν το πολλαπλασιασμό στους ινοβλάστες, μέχρι τώρα τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων από μόνη τους μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ παροδικά ανάλογα με τον φαινότυπο των ΛΜΚ. Αυτό, μπορεί να σχετίζεται με την μειωμένη συγκέντρωση M_3 υποδοχέων στα συνθετικά ΛΜΚ [15,66,67]. Γενικά, η σύνδεση μουσκαρινικών αγωνιστών στους M_2 ή M_3 κυρίως υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP κινασών και της PI3K. Τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν την αντιγραφή/μεταγραφή του DNA, την είσοδο των ΛΜΚ στο κυτταρικό κύκλο. Μελέτες σε καλλιέργειες ΛΜΚ δείχνουν ότι για το πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ συνήθως απαιτείται η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε μουσκαρινικούς αγωνιστές και ένα μιτογόνο ερέθισμα άλλης ομάδας, όπως έναν αυξητικό ή φλεγμονώδη παράγοντα. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι μουσκαρινικοί υποδοχείς μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (RTKs) αν και η αλληλεπίδραση αυτή δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Εικόνα 8) [65,68].

Οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν το πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ συνδεόμενοι στους RTKs τους οποίους ενεργοποιούν. Το σηματοδοτικό μονοπάτι των αυξητικών παραγόντων ξεκινά με τη σύνδεση της πρωτεΐνης Shc, της πρωτεΐνης δέσμευσης Grb2 και του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων Sos στον RTK. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η πρωτεΐνη p21 Ras. Το μόριο p21 Ras φαίνεται να αποτελεί ένα κομβικό σημείο στα μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό. Η ενεργοποιημένη p21 Ras δεσμεύει την PI3K και τη κυτταροπλασματική κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf-1 και τις ενεργοποιεί [69]. Η ενεργοποιημένη Raf-1 ξεκινά το σηματοδοτικό καταρράκτη των MAPK φωσφορυλιώνοντας την MEK1 η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις ERK1/2 επάγοντας τελικά την έκφραση της κυκλίνης D_1 και τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G_1 στη φάση S (Εικόνα 9) [70,71].



Εικόνα 8: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους μουςκαρινικούς και RTKs υποδοχείς στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (Ανατύπωση από: Gosens et al., 2006).

ERK: Extracellular signal-regulated kinases; Gi: Inhibitory G protein; GPCR: G protein-coupled receptor; Grb: Growth factor receptor-bound protein; Gs: Stimulatory G protein; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MEK: MAPK kinase; mTOR: Mammalian Target of Rapamycin; PI3K: Phosphatidylinositol 3 -kinase; PKB/Akt: Protein kinase B; PKC: Πρωτεϊνική κινάση C; RTK: Receptor tyrosine kinase, υποδοχέας κινάσης τυροσίνης; SOS: Son of Sevenless



Εικόνα 9: Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ που προκαλείται από διάφορα μιτογόνα (Ανατύπωση από: Hirst S.J. et al., 2004).

ERK: Extracellular signal-regulated kinases; Gi: Inhibitory G protein; GPCR: G protein-coupled receptor; Grb: Growth factor receptor-bound protein; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MEK: MAPK kinase; PI3K: Phosphatidylinositol 3 -kinase; PKB/Akt: Protein kinase B; RTK: Receptor tyrosine kinase, υποδοχέας κινάσης τυροσίνης; SOS: Son of Sevenless; JAK: Janus tyrosine kinase; NFκB: Nuclear factor K β ; NADPH oxidase: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

Στον άνθρωπο, έχει βρεθεί ότι και άλλες MAPK όπως η p38 εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Η Raf-1 και κατ' επέκταση το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK, μπορεί και να ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από την p21 Ras, μέσω της PKC που ενεργοποιείται από τον M₃ μουσκαρινικό υποδοχέα μέσω της πρωτεΐνης G_q και της α υπομονάδας της (Εικόνα 8). Η PKC μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την p70S6K και να αναστείλει τη δράση της GSK3, της οποίας φυσιολογικός ρόλος είναι να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό. Οι M₂ υποδοχείς μέσω της G_i πρωτεΐνης και των βγ υπομονάδων της ενεργοποιούν τη πρωτεΐνη p21 Ras. Η PI3K ενεργοποιείται με αλλοστερική αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Ras και στρατολογεί κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Akt/PKB, PDK) και μέλη της οικογένειας Rho GTPασών (Rac, cdc42, αλλά όχι RhoA) που ρυθμίζουν το κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ [68,70]. Η PKB αναστέλλει τη μεταγραφή του αναστολέα της Cdk, p27^{Kip1}, ενώ η PDK1 ενεργοποιεί την Akt και την p70S6K. Η Akt αναστέλλει τη GSK-3 ενώ ενεργοποιεί τον παράγοντα mTOR. Το μονοπάτι της PI3K ενεργοποιείται και μέσω ενεργοποίησης του M₃ υποδοχέα προερχόμενο από την ετεροτριμερή πρωτεΐνη G_q και τις βγ υπομονάδες της, επάγοντας το πολλαπλασιασμό [41].

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Rac1 αποτελεί μέρος του συμπλόκου NADPH που προκαλεί ενεργές ρίζες οξυγόνου (H₂O₂ και O₂⁻). Στο μονοπάτι αυτό εμπλέκονται ο παράγοντας NF-kB, η JAK2 και STAT3 με αποτέλεσμα την επαγωγή της κυκλίνης D1 (Εικόνα 9) [44,72]. Η ενεργοποίηση των κυκλινών και των κυκλο-εξαρτώμενων κινασών (Cdks) απαιτείται για την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb). Έτσι, μειώνεται η συγγένεια δέσμευσης της Rb στο παράγοντα επιμήκυνσης E2F. Ο διαχωρισμός, είναι το έναυσμα για ενεργοποίηση του E2F που στη συνέχεια επάγει τη δράση της DNA πολυμεράσης και τη μεταγραφή γονιδίων της S φάσης του κυτταρικού κύκλου [12,72,73].

1.4.2. Μουσκαρινικοί προσδέτες

Οι μουσκαρινικοί προσδέτες μπορούν να χωριστούν σε αγωνιστές, μερικούς αγωνιστές, ουδέτερους ανταγωνιστές, αντίστροφους αγωνιστές και ανταγωνιστές ανάλογα με τη δράση τους. Ωστόσο, η διάκριση αυτή δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρη [74].

Φάρμακα τα οποία δεσμεύονται στους μουσκαρινικούς υποδοχείς και μιμούνται τη δράση του ενδογενή αγωνιστή (ACh) λέγονται μουσκαρινικοί αγωνιστές. Οι αγωνιστές συνδέονται στον υποδοχέα, κατά την ενεργή κατάσταση, με υψηλή συγγένεια ή/και οδηγούν τον υποδοχέα στην ενεργή του διαμόρφωση. Δύο από τους πιο γνωστούς αγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων είναι η ACh, ο ενδογενής νευροδιαβιβαστής του παρασυμπαθητικού και η καρβαχόλη συνθετική ουσία που δεν διασπάται από την AChE. Η ACh μπορεί να συνδεθεί σε όλους τους τύπους μουσκαρινικού υποδοχέα με την ίδια συγγένεια [37]. Μελέτες δείχνουν διαφορετική συμπεριφορά

ανάμεσα στην ACh και την καρβαχόλη, κυρίως ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τη σύνδεσή τους στον υποδοχέα [75].

Οι μερικοί αγωνιστές, σε αντίθεση με τους πλήρεις αγωνιστές, δεν έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν τη μέγιστη απόκριση του υποδοχέα, ενώ οι ουδέτεροι ανταγωνιστές συνδέονται στον υποδοχέα χωρίς διάκριση μεταξύ της ανενεργής ή της ενεργής κατάστασης του και κατά συνέπεια δεν αλλάζουν το επίπεδο δραστηριότητας του υποδοχέα [74].

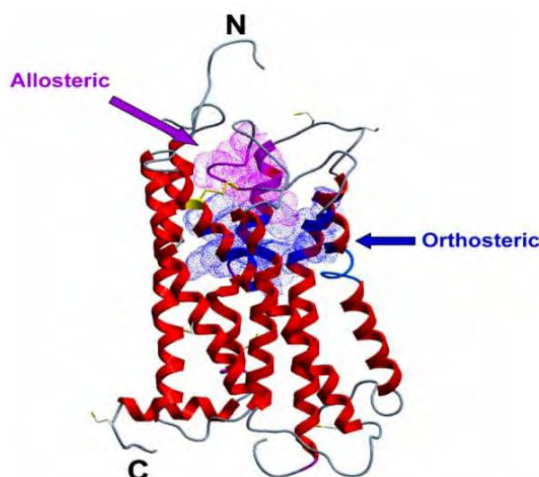
Οι μουσκαρινικοί ανταγωνιστές είναι φάρμακα τα οποία δεσμεύονται σε υποδοχείς χωρίς να έχουν κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα από μόνα τους, αλλά ανταγωνίζονται τη δράση των αγωνιστών. Μερικά από αυτά είναι η ατροπίνη, το ιπρατρόπιο και η πιρενζεπίνη, ενώ το τιοτρόπιο θεωρείται κλασσικός ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων επίσης. Στους τρόπους δράσης των ανταγωνιστών ανήκουν: α) ο *συναγωνιστικός ανταγωνισμός*, όπου αποκλείεται η ταυτόχρονη δέσμευση αγωνιστή και ανταγωνιστή στον υποδοχέα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ο αγωνιστής και ο ανταγωνιστής είτε ανταγωνίζονται την ίδια θέση δέσμευσης ή συνδέονται σε παρακείμενες περιοχές που επικαλύπτονται (συντοπική αλληλεπίδραση), ή ακόμα συνδέονται σε διαφορετικές θέσεις πάνω στο μόριο του υποδοχέα, αλλά επηρεάζουν το μακρομόριο του υποδοχέα με τέτοιο τρόπο ώστε να μη είναι δυνατή η ταυτόχρονη δέσμευση αγωνιστή και ανταγωνιστή. β) ο *μη συναγωνιστικός ανταγωνισμός*, όπου ο αγωνιστής και ο ανταγωνιστής μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα στο υποδοχέα. Η δέσμευση του ανταγωνιστή μειώνει ή αποτρέπει τη δράση του αγωνιστή με ή χωρίς επίδραση στη δέσμευση του. Η μέγιστη δράση (αποτελεσματικότητα) του αγωνιστή μειώνεται παρουσία ανταγωνιστή. Οι συναγωνιστικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές θα πρέπει να έχουν αρκετά μεγάλη χημική συγγένεια για τον υποδοχέα-στόχο, ώστε να απομακρύνουν το ενδογενές μόριο από τη θέση δέσμευσης του στον υποδοχέα και θα πρέπει να παραμένουν σε υψηλή συγκέντρωση στην υποδοχέα προκειμένου να έχουν δράση. Ωστόσο, ακόμη και αν η συγγένεια ή η συγκέντρωση του προσδέτη είναι μειωμένη, η φυσιολογική μετάδοση σήματος του ενδογενούς μορίου που συνδέεται στον υποδοχέα, επηρεάζεται αρνητικά. [74].

Με τη μη-συναγωνιστική προσέγγιση διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία και μετάδοση σήματος του ενδογενούς μορίου μέσω των υποδοχέων. Για το λόγο αυτό, οι μη-συναγωνιστικοί ανταγωνιστές αποτελούν εν δυνάμει πιθανά ασφαλέστερα φάρμακα, σε σχέση με τους συναγωνιστικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές. Τα περισσότερα από τα φάρμακα που έχουν ταξινομηθεί ως «ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές» κατατάσσονται πλέον ως αντίστροφοι αγωνιστές, όπως έχει γίνει πρόσφατα για την ατροπίνη, δαριφενσίνη, τολτεροδίνη και οξυβουτυνίνη για τους υποδοχείς M₂[74].

