



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Μελέτη της επίδρασης του τιτροπίου στα
Λεία Μυϊκά Κύτταρα του αναπνευστικού»

«The effect of tiotropium on airway smooth muscle cells»

Γεωργία Χατζηαντώνη του Ανδρέα

Λάρισα Ιούνιος, 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού οι αεραγωγοί παρουσιάζουν συχνά αναδιαμόρφωση του τοιχώματος τους (remodeling) και αυξημένη χολινεργική διαβίβαση που οδηγούν σε μείωση της διαμέτρου των αεραγωγών, βρογχόσπασμο και δύσπνοια. Στην αντιμετώπιση των παθήσεων αυτών χρησιμοποιούνται αντιχολινεργικά φάρμακα, όπως το τιotropίο. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ανταγωνιστές των μουςκαρινικών υποδοχέων, όπως η γαλλαμίνη και η ατροπίνη, προκαλούν πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ), απουσία αγωνιστή, μέσω των μονοπατιών των PI3K και MAPK. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή μιτογόνο δράση του τιotropίου και τα μονοπάτια που μπορεί να εμπλέκονται στη δράση του αυτή.

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS και τιotropίου (5nM, 30nM στα κύτταρα κουνελιού και 5nM, 10nM στα κύτταρα ανθρώπου). Ο επαγόμενος από το τιotropίο πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκε με την μέθοδο MTT και Trypan Blue. Η έκφραση των p38, p42/44 και κυκλίνης D1 έγινε μετά από επώαση των κυττάρων με τιotropίο για 4h και με ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot Blot).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι ο ορός (10%) προκαλεί πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου και αυξάνει την έκφραση των MAPK (p38 και ERK-p44/42), επάγοντας την έκφραση κυκλίνης D1. Στα ΛΜΚ του ανθρώπου, το τιotropίο (10nM) επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ και επάγει την έκφραση της MAPK-p38. Παρόμοια και στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, το τιotropίο έχει μιτογόνο δράση μόνο στην συγκέντρωση 5nM ενώ σε υψηλότερη συγκέντρωση (30nM) δεν έχει καμία επίδραση. Επίσης, στα κύτταρα αυτά το τιotropίο (5nM ή 30nM) επάγει την έκφραση της MAPK-p44/42 και της κυκλίνης D1, χωρίς επίδραση στα επίπεδα της MAPK-p38.

Συμπερασματικά, το τιotropίο σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει μιτογόνο δράση σε ΛΜΚ ανθρώπου και κουνελιού. Η δράση του αυτή, εν μέρει μεσολαβείται μέσω MAPK. Σε υψηλές συγκεντρώσεις το τιotropίο επάγει τις MAPK και την κυκλίνη D1 σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, χωρίς όμως να προκαλεί πολλαπλασιασμό τους.

Abstract

In chronic inflammatory diseases of the respiratory system, the airways are often shown to have increased cholinergic transmission and to be remodelled, which leads to a decrease of the airway diameter, bronchospasm and shortness of breath. Anticholinergic drugs, such as tiotropium, are used to treat these conditions. Recent studies show that muscarinic receptor antagonists, such as gallamine and atropine, cause airway smooth muscle cells (ASMCs) proliferation, in the absence of an agonist, via the PI3K and MAPK signaling pathways. In the present study, we investigate the mitogenic effect of tiotropium and the pathways that may be involved in its action.

ASMCs cultures of rabbit trachea and human bronchi were used. Cells were cultured in the presence of 10% FBS and tiotropium (5nM, 30nM on rabbit cells and 5nM, 10nM on human cells). The proliferation induced by tiotropium was estimated by the MTT and Trypan Blue methods. Expression of p38, p42/44 and cyclin D1 were verified after incubating the cells with tiotropium for 4h and by Dot-Blot immunoassay.

The results of these experiments show that the serum (10%) induces proliferation in rabbit tracheal and human bronchial ASMCs and increases MAPK expression (p38 and ERK-p44/42), inducing cyclin D1 expression. In human ASMCs, tiotropium (10nM) induces the proliferation of ASMCs and induces MAPK-p38 expression. Similar to rabbit trachea ASMCs, tiotropium has mitogenic activity only at 5nM concentration while at higher concentrations (30nM) it has no effect. Also, in these cells, tiotropium (5 or 30nM) induces the expression of MAPK-p44/42 and cyclin D1, without affecting the levels of MAPK-p38.

In conclusion, tiotropium at low concentrations has mitogenic effect in human and rabbit ASMCs. This action is partly mediated through the MAPK signalling pathway. At high concentrations, tiotropium induces MAPKs and cyclin D1 but does not cause proliferation of the cells.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που με δέχτηκε στο εργαστήριο, για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που μου έδειξε. Η καθοδήγηση της μου ήταν απαραίτητη τόσο πριν την είσοδο μου στο εργαστήριο αλλά και κατά την διάρκεια ολόκληρης της πτυχιακής μου.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, που δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Βασιλάκη Άννα, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, αλλά και για την συμβολή της στην επίτευξη μέρους της πειραματικής διαδικασίας και κυρίως για τις γνώσεις που μου μετέφερε.

Επιπλέον οφείλω και ένα τεράστιο ευχαριστώ και στην κυρία Σταματίου Ροδόπη, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας, για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που μου έδειξε, αλλά και την συνεχή επίβλεψη και στήριξη κατά την διάρκεια των πειραμάτων και για όλες τις γνώσεις που μου παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την δική τους συμβολή, ιδιαίτερα την μεταπτυχιακό φοιτήτρια Τρισόκκα Παναγιώτα, που ήταν δίπλα μου όποτε την χρειάστηκα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1. Λείες Μυϊκές Ίνες.....	9
1.1.1 Μορφολογία ΛΜΚ αεραγωγών	11
1.1.2. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ	13
1.1.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	16
1.1.4. Ο ρόλος των ΛΜΚ στην παθοφυσιολογία νόσων του αναπνευστικού.	20
1.2. Αυτόνομο νευρικό σύστημα.	22
1.2.1.Υποδοχείς ακετυλοχολίνης.....	24
1.2.1.1. Νικοτινικοί υποδοχείς (nACh).....	25
1.2.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς (mACh)	26
1.3. Μουσκαρινικοί υποδοχείς στο αναπνευστικό σύστημα	28
1.3.1. Ο ρόλος των μουσκαρινικών υποδοχέων στη συστολή των ΛΜΚ του αναπνευστικού	29
1.3.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ	30
1.3.2.Μουσκαρινικοί προσδέτες.....	32
1.3.2.1. Το φαινόμενο της αλλοστερικής τροποποίησης στους μουσκαρινικούς υποδοχείς	34
1.3.2.2. Αλλοστερικοί τροποποιητές	36
1.3.2.3. Τιοτρόπιο	37
Σκοπός της εργασίας	39
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
2. Μέθοδοι και υλικά	41
2.1. Ανάπτυξη καλλιιεργειών	41
2.2. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ	43
2.2.1 Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με χρωστική Trypan Blue.....	43
2.2.2 Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	44
2.3. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot-Blot)	46
2.3.1 Ομογενοποίηση κυττάρων	46
2.3.2. Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	47
2.3.3. Ανοσοαποτύπωση Dot-Blot.....	48
2.4 Στατιστική Ανάλυση.....	51
3. Αποτελέσματα	52
3.1. Η επίδραση του ορού στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	52

3.1.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	52
3.1.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	52
3.2. Η επίδραση του τιτροπίου στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ	53
3.2.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	53
3.2.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	54
3.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην μιτογόνο δράση του τιτροπίου	55
3.3.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	55
3.3.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	57
4. Συζήτηση	58
Βιβλιογραφία	61

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το αναπνευστικό σύστημα στον άνθρωπο μπορεί να διαχωριστεί, με βάση την ανατομία του, σε ανώτερο και κατώτερο. Το ανώτερο αναπνευστικό αποτελείται από την μύτη, τον φάρυγγα και τον λάρυγγα ενώ το κατώτερο αποτελείται από τους πνεύμονες, την τραχεία, που διακλαδίζεται στους κύριους βρόγχους και εν συνεχεία, στο εσωτερικό του πνεύμονα, τα βρογχιόλια και τις κυψελίδες όπου γίνεται η ανταλλαγή των αερίων, O₂ και CO₂. Με βάση τη λειτουργία του, το αναπνευστικό διακρίνεται σε 2 ζώνες: α) την αγωγή (conducting zones), που εκτείνεται από την ρινική οδό μέχρι τα βρογχιόλια και σχηματίζει την οδό διαμέσου της οποίας μετακινούνται τα αέρια και β) την αναπνευστική (respiratory zone) όπου εκεί λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή αερίων. (Patwa & Shah, 2015)

Σε φυσιολογικές συνθήκες, με την αναπνοή ο αέρας εισέρχεται από την μύτη, όπου θερμαίνεται και υγραίνεται με την βοήθεια του βλεννογόνου. Η ρινική οδός επενδύεται από τον βλεννογόνο και είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία και αδένες που εκκρίνουν υδατώδες υγρό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο αέρας που φτάνει στην τραχεία να είναι όσο το δυνατόν πιο υγρός και κοντά στην θερμοκρασία του σώματος, έτσι ώστε οι λεπτοί ιστοί στις κυψελίδες να μην ξηραίνονται από τον εισερχόμενο αέρα. Παράλληλα η δομή του ανώτερου αναπνευστικού και του τραχειοβρογχικού δέντρου είναι ιδανική ώστε να κατακρατά σωματίδια και να ανιχνεύει επιβλαβείς παράγοντες που εισέρχονται στο σώμα μέσω της αναπνοής. (Smith, 1971)

1.1. Λείες Μυϊκές Ίνες

Υπάρχουν ομάδες λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) σε διαδοχικές στρώσεις που επενδύουν τα τοιχώματα κοίλων και σπλαχνικών οργάνων όπως τα τοιχώματα των αγγείων, των ουρητήρων, της ουροδόχου κύστης, στο αναπαραγωγικό σύστημα ανδρών και γυναικών, στους αεραγωγούς, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στην ίριδα του ματιού. Με την ελεγχόμενη σύσπαση τους, επιτυγχάνεται η κίνηση του αέρα προς τους πνεύμονες ή η προώθηση της τροφής στο στομάχι ή ρυθμίζεται η κυκλοφορία του αίματος στα αιμοφόρα αγγεία. (Sherwood, 2016)

Στους αεραγωγούς υπάρχουν πολυδύναμοι λείοι μύες οι οποίοι σχηματίζουν λειτουργικά συγκύτια, δηλαδή όταν διεγείρονται συσπώνται ως μια ενιαία μονάδα. Μεμονωμένα ΛΜΚ συνδέονται μεταξύ τους με χασμοσυνδέσμους (gap junctions), επιτρέποντας έτσι την ελεύθερη μετακίνηση μικρών μορίων μεταξύ των κυττάρων, δημιουργώντας ηλεκτρική και μεταβολική σύζευξη μεταξύ τους. (Sherwood, 2016; Gu & Lee, 2006). Ένα κύριο χαρακτηριστικό των ΛΜΚ είναι η ικανότητα σύσπασης τους. Με αυτό τον τρόπο τους δίνεται η ικανότητα να προκαλούν σύσπαση ολόκληρου του οργάνου που περιβάλλουν, αλλά και να μπορούν να ρυθμίζουν την διάμετρο των αεραγωγών και τον βρογχοκινητικό τόνο (bronchomotor tone).

Ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ενδοτικότητα των αεραγωγών, είναι ο τόνος των ΛΜΚ και η απόκριση τους στην διάταση που προκαλείται από τη βαθιά εισπνοή. Τα ΛΜΚ έχουν την ικανότητα χάλασης ως απάντηση στην διάταση τους, δηλαδή όταν γίνει απότομα διάταση τους η τάση που αναπτύσσεται σε αυτά αρχικά αυξάνεται αλλά γρήγορα προσαρμόζονται στο νέο τους μήκος με την αναδιοργάνωση των συνδέσεων των εγκάρσιων γεφυρών. Ωστόσο, ο Gunst και οι συνεργάτες του, υπέθεσαν ότι η μηχανική διάταση και ταλάντωση των ΛΜΚ μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού που οδηγεί σε μείωση της ακαμψίας και της συσταλτότητας του μύος. (An et al, 2007; Gu & Lee, 2006; Sherwood, 2016)

Τα ΛΜΚ είναι τα κυριότερα κύτταρα τελεστές, υπεύθυνα για τον έλεγχο της διαμέτρου των αεραγωγών και επομένως για την αντίσταση στην ροή του αέρα ολόκληρου του τραχειο-βρογχικού δέντρου. Η συστολή στα ΛΜΚ γίνεται με την ολίσθηση των νηματίων ακτίνης και μυοσίνης, μια διαδικασία που χρειάζεται ενέργεια για να επιτευχθεί. Η συστολή ξεκινά με την είσοδο Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα από τον εξωκυττάριο χώρο ή από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το Ca^{2+} προσδένεται στην καλμοδουλίνη, ενεργοποιείται η Ca^{2+} /καλμοδουλινο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase - CaMK) που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (Myosin Light-Chain Kinase - MLCK), με τελικό αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και τελικά την σύσπαση της μυϊκής ίνας. Παράλληλα μεταξύ μεμονωμένων ΛΜΚ, υπάρχουν χασμοσύνδεσμοι που επιτρέπουν τη συντονισμένη, αργή και διαρκή συστολή ολόκληρου του λείου μυ. Η τάση που αναπτύσσεται κατά συστολή των ΛΜΚ υπερνικά την αντίσταση που αναπτύσσεται από τις ελαστικές ιδιότητες του λείου μυ στο τοίχωμα των αεραγωγών και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ελάττωση της διαμέτρου του αυλού των αεραγωγών. (Gu & Lee, 2006; Martinsen A., 2014)

Ο βασικός τόνος των ΛΜΚ ρυθμίζεται έτσι ώστε να παρέχει τη βέλτιστη ισορροπία μεταξύ της αντίστασης των αεραγωγών και του νεκρού χώρου κατά την ευπνεϊκή αναπνοή. Επιπλέον, ο τόνος των ΛΜΚ παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της διαμέτρου των αεραγωγών όταν η διατοιχωματική πίεση δρα για την σύμπτυξη των τοιχωμάτων τους (π.χ. κατά τη διάρκεια υπεραερισμού και βήχα), ιδιαίτερα στους μικρού και μεσαίου μεγέθους αεραγωγούς. Σε απόκριση σε εισπνεόμενα ερεθιστικά, η βρογχοσυστολή που προκύπτει από συστολή των ΛΜΚ, σε συνδυασμό με αυξημένη έκκριση από τους αεραγωγούς και τον (αντανακλαστικό) βήχα, παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των αεραγωγών. (Gu & Lee, 2006)

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διέγερση των ΛΜΚ ενεργοποιεί σύμπλοκα πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (ταλίνη, βινκουλίνη, παξιλλίνη και α-ακτινίνη) ευαίσθητων στην μηχανική παραμόρφωση. Τα σύμπλοκα αυτά συνδέονται με διαμεμβρανικές ιντεγκρίνες σε θέσεις κυτταρικής προσκόλλησης. Έχουν την ικανότητα να δημιουργούν θέσεις προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων

και μπορούν, ίσως, να μεταφέρουν μηχανικά ερεθίσματα από το ένα κύτταρο στο άλλο, μέσω των διαμεμβρανικών ιντεγκρινών. Αυτό συνεπάγει την έναρξη σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό όπως είναι ο πολυμερισμός της ακτίνης, η σύνδεση της ακτίνης του κυτταροσκελετού σε πρωτεΐνες προσκόλλησης και η ενεργοποίηση συσταλών πρωτεϊνών ευαίσθητες στην μηχανική τάση. (An et al, 2007)

Στους κατώτερους αεραγωγούς, οι λείες μυϊκές ίνες είναι διατεταγμένες ελικοειδώς. Στους βρόγχους οι λείες μυϊκές ίνες αποτελούν το 4-5% της κυτταρικής μάζας. Αν και μικροσκοπικά οι λείες μυϊκές ίνες των ανώτερων και κατώτερων αεραγωγών φαίνονται παρόμοιες, πιθανότατα υπάρχει ετερογένεια όσον αφορά τα πρόδρομα κύτταρα από τα οποία προέρχονται, όπως υποδεικνύει η διαφορετική έκφραση των β-αδρενεργικών υποδοχέων στα ΛΜΚ του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού. (Amrani & Panettieri, 2003)

1.1.1 Μορφολογία ΛΜΚ αεραγωγών

Τα ΛΜΚ οργανώνονται σε στοιβάδες. Είναι μονοπύρηννα, επιμήκη κύτταρα με ατρακτοειδές σχήμα και λεπτά άκρα. Η διάμετρος τους κυμαίνεται από 2 έως 10 μm και το μήκος τους από 50 μέχρι 400 μm. Τα νημάτια των ΛΜΚ, σε αντίθεση με τους σκελετικούς μύες, δεν οργανώνονται σε σαρκομερίδια ούτε σχηματίζουν μυϊκά ινίδια με αποτέλεσμα να μην εμφανίζουν τις γραμμώσεις των σκελετικών μυϊκών ινών, αλλά να έχουν πυκνά σωμάτια. Στα πυκνά σωμάτια είναι αγκυροβολημένα τα ινίδια ακτίνης (λεπτά νημάτια) και μυοσίνης (παχιά νημάτια). Τα μόρια μυοσίνης διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι εγκάρσιες γέφυρες να εκτείνονται σε όλο το μήκος των παχέων νηματίων. (Sherwood, 2016; Black et al, 2012)

Φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ καλείται η ικανότητα μετάβασης τους από τον έναν φαινότυπο στον άλλο. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να μεταβάλλουν τις κυτταρικές τους λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της συσταλτότητας, του πολλαπλασιασμού, της ικανότητας μετανάστευσης και της έκκρισης φλεγμονωδών παραγόντων. Οι δύο φαινότυποι που παρουσιάζουν τα ΛΜΚ είναι (α) ο *συσταλτός* και (β) ο *συνθετικός* φαινότυπος και μπορούν να εναλλάσσονται με μια δυναμική και αντιστρεπτή διαδικασία που επηρεάζεται από το συνολικό περιβάλλον του κυττάρου. Ο κάθε φαινότυπος έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**. (Wright et al, 2013)

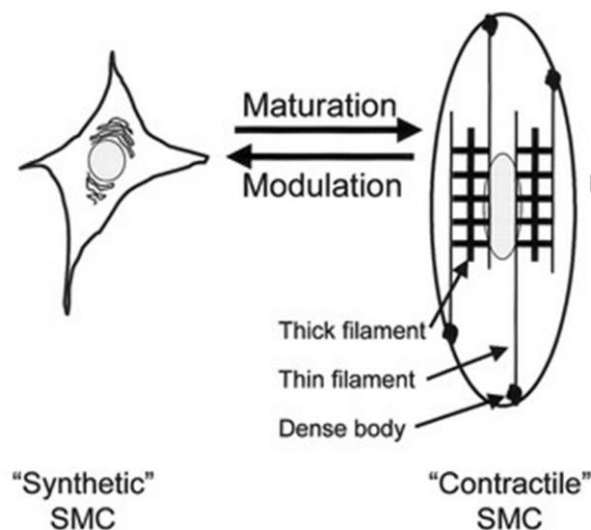
Η μετάβαση από τον συσταλτό στον συνθετικό φαινότυπο ονομάζεται *τροποποίηση*, ενώ η αντίστροφη διαδικασία ονομάζεται *ωρίμανση (Εικόνα 1)*. Τόσο η τροποποίηση όσο και η ωρίμανση μπορούν να οφείλονται σε εσωτερικούς (γενετικούς, φυσιολογικούς ή παθολογικούς) ή εξωτερικούς παράγοντες, όπως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων

(Platelet Derived Growth Factor – PDGF) και β-αυξητικό παράγοντα όγκου (Tumor Growth Factor-β-TGFβ).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά μόρια που εκφράζονται στον συσταλτό και συνθετικό φαινότυπο των λείων μυϊκών ινών. Πηγή: (Wright et al, 2013).