1.4.2.1. Το φαινόμενο του αλλοστερισμού στους μουσκαρινικούς υποδοχείς

Η δυνατότητα των μουσκαρινικών υποδοχέων για αλλοστερική διαμόρφωση ανακαλύφθηκε το 1968/1969 από τον Lullmann και τους συναδέλφους του στην αναζήτηση νέων αντιδωτών κατά της δηλητηρίασης με αναστολείς της AChE [75,76]. Ως «αλλοστερική αλληλεπίδραση» αναφέρεται η κατάσταση κατά την οποία δύο ή και περισσότερες θέσεις σε έναν υποδοχέα συνδέονται λειτουργικά. Έτσι, η σύνδεση ενός προσδέτη σε μία θέση του υποδοχέα μπορεί να επηρεάσει τη φύση και την έκταση της δέσμευσης ενός άλλου προσδέτη.

Εάν τα μόρια του προσδέτη είναι ταυτόσημα, η αλληλεπίδραση ορίζεται ως ομοτροπική, ενώ εάν τα μόρια είναι διαφορετικά, η αλληλεπίδραση ορίζεται ως ετεροτροπική [77,78]. Οι mAChrs έχουν τουλάχιστον δύο θέσεις δέσμευσης, την ορθοστερική και μια ή περισσότερες τοπογραφικά διακριτές αλλοστερικές θέσεις που φαίνεται να εντοπίζονται κοντά στην είσοδο του ορθοστερικού θύλακα (Εικόνα 10) [75].



Εικόνα 10: Απεικόνιση του M_2 υποδοχέα όπου επισημαίνεται η αλλοστερική και ορθοστερική θέση σύνδεσης. (Ανατύπωση από: Karen J et al., 2007)

Στην ορθοστερική θέση του υποδοχέα συνδέονται οι ενδογενείς αγωνιστές των υποδοχέων, όπως η ACh καθώς και μερικοί από τους ανταγωνιστές. Στην αλλοστερική θέση συνδέονται τροποποιητές που μεταβάλλουν την ικανότητα δράσης των αγωνιστών [79]. Η αλλοστερική και ορθοστερική θέση του υποδοχέα φαίνεται πως βρίσκονται σε μια συνεχή αλληλεπίδραση. Αυτό σημαίνει ότι αλλοστερικοί και ορθοστερικοί προσδέτες επηρεάζουν τη συγγένεια δέσμευσής τους, με αμοιβαίο τρόπο. Αυτό μπορεί να γίνεται με θετική ή αρνητική συνέργεια και σε μοντέλα ποσοτικοποίησης της αλλοστερικής ρύθμισης αυτό περιγράφεται από τον παράγοντα συνεργασίας α . Σε κάθε περίπτωση, θετική συνέργεια σημαίνει ότι ο αλλοστερικός παράγοντας προτιμά τον υποδοχέα όταν ο προσδέτης είναι συνδεδεμένος στην ορθοστερική θέση σε σύγκριση με τον ορθοστερικά ελεύθερο υποδοχέα. Αντίθετα, σε αρνητική συνέργεια ο αλλοστερικός προσδέτης

προτιμά έναν ελεύθερο υποδοχέα. Είτε ο ορθοστερικός προσδέτης είναι δεσμευμένος είτε όχι, ο αλλοστερικός τροποποιητής δεσμεύεται με την ίδια συγγένεια στον υποδοχέα [80,81].

Η δέσμευση ενός αλλοστερικού τροποποιητή μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση της διαμόρφωσης του υποδοχέα που μεταδίδεται στην ορθοστερική θέση (και αντίστροφα), δημιουργώντας ουσιαστικά ένα "νέο" υποδοχέα με τις δικές του δεσμευτικές και λειτουργικές ιδιότητες. Ωστόσο, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι οι μουσκαρινικοί υποδοχείς αλληλοεπιδρούν με πολυάριθμες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες (π.χ., ετεροτριμερείς G) που επηρεάζουν επίσης τη διαμόρφωση του υποδοχέα [77,82].

1.4.2.2. Αλλοστερικοί τροποποιητές

Οι αλλοστερικοί τροποποιητές ταξινομούνται σε:

1) θετικούς αλλοστερικούς τροποποιητές (positive allosteric modulators, PAMs), οι οποίοι ενισχύουν τη δέσμευση ή/και τη μέγιστη επίδραση ενός ορθοστερικού προσδέτη.

2) αρνητικούς αλλοστερικούς τροποποιητές (negative allosteric modulators, NAMs), οι οποίοι έχουν αρνητική συνεργασία με έναν ορθοστερικό προσδέτη και ανταγωνίζονται ή μειώνουν την αποτελεσματικότητα του ενδογενή προσδέτη.

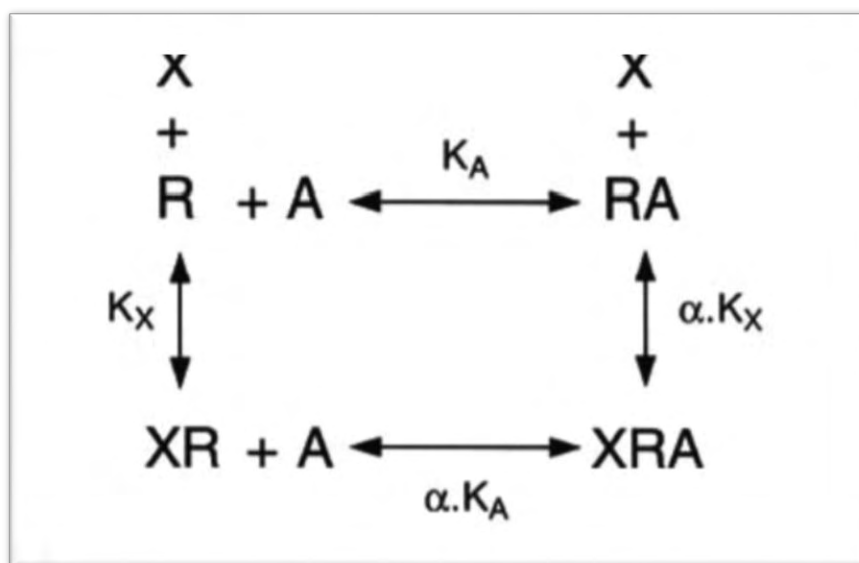
3) ουδέτερους αλλοστερικούς τροποποιητές (neutral allosteric ligands, NALs) που μπορούν να συνδεθούν στον υποδοχέα αλλά δεν έχουν επίδραση στη συγγένεια ή την αποτελεσματικότητα ενός ορθοστερικού υποκαταστάτη [83].

Για παράδειγμα, η δέσμευση του ορθοστερικού ανταγωνιστή N-μεθυλοσκοπολαμίνη στον M_2 υποδοχέα ενισχύεται αλλοστερικά από το αλκουρόνιο, ενώ αναστέλλεται αλλοστερικά από τη γαλαμίνη, παρόλο που και οι δύο αλλοστερικοί τροποποιητές συνδέονται σε κοινή αλλοστερική θέση στον υποδοχέα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ένας αλλοστερικός τροποποιητής μπορεί να αυξήσει τη δέσμευση ενός ορθοστερικού αγωνιστή, αλλά να μειώσει την αποτελεσματικότητα της σηματοδότησης του [84,85].

Γενικά, υπάρχουν πολύ λίγοι ορθοστερικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές που παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα για έναν μόνο από τους 5 υποτύπους μουσκαρινικών υποδοχέων ως προς τη συγγένεια και το ίδιο ισχύει και για τους αλλοστερικούς τροποποιητές. Ένας από τους πιο διαδεδομένους και καλά μελετημένους αλλοστερικούς τροποποιητές είναι η γαλαμίνη με κατά σειρά επιλεκτικότητα στους υποδοχείς $M_2 > M_1$, $M_4 > M_3$, M_5 [80]. Ένας άλλος αλλοστερικός τροποποιητής με υψηλή συγγένεια για τον M_2 υποδοχέα είναι το αλκουρόνιο. Έχει βρεθεί πως όταν η πιλοκαρπίνη, ένας κλασικός μουσκαρινικός αγωνιστής, είναι δεσμευμένη στους υποδοχείς M_2 , η συγγένεια του αλκουρονίου για τον υποδοχέα εμφανίζονταν αυξημένη. Επίσης, το αλκουρόνιο απροσδόκητα κατέστειλε τις αγωνιστικές επιδράσεις της πιλοκαρπίνης, ενώ σε

μερικές περιπτώσεις την έκανε να συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένας μουσκαρινικός αλλοστερικός παράγοντας μπορεί να ρυθμίσει την αποτελεσματικότητα ενός μουσκαρινικού αγωνιστή. Επιπλέον, το αλκουρόνιο και η στρυχνίνη είναι αλλοστερικοί παράγοντες που έχει βρεθεί ότι είναι συνεργάζονται θετικά με τον ανταγωνιστή N-μεθυλοσκοπολαμίνη, ενώ η βρουκίνη εμφανίζει θετική συνέργεια με την ACh σε συγκεκριμένους υποτύπους υποδοχέων [86].

Έχουν σχεδιαστεί μοντέλα απεικόνισης και ποσοτικοποίησης της αλλοστερικής αλληλεπίδρασης στους υποδοχείς με στόχο την περαιτέρω κατανόηση της δράσης του αλλοστερικού φαινομένου [82]. Το πιο απλό αλλοστερικό μοντέλο υποθέτει ότι η σύνδεση ενός αλλοστερικού προσδέτη στον υποδοχέα επηρεάζει μόνο τη συγγένεια του ορθοστερικού συνδέτη. Αυτό το μοντέλο αναφέρεται ως ATCM (Allosteric Ternary Complex Model). Η αλληλεπίδραση των προσδεμάτων στο μοντέλο αυτό λαμβάνει υπόψη ως παραμέτρους τη συγκέντρωση κάθε προσδέματος, τις σταθερές διάστασης (K_α και K_β , αντίστοιχα) του ορθοστερικού και του αλλοστερικού συνδέτη και το «παράγοντα συνεργείας» α , που είναι ένα μέτρο του μεγέθους και της κατεύθυνσης της αλλοστερικής επίδρασης μεταξύ των περιοχών δέσμευσης (Εικόνα 11) [82,83].



Εικόνα 11: Μοντέλο αλλοστερισμού ATCM. (Ανατύπωση από: Birdsall N. and Lazareno S., 2005)
R: υποδοχέας; *A:* ορθοστερικός προσδέτης; *X:* αλλοστερικός προσδέτης; K_A : συγγένεια του *A* για τον υποδοχέα; K_X : συγγένεια του *X* για τον υποδοχέα; α : παράγοντας συνεργατικότητας *a*

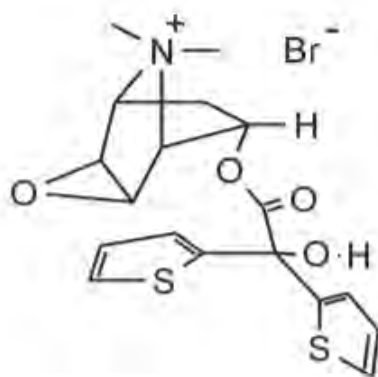
Ωστόσο, υπάρχουν αλλοστερικοί προσδέτες των οποίων η δράση εμφανίζεται πιο περίπλοκη και δεν μπορεί να περιγραφεί επαρκώς από το ATCM μοντέλο. Αυτοί οι προσδέτες, δεν ρυθμίζουν μόνο την συγγένεια και τη σηματοδότηση του ορθοστερικού προσδέματος, αλλά επίσης, ενεργούν ως αγωνιστές από μόνοι τους. Υπήρχε έτσι η ανάγκη για επέκταση του ATCM σε ένα αλλοστερικό

μοντέλο που περιγράφει τη λειτουργία GPCR με περισσότερους παράγοντες που σχετίζονται με: α) την ικανότητα του υποδοχέα για την ουσιαστικό ισομερισμό μεταξύ ενεργών (R^*) και αδρανών (R) διαμορφώσεων, β) την ικανότητα των προσδετών να ενεργούν είτε ως αγωνιστές, είτε ως αντίστροφοι αγωνιστές, γ) την ικανότητα κάθε προσδέματος να διαμορφώνει αλλοστερικώς τη συγγένεια δέσμευσης του άλλου και δ) την ικανότητα των δύο προσδετών για τη ρύθμιση της μετάβασης του υποδοχέα σε ενεργή κατάσταση όταν συνυπάρχουν [74,75,82]

Λόγω της ποικιλότητας δράσης των αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων, τη τελευταία δεκαετία ο σχεδιασμός φαρμάκων που στοχεύουν τις αλλοστερικές θέσεις δέσμευσης των μουσκαρινικών υποδοχέων γνώρισε μεγάλη άνθηση.

1.4.2.3. Τιωτρόπιο

Το τιωτρόπιο είναι ένας μουσκαρινικός ανταγωνιστής (αντιχολινεργικό). Προκαλεί βρογχοδιαστολή και είναι το βρογχοδιασταλτικό επιλογής στη ΧΑΠ, αλλά λιγότερο αποτελεσματικό, σε σχέση με τους β_2 -αδρενεργικούς αγωνιστές, στο άσθμα (Εικόνα 12) [87].



Εικόνα 12: Η χημική δομή του τιωτρόπιου. (Ανατύπωση από: Barnes et al., 2001)

Το τιωτρόπιο ανταγωνίζεται τη δράση των μουσκαρινικών αγωνιστών καθώς μπορεί να συνδεθεί με την ίδια χημική συγγένεια στους M_1 , M_2 και M_3 μουσκαρινικούς υποδοχείς. Θεωρείται κυρίως ανταγωνιστής των M_1 και M_3 υποδοχέων, καθώς η αποδέσμευσή του από αυτούς είναι 100 φορές πιο αργή, απ' ό τι στους M_2 υποδοχείς. Έτσι, το τιωτρόπιο φαίνεται να προκαλεί μακροχρόνιο αποκλεισμό των M_3 υποδοχέων, αλλά μόνο παροδικό αποκλεισμό των M_2 [88].

Σε ασθενείς που πάσχουν από ΧΑΠ, αρκεί μια ημερήσια δόση 18 μ g για να βελτιώσει σημαντικά τη λειτουργία των πνευμόνων [89]. Εκτός από τη βρογχοδιασταλτική του δράση

μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι το τιοτρόπιο μπορεί να επηρεάσει και την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, που παρατηρείται σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού. [90,91]. Ειδικότερα, το τιοτρόπιο έχει δείξει ότι αναστέλλει την αύξηση της μάζας του λείου μυ τραπεζίας και την έκφραση της μυοσίνης σε μοντέλα άσθματος σε ινδικά χοιρίδια. Σε ινοβλάστες που λήφθηκαν με βιοψία και απομονώθηκαν από πνεύμονες ασθενών που έπασχαν από πνευμονική ίνωση αλλά και σε μυοϊνοβλάστες το τιοτρόπιο ελάττωσε τον επαγόμενο από ACh πολλαπλασιασμό των κυττάρων [92].

Τα αντιχολινεργικά φάρμακα συχνά συνδυάζονται με β_2 αγωνιστές ως θεραπευτική αγωγή. Νέα δεδομένα δείχνουν ότι το τιοτρόπιο ενισχύει συνεργικά τις επιδράσεις της ολοδατερόλης μέσω της αύξησης της συγγένειας και της ενδογενούς αποτελεσματικότητας της, δρώντας σε αλλοστερικές θέσεις του β_2 -αδρενεργικού υποδοχέα [93]. Φαίνεται πως η αλλοστερική διαμόρφωση συμβάλλει σε αυτήν τη συνεργική δράση, υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων μπορεί να είναι χρήσιμος για τη ΧΑΠ. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Kruse et al., σε αντίθεση με την ατροπίνη, το τιοτρόπιο δεσμεύεται στην αλλοστερική θέση του M_3 υποδοχέα πολύ πιο σταθερά και αποτρέπει την είσοδο ACh στην ορθοστερική θέση δέσμευσης [94,95,96].

1.4.2.4. Φαρμακευτική προσέγγιση του αλλοστερικού φαινομένου

Οι ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων, που αναφέρονται ως αντιχολινεργικά, είναι κοινά φάρμακα που προκαλούν βρογχοδιαστολή και χρησιμοποιούνται ευρέως, μόνα τους ή σε συνδυασμό με μακράς δράσης β_2 αγωνιστές, για τη θεραπεία κυρίως της ΧΑΠ και, σε μικρότερο βαθμό, του άσθματος. Αυτήν τη στιγμή στα αντιχολινεργικά φάρμακα, συγκαταλέγεται και το τιοτρόπιο (tiotropium), ένας ανταγωνιστής των M_2 ή/και M_3 μουσκαρινικών υποδοχέων [97,98].

Σήμερα, μια νέα φαρμακευτική προσέγγιση, χρησιμοποιεί ουσίες που στοχεύουν τις αλλοστερικές θέσεις δέσμευσης των μουσκαρινικών υποδοχέων ή/και παράγοντες που δεσμεύουν ταυτόχρονα τόσο την ορθοστερική όσο και την αλλοστερική θέση του υποδοχέα [99].

Οι αλλοστερικοί τροποποιητές εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τους κλασικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές σε μια θεραπευτική προσέγγιση. Αρχικά, θεωρούνται γενικά πιο ασφαλή φάρμακα καθώς η δράση τους εμφανίζει κορεσμό (Ceiling effect) και ως εκ τούτου, δεν εμφανίζουν τοξικότητα λόγω υπερδοσολογίας. Επίσης, με τη χρήση αλλοστερικών τροποποιητών αποφεύγεται η απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση (internalization) των υποδοχέων γεγονός που διασφαλίζει τη φυσιολογική μετάδοση σήματος μέσω αυτών. Επιπλέον, λόγω της μεγαλύτερης εξελικτικά δομικής ποικιλότητας των αλλοστερικών θέσεων δέσμευσης έναντι αυτής της ορθοστερικής θέσης, με τη χρήση αλλοστερικών τροποποιητών μπορούμε πλέον να δημιουργούμε χημικά μόρια/φάρμακα των οποίων η χημική δομή επιδέχεται βελτίωση για *per*

ος χορήγηση/βιοδιαθεσιμότητα και βέλτιστες φαρμακοκινητικές ιδιότητες καθώς επίσης και μόρια πιο εκλεκτικά ως προς τους επιμέρους υπότυπους των υποδοχέων. Τέλος, οι παράγοντες που δεσμεύουν τόσο στην αλλοστερική όσο και την ορθοστερική θέση των υποδοχέων είναι πιο αποτελεσματικοί από αυτούς που εμφανίζουν προτίμηση για τη μία ή την άλλη θέση [77,100].

Ωστόσο, έως ότου υπάρξει καλύτερος έλεγχος και κατανόηση των διαδικασιών μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών της διαμόρφωσης του υποδοχέα καθώς και του μοριακού μηχανισμού δράσης των αλλοστερικών τροποποιητών, οι θεραπευτικές αυτές προσεγγίσεις θα επιδέχονται βελτίωση και επιπλέον διερεύνηση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Χειρισμός πειραματόζωων

Ως πηγή των Λείων Μυϊκών Κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα θηλυκά και αρσενικά κουνέλια, τα οποία διατηρήθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και τους παρέχονταν τροφή και νερό, ως τη μέρα της θανάτωσής τους. Ο χειρισμός των ζώων έγινε σύμφωνα με ηθικές, συνταγματικές και ευρωπαϊκές (Directive 2010/63/EU) οδηγίες. Τα ζώα θανατώθηκαν με ενδοφλέβια χορήγηση πεντοθάλης (Abbott, Illinois, USA).

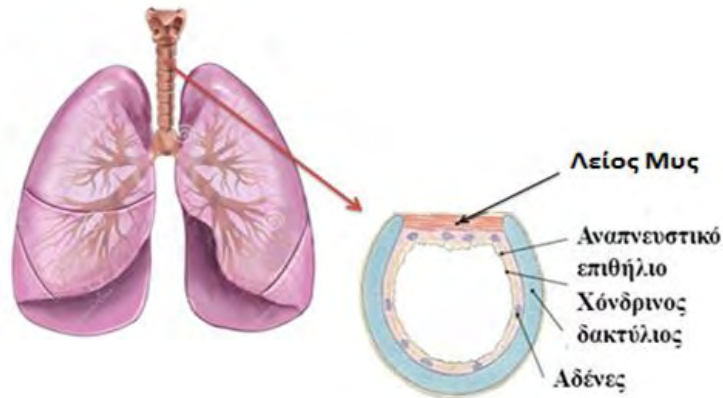
2.1.1. Απομόνωση ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Μετά την θανάτωση των ζώων, απομακρύνθηκαν οι ιστοί που βρίσκονται στην περιοχή της τραχείας, κάτω από ασηπτικές συνθήκες και η τραχεία τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου (Πίνακας 2), σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις του ιστού με αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου.

Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου.

Ουσία	NaCl	KCl	MgSO ₄	Glucose	KH ₂ PO ₄	NaHPO ₄	NaHCO ₃	CaCl ₂
Συγκέντρωση (mM)	139	5.4	1.47	11	1.47	2.8	1.4	0.2

Σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής, αφαιρέθηκε το λίπος και τα υπολείμματα ιστών που περιβάλλαν την τραχεία και στη συνέχεια κόπηκε ο χόνδρος που βρίσκεται απέναντι από τις λείες μυϊκές ίνες, έτσι ώστε να ανοίξει η τραχεία κατά μήκος (Εικόνα13). Το επιθήλιο απομακρύνθηκε με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό. Οι λείες μυϊκές ίνες απομακρύνθηκαν από τον χόνδρο και αφού ακολούθησαν πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου, μεταφέρθηκαν σε 2ml διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού A (Πίνακας 3) και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο, στους 37°C, με συνεχή ανάδευση.



Εικόνα 13: Ανατομία της τραχείας. (Τροποποιημένη από: www.slideplayer.com 20/8/2020).

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού A.

Κrebs χαμηλού ασβεστίου	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin, BSA)	Κολλαγενάση I	Ελαστάση IV
Σύσταση	0.25%	2mg/ml	10U/ml

Μετά το τέλος της επώασης το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C. Ανάμεσα στις δύο φυγοκεντρήσεις το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου. Μετά την δεύτερη φυγοκέντρωση, το εναιώρημα μεταφέρθηκε στο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού B (Πίνακας 4) και επώαστηκε για 60 λεπτά σε υδατόλουτρο, στους 37°C, με συνεχή ανάδευση.

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού B

Κrebs χαμηλού ασβεστίου	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin, BSA)	Κολλαγενάση I	Ελαστάση IV
Σύσταση	0.25%	1 mg/ml	20U/ml

Έπειτα, το εναιώρημα των λείων μυϊκών ινών φυγοκεντρήθηκε εκ νέου 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταξύ των φυγοκεντρήσεων, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12 (DMEM-F12, GIBCO), το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) 100U/ml πενικιλίνη και 100g/ml στρεπτομυκίνη (διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, PS). Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε με ελαφριά ανάδευση προκειμένου να αποκολληθούν τα χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών.

2.2. Καθιέρωση πρωτογενούς καλλιέργειας ΔΜΚ τραχείας κουνελιού

Μετά την απομόνωση, τα ζωντανά κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon YS2T, (Nikon Inc., Melville New York, USA), με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) έπειτα από χρώση με Trypan blue. Η χρωστική Trypan blue (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα, καθώς εισέρχεται από τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες στο εσωτερικό του κυττάρου.