Συσταλτός Φαινότυπος	Συνθετικός Φαινότυπος
<ul style="list-style-type: none"> • Βαριά αλυσίδα μυοσίνης • SM22 • Calponin • α-ακτίνη των λείων μυών • Σύμπλοκο dystrophin glycoprotein • Δεσμίνη • Ιντεγκρίνη που δεσμεύεται σε λαμίνες (alpha 7b) 	<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία βαριάς αλυσίδας μυοσίνης • L- caldesmon • Vimentin • Αλφα/ βήτα PKC • CD44

Η διαδικασία της μετάβασης των ΛΜΚ από τον ένα φαινότυπο στον άλλο απαιτεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών σηματοδότησης, με κύριο ρόλο το σηματοδοτικό μονοπάτι της εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενης κινάσης (Extracellular signal-Regulated Kinase - ERK) και της κινάσης της 3-φωσφοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3-Kinase - PI3K). Η ενεργοποίηση αυτών των οδών οδηγεί σε αλλαγές στη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων που απαιτούνται για την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μυϊκή συστολή ή την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. (Wright et al, 2013) .



Εικόνα 1. Η τροποποίηση (modulation) και ωρίμανση (maturation) των λείων μυϊκών κυττάρων. Πηγή. (Halayko & Solway, 2001)

Ο συνθετικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση συσταλών πρωτεϊνών, όπως τη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης των λείων μυών (smooth muscle myosin heavy chain - sm-MHC),

την α-ακτίνη των λείων μυών (smooth muscle α actin - sm- α -actin), τη δεσμίνη, την MLCK και άλλα **(Πίνακας 1)**. Ο συνθετικός φαινότυπος δεν έχει την ικανότητα να συσπάται ως απάντηση σε μόρια που δρουν στον συσταλτό φαινότυπο όπως είναι η μεταχολίνη και η βραδυκινίνη. Παράλληλα έχει μειωμένη έκφραση των συσταλών πρωτεϊνών (ακτίνη, μυοσίνη). Τα κύτταρα που εκφράζουν συνθετικό φαινότυπο, έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού ως απόκριση σε μιτογόνα, την ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular Matrix - ECM) και κυτταροκίνες. (Wright et al, 2013; Zuyderduyn et al, 2008) .

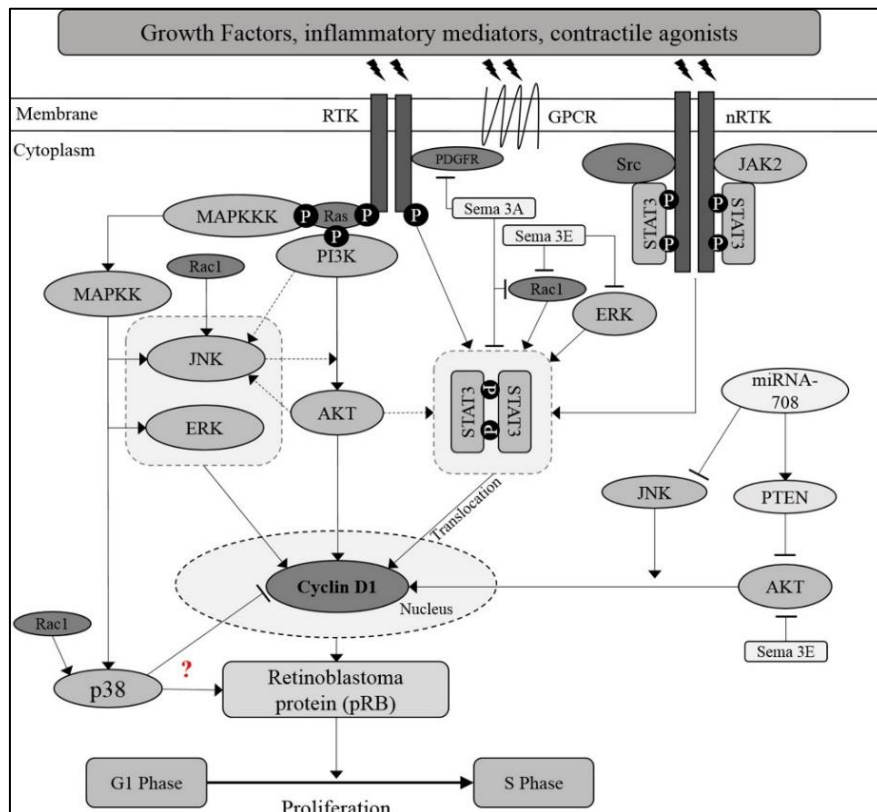
Σε καλλιέργεια ΛΜΚ και/ή σε παρασκευάσματα με απομονωμένους βρόγχους, οι ερευνητές έδειξαν ότι μια ποικιλία κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου α (Tumor Necrosis Factor alpha - TNF- α), Ιντερλευκίνη (Interleukin - IL) 1 β , IL-5 και IL-13, μπορούν να τροποποιήσουν τον συσταλτό φαινότυπο των ΛΜΚ, προκαλώντας μια μη ειδική υπεραπόκριση του ΛΜΚ σε αγωνιστές των υποδοχέων που συνδέονται με G- πρωτεΐνες (G protein-coupled receptor - GPCR), με μηχανισμό που ακόμα δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. (Amrani & Panettieri, 2003)

Η μετάβαση από τον ένα φαινότυπο στον άλλον δεν έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συμβεί *in vivo* στον άνθρωπο, όπου τα κύτταρα δεν είναι απομονωμένα όπως στην καλλιέργεια, αλλά πολλά δίκτυα σηματοδότησης δρουν ταυτόχρονα και επηρεάζουν την κατάσταση των ΛΜΚ. Αλλαγές στον φαινότυπο των ΛΜΚ φαίνεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεση νόσων του αναπνευστικού. (Wright et al, 2013; Zuyderduyn et al, 2008; Amrani & Panettieri, 2003) Σε παθολογικές καταστάσεις όπως στο άσθμα και την Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) πιθανόν να εκφράζεται ένας επιπλέον φαινότυπος των ΛΜΚ, ο *υπερσυσταλτός*. Ο υπερσυσταλτός φαινότυπος των ΛΜΚ έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα σε καλλιέργεια ΛΜΚ σκύλου, στα οποία είχε στερηθεί ο ορός. Μελέτες με ΛΜΚ που εκφράζουν τον συνθετικό φαινότυπο έχουν δείξει ότι τα κύτταρα αυτά αποτελούν πηγή μιας ποικιλίας φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα ΛΜΚ κύτταρα είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με κύτταρα του ανοσοποιητικού και πιθανόν εμπλέκονται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς που αποτελούν τη βάση χρόνιων παθήσεων του αναπνευστικού. (Wright et al, 2013; Zuyderduyn et al, 2008)

1.1.2. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ

Τα ΛΜΚ πολλαπλασιάζονται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και παράγοντες που προκαλούν συστολή των ΛΜΚ **(Εικόνα 2)**. Τα ερεθίσματα αυτά ενεργοποιούν υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases - RTKs), GPCRs και κινάσες τυροσίνης που δεν είναι υποδοχείς (Non-Receptor Tyrosine Kinases-nRTKs). Η ενεργοποίηση των RTKs και των GPCRs προάγει την ενεργοποίηση του ιού του σαρκώματος του αρουραίου (Rat sarcoma virus -Ras), μιας μικρής πρωτεΐνης τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTPase), η οποία ενεργοποιεί τόσο

τις οδούς σηματοδότησης κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinase-MAPK) όσο και τα μονοπάτια σηματοδότησης της PI3K με την πρωτεϊνική κινάση B (AKT). Η ενεργοποίηση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D1, που ο ρόλος της είναι να προάγει τον κυτταρικό κύκλο από την φάση G1 στην S και τελικά τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (**Εικόνα 2**). (Yap et al, 2019).



Εικόνα 2. Αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Φλεγμονώδεις μεσολαβητές, αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη φλεγμονή στο άσθμα και προκαλούν συστολή των ΛΜΚ, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK, PI3K/AKT και JAK2/STAT3. Η ενεργοποίηση αυτών των μορίων σηματοδότησης, αυξάνει την έκφραση κυκλίνης D1, προάγωντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Πηγή. (Yap et al., 2019)

Σε πειράματα που επάγεται ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ από ορό, οι οδοί σηματοδότησης που φαίνεται να εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, είναι της PI3K και της ρυθμιζόμενης από ERKs, τόσο σε ΛΜΚ που έχουν ληφθεί από αεραγωγούς φυσιολογικών ατόμων όσο και ασθενών με άσθμα. Μελέτες δείχνουν ωστόσο ότι ισχυρά μιτογόνα ερεθίσματα (π.χ 10% FBS) μειώνουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK σε ΛΜΚ που έχουν ληφθεί από αεραγωγούς ασθενών με άσθμα. (Walker et al, 1998; Yap et al, 2019)

Αυξητικοί παράγοντες: Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor - EGF), ο PDGF, ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor - bFGF), ο αυξητικός παράγοντας-1 που μοιάζει με την ινσουλίνη (Insulin-like Growth Factor 1 - IGF-1) και η ινσουλίνη, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

ενεργοποιώντας τους RTKs. (Stamatiou et al, 2012). Ο TGFβ1 επάγει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και τη μετανάστευση των ΛΜΚ και μειώνει την απόπτωση τους. (Yap et al, 2019; Gerthoffer et al, 2012) Ο TGFβ1 έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και έχει αποδειχθεί ότι είναι αυξημένος σε αεραγωγούς ασθενών με άσθμα.

Αγωνιστές των GPCRs: Αγωνιστές των μουςκαρινικών υποδοχέων, όπως είναι η ακετυλοχολίνη, έχουν συσχετιστεί με πάχυνση του λείου μυός σε ζωικά μοντέλα άσθματος. Αν και η διέγερση των μουςκαρινικών υποδοχέων επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, συνήθως οι αγωνιστές αυτοί δρουν σε συνδυασμό με αυξητικούς παράγοντες και έχουν ως αποτέλεσμα να αυξάνεται πολύ περισσότερο ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ σε σύγκριση με τον πολλαπλασιασμό που θα προκαλούσε από μόνος του ο αυξητικός παράγοντας. (Stamatiou et al, 2014; Gerthoffer et al, 2012)

Η διέγερση GPCRs συζευγμένων με Gq πρωτεΐνη, από την ισταμίνη, βραδυκινίνη ή θρομβίνη ή GPCRs συζευγμένων με Gi πρωτεΐνη (για παράδειγμα από τη θρομβοξάνη) έχει μιτογόνο δράση στα ΛΜΚ. Αντιθέτως η διέγερση GPCRs υποδοχέων που συνδέονται με Gs φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (Gerthoffer et al, 2012)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ενεργοποιούν τόσο τους GPCRs όσο και τους nRTKs για να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, που υποδεικνύει την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας και της αυξημένης μάζας των ΛΜΚ. (Yap et al., 2019)

Κυτταροκίνες: Οι περισσότερες από τις κυτταροκίνες επιδρούν στην γονιδιακή ρύθμιση μέσω γλυκοπρωτεϊνικών συμπλόκων στην επιφάνεια του κυττάρου και συνδέονται με αρκετές κινάσες τυροσίνης (π.χ πρωτεΐνες της οικογένειας Src και μόρια που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια της MAPK και των Janus Kinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription proteins (STAT). Η ανοσοσφαιρίνη IgE φαίνεται να προκαλεί επίσης πολλαπλασιασμό και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε ανθρώπινα ΛΜΚ. Ο TNF-α προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, από βρόγχους ανθρώπου και τραχείας κουνελιού, μέσω των μονοπατιών των p42/p44 MAPK. Σε αντίθεση με τον TNF-α, η IL-1β, σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού δεν ενεργοποιεί ούτε το σηματοδοτικό μονοπάτι της p42/p44, ούτε της p38 MAPK ή PI3K. (Yap et al, 2019; Stamatiou et al, 2012).

Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ φαίνεται να συνδέεται άμεσα με αυξημένη μάζα των ΛΜΚ, την μετανάστευση τους, αλλά και την μειωμένη απόπτωση τους. Η αυξημένη μάζα των ΛΜΚ, που παρατηρείται σε νόσους του αναπνευστικού, όπως το άσθμα, έχει συσχετιστεί με τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ που προκαλείται από αυξητικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις μεσολαβητές και νευροδιαβιβαστές. Παράλληλα η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός έχει βρεθεί να ρυθμίζονται από παρόμοια μόρια ή οδούς σηματοδότησης με αυτά του πολλαπλασιασμού. Σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, όπως ο STAT3 και

η c-Jun N-terminal kinase (JNK), καθώς και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όπως η κυκλίνη D1, αναφέρθηκε ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη μετανάστευση των ΛΜΚ. Επιπλέον μερικά microRNAs, έχουν την δυνατότητα να δρουν ως ρυθμιστές τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο στη μετανάστευση των ΛΜΚ κατά την αλλεργική φλεγμονή και το άσθμα. Όσον αφορά την απόπτωση των ΛΜΚ, φαίνεται πως ρυθμίζεται από κοινά με τον πολλαπλασιασμό μονοπάτια, όπως αυτά των MAPKs, τα μονοπάτια σηματοδότησης JAK/STAT και PI3K/AKT, καθώς και μερικά microRNAs. (Gerthoffer et al, 2012; Yap et al, 2019)

1.1.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

Τα κύρια και καλύτερα μελετημένα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, είναι αυτά των MAPK και της PI3K μαζί με την πρωτεϊνική κινάση B ή αλλιώς AKT (μονοπάτι PI3K/AKT). Επιπλέον στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ εμπλέκονται και τα μονοπάτια JAK2/STAT3 και της κυκλίνης D1. Μεταξύ αυτών των οδών πολλαπλασιασμού, οι Walker et al. (1998), απέδειξαν ότι σε ΛΜΚ βροός, το κύριο μονοπάτι για τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ είναι αυτό της PI3K, ενώ το μονοπάτι της ERK, έχει συμπληρωματικό ρόλο για τον πολλαπλασιασμό. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η θεραπεία του άσθματος με στόχευση την αναστολή του μονοπατιού της PI3K αντί ERK θα μπορούσε πιθανόν να αναστείλει ή ακόμη και να ανατρέψει την αύξηση των ΛΜΚ που παρατηρείται στο άσθμα. (Walker et al, 1998; Yap et al., 2019)

Μονοπάτι της PI3K. Η οικογένεια της PI3K αποτελείται από ετεροδιμερή που διαθέτουν μια καταλυτική υπομονάδα, την p110, και μια ρυθμιστική υπομονάδα. Περιλαμβάνει τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών (τάξεις I, II και III) με βάση τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους που χωρίζονται περαιτέρω σε υποκατηγορίες (IA, IB) με βάση την καταλυτική υπομονάδα p110. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K εμπλέκεται σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, του μεταβολισμού και της μετανάστευσης. Παράλληλα μελέτες υποστηρίζουν ότι εμπλέκεται και σε ασθένειες όπως το άσθμα και τη καρκινογένεση. (Yoo et al, 2017; Fujita, 2012)

Η PI3K καταλύει τη φωσφορυλίωση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol Biphosphate - PIP2) για το σχηματισμό της 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate - PIP3). Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες του κυτοσολίου, με περιοχές ομόλογες με πλεξτρίνη, όπως πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεΐνες σκαλωσιάς και παράγοντες ανταλλαγής γουανίνης (Guanine nucleotide exchange factor - GEF), συσσωρεύονται στις θέσεις ενεργοποίησης της PI3K με άμεση δέσμευση στη PIP3 και ακολουθεί η ενεργοποίηση καταρακτών σηματοδότησης. Τελεστές της σηματοδότησης της PI3K είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης όπως η Akt και η εξαρτώμενη από 3-φωσφοϊνοσιτίδια κινάση 1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 – PDK1). Η ενεργοποίηση της Akt από την PDK1,

ενεργοποιεί τα μόρια στόχους της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian Target Of Rapamycin - mTOR), το σύμπλοκο 1 και πλήθος άλλων πρωτεϊνών που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K τερματίζεται με την αποφωσφορυλίωση της PIP3 από τη φωσφατάση και το ομόλογο τενσίνης (Phosphatase and Tensin homolog -PTEN), τον κύριο ενδογενή αναστολέα της PI3K. (Yoo et al, 2017; Qie & Diehl, 2016)