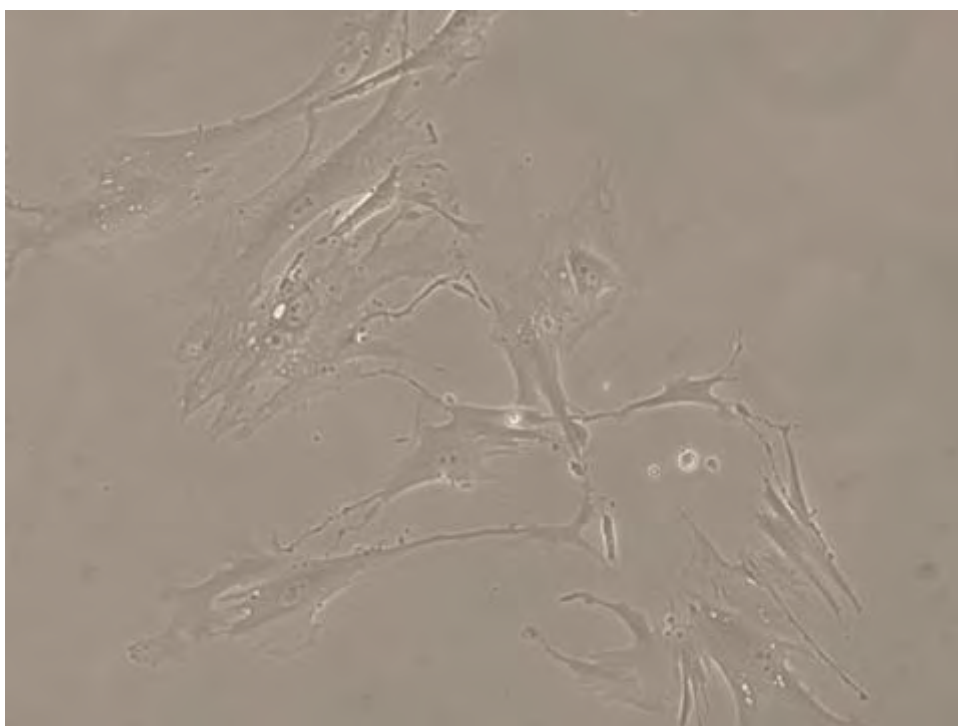
Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε φλάσκα των 75cm² (περίπου 5x10⁴ κύτταρα ανά 2 ml θρεπτικού υλικού), μαζί με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% FBS, 100U/ml πενικιλίνη και 100g/ml στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% διοξειδίου του άνθρακα (Carbondioxide, CO₂). 24 με 48 ώρες μετά την απομόνωση, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας, οπότε το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε, αντικαταστάθηκε με νέο και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες, με περιοδική αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανά 2 ή 3 ημέρες.

Όταν τα κύτταρα δημιούργησαν μονοστιβάδα και κάλυψαν το 80-100% της επιφάνειας της φλάσκας αποκολλήθηκαν με 0.25% τρυψίνη και 0.53mM EDTA. Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και έγινε έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με αποστειρωμένο ισότονο διάλυμα PBS (phosphate buffer saline) 1x με την ακόλουθη σύσταση: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄. Η έκπλυση με PBS απομάκρυνε εναπομείναντα ίχνη ορού που αναστέλλουν τη δράση της τρυψίνης. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 0.25% τρυψίνης-0.53mM EDTA και επώαση στο κλίβανο για 5 λεπτά. Με την ενζυμική δράση της τρυψίνης τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας. Κατόπιν, έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου (10ml σε κάθε φλάσκα επιφάνειας 75cm²), που περιείχε FBS, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη. Έγινε επαναιώρηση των κυττάρων και τα κύτταρα μοιράστηκαν σε φλάσκες ή τρυβλία και προστέθηκε θρεπτικό μέσο.

Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, κάτω από άσηπτες συνθήκες. Τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην 3^η με 6^η ανακαλλιέργεια.

2.2.1. Διατήρηση κυττάρων και ανάπτυξη καλλιιεργειών

Τα κύτταρα προς αποθήκευση, ήταν προσκολλημένα ως μονοστιβάδα στην επιφάνεια της φλάσκας, ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1xPBS και αποκολλήθηκαν με τρυψίνη (Εικόνα 14). Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C.



Εικόνα 14: Καλλιέργεια ΑΜΚ τραχείας κουνελιού, όπως φαίνεται με μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Για την ανάπτυξη καλλιέργειας από τα αποθηκευμένα κύτταρα, οι μικροσωλήνες μεταφέρθηκαν από τους -80°C σε υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης, τύπου falcon και έγινε προσθήκη με αργό ρυθμό προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου DMEM-F12 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (1000rpm για 3min), ώστε να απομακρυνθεί το διμεθυλοσουλφοξίδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) από τα κύτταρα. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα.

2.3. Κατεργασία των ΛΜΚ με παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό τους

Αρχικά, τα κύτταρα που βρισκόταν σε καλλιέργεια, πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1xPBS και στη συνέχεια επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 100U/ml πενικιλίνη και 100g/ml στρεπτομυκίνη) στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Η στέρηση του ορού είχε ως στόχο τον κατά το δυνατό συγχρονισμό των κυττάρων, καθώς απουσία ορού τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται, παραμένουν όμως ζωντανά και διατηρούν τη δυναμική να αρχίσουν ξανά να διαιρούνται όταν δεχτούν το κατάλληλο ερέθισμα. Για τη μελέτη της πιθανής μιτογόνου δράσης του ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων τιotropίου, τα ΛΜΚ επώαστηκαν για 4 ή 48 ώρες με τιοτρόπιο σε συγκεντρώσεις 1-30nM (ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος). Τα πειράματα έγιναν παρουσία ή απουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD98059 (100μM) ή αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM). Πριν την επώαση των κυττάρων με τους παραπάνω αναστολείς, προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με LY294002 και 1 ώρα με PD98059. Ως ομάδα ελέγχου (αρνητικό control) θεωρήθηκαν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία μουσκαρινικού ανταγωνιστή. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η ικανότητα των ΛΜΚ να πολλαπλασιάζονται (θετικό control).

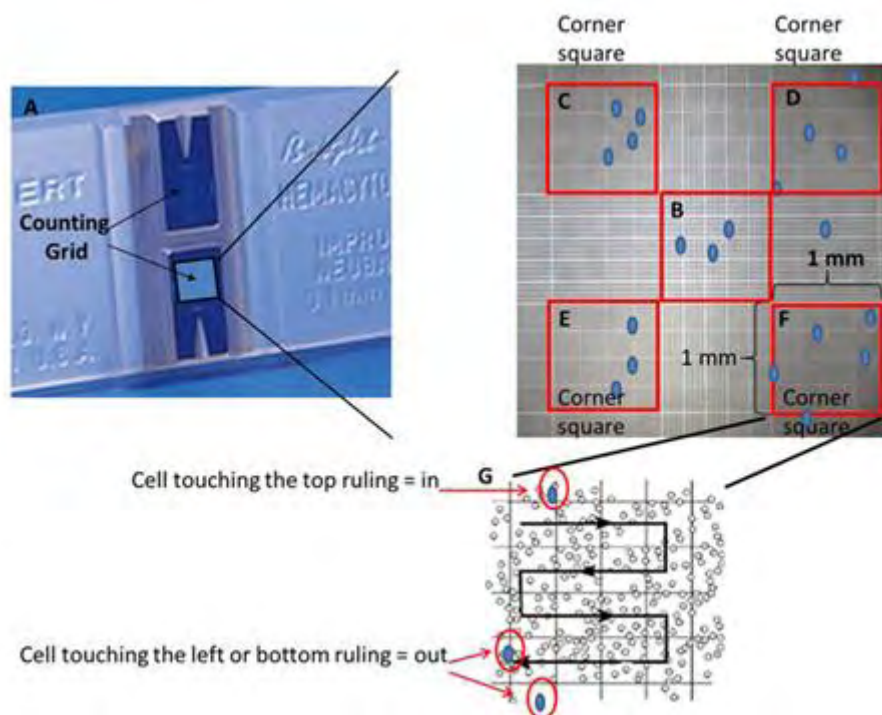
2.3.1. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με χρήση αιμοκυτταρόμετρου μετά από χρώση με χρωστική Trypan blue

Με χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer, Εικόνα 15) μετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα. Τα νεκρά απορροφούν τη χρωστική, καθώς αυτή μπορεί και διαπερνά τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες και χρωματίζει τα κύτταρα κυανά και έτσι διαχωρίζονται από τα ζωντανά.

Στη συνέχεια, έγινε αναγωγή σε αριθμό κυττάρων ανά ml κυτταρικού αιωρήματος, χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\frac{a}{8} \times 5 \times 10^4$$

όπου *a* ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε 8 τετράγωνα της πλάκας.



Εικόνα 15: Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer). Τροποποιημένη από: <https://bitesizebio.com>, (20/8/2020)

2.4. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm μέχρι που τα κύτταρα να καλύπτουν το 50 με 60% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με διάλυμα 1xPBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 1xPBS-3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα πλύση με διάλυμα 1xPBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα 1xPBS-1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4⁰C, έτσι ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές. Έπειτα, οι μη ειδικές θέσεις στις οποίες θα μπορούσε να συνδεθεί το αντίσωμα δεσμεύτηκαν από διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα ή για ολόκληρη τη νύχτα στους 40⁰C. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween-1% BSA, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1xPBS 0.1% Tween-1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με την φθορίζουσα ουσία σε διάλυμα 1xPBS-0.1%-Tween-1%BSA, για 30 λεπτά στους 40⁰C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε πάλι με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1xPBS-0.1% Tween-1% BSA. Στη συνέχεια η κάθε καλυπτρίδα εμβαπτίστηκε στιγμιαία σε H₂O και αφού απομακρύνθηκε το νερό τοποθετήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες είχαν στην επιφάνειά τους 2μl Vectashield (Vector laboratories) που περιείχε χρωστική DAPI για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Ακολούθησε σφράγιση των καλυπτρίδων με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα

παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA) και φωτογράφιση του παρασκευάσματος με ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό

Πρωτεΐνη	Αντίσωμα (Sigma)	Δραίωση
Μυοσίνη λείου μυός (MHC)	anti-myosin (smooth) clone HSM-V mouse monoclonal antibody	1:1000
α-ακτίνη λείου μυός (α-actin)	anti-smooth muscle α -actin mouse monoclonal antibody (Sigma)	1:1000

2.5. Στατιστική ανάλυση

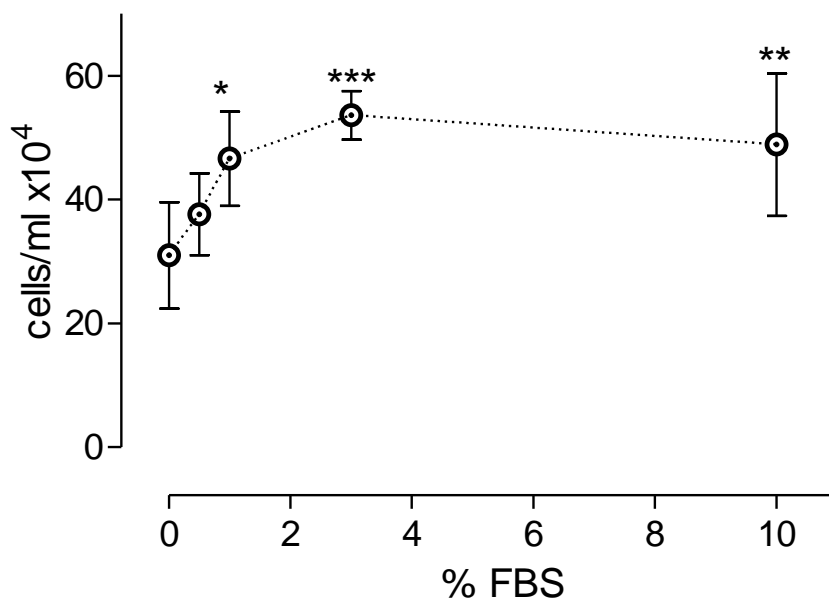
Σε κάθε πείραμα μελέτης του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ, κάθε συνθήκη επαναλήφθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Οι διαφορές μεταξύ των μέσων αναλύθηκαν με one-way ANOVA που ακολουθείται από τη δοκιμασία Bonferonni ή με Unpaired t test. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το $P < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Η επίδραση του ορού στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

Η επώαση των ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού για 48h με ορό (FBS) σε συγκεντρώσεις 0.5-10% είχε ως αποτέλεσμα την δόσοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, όπως αυτός εκτιμήθηκε με τη χρώση Trypan Blue (Διάγραμμα 1). Ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) από τη συγκέντρωση 1% του ορού και έφτασε στο μέγιστο επίπεδο από τη συγκέντρωση 3% ορού. Ειδικότερα, ο αριθμός των κυττάρων παρουσία 0.5%, 1%, 3% και 10% FBS ήταν 376000 ± 29700 , 466200 ± 34000 , 536200 ± 17500 και 488700 ± 41500 κύτταρα αντίστοιχα. Ο αριθμός των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 48h ήταν 310000 ± 38400 κύτταρα.

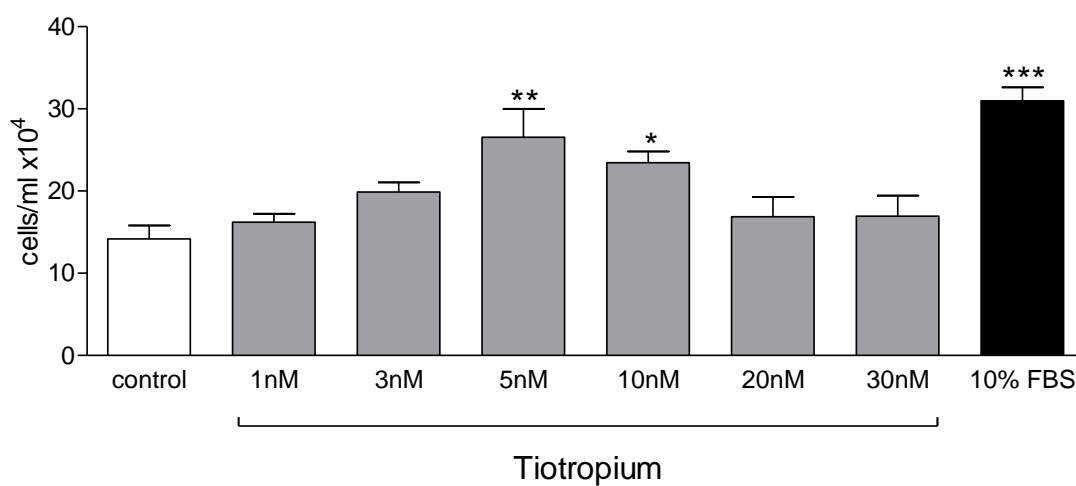


Διάγραμμα 1: Πολυπλοκασμός ΛΜΚ παρουσία 0.5-10% ορού (FBS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM από 5 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με τον αριθμό των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία FBS (αρνητικό control).

3.2. Η επίδραση του τιτροπιού στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν για 48h παρουσία μόνο του μουσκαρινικού ανταγωνιστή τιτροπιού σε συγκεντρώσεις: 1nM, 3nM, 5nM, 10nM, 20nM ή 30nM. Μετά τις 48 ώρες, με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) μετρήθηκαν τα ζωντανά ΛΜΚ κύτταρα.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το τιotropίο σε συγκεντρώσεις 1-10nM αυξάνει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο τον αριθμό των ΛΜΚ, με μέγιστη επίδραση στη συγκέντρωση των 5nM (Διάγραμμα 2). Ειδικότερα, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με 5nM ή 10nM τιotropίο ο αριθμός τους αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0.05$) από 141900 ± 36500 (αριθμός κυττάρων που επώαστηκαν για 48 ώρες απουσία ορού και τιotropίου, αρνητικό control), σε 265600 ± 77500 και 234400 ± 30600 αντίστοιχα. Αντίθετα, παρουσία 20nM ή 30nM τιotropίου, ο αριθμός των ΛΜΚ δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (Διάγραμμα 2).

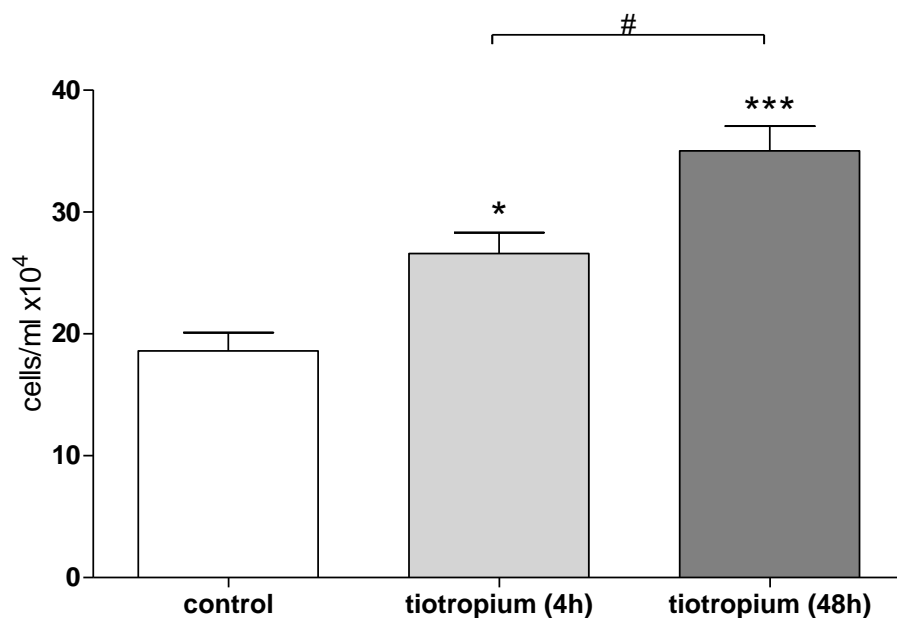


Διάγραμμα 2: Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ παρουσία τιotropίου (1-30nM). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM από 5 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control, δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία FBS και τιotropίου.

ΛΜΚ επώαστηκαν με 5nM τιotropίο, απουσία ορού, για 4 ώρες και στη συνέχεια το φάρμακο απομακρύνθηκε και ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε μετά από 48 ώρες. Παράλληλα ΛΜΚ επώαστηκαν απουσία ορού με 5nM τιotropίο για 48 ώρες, οπότε και μετρήθηκαν τα κύτταρα. Η συγκέντρωση αυτή του τιotropίου επιλέχθηκε καθώς τα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι στη συγκέντρωση αυτή τα ΛΜΚ εμφανίζουν τον μέγιστο επαγόμενο από το τιotropίο πολλαπλασιασμό (Διάγραμμα 2). Στόχος των πειραμάτων ήταν να διερευνηθεί εάν η μιτογόνος δράση του τιotropίου επιτυγχάνεται μέσω των M_2 ή/και των M_3 μουσκαρινικών υποδοχέων, βασισμένοι στο χρόνο σύνδεσης (χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$) του τιotropίου στους M_2 και M_3 υποδοχείς που είναι ~4 ώρες και ~35 ώρες, για τον M_2 και M_3 υποδοχέα αντίστοιχα [88].

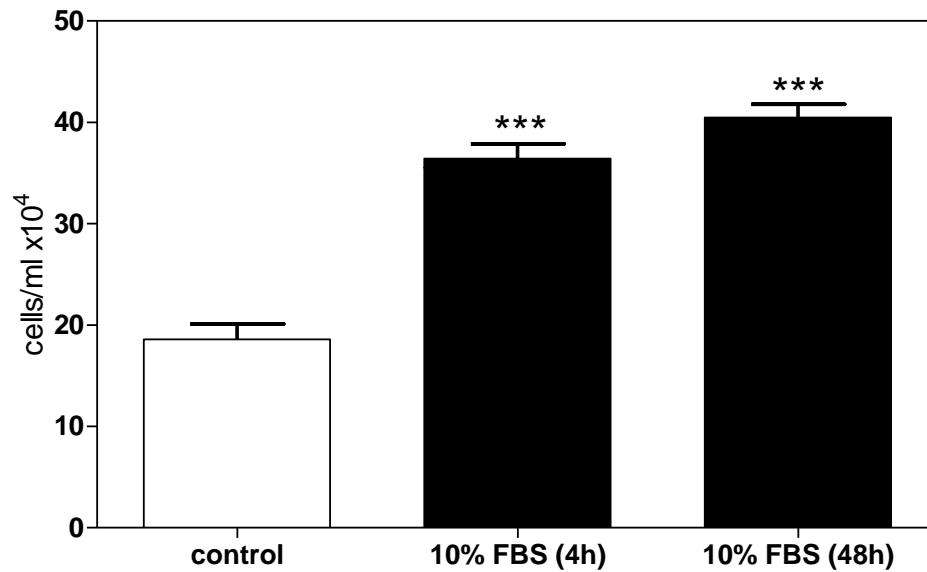
Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι, η επώαση των ΛΜΚ με 5nM τιotropίο τόσο για 4, όσο και για 48 ώρες προκαλεί πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Διάγραμμα 3). Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός

των ΛΜΚ υπολογίστηκε 265900 ± 17200 και 350000 ± 20300 για τις 4 και τις 48 ώρες επώασης αντίστοιχα, έναντι του 185900 ± 15100 που αντιστοιχεί στο αρνητικό control. Εντούτοις, ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος ($p < 0.05$) όταν τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία τιτροπίου για 48 ώρες σε σύγκριση με τον αριθμό των ΛΜΚ που επώαστηκαν με τιτροπίο για 4 ώρες (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 3: Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ παρουσία 5nM τιτροπίου για 4 ή 48 ώρες στο υλικό της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$ και *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control και # $p < 0.05$ σε σύγκριση μεταξύ αριθμού κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία αγωνιστή για 4 ή 48 ώρες.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η διαφορά της δράσης του τιτροπίου στα ΛΜΚ σε σχέση με το χρόνο επίδρασης του φαρμάκου στα κύτταρα οφείλεται στη σύνδεση του φαρμάκου στους M_2 ή M_3 υποδοχείς ή αποτελεί μη ειδική δράση, ανεξάρτητη του μιτογόνου ερεθίσματος. Για το λόγο αυτό τα ΛΜΚ επώαστηκαν παρουσία 10% FBS, για 4 ή 48 ώρες (Διάγραμμα 4). Ο αριθμός των κυττάρων εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά αυξημένος ($p < 0.001$) τόσο στη περίπτωση όπου τα κύτταρα επώαστηκαν με ορό για 4 ώρες, όσο και σε εκείνη που επώαστηκαν για 48 ώρες. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε ως 364100 ± 14700 και 404700 ± 13000 για τις 4 και τις 48 ώρες αντίστοιχα, έναντι του 185900 ± 15100 που βρέθηκε στη περίπτωση του αρνητικού control, δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς ορό (Διάγραμμα 4).

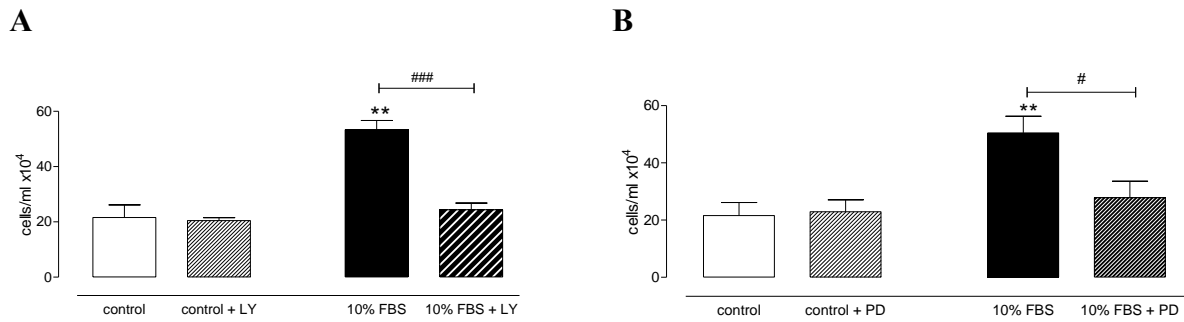


Διάγραμμα 4: Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ παρουσία 10% FBS για 4 ή 48 ώρες στο υλικό της καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$ και *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control.