Μονοπάτι MAPK. Οι MAPK είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης- θρεονίνης (Soares-Silva, 2016). Σε κύτταρα θηλαστικών, έχουν χαρακτηριστεί πλήρως 3 οικογένειες MAPK: οι κλασικές MAPK ή αλλιώς ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες ERKs, η C-Jun N-terminal κινάση (JNK) ή αλλιώς πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το stress (Stress-activated protein kinases – SAPK) και η κινάση p38. Οι MAPKs εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια πρωτεϊνικών κινασών. Κάθε σηματοδοτικός καταρράκτης αποτελείται από τρία ένζυμα που ενεργοποιούνται σε σειρά: μια κινάση κινάσης MAPK (MAPKKK), μια κινάση MAPK (MAPKK) ή MEK (MAPK / ERK kinase) και μια κινάση MAP (MAPK). (Zhang and Liu, 2002)

Οι οδοί σηματοδότησης των MAPK έχουν την ικανότητα να αναμεταδίδουν, να ενισχύουν και να ενσωματώνουν σήματα από ένα μεγάλο φάσμα ερεθισμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση της κατάλληλης, φυσιολογικής, απόκρισης στα κύτταρα των θηλαστικών, που περιλαμβάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, φλεγμονώδεις αποκρίσεις και απόπτωση. (Zhang and Liu, 2002)

Οι ERKs βρίσκονται σε 2 ισομορφές: Erk1 ή p44 και Erk2 ή p42. Τόσο η p44 όσο και η p42, έχουν κοινό το 83% των αμινοξέων τους και εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, ορός και φορβόλ-εστέρες, αλλά και, σε μικρότερο βαθμό, σε προσδέτες των GPCRs, κυτταροκίνες, ωσμωτικό στρες και σε αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, ενεργοποιούνται οι μικρές τριφωσφορικές γουανοσίνες (Ras) και στην συνέχεια ενεργοποιούνται διαδοχικά οι πρωτεϊνικές κινάσες του ινοσαρκώματος (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-Raf) και η MAPK/ERK κινάση (MEK). Τελικά οι ERKs ενεργοποιούνται και μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα τους που είναι μεμβρανικές (καλνεξίνη κ.α) και κυτταροσκελετικές (νευροϊνίδια και παξικιλίνη) πρωτεΐνες αλλά και πυρηνικά υποστρώματα (συνενεργοποιητής του υποδοχέα στεροειδών-1, STAT3 κ.α). (Roux & Blenis, 2004; Pagès, 1999) Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να ελέγχει το κατά πόσο ένα κύτταρο θα διαφοροποιηθεί ή θα πολλαπλασιαστεί όπως και την επιβίωση των κυττάρων σε διάφορα κύτταρα ασπόνδυλων και θηλαστικών. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η παρατεταμένη ενεργοποίηση των ERKs, είναι απαραίτητη για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην S και σχετίζεται με την επαγωγή ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και την απενεργοποίηση γονιδίων που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. (Roux & Blenis, 2004; Meloche & Pouyssegur, 2007)

Η δεύτερη οικογένεια MAPK είναι αυτή των JNK. Υπάρχουν τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις JNK. Υπάρχουν 12 ισομορφές των κινασών αυτών οι οποίες είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Το μονοπάτι σηματοδότησης τους εμπλέκεται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως την απόπτωση και την μεταγραφή γονιδίων. Η ενεργοποίησή τους γίνεται από τις MAPKKKs. (Zhang and Liu, 2002; Ruvolo P. , 2001)

Οι Pedram et al. 1998 μελέτησαν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοός. Μετά το πέρας των πειραμάτων, ανακάλυψαν ότι η παρουσία της ERK, της οποίας η ενεργοποίηση επάγεται από τον αγγειακό αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου (Vascular endothelial growth factor – VEGF), είναι απαραίτητη για την ταχεία ενεργοποίηση της JNK. Επίσης έδειξαν ότι και οι δύο οικογένειες των MAP κινασών, επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αν και οι JNK είναι ο σημαντικότερος τελεστής του μονοπατιού σηματοδότησης. Είναι πιθανό η αλληλεπίδραση, μελών της οικογένειας των MAP κινασών (π.χ ERK- JNK) να καθορίζει αν ένα κύτταρο θα διαιρεθεί ή θα διαφοροποιηθεί. (Ruvolo P. , 2001) (Pedram A, 1998; Fujita, 2012)

Η οικογένεια της p38 MAPK των θηλαστικών, διαθέτουν τέσσερις ισομορφές, οι οποίες μπορούν όλες να φωσφορυλιωθούν από την anti-MAP Kinase Kinase 6 (MKK6/SKK3). Ενεργοποιούνται από το κυτταρικό στρες συμπεριλαμβανομένης ακτινοβολίας UV, θερμικού σοκ, υψηλού ωσμωτικού στρες, λιποπολυσακχαριτών, αναστολέων σύνθεσης πρωτεϊνών, προφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως IL-1 και TNF-α) και ορισμένων μιτογόνων. (Zhang and Liu, 2002)

Η p38 MAPK φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη φλεγμονή και άλλες αποκρίσεις στο στρες. Η δραστηριότητα της p38 απαιτείται για την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1/S, που επάγεται από το Cdc42. Αυτός ο ανασταλτικός ρόλος μπορεί να διαμεσολαβείται από την αναστολή της έκφρασης της κυκλίνης D1. Η ενεργοποιημένη p38 μπορεί να προκαλέσει παύση του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση της μίτωσης σε σωματικά κύτταρα, συγκεκριμένα στο σημείο ελέγχου συναρμολόγησης της ατράκτου. Επίσης αναφέρεται ότι η p38 εμπλέκεται σε διάφορες διαδικασίες διαφοροποίησης των κυττάρων των σπονδυλωτών όπως λιποκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα, χονδροβλάστες, ερυθροβλάστες, μυοβλάστες και νευρώνες. (Zhang and Liu, 2002)

Η ενεργοποίηση των μονοπατιών των ERK, JNK και PI3K/AKT, έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση κυκλίνης D1. Αντιθέτως η p38 προκαλεί πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινα ΛΜΚ, με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein - pRb) ενώ αναστέλλει την κυκλίνη D1. Αυτά τα αντιφατικά ευρήματα σχετικά με το ρόλο της p38 στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ θα μπορούσαν να οφείλονται είτε στην φύση των μιτογόνων

ερεθισμάτων ή σε έναν διπλό ρόλο της p38 και/ή σε διαφορετικά είδη. (Yar et al., 2019) Για παράδειγμα, ένας διπλός ρόλος της p38 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει αναφερθεί στους ινοβλάστες. Διαφορετικά ερεθίσματα μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση της p38 και τελικά είτε το κύτταρο θα πολλαπλασιαστεί ως απόκριση σε μιτογόνο ερέθισμα, είτε ο κυτταρικός κύκλος θα διακοπεί. Ο bFGF, αλλά όχι η θρομβίνη, επάγει τη φωσφορυλίωση της p38, ενώ και τα δύο ερεθίσματα ήταν εξίσου αποτελεσματικά στην πρόκληση φωσφορυλίωσης της pRb και τελικά πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (Yar et al., 2019)

Μονοπάτι JAK2/STAT3. Η οδός JAK2/STAT3 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Ο STAT3, ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από πολλά μόρια, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του στον πυρήνα και την αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D1. Μερικά από τα μόρια που είναι ικανά να τον ενεργοποιούν είναι: RTKs, nRTKs (Src και JAK2) και PDGF, καθώς και κινάσες των MAPKs και η PI3K σε καρκινικά κύτταρα. Το μονοπάτι αυτό φαίνεται να αλληλεπιδρά με το μονοπάτι της Akt, αν και απαιτεί περισσότερη διερεύνηση, αλλά και με το μονοπάτι της ERK, όπου αναστολή της ERK έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του STAT3 που προκαλείται από την IL-17 σε ανθρώπινα ΛΜΚ υποδηλώνοντας έναν λειτουργικό ρόλο της διασταύρωσης των μονοπατιών ERK-STAT3. (Yar et al., 2019)

Μονοπάτι Κυκλίνης. Οι κυκλίνες αποτελούν ρυθμιστικές υπομονάδες σε κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDKs, Cyclin-Dependent Kinases). Παράγονται και αποικοδομούνται με μια αυστηρά καθορισμένη σειρά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη σωστή διαίρεση του κυττάρου. (Ζίφα, 2019)

Τα κύτταρα των θηλαστικών, κωδικοποιούν τρεις κυκλίνες D (D1, D2 και D3). Λειτουργούν ως αλλοστερικοί ρυθμιστές των Cyclin-Dependent Kinases-4 και 6 (CDK4 και CDK6) και συντονίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από τη G1 φάση στη S, έπειτα από εξωκυτταρική διέγερση (π.χ. ύπαρξη αυξητικού παράγοντα ή διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών). Υπερέκφραση των κυκλινών D ή υπερενεργοποίηση των CDK που σχετίζονται με αυτές, φαίνεται να συμβάλλει άμεσα στη νεοπλασματική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, η κυκλίνη D1 είναι η πιο συχνά απορυθμισμένη κυκλίνη σε περιπτώσεις ανθρώπινων καρκίνων, σε σχέση με τις άλλες 2 κυκλίνες. Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 οδηγεί σε απορρυθμισμένη δραστηριότητα CDK, ταχεία ανάπτυξη κυττάρων υπό συνθήκες περιορισμένης μιτογόνου σηματοδότησης, παράκαμψη βασικών κυτταρικών σημείων ελέγχου και τελικά νεοπλασματική ανάπτυξη. (Qie & Diehl, 2016; Neumeister et al, 2003)

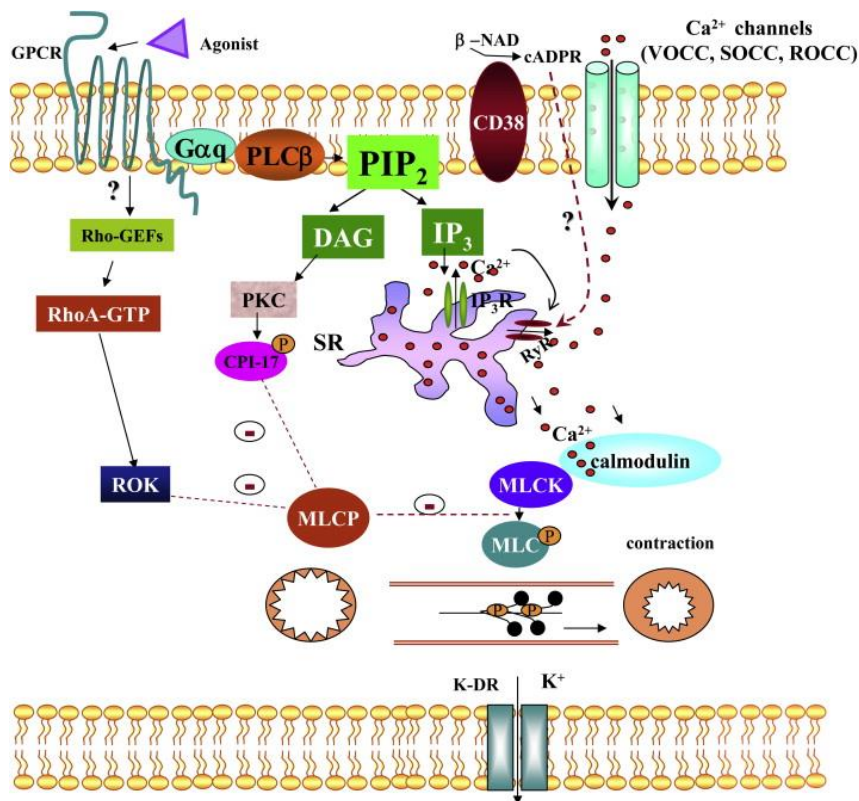
Σε πειράματα που έγιναν, προστέθηκε ορός σε κύτταρα που βρίσκονταν σε ηρεμία. Η κυκλίνη D1 συσσωρευόταν στον πυρήνα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα πριν από την φάση S και εξαφανίζονταν όταν αυτά προχώρησαν στη φάση S. Η μικροέγχυση αντισωμάτων έναντι της κυκλίνης D1 ή αντινοηματικού πλασμιδίου, εμπόδισε τα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση S. Αυτά τα

αποτελέσματα δείχνουν ότι η κυκλίνη D1 αποτελεί σημαντικό στόχο σημάτων πολλαπλασιασμού στην φάση G1. (Baldin, 1993)

1.1.4. Ο ρόλος των ΛΜΚ στην παθοφυσιολογία νόσων του αναπνευστικού.

Σύσπαση των ΛΜΚ. Σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού, όπως ΧΑΠ και άσθμα, παρατηρείται αύξηση της σύσπασης των ΛΜΚ των αεραγωγών, με αποτέλεσμα την μείωση της διαμέτρου τους, που οδηγεί σε δύσπνοια. Αυτό μπορεί να είναι και αποτέλεσμα αυξημένης απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών π.χ. ακετυλοχολίνης ή άλλων συστατών μεσολαβητών π.χ. λευκοτριένιων. Η έκθεση σε τέτοιους παράγοντες, ακόμα και κατά την εμβρυϊκή ζωή, είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγές στον αριθμό των ΛΜΚ στα τοιχώματα των αεραγωγών, αλλά και στην απόκριση τους σε παράγοντες που προκαλούν συστολή. (Lam, Lamanna & Bourke, 2019)

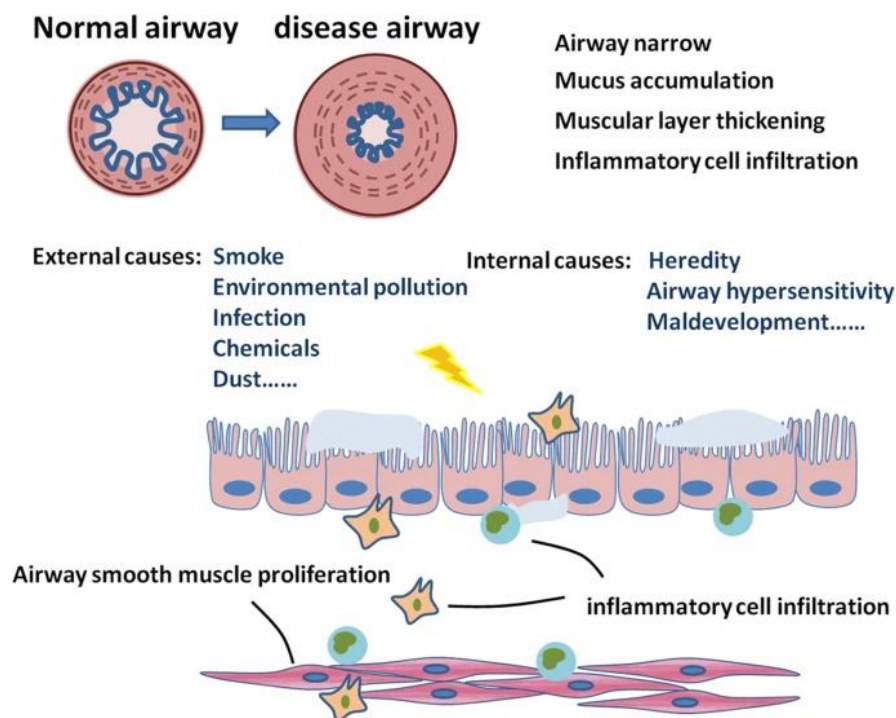
Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ΛΜΚ διατηρούν την ισορροπία μεταξύ βρογχοδιαστολής και βρογχοσύσπασης. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας οδηγεί σε υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Υπάρχουν πολλοί και καλά αναγνωρισμένοι μηχανισμοί στις λείες μυϊκές ίνες που ρυθμίζουν τη συστολή και τη χάλαση τους. Ένα παράδειγμα ρυθμιστικού μηχανισμού είναι με το εκτοένζυμο CD38, που οδηγεί σε παραγωγή κυκλικής ADP ριβόζης (Cyclic ADP-ribose - cADPR) και απελευθέρωση Ca^{2+} μέσω των διαύλων ρυανοδίνης του σαρκοπλασματικού δικτύου.