3.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην μιτογόνο δράση του τιτροπίου

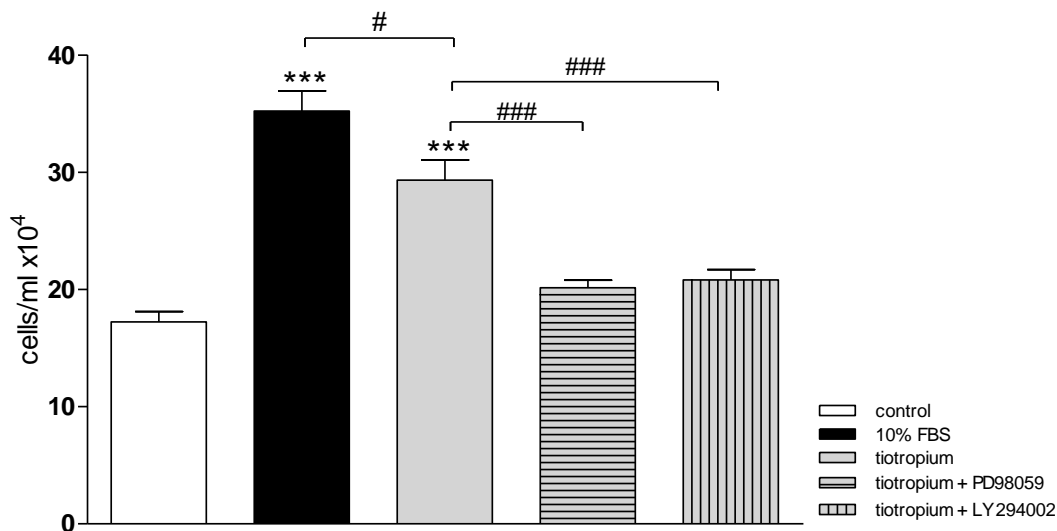
Με σκοπό να διερευνηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μιτογόνο δράση του τιτροπίου, ΛΜΚ κύτταρα επώαστηκαν με τιτροπίο συγκέντρωσης 5nM, παρουσία και απουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 ή του αναστολέα του μονοπατιού των MAP κινασών PD98059.

Αρχικά εξετάστηκε αν οι αναστολείς έχουν κυτταροτοξική δράση και αν στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ που επάγεται από τον ορό. Τόσο το LY294002 (Διάγραμμα 5A) σε συγκέντρωση 20μM, όσο και το PD98059 σε συγκέντρωση 100μM (Διάγραμμα 5B), δεν επηρεάζουν τον αριθμό των ΛΜΚ που καλλιεργούνται απουσία ορού ενώ αντίθετα αναστέλλουν πλήρως τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ που επάγεται από τον ορό (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Η επίδραση του LY294002 (A) και PD98059 (B) στον αριθμό των ΛΜΚ που καλλιεργούνται απουσία (control) ή παρουσία ορού (10% FBS). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. $**p < 0.01$ σε σύγκριση με το αρνητικό control. $\#p < 0.05$ και $###p < 0.001$ σε σύγκριση με την επίδραση του 10% FBS.

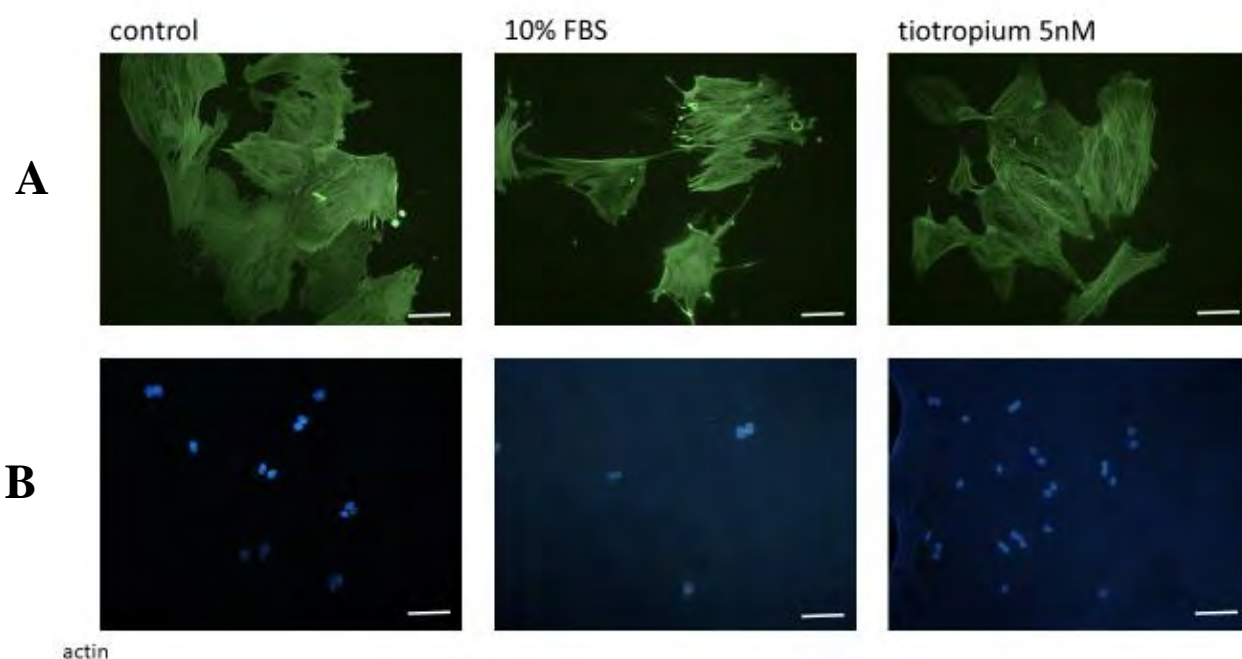
Το LY294002 όσο και το PD98059 αναστέλλουν την μιτογόνο δράση του τιτροπίου σε συγκέντρωση 5nM (Διάγραμμα 6). Αναλυτικότερα, ο αριθμός των ΛΜΚ ήταν 293300 ± 17000 για τα κύτταρα που επώαστηκαν με τιτροπίο 5nM και 201300 ± 6600 και 208000 ± 8900 για τα ΛΜΚ που επώαστηκαν με PD98059 ή LY294002 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6: Η επίδραση του PD98059 και LY294002 στον επαγόμενο από 5nM τιτροπίο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 7 ανεξάρτητα πειράματα. $***p < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control. $\#p < 0.05$ και $###p < 0.001$ σε σύγκριση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία τιτροπίου και 10% FBS ή PD98059 ή LY294002.

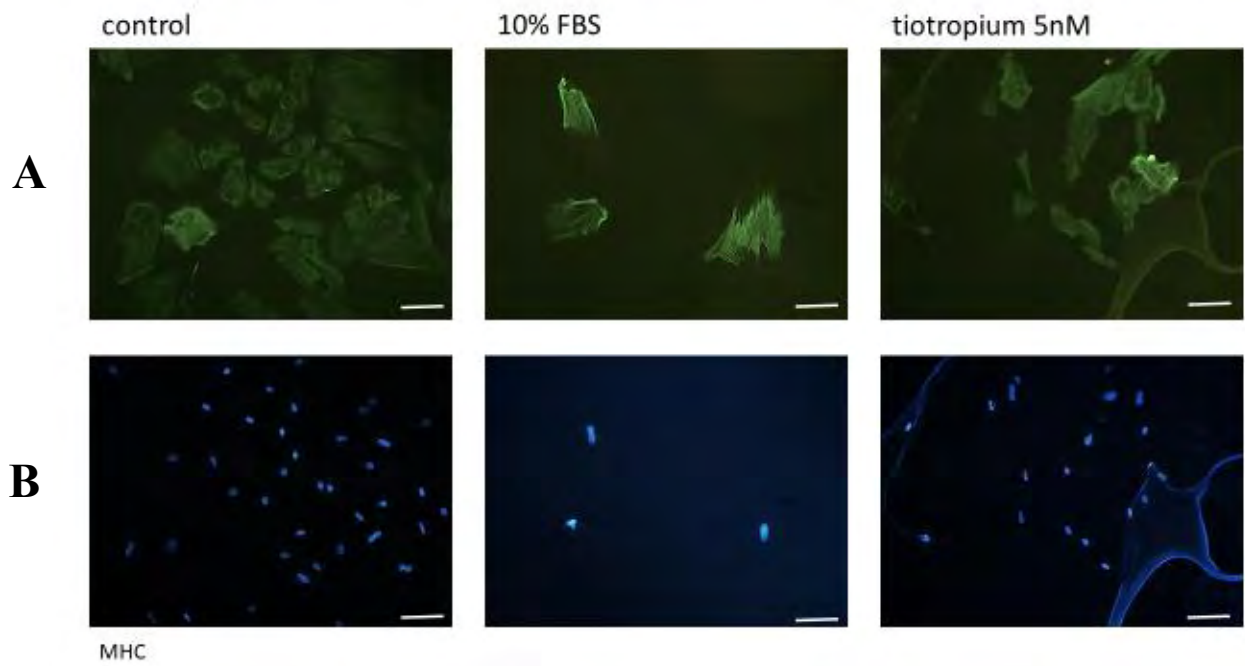
3.4. Η επίδραση του τιotropίου στον φαινότυπο των ΛΜΚ

Με τη τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού, εξετάστηκε η επίδραση του τιotropίου 5nM στη μορφολογία των ΛΜΚ. Αρχικά, έγινε χρήση του αντισώματος για την α-ακτίνη του λείου μυός, ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την MHC καθώς και χρωστική DAPI για την χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Η α-ακτίνη και η MHC είναι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε αφθονία στο συστατικό φαινότυπο των ΛΜΚ, του οποίου η κύρια λειτουργία είναι η σύσπαση. Όταν τα κύτταρα μεταπίπτουν στο συνθετικό φαινότυπο οι πρωτεΐνες αυτές μειώνονται [6]. Κύτταρα control θεωρήθηκαν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού.



Εικόνα 16: A. Έκφραση ακτίνης σε ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν απουσία (control) ή παρουσία ορού (10% FBS) ή τιotropίο (5nM). B. Χρώση πυρήνων με DAPI των κυττάρων που παρουσιάζονται στην επάνω σειρά. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 40x).

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι στη περίπτωση των κυττάρων που επώαστηκαν με 10% FBS, η ένταση του σήματος ανοσοφθορισμού δεν άλλαξε ιδιαίτερα σε σχέση με τα κύτταρα control τόσο για την έκφραση της α-ακτίνης (Εικόνα 16A) όσο και για την MHC (Εικόνα 17A). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη περίπτωση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν με τιotropίο συγκέντρωσης 5nM, όπου το σήμα φθορισμού για την α-ακτίνη (Εικόνα 16A) όσο και για την MHC (Εικόνα 17A) έχει περίπου την ίδια ένταση με τα κύτταρα control.



Εικόνα 17: Α. Έκφραση MHC σε ΑΜΚ που καλλιεργήθηκαν απουσία (*control*) ή παρουσία ορού (10% FBS) η τιotropίο (5nM). Β. Χρώση πυρήνων με DAPI των κυττάρων που παρουσιάζονται στην επάνω σειρά. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (*Zeiss Axioskop 40*, σε μεγέθυνση 40x).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το άσθμα και η ΧΑΠ αποτελούν συχνές και σοβαρές χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού παγκοσμίως, με σοβαρή επίπτωση τόσο στην ποιότητα ζωής των ασθενών όσο και στην οικονομία [101]. Οι ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων (αντιχολινεργικά) είναι κοινά φάρμακα που προκαλούν βρογχοδιαστολή και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία κυρίως της ΧΑΠ, αλλά και στο άσθμα [98]. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των νόσων αυτών είναι η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών στους ασθενείς, όπου περιλαμβάνεται, μεταξύ άλλων, η υπερπλασία ή/και υπερτροφία των ΛΜΚ και η αυξημένη χολινεργική διαβίβαση [35,36].

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ορού στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Ο ορός FBS περιέχει ένα μίγμα αυξητικών παραγόντων απαραίτητων για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ έχει βρεθεί πως επάγει την τροποποίηση των ΛΜΚ στο συνθετικό φαινότυπο τους, ικανό για πολλαπλασιασμό [36,38]. Για τον λόγο αυτό, ΛΜΚ επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ορού (0.5-10%) και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η μιτογόνος δράση του ορού στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού είναι στατιστικά σημαντική από την συγκέντρωση 1% και μετά τη συγκέντρωση 3% ορού η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων παρουσία ορού φτάνει σε ένα μέγιστο επίπεδο (Διάγραμμα 1). Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, στα επόμενα πειράματα επιλέχτηκε η συγκέντρωση 10% FBS ως θετική ομάδα ελέγχου (positive control), προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα διέθεταν ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Είναι γνωστό ότι τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη M_2 , M_3 και M_4 μουσκαρινικούς υποδοχείς [43]. Είναι ήδη γνωστή και καλά μελετημένη η μιτογόνος δράση των μουσκαρινικών αγωνιστών στα ΛΜΚ του αναπνευστικού. Η σύνδεση μουσκαρινικών αγωνιστών (π.χ ACh) στους M_2 ή M_3 κυρίως υποδοχείς, οδηγεί στην ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP κινασών και της PI3K, τα οποία οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ [15,28,38]. Η δράση αυτή των μουσκαρινικών αγωνιστών αναστέλλεται από ανταγωνιστές τους όπως το τιοτρόπιο [90,91,92]. Αντιθέτως, η πιθανή μιτογόνος δράση των ανταγωνιστών των μουσκαρινικών υποδοχέων, απουσία αγωνιστή, είναι ένα φαινόμενο που ακόμα μελετάται. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το τιοτρόπιο, ένα κλινικά χρησιμοποιούμενο φάρμακο για τη ΧΑΠ και το άσθμα και κλασσικός ανταγωνιστής των M_2/M_3 μουσκαρινικών υποδοχέων [97]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, το τιοτρόπιο, απουσία αγωνιστή, είναι ικανό να προκαλέσει δόσοεξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ σε μικρές συγκεντρώσεις 1-10nM (Διάγραμμα 2), ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (20nM ή 30nM) δεν επηρεάζει τον αριθμό των ΛΜΚ. Η

μιτογόνος αυτή δράση του τιτροπίου στα ΛΜΚ του αναπνευστικού, απουσία αγωνιστή, επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAPK (Διάγραμμα 6) και συμφωνεί με ευρήματα προηγούμενων μελετών σε ΛΜΚ αναπνευστικού κουνελιού ή αρουραίου [84,102]. Καθώς η μιτογόνος δράση του τιτροπίου είναι δοσοεξαρτώμενη και εμφανίζεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις 1-10nM, συνηγορεί ότι η δράση αυτή μάλλον μεσολαβείται μέσω M_2 ή/και M_3 υποδοχέων με τους οποίους εμφανίζει ίδια υψηλή χημική συγγένεια (dissociation constant 0.1 to 0.3 nM) ενώ για άλλους τύπους υποδοχέων (π.χ. ισταμίνης ή αδρενεργικούς) η χημική συγγένεια του τιτροπίου είναι χαμηλή [90].

Στην παρούσα μελέτη δεν έχει διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο το τιτροπίο προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ του αναπνευστικού. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, δύο πιθανές ερμηνείες για τη δράση αυτή του τιτροπίου προκύπτουν: α) Οι υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες φαίνεται να είναι ενεργοί ακόμα και απουσία αγωνιστή και να οδηγούν σε παραγωγή ενδοκυττάρων μηνυμάτων [85,86]. Η σύνδεση κατά συνέπεια ενός ανταγωνιστή στους υποδοχείς αυτούς μπορεί να προκαλεί μεταβολή σε δευτερογενή μηνύματα που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Κάτι τέτοιο έχει δειχθεί για άλλους μουσκαρινικούς ανταγωνιστές, όπως την ατροπίνη [103] ή την γαλαμίνη [80]. β) Η σύνδεση ανταγωνιστών στην αλλοστερική θέση ενός υποδοχέα μπορεί να «μιμηθεί» τη δράση αγωνιστή καθώς η αλλοστερική και ορθοστερική θέση αλληλοεπιδρούν [80,104,105]. Μέχρι πρόσφατα το τιτροπίο θεωρούνταν ένας κλασικός ανταγωνιστής της ορθοστερικής θέσης των μουσκαρινικών υποδοχέων. Εντούτοις πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν και μια δεύτερη θέση σύνδεσης του τιτροπίου στον M_3 υποδοχέα και τη δράση του ως αλλοστερικό τροποποιητή [94,95] όπως η γαλαμίνη [80].

Η μιτογόνος δράση του τιτροπίου στα ΛΜΚ, παρουσιάζεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις του τιτροπίου (1-10nM), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20nM και 30nM) το τιτροπίο δεν επηρεάζει τον αριθμό των ΛΜΚ (Διάγραμμα 1). Καθώς το τιτροπίο έχει παρόμοια χημική συγγένεια για τους υποδοχείς M_2 και M_3 , η διαφορετική αυτή δράση του δεν μπορεί να αποδοθεί στην διαφορετική επίδραση στους M_2 και M_3 υποδοχείς [88]. Σε πρόσφατη μελέτη των Stamatiou et.al σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού μια παρόμοια δράση εμφανίζει και η ατροπίνη [84]. Μια διπλή επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ του αναπνευστικού εμφανίζουν και οι αγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων [102]. Αν και ο μηχανισμός της διπλής αυτής επίδρασης δεν έχει διερευνηθεί, εντούτοις η ενεργοποίηση μουσκαρινικών υποδοχέων που συνδέονται με G_q πρωτεΐνες (M_1 και M_3) έχει αποτέλεσμα τόσο τη μιτογόνο δράση στα ΛΜΚ μέσω PI3K, αλλά και παράλληλη ενεργοποίηση της PKC και της GSK3 που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό [70].

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μιτογόνο δράση του τιτροπίου. Το τιτροπίο (5nM) δρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK

κινασών ή/και της PI3K, στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ καθώς η ταυτόχρονη παρουσία των αναστολέων των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών LY294002 ή PD89005 αντίστοιχα ανέστειλαν την μιτογόνο δράση του (Διάγραμμα 5). Τα μονοπάτια αυτά επάγουν τη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων, που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε αντιγραφή του DNA του και μιτωτικό διπλασιασμό [28]. Φαίνεται λοιπόν ότι το τιτροπίο, όπως και οι μουσκαρινικοί αγωνιστές ή 10% FBS (Διάγραμμα 6), ενεργοποιεί παρόμοια μονοπάτια μεταγωγής σήματος [44]. Η αναστολή ενός μόνο σηματοδοτικού μονοπατιού, της PI3K ή των MAPK, είναι αρκετή για να αναστείλει πλήρως τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ που επάγεται είτε από τον ορό, είτε από το τιτροπίο, γεγονός που υποδεικνύει ότι στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τουλάχιστον από τους δύο αυτούς μιτογόνους παράγοντες αφενός μεν η ενεργοποίηση του ενός σηματοδοτικού μονοπατιού οδηγεί και στην ενεργοποίηση του άλλου, αφ' εταίρου απαιτείται η ενεργοποίηση και των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Το τιτροπίο μπορεί να συνδεθεί εξίσου στους M₂ και M₃ υποδοχείς σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, θεωρείται όμως ανταγωνιστής των M₃ μουσκαρινικών υποδοχέων, καθώς η αποδέσμευσή του είναι 100 φορές πιο αργή απ' ότι στους M₂ μουσκαρινικούς υποδοχείς. Έτσι, το τιτροπίο μπορεί να παραμείνει συνδεδεμένο στους M₃ υποδοχείς για περίπου 36 ώρες, αλλά μόνο για περίπου 4 ώρες στους M₂ υποδοχείς [88]. Με βάση τα δεδομένα αυτά, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η μιτογόνος δράση του τιτροπίου μεσολαβείται μέσω των M₂ ή/και των M₃ υποδοχέων. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που είχαν υποστεί στέρηση ορού για 24 ώρες, επώαστηκαν στη συνέχεια για 4 ή 48 ώρες με τιτροπίο συγκέντρωσης 5nM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα αυξάνονται στατιστικά σημαντικά τόσο στη περίπτωση των 4 ωρών επώασης με τιτροπίο, όσο και στις 48 ώρες επώασης (Διάγραμμα 3). Σε παρόμοιο πείραμα, έγινε επώαση των ΛΜΚ με 10% FBS, ένα άλλο μιτογόνο ερέθισμα, για 4 και 48 ώρες και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων βρέθηκε ήδη στατιστικά αυξημένος από τις 4 ώρες (Διάγραμμα 4). Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι έστω και σύντομη επίδραση (για 4 ώρες) ενός μιτογόνου ερεθίσματος στα ΛΜΚ, όπως είναι ο ορός, είναι αρκετή να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ και κατά συνέπεια δεν μπορούσαμε να βγάλουμε σαφές συμπέρασμα για το αν το τιτροπίο δρα μέσω των M₂ ή μέσω των M₃ υποδοχέων.

Τέλος, μελετήσαμε την επίδραση του τιτροπίου στο φαινότυπο των ΛΜΚ με τη τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα ΛΜΚ υπάρχουν σε δύο διαφορετικούς φαινότυπους, τον 'συσταλτό' και τον 'συνθετικό', και εμφανίζουν διαφορές ως προς το είδος και το πλήθος των υποδοχέων που διαθέτουν [12]. Τα συνθετικά ΛΜΚ εμφανίζονται πεπλατυσμένα με ελαττωμένη έκφραση των συσταλτών πρωτεϊνών α-ακτίνη, MHC και δεσμίνη, καθώς και M₃ υποδοχέων, ενώ έχουν αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα [6,12]. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η επώαση των ΛΜΚ με ορό ή τιτροπίο για 48 ώρες δεν μεταβάλλει την έκφραση των πρωτεϊνών α-ακτίνη

και MHC (Εικόνα 16,17), πιθανόν λόγω της σύντομης έκθεσης των κυττάρων στα μιτογόνα (48 ώρες) ενώ για ανιχνεύσιμη την μεταβολή του φαινοτύπου των ΛΜΚ απαιτείται πιο μακρόχρονη (>3 ημέρες) έκθεση των κυττάρων στο ερέθισμα [15].

Συμπερασματικά, το τιotropio, απουσία αγωνιστή, προκαλεί σε χαμηλές μόνο συγκεντρώσεις (1-10nM) πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών, ενώ η βραχύχρονη (48 ώρες) έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο δεν μεταβάλλει τον κυτταρικό φαινότυπο. Ο ρόλος λοιπόν των αντιχολινεργικών φαρμάκων στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία χρόνιων παθήσεων του αναπνευστικού όπως στη ΧΑΠ και το άσθμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berne RM, Levy MN. Physiology, 7th edition, chapter 3, 2018:280-284.
2. Cunningham, Ταιτζόγλου Ι, Τσανταρλιώτου Μ, Ζερβός Ι, Λαυρεντιάδου Σ. Κτηνιατρική Φυσιολογία, 5η Έκδοση, Εκδόσεις Ροτόντα, 2018:118-120.
3. James A, Carroll N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J.* 2000 Apr;15(4):782-9.
4. Halayko, AJ, Amrani Y, "Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma." *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 March 20; 137(2-3):209-222.
5. Black JL, Panettieri RA, Banerjee Jr, Berger, P. Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation? *Clin Chest Med.* 2012 September;33(3): 543–558.
6. Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Jan 1;5(1):80-8.
7. Tran, T, Ens-Blackie, K, Rector ES, Stelmack, GL, McNeill KD, Tarone G, Gerthoffer WT, Unruh H, and Halayko AJ. Laminin-binding integrin alpha7 is required for contractile phenotype expression by human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Dec; 37(6): 668–680.
8. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Oct;22(5):370-8.
9. Gosens R, Meurs H, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Nelemans SA, Zaagsma J. Functional characterization of serum and growth factor induced phenotypic changes in intact bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2002 Oct; 137(4): 459–466.
10. Wright DB, Trian T, Siddiqui S, Pascoe CD, Johnson JR, Dekkers BGJ, Bagchi R, Burgess JK, Kanabar V, Ojo OO. Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013 Feb;26(1):42-9.
11. Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME et al. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1):197-206.
12. Hirst SJ, Walker TR, Chilvers ER. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation asthma. *Eur Respir J.* 2000 March;16: 159-177.
13. Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Dec;7(6):574-81.