Εικόνα 3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων του αναπνευστικού. Πηγή: Pelaia, G. et al 2008

Η διέγερση GPCR ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (phospholipase C - PLC) και διασπά τη PIP2 σε IP3 και διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol - DAG). Το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} συνδέεται με την καλμοδουλίνη για να αλλάξει την κατάσταση φωσφορυλίωσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης ρυθμίζοντας έτσι τη συστολή των ΛΜΚ. Η εξάντληση του Ca^{2+} στις αποθήκες ασβεστίου του σαρκοπλασματικού προκαλεί εισροή Ca^{2+} μέσω διαύλων που ελέγχονται από αποθήκες Ca^{2+} (Store-Operated Calcium Channels - SOCC) (**Εικόνα 3**). (Yan et al, 2018)

Αναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών. Ως αναδιαμόρφωση, ορίζεται η μεταβολή της δομής του τοιχώματος των μικρών και μεγάλων αεραγωγών, με αποτέλεσμα την μεταβολή του τόνου τους. Αυτό συμβαίνει σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως στο άσθμα και στην ΧΑΠ. Συγκεκριμένα οι αλλαγές στη δομή του τοιχώματος των αεραγωγών που παρατηρούνται περιλαμβάνουν: αύξηση του πάχους της βασικής μεμβράνης και του συνδετικού ιστού, αύξηση της μάζας των λείων μυών των αεραγωγών (υπερπλασία και υπερτροφία), αγγειογένεση, υπερτροφία των αδένων και υπερπαραγωγή βλέννας λόγω υπερπλασίας των goblet επιθηλιακών κυττάρων. (**Εικόνα 4**). (Yan et al, 2018; Jindal, 2016; Chung, 2005)



Εικόνα 4. Αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών σε χρόνιες νόσους του αναπνευστικού συστήματος. Πηγή Yan et al. 2018

Η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από στένωση των αεραγωγών (συνήθως των περιφερειακών) και πάχυνση των τοιχωμάτων τους με αποτέλεσμα τον προοδευτικό περιορισμό της ροής του αέρα. Σχετίζεται με ανώμαλη φλεγμονώδη απόκριση των πνευμόνων σε επιβλαβή σωματίδια ή αέρια. Τα ΛΜΚ έχουν τη δυνατότητα να συσπώνται, ανάλογη με τον φαινότυπο που εκφράζουν, και να

ελέγχουν με τον τρόπο αυτό τον τόνο των αεραγωγών και τη διάμετρο τους. Μεταβολές στον φαινότυπο και στην ποσότητα/μέγεθος των ΛΜΚ, μεταβολές που παρατηρούνται σε περιπτώσεις αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος των αεραγωγών, είναι ιδιαίτερα εμφανείς στους μικρούς αλλά περιγράφονται επίσης και στους μεγάλους αεραγωγούς. (Yan et al, 2018; Jindal, 2016; Chung, 2005)

Στο άσθμα, η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση σοβαρών συμπτωμάτων της νόσου και εμφανίζεται σε όλους τους τύπους των αεραγωγών και σε διάφορους βαθμούς σοβαρότητας της νόσου. Με βάση τα ευρήματα από βιοψίες σε άτομα με άσθμα, το πάχος του στρώματος των ΛΜΚ σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου. Επίσης, μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ΛΜΚ, έχουν δείξει ότι τα ΛΜΚ από ασθματικούς ασθενείς διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με ΛΜΚ που έχουν ληφθεί από υγιή άτομα. (Jindal, 2016; Chung, 2005; Lam, Lamanna & Bourke, 2019)

Η αύξηση της μάζας των ΛΜΚ είναι ένα βασικό στοιχείο της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών. Μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες που εμπλέκονται στην μετανάστευση των ΛΜΚ, όπως αυξητικούς παράγοντες (πχ. PDGF), κυτταροκίνες (IL-5, IL-4, IL-13) κ.α. ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα παραγόντων (π.χ κάπνισμα) που δρουν κατά την εμβρυϊκή ζωή όπως για παράδειγμα στη βρογχοπνευμονική δυσπλασία. Η βρογχοπνευμονική δυσπλασία προκύπτει ως αποτέλεσμα πρόωρης γέννησης ή μη κανονικής ανάπτυξης των πνευμόνων κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των ΛΜΚ και δυσμορφία των κυψελίδων, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος και ΧΑΠ (Athari, 2019; Lam, Lamanna & Bourke, 2019; Thébaud et al, 2019)

Ο αυξημένος αριθμός των ΛΜΚ στο τοίχωμα των αεραγωγών αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών σε παράγοντες που προκαλούν σύσπαση. (Lam, Lamanna & Bourke, 2019). Η απορρύθμιση της σηματοδότησης της έκκρισης παραγόντων που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (Wingless-related integration site - Wnt) και η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με την παθολογική αναδιαμόρφωση των αεραγωγών σε ασθματικούς ασθενείς. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D εντείνει τη σοβαρότητα του άσθματος. Επιπλέον, η βιταμίνη D μειώνει την έκφραση του Wnt5a και της β-κατενίνης και αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, αποτρέποντας έτσι την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στο άσθμα. (Athari, 2019)

1.2. Αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Η εννεύρωση της αναπνευστικής οδού επιτυγχάνεται μέσω ενός δικτύου προσαγωγών και απαγωγών νευρώνων του πνευμονογαστρικού νεύρου, ως μέρος του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ΑΝΣ). Οι νευρώνες των αεραγωγών ρυθμίζουν πολλές πτυχές της λειτουργίας των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένου της αναπνοής και του αντανακλαστικού Hering-Breuer, του τόνου των λείων μυών των αεραγωγών, της έκκρισης βλέννας και του βήχα. Οι ίνες του πνευμονογαστρικού νεύρου

μπορούν να χωριστούν σε τρία κύρια συστατικά: τις πρωτεύουσες προσαγωγές νευρικές ίνες, τα κέντρα ενσωμάτωσης στον εγκέφαλο και τις παρασυμπαθητικές απαγωγές νευρικές ίνες. (Sherwood, 2016; Kistemaker & Prakash, 2016)

Η εξωτερική νευρική διέγερση είναι απαραίτητη για την ρύθμιση και διατήρηση του ρυθμού της αναπνοής, ανταποκρινόμενη στις μεταβαλλόμενες ανάγκες του οργανισμού για O₂ και αποβολή CO₂. Τα κέντρα ελέγχου της αναπνοής εδράζουν στο εγκεφαλικό στέλεχος (προμήκη μυελό) όπου υπάρχουν συναθροίσεις νευρώνων που παράγουν ρυθμικά ερεθίσματα που προωθούνται στους αναπνευστικούς μύες και επιτυγχάνεται έτσι η ασυνείδητη ρυθμική σύσπαση- χάλαση των μυών αυτών. Παράλληλα στο εγκεφαλικό στέλεχος εντοπίζονται και άλλα αναπνευστικά κέντρα. Συγκεκριμένα στην περιοχή της γέφυρας εντοπίζεται το πνευμονοταξικό κέντρο και το αναπνευστικό κέντρο, απαραίτητα στη διαμόρφωση του αναπνευστικού ρυθμού. Παράλληλα για την καθιέρωση του αναπνευστικού ρυθμού, υπεύθυνη είναι μια ομάδα νευρώνων στο σύμπλεγμα προ-Bötzinger, στους κοιλιακούς αναπνευστικούς νευρώνες. Στο σημείο αυτό υπάρχει μια ομάδα νευρώνων που εμφανίζουν δραστηριότητα βηματοδότη, παράγουν αυτόματα δυναμικά δράσης και πιστεύεται ότι η συχνότητα των ρυθμικών ώσεων στους ραχιαίους αναπνευστικούς νευρώνες καθορίζεται την συναπτική τροφοδότηση από το σύμπλεγμα αυτό. (Sherwood, 2016)

Σε καταστάσεις ηρεμίας, όταν επικρατεί το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα, η αναπνοή χαρακτηρίζεται ως ήρεμη. Η σύσπαση και η χάλαση των μυών ελέγχονται από το αναπνευστικό κέντρο του προμήκη μυελού, όπου ρυθμικές ώσεις από τα κυτταρικά σώματα κινητικών νευρώνων που βρίσκονται στον νωτιαίο μυελό, καταλήγουν στους εισπνευστικούς μύες, το διάφραγμα και τους έξω μεσοπλευρίους μύες. Το αναπνευστικό κέντρο αποτελείται από δυο ομάδες νευρώνων, τους ραχιαίους (Dorsal Respiratory Group) και τους κοιλιακούς αναπνευστικούς νευρώνες (Ventral Respiratory Group). Οι ραχιαίοι αναπνευστικοί νευρώνες αποτελούνται κυρίως από εισπνευστικούς νευρώνες, οι νευράξονες των οποίων φτάνουν στους κινητικούς νευρώνες ελέγχοντας τους εισπνευστικούς μύες. Κατά την εισπνοή οι νευρώνες αυτοί διεγείρονται με αποτέλεσμα την περιοδική σύσπαση των εισπνευστικών μυών. Η εκπνοή επιτελείται παθητικά, όταν δεν αποστέλλονται νευρικές ώσεις από τους νευρώνες αυτούς και τότε οι εισπνευστικοί μύες χαλαρώνουν. (Sherwood, 2016)

Το αναπνευστικό κέντρο, υπό φυσιολογικές συνθήκες επιδέχεται λεπτής ρύθμισης από τα αναπνευστικά κέντρα της γέφυρας. Το πνευμονοταξικό κέντρο αποστέλλει ώσεις στους ραχιαίους αναπνευστικούς νευρώνες, επιδρώντας στους εισπνευστικούς νευρώνες, περιορίζοντας τελικά την διάρκεια της αναπνοής. Το αναπνευστικό κέντρο αναστέλλει την απενεργοποίηση των εισπνευστικών νευρώνων ενισχύοντας την εισπνοή. Στην ομαλή ρύθμιση της αναπνοής υπερισχύει το πνευμονοταξικό κέντρο για τον έγκαιρο τερματισμό της εισπνοής. Ακολούθως συμβαίνει εκ νέου

διέγερση των εισπνευστικών μυών με αποτέλεσμα νέα εισπνοή. Στην περίπτωση που απαιτείται αύξηση του αερισμού, ενεργοποιούνται οι κοιλιακοί αναπνευστικοί νευρώνες, όπου φυσιολογικά δεν ενεργοποιούνται στην ήρεμη αναπνοή. Η ομάδα αυτών των νευρώνων περιλαμβάνει εισπνευστικούς και εκπνευστικούς νευρώνες. Κατά την ενεργή αναπνοή ενεργοποιούνται διεγείροντας τους κινητικούς νευρώνες προκαλώντας σύσπαση των εισπνευστικών μυών. (Sherwood, 2016)

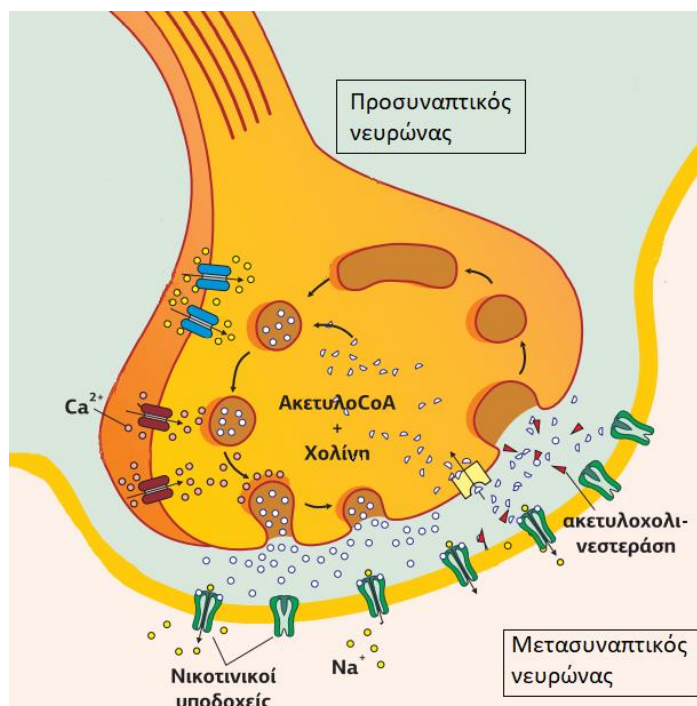
Σε περιπτώσεις επικράτησης του συμπαθητικού, για παράδειγμα κατά την άσκηση, ο εισπνεόμενος αέρας αυξάνεται και έτσι ενεργοποιείται το αντανακλαστικό Hering-Breuer, ώστε να μην γίνει υπέρμετρη διάταση των πνευμόνων. Υπάρχουν πνευμονικοί υποδοχείς διάτασης στην στοιβάδα των λείων μυϊκών ινών, οι οποίοι ενεργοποιούνται και μεταφέρουν στο αναπνευστικό κέντρο του προμήκου, με αποτέλεσμα την δημιουργία αρνητικής ανάδρασης, αναστέλλοντας τους εισπνευστικούς νευρώνες (Sherwood, 2016)

Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ) νευρώνει τα ΛΜΚ τροποποιώντας την συσταλτική δραστηριότητα του μυός, ρυθμίζοντας έτσι τον ρυθμό και την δύναμη των συστολών. Αυτό εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό των χολινεργικών και αδρενεργικών υποδοχέων κάθε κυττάρου ώστε να είναι ικανό να ανταποκρίνεται στους νευροδιαβιβαστές του ΑΝΣ. Εκτός από το ΑΝΣ ικανότητα να επηρεάζουν τον ρυθμό και την δύναμη των συστολών των ΛΜΚ, έχουν ορμόνες, τοπικοί μεταβολίτες και φάρμακα. Σε μερικές περιπτώσεις η νεύρωση των ΛΜΚ είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα ο ρυθμός και η δύναμη των συστολών των ΛΜΚ να εξαρτάται εξ' ολοκλήρου από χημικούς παράγοντες είτε αυτοί είναι τοπικοί είτε φτάνουν στους πνεύμονες μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. (Sherwood, 2016)

1.2.1.Υποδοχείς ακετυλοχολίνης

Η ακετυλοχολίνη (ACh) είναι ο ενδογενής νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται από τις μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού. Οι υποδοχείς ακετυλοχολίνης (AChRs) χωρίζονται στους ιοντοτροπικούς νικοτινικούς υποδοχείς (nAChRs) και τους μεταβοτροπικούς μουσκαρινικούς υποδοχείς (mAChRs).

Η ACh του νευρικού συστήματος συντίθεται από τη χολίνη και το ακέτυλοl-CoA, με τη δράση του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Choline acetyltransferase - ChAT), αποθηκεύεται σε κυστίδια όπου μεταφέρεται με τον κυστιδικό μεταφορέα της ACh (Vesicular acetylcholine transporter - VAChT). Απελευθερώνεται με εξωκυττάρωση από τον προσυναπτικό νευρώνα στην συναπτική σχισμή (**Εικόνα 5**). (Chen et al, 2019; Jakubik & El-Fakahany, 2020)



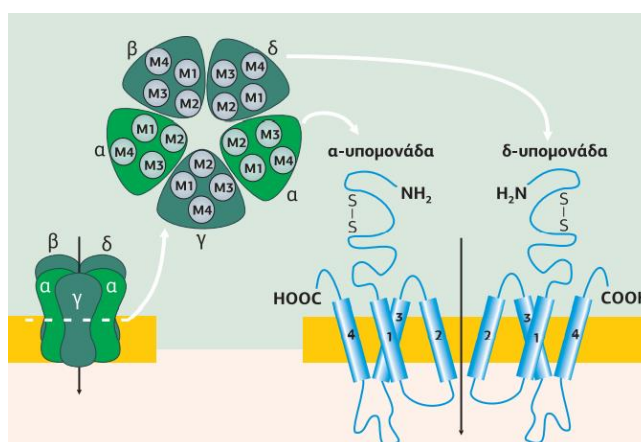
Εικόνα 5. Σύνθεση ακετυλοχολίνης στον προσυναπτικό νευρώνα και μεταφορά της στην σύναψη. Πηγή: Ζίφα Α. (2019).

1.2.1.1. Νικοτινικοί υποδοχείς (nACh)

Οι nAChRs, ήταν οι πρώτοι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών που ανακαλύφθηκαν. Είναι ιοντοτροπικοί υποδοχείς κατιόντων, που μεσολαβούν στην γρήγορη μετάδοση του μηνύματος στην συναπτική σχισμή. (Tsetlin, 2020; Chen et al, 2019; Ζίφα, 2019) Ο νικοτινικός υποδοχέας αποτελείται από πέντε υπομονάδες. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές (M1-M4), ένα μεγάλο NH₂-τελικό άκρο με το χαρακτηριστικό δισουλφιδικό (S-S) δεσμό, και ένα κοντό εξωκυτταρικό COOH-άκρο (**Εικόνα 6**). Έχουν χαρακτηριστεί δεκαεπτά υπότυποι nAChR, από τους οποίους 12 εντοπίζονται στους νευρώνες (α2-α10 and β2-β4) και 5 στα μυϊκά κύτταρα (α1, β1, δ, γ and ε). (Tsetlin, 2020; Chen et al, 2019; Ζίφα, 2019)

Η δέσμευση της ACh ή αγωνιστών των νικοτινικών υποδοχέων (π.χ νικοτίνη) στους nAChRs οδηγεί σε εκπόλωση της μεμβράνης με αποτέλεσμα το άνοιγμα τασεοεξαρτώμενων ιοντικών διαύλων, με αποτέλεσμα την μετακίνηση ιόντων. Η είσοδος ασβεστίου από τασεο-εξαρτώμενους διαύλους προκαλεί την απελευθέρωση μορίων, όπως νευροδιαβιβαστές, αυξητικούς παράγοντες μέσω εξωκυττάρωσης. (Chen et al, 2019)

Νικοτινικοί υποδοχείς που βρίσκονται προσυναπτικά, ρυθμίζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών όπως ακετυλοχολίνης, ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνης κ.α. Έχουν βρεθεί επίσης και νικοτινικοί υποδοχείς που διαθέτουν θέσεις δέσμευσης εκτός από τις θέσεις δέσμευσης για τον εγγενή νευροδιαβιβαστή. Έχει προταθεί η ύπαρξη μιας αλλοστερικής ρυθμιστικής θέσης, στην οποία μπορεί να δεσμευτεί ένας μη ανταγωνιστικός ενεργοποιητής. (Whitehouse, 2014)



Εικόνα 6. Δομή νικοτινικού υποδοχέα, όπου διακρίνονται οι υπομονάδες και οι διαμεμβρανικές περιοχές. Πηγή: Ζίφα Α. (2019).

Η διέγερση των nAChR ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με τον υπότυπο του νικοτινικού υποδοχέα και το τύπο του κυττάρου. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του υπότυπου α7-nAChR, από την νικοτίνη, ενεργοποιεί τα μονοπάτια σηματοδότησης Ras/ERK/MAPK και JAK2/STAT/-PI3K, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. (Chen et al, 2019)

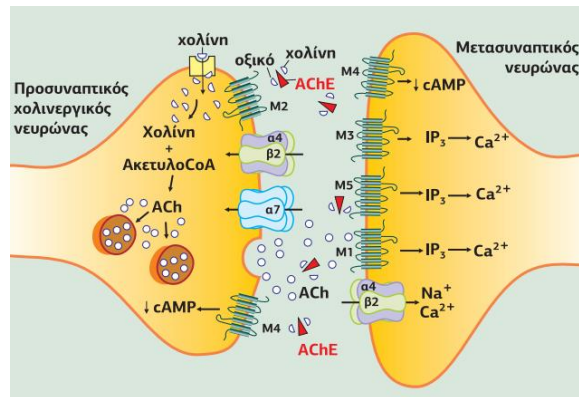
Απορρύθμιση των nAChR σε συνδυασμό με μειωμένη έκφραση μουσκαρινικών υποδοχέων (υπότυπος M2) στον φλοιό, σχετίζεται με νευρολογικές διαταραχές όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των nAChRs σε μη νευρικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κερατινοκυττάρων του δέρματος, καθώς και καρκινικών κυττάρων. Μελέτες στα καρκινικά κύτταρα, έδειξαν ότι nAChR προάγουν την ογκογένεση μέσω AChRs απουσία νικοτίνης ή αγωνιστών AChR. (Chen et al, 2019)

1.2.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς (mACh)

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια A (Ροδοψίνης) των GPCR. Όπως όλοι οι GPCRs διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές, 3 ενδοκυτταρικούς βρόχους, 3 εξωκυτταρικούς βρόχους, μεγάλο ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο και μικρό εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από πέντε διακριτούς υπότυπος, M1 - M5, που μπορούν να συνδέονται με ετεροτριμερές G πρωτεΐνες Gαβγ (Gαq ή Gαi). (Kruse et al, 2014; Coulson & Fryer, 2003; Jakubik & El-Fakahany, 2020; Ζίφα, 2019; Chen et al, 2019)

Οι M1, M3 και M5 έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την Gq/11 και το μονοπάτι δράσης της PLC. Επιπλέον έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A2, τη φωσφολιπάση D, την κινάση τυροσίνης, καθώς και διαύλους ασβεστίου. Οι M2 και M4 αναστέλλουν την δράση της αδενυλικής κυκλάσης με την ενεργοποίηση της Gi/o και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τη

φωσφολιπάση A2 ως δεύτερο αγγελιοφόρο. Παράλληλα οι M2-M4 συνδεδεμένοι με μια Gα1 με μια αδενυλική κυκλάση, μειώνουν την παραγωγή cAMP και την απελευθέρωση της ACh. **(Εικόνα 7)** (Kruse et al, 2014; Coulson & Fryer, 2003; Jakubik & El-Fakahany, 2020; Ζίφα, 2019; Chen et al, 2019)



Εικόνα 7. Χολινεργική σύναψη. Διακρίνονται νικοτινικοί και μουσκαρινικοί υποδοχείς και συνοψίζεται η δράση τους. Πηγή: Ζίφα Α. (2019).