14. Gosens R, Nelemans SA, GrootteBromhaar MM, McKay S, Zaagsma J, Meurs H. Muscarinic M3-receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Feb;28(2):257-62.
15. Stamatiou R, Paraskeva E, Vasilaki A, et al. Long-term exposure to muscarinic agonists decreases expression of contractile proteins and responsiveness of rabbit tracheal smooth muscle cells. *BMC Pulm Med.* 2014 Mar 10; 14:39.
16. Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA Jr, Penn RB. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Oct;23(4):546-54.
17. Ediger TL, Schulte NA, Murphy TJ, Toews ML. Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2003 May;21(5):759-69.
18. Gosens R, Roscioni SS, Dekkers BG, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 13;585(2-3):385-97.
19. Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, Chiu CT, Hsiao LD, Yang CM. Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/ MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2002 Mar;14(3):265-75.
20. Gosens R, Dueck G, Rector E, Nunes RO, Gerthoffer WT, Unruh H, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Cooperative regulation of GSK-3 by muscarinic and PDGF receptors is associated with airway myocyte proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Nov;293(5):1348-58.
21. Stamatiou R, Paraskeva E, Gourgoulialis K, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A. Cytokines and growth factors promote airway smooth muscle cell proliferation. *ISRN Inflamm.* 2012 Jul 8;731472.
22. Krymskaya VP, Goncharova EA, Ammit AJ, Lim PN, Goncharov DA, Eszterhas A, Panettieri Jr RA. Src is necessary and sufficient for human airway smooth muscle cell proliferation and migration. *FASEB J.* 2004 Dec 20;428-430.
23. Abell K, Watson CJ. The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity. *Cell Cycle.* 2005 Jul;4(7):897-900.
24. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999 Aug 13;285(5430):1028-32.
25. Wang ZL, Walker BA, Weir TD, Yarema MC, Roberts CR, Okazawa M, Pare PD, Bai TR. Effect of chronic antigen and beta 2 agonist exposure on airway remodeling in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Dec;152(6 Pt 1):2097-104.

26. Krymskaya VP, Ammit AJ, Hoffman RK, Eszterhas AJ, Panettieri Jr. RA. Activation of class IA PI3K stimulates DNA synthesis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 May;280(5):1009-18.
27. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):673-6.
28. Zhou L, Hershenson MB. Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Sep 16;137(2-3):295-308.
29. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001 Apr;22(2):153-83.
30. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B et al. MAP kinases. *Chem Rev*. 2001 Aug;101(8):2449-76.
31. Kelleher MD, Abe MK, Chao TS, Jain M, Green JM, Solway J, Rosner MR, Hershenson M.B. Role of MAP kinase activation in bovine tracheal smooth muscle mitogenesis. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):894-901.
32. Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science*. 2002 Jun 28;296(5577):2345-7.
33. Chen YR, Tan TH. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. *Int J Oncol*. 2000 Apr;16(4):651-62.
34. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995 Mar 31;270(13):7420-6.
35. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New concept in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 May 1;5(4):478-85.
36. Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Jan 1; 5(1): 89–96.
37. Gosens R, Zaagsma J, Bromhaar MG, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodeling? *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1-3):193-201.
38. Hirst SJ (1996). Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J*. 1996 Apr;9(4):808-20.
39. McKay S, Sharma HS. Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir Res*. 2002;3(1):11.

40. Karpova AY, Abe MK, Li J, Liu PT, Rhee JM, Kuo WL et al. MEK1 is required for PDGF-induced ERK activation and DNA synthesis in tracheal myocytes. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 1):558-65.
41. Krymskaya VP, Penn RB, Ossini MJ, Scott PH, Plevin RJ, Walker TR et al. Phosphatidylinositol 3 -kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol.* 1999 Jul;277(1):65-78.
42. Walker F, Kato A, Gonez LJ, Hibbs ML, Pouliot N, Levitzki A. et al. Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7192-204.
43. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Nov 15;164(10 Pt 2): S28-38.
44. Stewart AG, Bonacci JV, Chan V, Quan L. Factors controlling airway smooth muscle proliferation in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004 Mar;4(2):109-15.
45. Hirst SJ. Regulation of airway smooth muscle cell immunomodulatory function: role in asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 Sep 16;137(2-3):309-26.
46. Vignola A, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V et al. Airway remodelling in asthma. *Chest.* 2003 Mar;123(3 Suppl):417S-22S.
47. Rennard S. Repair mechanisms in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Dec;98(6 Pt 2):278-86.
48. Barnes PJ. Autonomic Control of the Lower Airways. *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)* 2012 41. 201–204.
49. Canning, Fischer A. Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol.* 2001 Mar;125(1-2):113-27.
50. Racke K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004 March;17(4):181-98.
51. Mang CF, Kilbinger H. Modulation of acetylcholine release in the guinea-pig trachea by the nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP). *Br J Pharmacol.* 2000 Sep;131(1):94-8.
52. D'Agostino G, Erbeling D, Kilbinger H. Tachykinin NK2 receptors facilitate acetylcholine release from guinea-pig isolated trachea. *Eur J Pharmacol.* 2000 May 12;396(1):29-32.
53. Barnes PJ. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2004 Dec 20;117 Suppl 12A:24S-32S.
54. Kolahian S, Gosens R. Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. *J Allergy (Cairo).* 2012 Jan;16(6):81258.

55. Nathanson NM. Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2004, volume 2: 775-777
56. Caulfield MP and Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998 Jun;50(2):279-90.
57. Barnes PJ. Muscarinic receptors subtypes in airways. *Life Sci.* 1989 Mar; 44(3): 161–167.
58. Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther.* 2003 Apr;98(1):59-69.
59. Hirshman CA, Lande B, Croxton TL. Role of M2 muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction. *Life Sci.* 1999;64(6-7):443-8.
60. Roffel AF, Meurs H, Zaagsma J. Identification, localization and function of muscarinic receptor subtypes in the airways. In *Muscarinic Receptors in Airways Diseases*. Volume 2001:63-87.
61. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 2006 May 9;7(1):73.
62. Amrani Y, Panettieri RA. Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Mar;35(3):272-6.
63. Gosens R, Grootte Bromhaar MM, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, Meur H. Muscarinic M3 receptor-dependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype. *Br J Pharmacol.* 2004 Mar; 141(6): 943–950.
64. Meurs H, Roffel AF, Elzinga CR, Zaagsma J. Muscarinic receptor betaadrenoceptor cross-talk in airways smooth muscle. *Muscarinic Receptors in Airways Diseases* 2001: 121– 157.
65. Gosens R, Nelemans SA, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Zaagsma S, Meurs H. Muscarinic M3 receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Feb;28(2):257-62.
66. Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racké K. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Dec;35(6):621-7.
67. Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE. Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide. *Life Sci.* 2007 May 30;80(24-25):2270-3.
68. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Aug;114(2 Suppl):2-17.
69. Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA Jr et al. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled

- receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Oct;23(4):546-54.
70. William T. Gerthoffer, Schaafsma D, Sharma P, Ghavami S, Halayko AJ. Motility, Survival, and Proliferation. *Compr Physiol*. 2012 Jan; 2(1): 255–281.
 71. Pelaia G et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. *Respir Med*. 2008 Aug;102(8):1173-81.
 72. Page K, Hershenson MB. Mitogen-activated signaling and cell cycle regulation in airway smooth muscle. *Front Biosci*. 2000 Feb 1;5: 258-67.
 73. David C New and Yung H Wong. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*. 2007 Feb 26;(2):2.
 74. De Amici M, Dallanocce C, Holzgrabe U, Trankle C, Mohr K. Allosteric Ligands for G Protein-Coupled Receptors: A Novel Strategy with Attractive Therapeutic Opportunities. *Med Res Rev*. 2010 May;30(3):463-549.
 75. Karen JG, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2007 Sep; 5(3): 157–167.
 76. Lullmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, Wassermann O. Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur. J. Pharmacol*. 1969 June; 6:241–247.
 77. Christopoulos A, May LT, Avlani VA, Sexton PM. G-protein-coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). *Biochem Soc Trans*. 2004 Nov;32(Pt 5):873-7.
 78. Lee NH, El-Fakahany EE. Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemical Pharmacology*. 1991 July;5 42(2):199-205.
 79. Caulfield MP and Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*. 1998 Jun;50(2):279-90.
 80. Jakubík J, Bacáková L, Lisá V, El-Fakharany EE, Tucek S. Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6; 93(16): 8705–8709.
 81. May LT, Lin Y, Sexton PM, Christopoulos A. Regulation of M2 muscarinic acetylcholine receptor expression and signaling by prolonged exposure to allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Jan;312(1):382-90.
 82. Wang L, Martin B, Brenneman R, Luttrell LM, Maudsley S. Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Receptors: Future Therapeutics for Complex Physiological Disorders. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Nov; 331(2): 340–348.

83. Wessel AC Burger, Sexton PM, Christopoulos A, Thal DM. J Toward an understanding of the structural basis of allostery in muscarinic acetylcholine receptors. *Gen Physiol*. 2018 Oct 1; 150(10): 1360–1372.
84. Stamatiou R, Paraskeva E, Vasilaki A, Hatziefthimiou A. The muscarinic antagonist gallamine induces proliferation of airway smooth muscle cells regardless of the cell phenotype. *Pharmacol Rep*. 2019 Apr;71(2):225-232.
85. De Ligt RA, Kourounakis AP, IJzerman AP. Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2000 May; 130(1): 1–12.
86. Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadée W, Mohr K. Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 May;301(2):720-8.
87. Hvizdos KM, Goak L. Tiotropium bromide. *Drugs*. 2002;62(8):1195-203
88. Barnes PJ, Belvisi MG, Mak JCW. Tiotropium bromide (Ba679BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease. *Life Sci*. 1995;56(11-12):853-9.
89. Barnes PJ. The pharmacological properties of tiotropium. *Chest*. 2000 Feb;117(2 Suppl):63S-6S.
90. Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek T, Hammer R. Tiotropium (spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sci*. 1999;64(6-7):457-64.
91. Gosens R, Bos S, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 May 15;171(10):1096-102.
92. Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE. Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide. *Life Sci*. 2007 May 30;80(24-25):2270-3.
93. Kume H, Hiroaki I, Takaaki T, Yuji T. Synergistic effects by combination of tiotropium with olodaterol result from cross talk between muscarinic and β 2-adrenergic receptors via allosteric modulation. *European Respiratory Journal*. 2016 Nov;8 48:(60 Suppl)1399-3003.
94. Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond Kobilka BK. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2012 Feb 22;482(7386):552-6.

95. Kistemaker LEM, Elzinga CRS, Tautermann CS, Pieper MP, Seeliger D, Alikhil S, Schmidt M, Meurs H, Gosens R. Second M3 muscarinic receptor binding site contributes to bronchoprotection by tiotropium. *Br J Pharmacol*. 2019 Aug;176(16):2864-2876.
96. Jakubik J, Esam E, El-Fakahany EE. Current Advances in Allosteric Modulation of Muscarinic Receptors. *Biomolecules*. 2020 Feb; 10(2): 325.
97. Keam SJ, Keating GM. Tiotropium bromide. A review of its use as maintenance therapy in patients with COPD. *Treat Respir Med*. 2004;3(4):247-68.
98. Soler X, Ramsdell J. Anticholinergics/Antimuscarinic Drugs in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Dec;14(12):484.
99. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):41-54.
100. Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem*. 2005 Oct 20;48(21):6523-43.
101. Berger WE, Cline DC. Asthma and COPD: definitions, epidemiology, and treatment guidelines. *Postgrad Med*. 2005 Dec;118(6 Suppl Acute):2-8.
102. Placeres-Uray FA, Febres-Aldana CA, Fernandez-Ruiz R, Gonzalez de Alfonzo R, Lippo de Becemberg IA, Alfonzo MJ. M2 Muscarinic acetylcholine receptor modulates rat airway smooth muscle cell proliferation. *World Allergy Organ J*. 2013 Dec 30;6(1):22.
103. Guerra de González L, González de Alfonzo R, Lippo de Bécemberg I, Alfonzo MJ. Cyclic nucleotide-dependent phosphodiesterases (PDEI) inhibition by muscarinic antagonists in bovine tracheal smooth muscle. *Biochem Pharmacol*. 2004 Aug 15;68(4):651-8.
104. Langmead CJ, Fry VA, Forbes IT, Branch CL, Christopoulos A, Wood MD, Herdon HJ. Probing the molecular mechanism of interaction between 4-n-butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the muscarinic M(1) receptor: direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol*. 2006 Jan;69(1):236-46.
105. Placeres-Uray FA, Febres-Aldana CA, Fernandez-Ruiz R, Gonzalez de Alfonzo R, Mitchelson FM, Ziegler A. The effect of gallamine, gallopamil and nifedipine on responses to acetylcholine and carbachol in the taenia of the guinea pig caecum. *Br J Pharmacol*. 1984 Sep; 83(1): 145–155.