Οι υποδοχείς M1 (M1R) εντοπίζονται στα σώματα των μεταγαγγλιακών νευρώνων και μεσολαβούν στο αργό διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό. Η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων M2 (M2R) στην καρδιά υποδηλώνει τη σημασία τους στη συστολή των μυοκυττάρων και στον έλεγχο του καρδιακού ρυθμού. M2Rs εκφράζονται επίσης και στο ΚΝΣ π.χ στον θάλαμο. Επιπλέον, οι M2R συνεκφράζονται με τους υποδοχείς M3 (M3R) στους λείους μύες και σε συνεργασία, ελέγχουν την συστολή των ΛΜΚ. Άλλες διαδικασίες όπως η θερμορύθμιση, οι γνωστικές λειτουργίες και η μνήμη ρυθμίζονται εν μέρει από το M2R . (Chen et al, 2019)

Ο υποδοχέας M3 μεσολαβεί στην δράση της ACh στο ΚΝΣ και ΠΝΣ με διάφορες θεμελιώδεις φυσιολογικές λειτουργίες. (Chen et al, 2019)

Ο υποδοχέας M4 (M4R) ανήκει σε μια μεγαλύτερη οικογένεια συζευγμένων με πρωτεΐνη G υποδοχέων που συνδέονται με ετεροτριμερείς πρωτεΐνες Gi/ο. Εντοπίζεται κυρίως στο ΚΝΣ και ενεργοποιείται μέσω αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης, διάσπασης φωσφωϊνοσιτιδίων και από διαύλους καλίου που ρυθμίζουν την αναστολή των αυτοϋποδοχέων ACh. Οι M4Rs εκφράζονται κυρίως στο ραβδωτό σώμα και η ενεργοποίησή τους αναστέλλει την επαγόμενη από ντοπαμίνη κινητική διέγερση. Η απορρύθμιση των M4R είναι δυνατόν να προκαλέσει ψυχικές διαταραχές, όπως σχιζοφρένεια και νευροεκφυλιστικές διαταραχές, για παράδειγμα νόσο Alzheimer ή Parkinson. (Chen et al, 2019)

Ο τελευταίος μουσκαρινικός υποτύπος, ο υποδοχέας M5 (M5R), ανήκει στην υπεροικογένεια των GPCRs όπου συνδέονται με πρωτεΐνη Gα. Η ενεργοποίηση του M5R οδηγεί σε ανακύκλωση φωσφολιπιδίων και μεταβολή της συγκέντρωσης ασβεστίου εντός των κυττάρων. (Chen et al, 2019)

1.3. Μουσκαρινικοί υποδοχείς στο αναπνευστικό σύστημα

Η επίδραση του παρασυμπαθητικού στους λείους μύες του αναπνευστικού, διαμεσολαβείται από μουσκαρινικούς υποδοχείς που βρίσκονται σε αυτούς. Αυτοί οι υποδοχείς βρίσκονται προ-συνοπτικά σε νευρικές απολήξεις του παρασυμπαθητικού και μετά-συναπτικά σε λείες μυϊκές ίνες, στο αγγειακό επιθήλιο και σε βλεννογόνους αδένες. Μετά-συναπτικά οι μουσκαρινικοί υποδοχείς στις λείες μυϊκές ίνες του αναπνευστικού αποτελούνται κυρίως από τους υπότυπους M2 και M3. (Coulson & Fryer, 2003)

Οι mAChRs βρίσκονται κυρίως στους βρόγχους, αλλά η πυκνότητά τους αλλάζει στα διάφορα τμήματα του βρογχικού δέντρου. Μελέτες αυτοραδιογραφίας έδειξαν ότι μουσκαρινικοί υποδοχείς τύπου M1, M2 και M3 είναι παρόντες σε όλο το αναπνευστικό σύστημα σε διάφορα είδη οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Οι M1R στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου εκφράζονται κυρίως στους περιφερειακούς ιστούς του αναπνευστικού και στο κυψελιδικό τοίχωμα, αλλά δεν έχουν βρεθεί σε μεγαλύτερους αεραγωγούς. (Matera & Cazzola, 2016). Οι M2R εντοπίζονται προσυναπτικά και δρουν ως αυτοϋποδοχείς αναστέλλοντας την απελευθέρωση ACh από τους προσυναπτικούς νευρώνες. Οι M2R δεν φαίνεται να έχουν άμεση επίδραση στη σύσπαση των λείων μυών των αεραγωγών. Η ενεργοποίησή τους προκαλεί διαστολή των αιμοφόρων αγγείων των αεραγωγών μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το ενδοθήλιο. Συνδέονται με πρωτεΐνης Gi και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση μειώνοντας έτσι το cAMP. Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση μέσω Gs και αυξάνουν το cAMP, προκαλούν ενεργοποίηση Ca²⁺- εξαρτώμενων διαύλων K⁺, με αποτέλεσμα χάλαση των ΛΜΚ. Οι M2R αντιτίθενται σε αυτή την δράση των β-αδρενεργικών υποδοχέων καθώς ελαττώνουν το cAMP. M2R εκφράζονται επίσης και από ινοβλάστες των αεραγωγών. (Cazzola, Page & Matera, 2013; Matera & Cazzola, 2016; Coulson & Fryer, 2003). Τέλος οι M3R εκφράζονται στα ΛΜΚ των αεραγωγών, υποβλεννογόνιων αδένων που εκκρίνουν βλέννα και στο αγγειακό ενδοθήλιο του πνεύμονα. Φυσιολογικά η ACh που απελευθερώνεται από το πνευμονογαστρικό νεύρο ενεργοποιεί τους M3R των ΛΜΚ και προκαλεί τη συστολή τους. Έρευνες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν M3R έδειξαν ότι η συστολή των ΛΜΚ ως απόκριση στην ACh μεσολαβείται από τους M3 υποδοχείς. Στους περιφερειακούς αεραγωγούς αν και εκφράζονται υποδοχείς M3, δεν υπάρχει χολινεργική νεύρωση. Αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν από την ACh που απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν ChAT, ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. (Cazzola, Page & Matera, 2013; Matera & Cazzola, 2016; Cazzola, Calzetta & Matera, 2021)

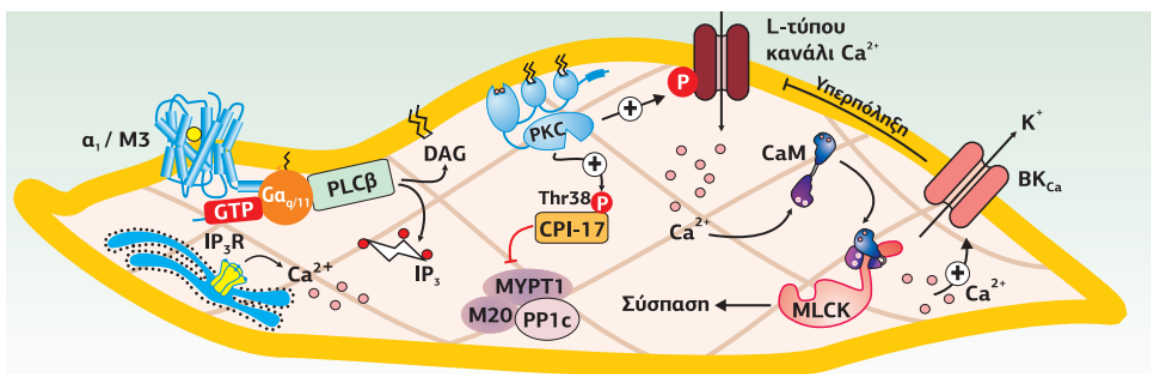
Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στο άσθμα ή στην ΧΑΠ, η ανεπαρκής λειτουργία των προσυναπτικών M2R οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση ACh με αποτέλεσμα υπερέκκριση βλέννας, αγγειοδιαστολή και ενισχυμένη βρογχοσυστολή. Παρόλα αυτά η λειτουργία των μεταγαγγλιακών M1

και M3 μουσκαρινικών υποδοχέων που υπάρχουν στους λείους μυς των αεραγωγών, στους υποβλεννογόνιους αδένες και στα αιμοφόρα αγγεία δεν φαίνεται να μεταβάλλονται στους ασθενείς με άσθμα ή ΧΑΠ. (Coulson & Fryer, 2003)

1.3.1. Ο ρόλος των μουσκαρινικών υποδοχέων στη συστολή των ΛΜΚ του αναπνευστικού

Η συστολή των ΛΜΚ, ως απόκριση στην ACh που απελευθερώνεται από μεταγαγγλιακούς νευρώνες, διαμεσολαβείται κατά κύριο λόγο από τους M3R που βρίσκονται μετασυναπτικά. Η ατροπίνη έχει την ικανότητα να αποτρέπει την συστολή, ενώ με την διάσπαση του νευροδιαβιβαστή από την ακετυλοχολινεστεράση, η συστολή των ΛΜΚ τερματίζεται. Όταν η ACh συνδεθεί στον M3R, συζευγμένο με G α -πρωτεΐνη, ενεργοποιούνται μονοπάτια που οδηγούν τελικά στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca²⁺, φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και τελικά τη συστολή των ΛΜΚ. Οι προσυναπτικοί M2R στις απολήξεις των μεταγαγγλιακών νευρώνων, τόσο στους κεντρικούς αεραγωγούς όσο και στους περιφερικούς βρόγχους, μπορούν να αναστείλουν την απελευθέρωση της ACh και να αναστείλουν την συστολή των ΛΜΚ. (Coulson & Fryer, 2003; Lam, Lamanna & Bourke, 2019)

Ειδικότερα, το μονοπάτι σηματοδότησης ξεκινά με την απελευθέρωση της ACh από τα παρασυμπαθητικά νεύρα και την δέσμευση της στους M3R. (Coulson & Fryer, 2003; Pelaia et al, 2015; Ζίφα, 2019). Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί, τότε η G α_q αποσυνδέεται από το σύμπλοκο με την G- β, γ και ενεργοποιεί την PLC β , η οποία υδρολύει την PIP₂ με αποτέλεσμα την παραγωγή DAG και IP₃. Η IP₃ ενεργοποιεί τους υποδοχείς IP₃ του ενδοπλασματικού δικτύου, οι οποίοι απελευθερώνουν Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Το Ca²⁺ δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη και το σύμπλοκο Ca²⁺/καλμοδουλίνη ενεργοποιεί MLCK. Η MLCK φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική, ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλώντας τη συστολή των ΛΜΚ (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μεταγωγικό μονοπάτι σύσπασης των λείων μυϊκών κυττάρων. Πηγή: Ζίφα Α. (2019).

Εκτός από το IP₃, η απελευθέρωση Ca²⁺ από το σαρκοπλασματικό δίκτυο μπορεί να προκληθεί και με την ενεργοποίηση του CD38. Το CD38 οδηγεί στη δημιουργία cADPR που αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς ρυανοδίνης και τελικά οδηγεί σε απελευθέρωση ασβεστίου. Επιπλέον, το Ca²⁺ μπορεί να εισέλθει στα ΛΜΚ από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω διαύλων SOCC, κανάλια ιόντων Ca²⁺ (receptor-operated Ca²⁺ channels - ROCC) ή τάσεοεξαρτώμενους διαύλους Ca²⁺ (voltage-operated Ca²⁺ channels - VOCC). Η ενεργοποίηση των VOCC, ωστόσο, συνήθως αναστέλλεται λόγω του ανοίγματος των διαύλων K⁺, την έξοδο K⁺ και την επαναπόλωση του κυττάρου. (Pelaia et al, 2008)

Η DAG ενεργοποιεί την PKC και τα μονοπάτια σηματοδότησης της Rho κινάσης. Μέσω αυτών των 2 μονοπατιών αναστέλλεται η MLCP και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί ευαισθητοποίησης στο Ca²⁺. (Pelaia et al, 2008)

Σε χρόνιες παθήσεις όπως στο άσθμα ή την ΧΑΠ, πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην αυξημένη σύσπαση των αεραγωγών αλλά και στη μειωμένη χάλαση τους. Σε αυτές τις παθήσεις, παρατηρείται συνήθως μια αυξημένη αλλά αναστρέψιμη παρασυμπαθητική δραστηριότητα. Επιπλέον, σε ασθενείς με άσθμα, ο χολινεργικός παρασυμπαθητικός τόνος συμβάλλει στη σύσπαση των λείων μυών στους βρόγχους και έχει ως αποτέλεσμα την στένωση των αεραγωγών. Οι ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων προκαλούν αποτελεσματική βρογχοδιαστολή, γεγονός που τους κάνει κατάλληλους για χρήση σε θεραπεία κυρίως ασθενών με ΧΑΠ αλλά και σε μερικές περιπτώσεις ασθενών με άσθμα. (Lam, Lamanna & Bourke, 2019; Matera & Cazzola, 2016)

1.3.1.2. Μουσκαρινικοί υποδοχείς και πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ

Οι Μουσκαρινικοί υποδοχείς που φαίνεται να εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, είναι οι υπότυποι M2 και M3. Μελέτες σε καλλιέργειες ΛΜΚ έδειξαν ότι η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων από μόνη της δεν αρκεί συνήθως να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, ο συνδυασμός τους όμως με αυξητικούς παράγοντες, όπως PDGF, φαίνεται να έχει μιτογόνο δράση στα ΛΜΚ. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός μουσκαρινικού αγωνιστή, και χαμηλών επιπέδων EGF ή 5% FBS προκαλεί πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρουραίου. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι σε ΛΜΚ ανθρώπων ή βοός, ο πολλαπλασιασμός που μεσολαβείται από τους μουσκαρινικούς υποδοχείς απαιτεί την ύπαρξη ενός αυξητικού παράγοντα ο οποίος ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK. (Oenema et al, 2013; Stamatiou et al, 2014; Placeres-Uray et al, 2013; Gerthoffer et al, 2012)

Παράγοντες όπως η ACh, που δρουν μέσω GPCRs, έχουν συσχετιστεί με πάχυνση της στοιβάδας των ΛΜΚ στο άσθμα σε ανθρώπους και σε μοντέλα ασθματικών ζώων. Η δέσμευση της ACh στους μουσκαρινικούς υποδοχείς, με τη συμμετοχή μερικών ενδοκυτταρικών δεύτερων

διαβιβαστών (cGMP, cAMP, Ca²⁺), μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (διεργασίες φωσφο/αποφωσφορυλίωσης) για την ενεργοποίηση ή την ρύθμιση πυρηνικών παραγόντων (nuclear factors) που εμπλέκονται στον διπλασιασμό του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Gerthoffer et al, 2012; Placeres-Uray et al, 2013) Σε πειράματα που έγιναν σε καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, έδειξαν ότι η μακροχρόνια επώαση τους (3-15 ημέρες) με μουσκαρινικούς αγωνιστές (ACh ή καρβαχόλη) οδηγεί σε μεταβολή του φαινότυπου τους και σε ελαττωμένη έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων (Stamatiou et al, 2014). Η δυνατότητα των μουσκαρινικών αγωνιστών να προκαλούν πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ εξαρτάται από την έκφραση των μουσκαρινικών υποδοχέων στα κύτταρα. Για παράδειγμα τόσο ακετυλοχολίνη όσο και η καρβαχόλη προκάλεσαν σύνθεση DNA και αύξησαν τον αριθμό των ΛΜΚ, που είχαν συστατικό φαινότυπο όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 7 μέρες (starvation). Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ φαίνεται να προκαλείται μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και MAPK. (Stamatiou et al, 2014)

Η διέγερση των μουσκαρινικών υποδοχέων, σχετίζεται με την ενεργοποίηση της MAPK και PI3K. Επιπλέον, η ενεργοποίηση και η φωσφορυλίωση των ERKs συμβαίνει ως αποτέλεσμα της δράσης αγωνιστών των M2 και M3 υποδοχέων. (Placeres-Uray et al, 2013). Η οδός σηματοδότησης των M3 υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνη G_q περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση του Raf-1 από την PKC. Η οδός σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων M2, που συνδέονται με Gi/o πρωτεΐνες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της PI3K. (Placeres-Uray et al, 2013)

Εκτός από τη μιτογόνο δράση των μουσκαρινικών αγωνιστών στα ΛΜΚ, έχει περιγραφεί και μηχανισμός αναστολής του πολλαπλασιασμού ΛΜΚ αναπνευστικού ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης 1) του καταρράκτη σηματοδότησης που ενεργοποιεί την κυκλική φωσφορική γουανοσίνη και την πρωτεϊνική κινάση G (cGMP/PKG) και 2) της MAPK: p38 και JNK. Η αυξημένη παραγωγή της cGMP που προκαλείται από την δράση μουσκαρινικών αγωνιστών, έχει παρατηρηθεί σε λείους μύες τραχείας βοοειδών. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αύξηση της cGMP, περιλαμβάνουν την διέγερση μουσκαρινικών υποδοχέων, ενεργοποίηση πρωτεΐνης G και επακόλουθη ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης- ευαίσθητης στο NO (NO-sGC) και/ή τον υποδοχέα του Νατριουρητικού Πεπτιδικού (NPR-GC) που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. (Placeres-Uray et al, 2013) Έχει περιγραφεί η δράση του M2 υποδοχέα, ο οποίος συνδέεται με μια πρωτεΐνη Gi/o. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την NO-sGC στον λείο μυ βοοειδών, ανεξάρτητα από την ύπαρξη μονοξειδίου του αζώτου (NO). Ομοίως, τα σύμπλοκα του υποδοχέα M3 με G_q πρωτεΐνη, έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση NPR-GC και παραγωγή cGMP, το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει την PKG. Η PKG είναι ικανή να φωσφορυλιώσει μεταγραφικούς

παράγοντες που σχετίζονται με την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο, επίσης να επάγει την αύξηση των πρωτεϊνών που οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. (Placeres-Uray et al, 2013)

Στο άσθμα, έχει βρεθεί αύξηση των ΛΜΚ συσταλτικού φαινότυπου στους κεντρικούς αλλά και περιφερικούς αεραγωγούς που σχετίζεται με υπερπλασία και υπερτροφία των κυττάρων. Έτσι, η αυξημένη μάζα των ΛΜΚ μπορεί να οφείλεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που προκαλείται από νευροδιαβιβαστές, αυξητικούς παράγοντες, αλλά και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές. (Gerthoffer et al, 2012)

1.3.2. Μουσκαρινικοί προσδέτες

Η δημιουργία εκλεκτικών προσδετών για τους μουσκαρινικούς υποδοχείς είναι δύσκολη λόγω της αυξημένης ομολογίας μεταξύ των υποτύπων των υποδοχέων, αλλά και της συνέκφρασης πολλών υποδοχέων στον ίδιο ιστό. Πειραματικά το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με την ανάπτυξη knockout ποντικών ή την επαγωγή της έκφρασης ενός μόνο τύπου υποδοχέα. Αυτό οδήγησε σε καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας κάθε υπότυπου του υποδοχέα και επέτρεψε την δημιουργία νέων προσδετών, ικανών για ειδική ενεργοποίηση συγκεκριμένου υπότυπου. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Γενικά, όταν εξετάζεται η συναγωνιστική δράση ενός μορίου, ελέγχονται μόρια ικανά να αλληλεπιδράσουν με την ορθοστερική θέση του υποδοχέα. Ο χαρακτηρισμός ανταγωνιστών για τους πέντε τύπους μουσκαρινικών υποδοχέων, έχει επιτευχθεί με τεχνικές που χρησιμοποιούν ραδιοσημασμένους προσδέτες, όπως την [³H]N-μεθυλοσκοπολαμίνη σε παρασκευάσματα κυτταρικών μεμβρανών που εκφράζουν μόνο έναν υποτύπο μουσκαρινικού υποδοχέα. Οι τιμές σταθερών συγγένειας (Kd) που ελήφθησαν, επέτρεψαν τον χαρακτηρισμό της επιλεκτικότητας ή μη για πληθώρα προσδετών. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Ο όρος *αγωνιστής* αναφέρεται σε μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να συνδέονται με έναν υποδοχέα και να τον ενεργοποιούν προκαλώντας αλλαγές στο κύτταρο. *Ανταγωνιστής* καλείται ένα μόριο που παρεμποδίζει τη δράση ενός αγωνιστή. Οι αγωνιστές μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την δράση τους σε πλήρεις, μερικούς και αντίστροφους, ενώ οι ανταγωνιστές, σε ανταγωνιστικούς και μη αντιστρεπτούς (Insurmountable antagonists). (Jakubik & El-Fakahany, 2020; Pleunry, 2004) Ένας *πλήρης αγωνιστής* μπορεί να προκαλέσει την μέγιστη απόκριση. Η απόκριση στο κύτταρο μπορεί να ποικίλει ακόμη και όταν ο πλήρης αγωνιστής καταλαμβάνει τον ίδιο αριθμό υποδοχέων. Ένας *μερικός αγωνιστής*, όπως λέει και το όνομα του, προκαλεί μερική απόκριση και σε καμία περίπτωση δεν έχει την ικανότητα πρόκλησης της μέγιστης απόκρισης, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Αυτό συνεπάγει ότι ένας μερικός αγωνιστής έχει χαμηλότερη αποτελεσματικότητα από έναν πλήρη

αγωνιστή. Οι *αντίστροφοι αγωνιστές* συνδέονται με τους υποδοχείς αλλά έχουν ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα από τους πλήρεις ή μερικούς αγωνιστές. (Jakubik & El-Fakahany, 2020; Pleuivy, 2004) Αντίστροφοι αγωνιστές έχουν περιγραφεί σε πολλά συστήματα στα οποία εμπλέκονται υποδοχείς. Οι καλύτερα περιγραφόμενοι αντίστροφοι αγωνιστές είναι τα παράγωγα β-καρβολίνης στον υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης. Οι αγωνιστές σε αυτόν τον υποδοχέα ενισχύουν, οι αντίστροφοι αγωνιστές μειώνουν και οι ανταγωνιστές δεν έχουν καμία επίδραση στη μετάδοση του σήματος από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). (Jakubik & El-Fakahany, 2020; Pleuivy, 2004)

Οι *ανταγωνιστικοί αγωνιστές* συνδέονται αντιστρεπτά σε κοινούς με τους αγωνιστές υποδοχείς, με την διαφορά ότι δεν προκαλούν καμία απόκριση. Αν αυξηθεί η συγκέντρωση του αγωνιστή παρουσία του ανταγωνιστή η δράση του δεύτερου καταργείται. Σε αντίθεση με τους ανταγωνιστικούς αγωνιστές δεν συμβαίνει το ίδιο στην περίπτωση των *μη αντιστρεπτών ανταγωνιστών*, οι οποίοι συνδέονται ισχυρά στον υποδοχέα και δεν αποσυνδέονται ακόμα και σε αυξημένη συγκέντρωση του αγωνιστή. Μη αντιστρεπτοί ανταγωνιστές καλούνται και οι *αλλοστερικοί ανταγωνιστές*, δηλαδή αυτοί που συνδέονται σε θέσεις διαφορετικές από αυτές του αγωνιστή. Οι αλλοστερικοί ανταγωνιστές προκαλούν αλλαγή στη διαμόρφωση της θέσης δέσμησης του αγωνιστή με αποτέλεσμα την αύξηση (θετική δράση) ή μείωση (αρνητική δράση) στη δέσμηση ή δράση ενός αγωνιστή που προσδέεται στην ορθοστερική θέση (π.χ. ακετυλοχολίνη). (Jakubik & El-Fakahany, 2020; Pleuivy, 2004)

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στους μουσκαρινικούς υποδοχείς, εμφανίζεται το φαινόμενο του αλλοστερισμού, το οποίο αναλύεται εκτενώς στην ενότητα (1.4.2.1). Γενικά οι υποδοχείς ή ένζυμα μπορούν να διαθέτουν μια ειδική θέση, η οποία όταν καταληφθεί από ένα προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση μιας άλλης περιοχής του υποδοχέα. Στην περίπτωση των μουσκαρινικών υποδοχέων τροποποιείται η θέση δέσμησης του ενδογενή προσδέτη (ACh). (Greig, Reale & Tata, 2013)

Πρόσφατα έχει προταθεί ότι οι πολυαμίνες μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα καθολικό (universal) πρότυπο, για τον σχεδιασμό νέων εκλεκτικών μουσκαρινικών προσδετών. Ένα παράδειγμα είναι η C-τριπυραμίνη που μπορεί να διακρίνει τους M1 και M2 υποδοχείς από τους άλλους υποτύπους. (Greig, Reale & Tata, 2013) Μεταξύ των μουσκαρινικών ανταγωνιστών, οι τοξίνες (MT1, MT2, MT7) που απομονώνονται από το δηλητήριο του φιδιού *Dendroaspis angusticeps* και *Dendroaspis polylepsis*, δείχνουν υψηλή συγγένεια για συγκεκριμένους υπότυπους των μουσκαρινικών υποδοχέων (π.χ. MT7 για τον υπότυπο M1). (Greig, Reale & Tata, 2013)

Εκτεταμένες μελέτες σε συστήματα, τα οποία εκφράζουν διάφορους υπότυπους των υποδοχέων, είτε εκ του φυσικού, είτε έπειτα από επιμόλυνση, έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα ενός αγωνιστή δεν εξαρτάται μόνο από τη συγγένεια δέσμησης στον υπότυπο του υποδοχέα, αλλά

μπορεί επίσης να τροποποιηθεί από την σύσταση του κυττάρου ή τον ιστό. (Greig, Reale & Tata, 2013)
 Η επιλεκτική δέσμευση σε ένα μόνο υπότυπο υποδοχέα και ακολουθούμενη από τη λειτουργική του ενεργοποίηση έχει εφαρμοστεί στο σχεδιασμό μουσκαρινικών αγωνιστών. Ένα παράδειγμα είναι ο αγωνιστής Vedaclidine (LY297802) που φαίνεται να είναι εκλεκτικός για τον υποτύπο M4 και επηρεάζει την μετάδοση του πόνου.

Πίνακας 2. Αγωνιστές και ανταγωνιστές μουσκαρινικών υποδοχέων και οι υποδοχείς τους. Πηγή: Greig et al 2013.

		Υποδοχέας
Αγωνιστές	Alvameline	M1
	Xanomeline	M1>M4
	Cevimeline	M1
	Vadaclidine (LY297802)	M4
Ανταγωνιστές	Pirenzepine	M1>M4
	Methoctramine	M2>M4
	Gallamine	M2>M4
	4-DAMP	M3>M1>M2
	Tropicamide	M4

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται μερικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων και οι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται. Οι αγωνιστές αυτοί χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ή βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές. (Greig, Reale & Tata, 2013)

1.3.2.1. Το φαινόμενο της αλλοστερικής τροποποίησης στους μουσκαρινικούς υποδοχείς

Η αλλοστερική τροποποίηση βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων μορίων να δεσμεύονται σε μια διαφορετική θέση του υποδοχέα από αυτή της θέσης δέσμευσης του ορθοστερικού προσδέτη (ενεργό κέντρο) και η οποία καλείται αλλοστερική θέση. Με την πρόσδεση τους στη θέση αυτή, οι αλλοστερικοί προσδέτες, έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την ορθοστερική θέση δέσμευσης. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Έχουν περιγραφεί αρκετοί αλλοστερικοί προσδέτες των μουσκαρινικών υποδοχέων, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι ικανοί να αποτρέψουν (negative cooperativity) την πρόσδεση μη-εκλεκτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών στον υποδοχέα. Για παράδειγμα, η γαλλαμίνη και η μεθοκτραμίνη είναι αλλοστερικοί προσδέτες που μειώνουν την ικανότητα πρόσδεσης του ανταγωνιστή N-μεθυλοσκοπολαμίνη και δρουν ως εκλεκτικοί αλλοστερικοί ανταγωνιστές του M2 υποδοχέα. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Οι αλλοστερικοί ρυθμιστές μπορούν να διαχωριστούν σε 3 κατηγορίες: 1) θετικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές, που αυξάνουν την συγγένεια των ορθοστερικών προσδετών (αγωνιστών) με τη θέση δέσμευσης τους, 2) αρνητικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές, που μειώνουν τη συγγένεια των ορθοστερικών προσδετών και 3) ουδέτεροι αλλοστερικοί ρυθμιστές που δεν επηρεάζουν τη

συγγένεια του ορθοστερικού προσδέτη. Πολλές έρευνες κατέδειξαν συγκεκριμένα αμινοξέα που ελέγχουν την δράση διαφόρων αλλοστερικών ρυθμιστών, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών αλλοστερικών “διακοπών” στους μουςκαρινικούς υποδοχείς. (Greig, Reale & Tata, 2013; Nussinov & Tsai, 2012)

Οι αλλοστερικοί ρυθμιστές των μουςκαρινικών υποδοχέων, όπως προαναφέρθηκε, συνδέονται σε μια θέση στον υποδοχέα που είναι χωρικά διαφορετική από αυτή του ενδογενούς διαβιβαστή (ACh). Αφού η θέση δέσμευσης του αγωνιστή-ορθοστερικού συνδέτη και αλλοστερικού ρυθμιστή είναι διαφορετικές, σημαίνει ότι και οι δύο συνδέτες δεν αποκλείεται να συνδεθούν στον υποδοχέα ταυτόχρονα για να σχηματίσουν ένα τριμερές σύμπλοκο. Η δέσμευση όμως του αλλοστερικού ρυθμιστή έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα που οδηγεί σε αλλαγές στη συγγένεια με τον ορθοστερικό προσδέτη. (Greig, Reale & Tata, 2013; Nussinov & Tsai, 2012)

Τα συναγωνιστικά φάρμακα είναι αυτά που δεσμεύονται στην ίδια θέση με τον φυσικό προσδέτη και τον ανταγωνίζονται. Αυτό δεν ισχύει για τα αλλοστερικά φάρμακα που μπορούν να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα υποδοχέα χωρίς να ανταγωνίζονται τους ενδογενείς προσδέτες και ως εκ τούτου μπορούν να δρουν ακόμη και αν ο ενδογενής προσδέτης είναι συνδεδεμένος ταυτόχρονα σε άλλη θέση στον ίδιο στόχο. (Greig, Reale & Tata, 2013; Nussinov & Tsai, 2012) Η δέσμευση ενός αγωνιστή στην εξωκυτταρική πλευρά ενός GPCR οδηγεί σε αλλαγές στην διαμόρφωση του, που επιτρέπουν στον υποδοχέα να ενεργοποιεί τις ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G (Kruse et al, 2013). Διαφορετικοί αγωνιστές μπορεί να ενεργοποιούν και διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Με βάση αυτή την παρατήρηση, έχει προταθεί ότι η σύζευξη διαφορετικών αλλοστερικών τροποποιητών στους υποδοχείς, είναι δυνατόν να τροποποιήσει το μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιείται από τον κλασικό αγωνιστή που συνδέεται στην ορθοστερική θέση του υποδοχέα. (Jakubik & El-Fakahany, 2020)

Από το 1969, οι Lüllmann et al. απέδειξαν ότι οι δι-αμμωνικές ενώσεις αλκανίου, είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν μη ανταγωνιστικά την απόκριση στον συμβατικό μουςκαρινικό αγωνιστή, καρβαχόλη (Lüllmann et al, 1969; Jakubik & El-Fakahany, 2020). Αργότερα, βρέθηκε ότι η γαλαμίνη αναστέλλει, μη ανταγωνιστικά, τη δράση της ακετυλοχολίνης και της καρβαχόλης στα κύτταρα των καρδιακών κόλπων. Οι καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης στους αγωνιστές μετατοπίστηκαν προς τα δεξιά, αλλά το μέγεθος των προοδευτικών μετατοπίσεων μειώθηκε με την αύξηση των συγκεντρώσεων της γαλαμίνης. Όταν η δράση της ακετυλοχολίνης στην καρδιά αξιολογήθηκε σε συνδυασμό με την παρουσία της γαλαμίνης και του ανταγωνιστή ατροπίνης, η αναστολή της λειτουργικής απόκρισης στην καρβαχόλη ήταν μικρότερη από την αναμενόμενη για τις επιδράσεις δύο ανταγωνιστικών ανταγωνιστών ταυτόχρονα. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα

ότι η γαλαμίνη δεσμεύεται σε μια αλλοστερική θέση στον υποδοχέα. Από τότε, έχει ανακαλυφθεί μια μεγάλη ποικιλία αλλοστερικών ρυθμιστών. (Jakubik & El-Fakahany, 2020)

Η ισχυρή αλληλεπίδραση του τιτροπίου με την αλλοστερική θέση δέσμωσης εξηγεί επίσης τη διαφορά μεταξύ της εξαιρετικά αργής κινητικής δέσμωσης και της άμεσης ανασταλτικής δράσης αυτού του βρογχοδιασταλτικού φαρμάκου. Το τιτροπίο προσδένεται σε μια αλλοστερική θέση και έχει άμεσα αποτελέσματα στην λειτουργία του M3 υποδοχέα. (Jakubik & El-Fakahany, 2020)

1.3.2.2. Αλλοστερικοί τροποποιητές

Κατά την διερεύνηση της ομολογίας της θέσης δέσμωσης της ACh, μεταξύ όλων των υποτύπων των μουσκαρινικών υποδοχέων, προέκυψε η ρύθμιση της από αλλοστερικούς προσδέτες. (Greig, Reale & Tata, 2013) Οι αλλοστερικοί αγωνιστές έχουν πολλά πλεονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι ότι η δέσμωση ενός αλλοστερικού μορίου μπορεί να μεταβάλει την εκλεκτικότητα του υποδοχέα. Επιπλέον, με τους αλλοστερικούς προσδέτες, μπορεί να επιτευχθεί κορεσμός, πράγμα που σημαίνει ότι όταν όλες οι θέσεις αλλοστερικής δέσμωσης είναι κατειλημμένες, δεν παρατηρούνται περαιτέρω δράσεις του μορίου. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Έχει επιτευχθεί η δημιουργία αλλοστερικών αγωνιστών για τους μουσκαρινικούς υποδοχείς. Πολλοί έχουν δοκιμαστεί για τη θεραπεία νευρολογικών/ψυχιατρικών διαταραχών, όπως τα ανάλογα 1H-pyrrolo[3,2-C]quinolin-4-(5H)-one (WO2012154731A1) που έχουν χαρακτηριστεί ως αλλοστερικοί ρυθμιστές για τον υπότυπο M4 μουσκαρινικού υποδοχέα. (Greig, Reale & Tata, 2013)

Πίνακας 3. Ενδεικτικά μόρια- αλλοστερικοί τροποποιητές και οι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται. Πηγή: Kruse et al. 2014

Υπότυπος υποδοχέα	Αλλοστερικοί τροποποιητές
M ₁	Tacrine, MT7, Brucine, Staurosporine, BQCA, VU0119498, VU0029627, ML169
M ₂	Gallamine, Alcuronium, C ₇ /3-phth, W84, DUO3, Tacrine, LY2033298, LY2119620
M ₃	N-chloromethyl brucine, WIN62577, VU0119498
M ₄	MT3, Thiochrome, LY2033298, LY2119620, VU0010010, VU0152100
M ₅	VU0119498, VU0238429, ML375

Στον Πίνακα 3 παρατίθενται κάποιοι αλλοστερικοί τροποποιητές. Τα μόρια αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την αλλοστερική ρύθμιση των mAChR. Επιπλέον μερικά αλλοστερικά μόρια έχουν την ικανότητα να συνδέονται και με τους πέντε υποτύπους των mAChR, αλλά στον πίνακα αναφέρεται ο υπότυπος για τον οποίο έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. (Kruse et al, 2014)

Η θέση δέσμευσης της γαλαμίνης και άλλων παρόμοιων μορίων ταυτοποιήθηκε μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} εξωκυτταρικού βρόχου του υποδοχέα. Με την βοήθεια υπολογιστικών μοντέλων μελετήθηκε λεπτομερώς και επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση ορθοστερικών προσδετών με την αλλοστερική θέση στον 2^ο και 3^ο εξωκυτταρικό βρόχο. Ανακαλύφθηκε ότι η σύνδεση των ορθοστερικών προσδετών στους υποδοχείς γίνεται σε δυο στάδια. Αρχικά ο ορθοστερικός προσδέτης προσδέεται στην αλλοστερική θέση, που λειτουργεί ως προθάλαμος, και έπειτα καταλήγει στην ορθοστερική θέση δέσμευσης. Αυτό το μοντέλο πρόσδεσης φαίνεται να είναι κοινό για όλους τους ορθοστερικούς προσδέτες που μελετήθηκαν. (Jakubik & El-Fakahany, 2020)

1.3.2.3. Τιτροπίο

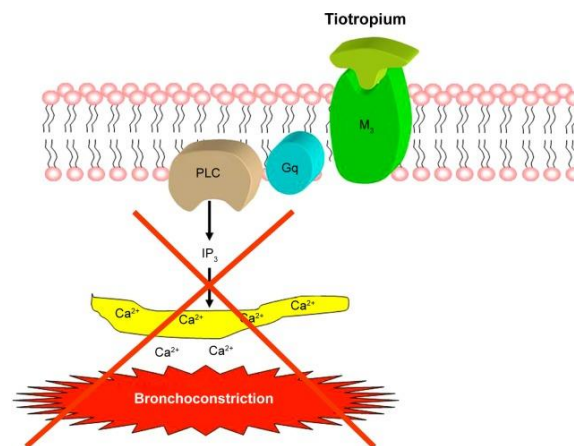
Το τιτροπίο είναι ένα αντιχολινεργικό βρογχοδιασταλτικό φάρμακο. Είναι αναστολέας των κυρίως των M2/M3 μουσκαρινικών υποδοχέων στους λείους μύες του αναπνευστικού και συνδέεται σε αυτούς με μεγάλη χημική συγγένεια. Είναι επιλεκτικό στους μουσκαρινικούς υποδοχείς που μεσολαβούν στην συστολή των λείων μυών των αεραγωγών και έχει μεγάλη διάρκεια δράσης. Έτσι η ανάγκη λήψης του περιορίζεται σε 1 φορά την ημέρα και προκαλεί βρογχοδιαστολή βελτιώνοντας τα συμπτώματα και την ποιότητα ζωής των ασθενών. (Heredia , 2009; Zhou et al, 2017; Anzueto & Miravittles, 2020; Cazzola, Page & Matera, 2013).

Το τιτροπίο ήταν ο πρώτος μουσκαρινικός ανταγωνιστής μακράς διάρκειας που διατέθηκε για την ΧΑΠ. Η θεραπεία με τιτροπίο φαίνεται να βελτιώνει τη λειτουργία των πνευμόνων σε ασθενείς με ΧΑΠ σταδίου 1 (ήπια) και 2 (μέτρια). Πλεονεκτήματα του είναι ότι δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα και δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα να μην προκαλούνται οι χαρακτηριστικές παρενέργειες των αντιχολινεργικών παραγόντων που επηρεάζουν το ΚΝΣ. (Heredia , 2009; Zhou et al, 2017; Anzueto & Miravittles, 2020; Cazzola, Page & Matera, 2013)

Γενικά το τιτροπίο έχει την ικανότητα να προσδέεται σε M1, M2 και M3 υποδοχείς. Σε μελέτες κινητικής, για τον χρόνο δέσμευσης του τιτροπίου σε ανθρώπινα κύτταρα, ο χρόνος ημιζωής για την αποδέσμευση του τιτροπίου είναι μεγαλύτερος στους M3 (8 x) σε σχέση με τους M1 (3,5 x) ή M2 (1 x) υποδοχείς. (Disse et al, 1999)

Οι ανταγωνιστές μεγάλης διάρκειας των μουσκαρινικών υποδοχέων (Long-acting muscarinic antagonists - LAMA) δρουν ως ισχυροί ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων των αεραγωγών. Η δέσμευση του τιτροπίου, με μεγάλη συγγένεια σε M3 υποδοχείς των αεραγωγών, αναστέλλει το μονοπάτι της PLC, με αποτέλεσμα να αποτρέπει πλήρως τη χολινεργική βρογχοσυστολή. Στους υποδοχείς αυτούς παραμένει συνδεδεμένος για ώρες με αποτέλεσμα η

αναστολή των M3 υποδοχέων να διαρκεί για περισσότερο από 24 ώρες και για αυτό τον λόγο η ανάγκη για πρόσληψη του περιορίζεται σε 1 φορά την ημέρα. (Pelaia et al, 2015)



Εικόνα 9. Μονοπάτι δράσης του τιοτροπίου. Πηγή: Pelaia et al 2015

Η αποτελεσματική και μακροχρόνια αναστολή των M3 υποδοχέων, από το τιοτρόπιο, οφείλεται στον πολύ αργό ρυθμό αποδέσμευσης του από αυτούς τους υποδοχείς. Η μοριακή βάση πίσω από αυτό είναι ότι το αρωματικό τμήμα του φαρμάκου διεισδύει βαθιά σε μια υδρόφοβη περιοχή του υποδοχέα M3, όπου οι υδροξυλομάδες του τιοτροπίου σχηματίζουν ισχυρούς διπλούς δεσμούς υδρογόνου με υπόλειμμα ασπαραγίνης (N508) του υποδοχέα. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η βρογχοδιασταλτική δράση του τιοτροπίου δεν μειώνεται κατά τη μακροχρόνια θεραπεία δηλαδή δεν αναπτύσσεται ανοχή στο φάρμακο. (Pelaia et al, 2015) Μελέτη 6.000 ασθενών με ΧΑΠ απέδειξαν ότι το τιοτρόπιο προκάλεσε σταθερή βελτίωση του FEV1 (forced expiratory volume in 1 second) σε όλη τη περίοδο της μελέτης, που διήρκεσε 4 έτη, χωρίς ανιχνεύσιμες απώλειες της αποτελεσματικότητας της βρογχοδιαστολής. (Pelaia et al, 2015)

Το χολινεργικό σύστημα παίζει βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΧΑΠ και οι ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων έχουν βασικό ρόλο στην θεραπεία της. Επίσης μελέτες σε ασθενείς με μη ελεγχόμενο άσθμα ή ασθενείς με άσθμα που έχουν πολυμορφισμούς που προβλέπουν μειωμένη ανταπόκριση στους β2-αγωνιστές και ασθενείς με ταυτόχρονη ΧΑΠ και άσθμα υποστηρίζουν επίσης το βασικό ρόλο των LAMA στην αντιμετώπιση των νόσων αυτών. (Cazzola, Page & Matera, 2013)

Υπάρχουν επί του παρόντος οι βραχείας δράσης ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων (SAMAs) και οι LAMA: το βρωμιούχο ιπρατρόπιο, το βρωμιούχο οξιτρόπιο και το βρωμιούχο τιοτρόπιο. Οι LAMA εμφανίζουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τους SAMA όσον αφορά τη διατήρηση της βρογχοδιαστολής για 24 ώρες. Ωστόσο, ενώ το βρωμιούχο τιοτρόπιο παρέχει βρογχοδιαστολή 24 ωρών, χρειάζονται 2-8 ημέρες για να επιτευχθεί η μέγιστη βρογχοδιαστολή και 2-3 εβδομάδες για να επιτευχθούν επίπεδα σταθερής κατάστασης στο πλάσμα. (Pelaia et al, 2015)

Σκοπός της εργασίας

Ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως είναι το άσθμα και η ΧΑΠ, τα τοιχώματα των αεραγωγών τους εμφανίζουν αναδιαμόρφωση (remodeling), που μεταξύ των άλλων περιλαμβάνει υπερτροφία ή/και υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, που οδηγεί σε ελάττωση της διαμέτρου των αεραγωγών. Επίσης, στις παθήσεις αυτές συχνά εμφανίζεται αυξημένη χολινεργική διαβίβαση και βρογχόσπασμος, που θεραπευτικά αντιμετωπίζεται, μεταξύ των άλλων και με τη χορήγηση ανταγωνιστών των μουσκαρινικών υποδοχέων (αντιχολινεργικά φάρμακα).

Το τιotropio είναι αντιχολινεργικό φάρμακο μακράς διάρκειας με άδεια για μακροχρόνια χρήση ως βρογχοδιασταλτικό για την θεραπευτική αντιμετώπιση της ΧΑΠ και ενίοτε του άσθματος.. Έχει την ικανότητα να προσδένεται σε M1, M2 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς και να ανταγωνίζεται τη δράση της ακετυλοχολίνης. Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας κουνελιού, έδειξε ότι οι ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων γαλαμίνη και ατροπίνη, απουσία αγωνιστή, επάγουν τον πολλαπλασιασμό τους. Η γαλαμίνη και η ατροπίνη δεν χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε νόσους του αναπνευστικού. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή μιτογόνο δράση του τιotropίου, ενός κλασικού αντιχολινεργικού φαρμάκου με ευρεία χρήση σε παθήσεις του αναπνευστικού, στα λεία μυϊκά κύτταρα του αναπνευστικού, κουνελιού και ανθρώπου όπως και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να εμπλέκονται στη δράση του αυτή.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Μέθοδοι και υλικά

2.1. Ανάπτυξη καλλιέργειών

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ΛΜΙ από βρόγχους ανθρώπου (cc-2576, Lonza Group, Basel, Switzerland) και κύτταρα τραχείας κουνελιού (πρωτογενείς καλλιέργειες). Τα κύτταρα ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) με θρεπτικό Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham/F12 (DMEM/F12) που περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum - FBS) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO). Το DMSO είναι κρυοπροστατευτικό υλικό, απαραίτητο για την διατήρηση των κυττάρων στην βαθιά κατάψυξη.

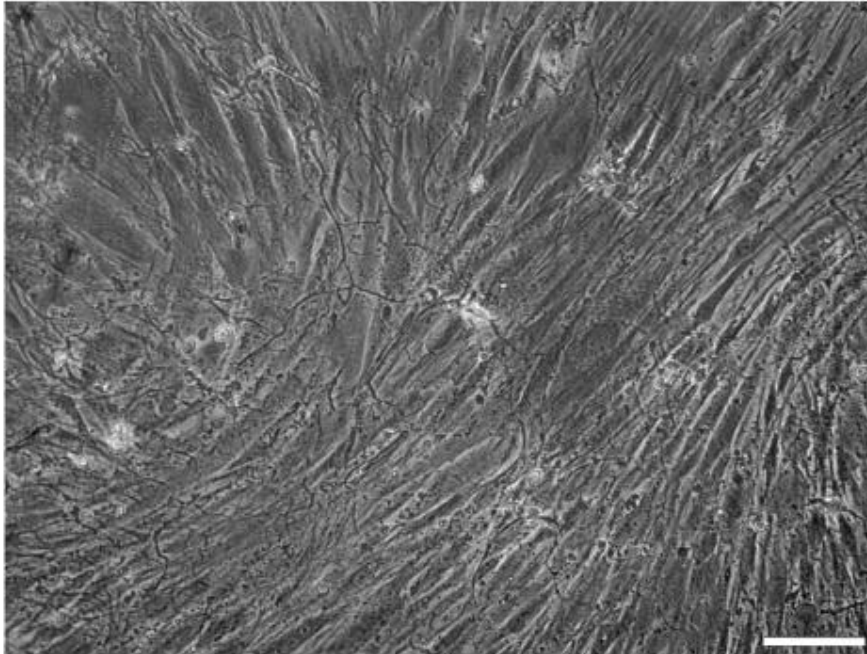
Το DMSO, χρησιμοποιείται ευρέως ως κρυοπροστατευτικό, όπως και σε *in vitro* πειράματα. Στην κυτταρική βιολογία χρησιμοποιείται για να προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση και την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Είναι ένα οργανικό, πολικό, απρωτικό μόριο, αμφιπαθητικής φύσης, ιδιότητες που το κάνουν ιδανικό διαλύτη για μερικώς διαλυτά και μη πολικά μόρια. Σε συγκέντρωση κάτω από 10% (v/v) δεν φαίνεται να είναι τοξικό. Το DMSO εκτός από *in vitro* μελέτες, χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς όπως για παράδειγμα ως αντιφλεγμονώδες ή διουρητικό και η δράση του στην περίπτωση αυτή εξαρτάται από την δόση και την οδό χορήγησης του. (Verheijen, 2019)

Τα κύτταρα αποτελούνται σε ποσοστό 80% από H_2O , ο όγκος του οποίου σε στερεή μορφή είναι μεγαλύτερος από ότι στην υγρή. Χωρίς το DMSO, κατά την ψύξη των κυττάρων σε υγρό άζωτο στους -80°C , θα επερχόταν δημιουργία κρυστάλλων, ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης λόγω αύξησης του όγκου και καταστροφή των κυττάρων. (Verheijen, 2019)

Από τους μικροσωλήνες ψύξης, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Eppendorf και έγινε προσθήκη με αργό ρυθμό προθερμασμένου στους 37°C , θρεπτικού μέσου DMEM/F12 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 5min, (φυγόκεντρος τύπου Centurion Scientific Ltd) στους 4°C , ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από τα κύτταρα. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10ml DMEM/F12 με 10% FBS και μεταφέρθηκε σε τρυβλίο. Στο τρυβλίο προστέθηκε DMEM-F12, το οποίο περιείχε 2.5 mM 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, CO_2).

Ο ορός εμβρύου βοός, περιέχει αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστίθενται στο υλικό της καλλιέργειας για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών. Το θρεπτικό υλικό στις κυτταροκαλλιέργειες αντικαθίστονταν με νέο, κάθε 2-3 μέρες για περίπου 2.5 εβδομάδες, μέχρι τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν. Τα ΛΜΚ δημιουργούν αυθόρμητα μονοστοιβάδα **(Εικόνα**

10). Όταν κάλυπταν περίπου το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν για να ανακαλλιεργηθούν.



Εικόνα 10. Καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας κουνελιού. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72h, παρουσία 10% FBS. Η φωτογραφία ελήφθη σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Nikon Diaphot 300, Nikon Inc., Melville, NY, USA) με ψηφιακή κάμερα (LeicaDFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany) σε μεγέθυνση X10. Κλίμακα 100μm.

Πριν την ανακαλλιέργεια των κυττάρων προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων / ml με τη μέθοδο trypan blue, που αναλύεται παρακάτω (**Ενότητα 2.2.1**), ώστε να γνωρίζουμε τον ακριβή τους αριθμό πριν την έναρξη του πειράματος.

Η αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο έγινε με 0.25% τρυψίνη και 0.53mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Η τρυψίνη, είναι μία πρωτεάση σερίνης που διασπά τα υπολείμματα λυσίνης και αργινίνης και οδηγεί στην απελευθέρωση των προσκολλημένων κυττάρων από το τρυβλίο. Το EDTA δεσμεύει το ασβέστιο που βρίσκεται στις χασματοσυνδέσεις των ΛΜΚ ώστε να χαλαρώσουν οι δεσμοί μεταξύ τους. (Gonzalez-Mariscal L, 1990)

Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολουθούν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με αποστειρωμένο ισότονο διάλυμα phosphate buffer saline (PBS) 1x με την ακόλουθη σύσταση: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄. Η έκπλυση με PBS είναι απαραίτητη ώστε να απομακρυνθεί η τρυψίνη. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 0.25% τρυψίνης-0.53mM EDTA και τα κύτταρα επώαστηκαν στο κλίβανο για 10 λεπτά. Με την ενζυμική δράση της τρυψίνης τα κύτταρα αποκολλώνται εκ νέου από την επιφάνεια του τρυβλίου. Τέλος γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου, FBS 10%, ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων και η τοποθέτησή τους σε τρυβλία καλλιέργειας για την διεξαγωγή του πειράματος.

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε υλικό απουσία ορού και στη συνέχεια για 48 ώρες παρουσία ή απουσία του ανταγωνιστή των M₂/M₃ υποδοχέων, τιτροπίο (Sigma) σε συγκεντρώσεις 5nM και 10nM για ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου και 5nM και 30nM για ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, σε μέσο καλλιέργειας απουσία ορού. Ως θετικός μάρτυρας (θετικό control) για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού και στις δυο περιπτώσεις, ήταν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε 10% FBS, απουσία τιτροπίου και αρνητικός μάρτυρας (αρνητικό control), ήταν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε μέσο στο οποίο απουσίαζε και ο FBS και το τιτροπίο.

2.2. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορες μεθόδους, εκθέτοντας τα κύτταρα άμεσα ή έμμεσα σε διάφορους παράγοντες (Pintor, 2020). Για τους σκοπούς των πειραμάτων σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν η χρωστική Trypan Blue και η χρωστική MTS–τετραζόλιο [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) – 2 - (4-sulphophenyl) - 2H-tetrazolium].

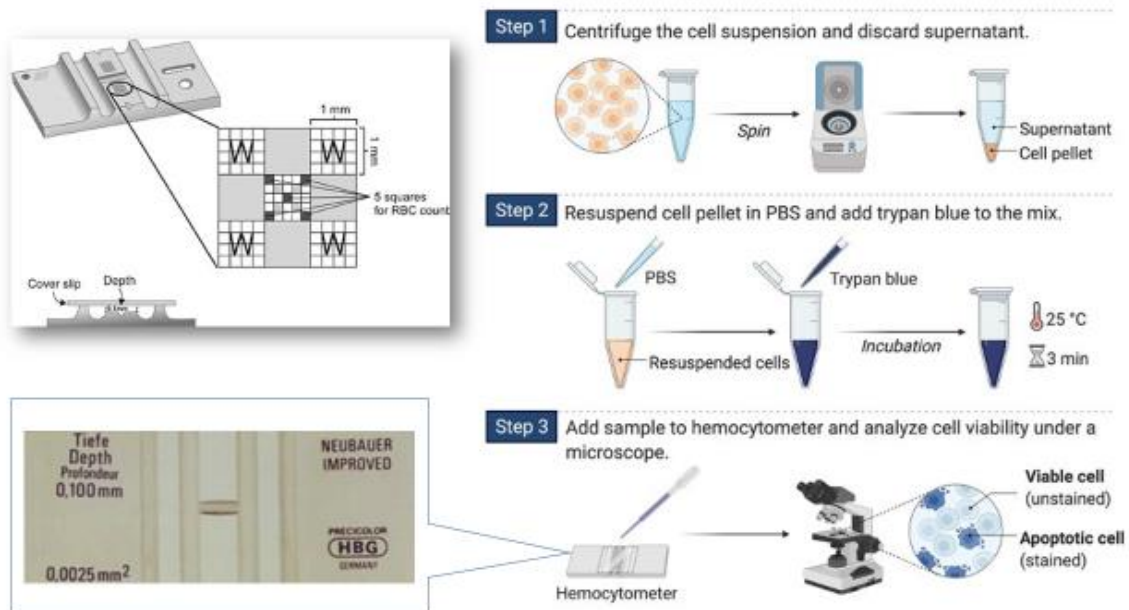
2.2.1 Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με χρωστική Trypan Blue

Η μέθοδος χρώσης με Trypan Blue, γενικά χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των ζωντανών έναντι των νεκρών κυττάρων σε εναιώρημα. Βασίζεται στην εκλεκτική διαπερατότητα την κυτταρικής μεμβράνης. Η μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, έχει την ικανότητα εκλεκτικής διαπερατότητας, έτσι αποκλείει την είσοδο της χρωστικής σε αυτά, σε αντίθεση με τα νεκρά που την απορροφούν στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σύνδεση της πρωτεΐνης της χρωστικής με πρωτεΐνες του κυττάρου άρα την χρώση του κυτταροπλάσματος των νεκρών κυττάρων, δίνοντας τελικά φωτεινό σήμα που μπορεί να ανιχνευθεί με κυτταρόμετρο ροής ή με την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε μικροσκόπιο (Strober , 2015; Avelar-Freitas, 2014)

Για τις ανάγκες του πειράματος, έγιναν 2 πλύσεις των κυττάρων με PBS και ακολούθησε η επώαση τους για 10 λεπτά με διάλυμα 0.25% τρυψίνη και 0.53mM EDTA. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε erpendorf όπου προστέθηκε διάλυμα PBS και χρωστική Trypan Blue. Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) (**Εικόνα 11**) και με την βοήθεια του τύπου:

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

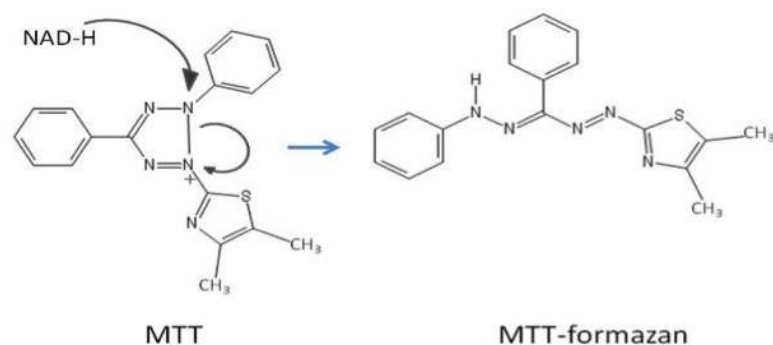
Όπου: *a*: ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε 8 τετράγωνα της πλάκας



Εικόνα 11. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου με χρωστική Trypan blue. Πηγή: Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability: a Complete Protocol <https://researchtweet.com/trypan-blue-exclusion-test-of-cell-viability/>, τροποποιημένο.

2.2.2 Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ με 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Τα ζωντανά κύτταρα, με τη δράση της μιτοχονδριακής δεϋδρογονάσης, έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να μετατρέπουν την υδατοδιαλυτή κίτρινη χρωστική MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], σε αδιάλυτο έγχρωμο προϊόν formazan (RNH-N==CR'-N==NR') (**Εικόνα 12**) (Kumar, 2018). Με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου (BIO-TEK, πρόγραμμα KC Junior), μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων, στα 490 nm με αναφορά στα 630nm. Η μετρούμενη οπτική πυκνότητα, υποδηλώνει την ύπαρξη του μεταβολίτη formazan και είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

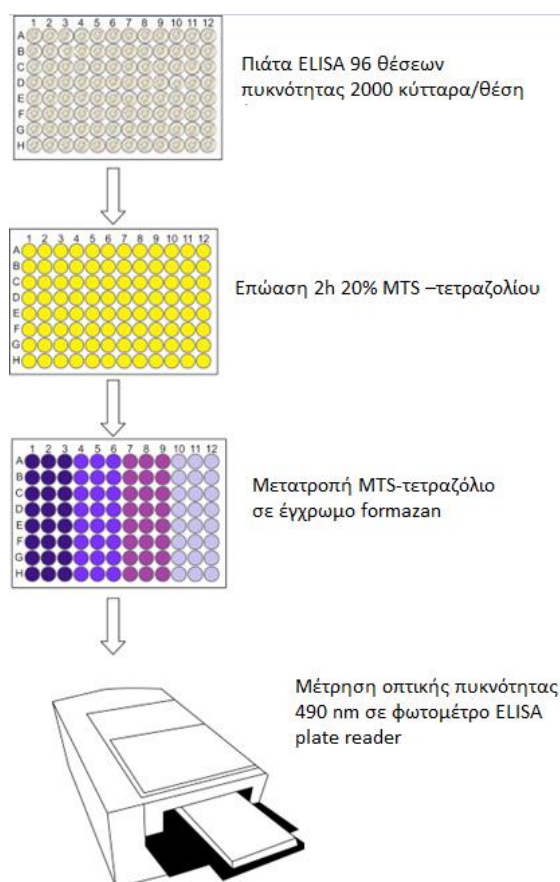


Εικόνα 12. Αντίδραση MTT προς MTT-Formazan (έγχρωμο προϊόν), με την συμβολή του NADH και την μιτοχονδριακή δεϋδρογονάση. Πηγή: Zerbinati et al. 2018.

Στα πειράματα που έγιναν τα κύτταρα διακρίθηκαν σε:

- i. Αρνητικό control, τα οποία ήταν κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και επομένως δεν πολλαπλασιαζόταν.
- ii. Θετικό control, κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και επομένως εμφάνιζαν το μέγιστο πολλαπλασιασμό.
- iii. Κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και παρουσία τιτροπίου για 48 ώρες.

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν με πυκνότητα 2000 κύτταρα ανά θέση, σε πιάτα ELISA 96 θέσεων, και επώαστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε 2.5 mM L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη, στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Μετά το πέρας των 24 ωρών το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (> 95%) βρισκόταν προσκολλημένα στην επιφάνεια του πιάτου. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των κυττάρων με διάλυμα 1X PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και ακολούθησε επώαση για 24 ή 72 ώρες με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε 2.5 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη, χωρίς ορό, στους 37°C παρουσία 5% CO₂.



Εικόνα 13. Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων με 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Πηγή: Eva Tvrda, 2019, τροποποιημένο.

Με την αφαίρεση του ορού εξασφαλίστηκε ο κατά το δυνατό συγχρονισμός των κυττάρων με σταμάτημα του πολλαπλασιασμού τους. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με τιτροπιο για 48 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης τους με τιτροπιο, προστέθηκε σε κάθε θέση του πιάτου ELISA 20% διάλυμα MTS – τετραζολίου και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C, παρουσία 5% CO₂. Τα πιάτα ELISA τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων (**Εικόνα 13**).

Στη συνέχεια, ακολούθησε μετατροπή της οπτικής πυκνότητας σε ποσοστό % της οπτικής πυκνότητας του control (δηλαδή η οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού θεωρήθηκε 100%).

2.3. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (Dot-Blot)

Η ανοσοαποτύπωση Dot Blot αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου ανάλυσης πρωτεϊνών κατά Western. Είναι μια οικονομική και γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών. Για να διεκπεραιωθεί η διαδικασία είναι απαραίτητα 2 αντισώματα. Σε σύγκριση με την μέθοδο ELISA-σάντουιτς, το Dot Blot εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. (Cheng, 2019)

2.3.1 Ομογενοποίηση κυττάρων

Αρχικά αφαιρέθηκε το υπάρχων θρεπτικό DMEM έγινε πλύση των κυττάρων με 1ml 1x PBS και 100µg/ml του αναστολέα των πρωτεασών PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Η παρουσία του PMSF είναι απαραίτητη γιατί όταν γίνει λύση των κυττάρων δεν θα διασπαστούν οι πρωτεΐνες. Ακολούθως το διάλυμα PBS - PMSF αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 100µl διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer) με σύσταση όπως φαίνεται στον **πίνακα 4**. Με την βοήθεια του scraper (ξύστρα), έγινε αποκόλληση των κυττάρων από τα τρυβλία. Ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε Eppendorf και τοποθετήθηκαν σε πάγο για ~10 λεπτά. Μετά ακολουθεί φυγοκέντρηση (10000rpm, 30min) σε φυγόκεντρο τύπου Centurion Scientific Ltd στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το ίζημα απορρίφθηκε και σε 100µl από το υπερκείμενο προστέθηκαν 33µl διαλύματος Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 4x. Το SDS διαταράσσει τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς στα μόρια των πρωτεϊνών, διαταράσσει την δομή τους και έτσι δεν επιτρέπει την συσσωμάτωσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος 5µl από το υπερκείμενο κρατήθηκαν για να χρησιμοποιηθούν

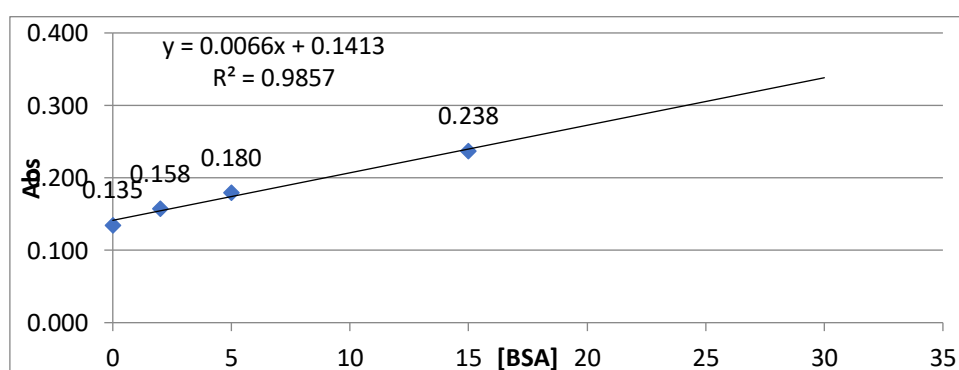
για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε στους -20°C εως ότου γίνει η ανοσοαποτύπωση Dot-Blot.

Πίνακας 4 . Σύσταση διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer)

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

2.3.2. Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στην χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 που έχει κόκκινο χρώμα και υπό όξινες συνθήκες, μεταβάλλεται σε μπλε. Το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται για σύντομο χρονικό διάστημα παρουσία χρωστικής Coomassie G-250 και το διάλυμα είναι όξινο. Η χρωστική έχει την ικανότητα να δημιουργεί εύκολα δεσμούς με βασικά ή αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Όταν δημιουργηθούν οι δεσμοί αλλάζει η μέγιστη οπτική απορρόφηση από τα 465nm στα 595 nm. Η απορρόφηση υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά και με την κλίση πρότυπης γραμμικής καμπύλης που προκύπτει αλλά και με την εφαρμογή του νόμου Beer–Lambert–Bouguer και τέλος προκύπτει η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. (Broc, Wenrich & Trumbo, 2012) (Goldring, 2018)



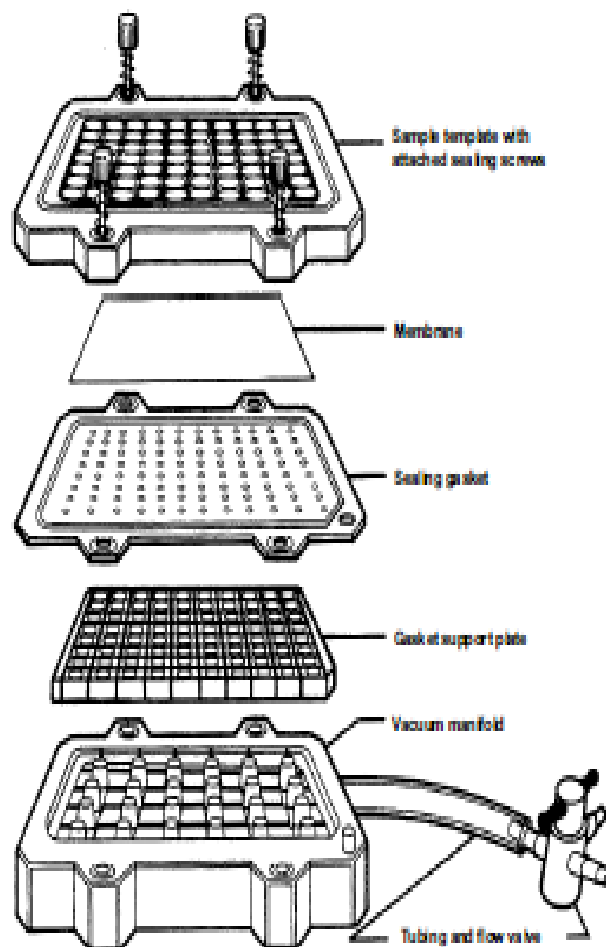
Διάγραμμα 1. Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών κατά Bradford στα δείγματα.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη λευκωματίνης (Bovine Serum Albumin - BSA) διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1 M, γνωστής συγκέντρωσης 0-30 µg/ml (**Διάγραμμα 1**). Παράλληλα αναμίχθηκαν 5 µl δείγματος (Ενότητα 2.3.1.) με 50 µl χρωστικής Coomassie (BioRad) και 195 µl Tris 0.1 M. Ακολούθως τα δείγματα

μεταφέρθηκαν σε πιάτα τύπου ELISA 96 θέσεων και φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο BIO-TEK στα 595nm. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα (Ενότητα 2.3.1). Οι μετρήσεις έπρεπε να γίνουν σε διάστημα 10-60 λεπτών από την προσθήκη του Biorad.

2.3.3. Ανοσοαποτύπωση Dot-Blot

Με βάση τα αποτελέσματα από την μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η ποσότητα πρωτεΐνης κάθε δείγματος σε μl που θα τοποθετηθεί σε κάθε πηγαδάκι της συσκευής (Bio-Rad, Bio-Dot 96-Well Microfiltration, **Εικόνα 14**). Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διαστάσεις 11.5x8cm, επώαστηκε σε 0.1 M Tris base (TBS) για 30 λεπτά πριν την έναρξη του πειράματος, στη συνέχεια η συσκευή συναρμολογήθηκε, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14** τοποθετήθηκε η μεμβράνη και η συσκευή συνδέθηκε με αντλία κενού αέρος με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας μέσω μιας γυάλινης φιάλης (συσσκευή παγίδευσης-waste trap set up).



Εικόνα 14: Συσκευή ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Bio-Rad, Bio-Dot 96-Well Microfiltration). Πηγή: <https://www.bio-rad.com/en-gr/product/bio-dot-bio-dot-sf-microfiltration-apparatus?ID=d986e28f-4a82-4c13-8ce1-3eae9bb4fdbb>

Ακολούθησε η ενυδάτωση της μεμβράνης με 0.1 M TBS 50μl /πηγαδάκι, το οποίο απομακρύνθηκε γυρίζοντας τη βαλβίδα στο κενό. Ανάλογα με την συγκέντρωση πρωτεΐνης που υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford, το κάθε δείγμα αραιώθηκε με 0.1 M TBS, ώστε όταν φορτωθούν στην συσκευή να έχουν όλα ίση ποσότητα πρωτεΐνης, συγκέντρωσης 5μg πρωτεΐνης/ 50 μl. Έπειτα προστέθηκαν 50 μl από κάθε διάλυμα δείγματος στην συσκευή. Σε όποιο πηγαδάκι δεν προστίθεται δείγμα προστέθηκαν μόνο 50 μl TBS.

Η συσκευή αφήνεται μέχρι να προσροφηθούν τα δείγματα σε αυτήν (~40 λεπτά). Σε τακτά χρονικά διαστήματα (~10-15 λεπτά) γίνονταν έλεγχος της συσκευής ώστε να μην στεγνώσει η μεμβράνη. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με 0.1M TBS 50 μl / πηγαδάκι και ακολούθησε η εφαρμογή κενού έπειτα από κάθε πλύση. Μετά από αυτό το στάδιο η μεμβράνη αφαιρέθηκε από την συσκευή και μεταφέρθηκε σε διάλυμα 0.1M TBS και ακολούθησε η χρώση της με Ponceau S 0.2%, που χρωματίζει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη (**Εικόνα 15**) για περίπου 5 λεπτά υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και έκθεση σε φως.



Εικόνα 15. Χρώση του συνόλου των πρωτεϊνών της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με χρωστική Ponceau S 0.2%

Ακολούθησαν 5-6 πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 0.1 M TBS μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς η χρωστική.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες, επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα blocking solution, ~5ml, υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή του blocking solution απαιτείται η προετοιμασία διαλύματος TBS-T με σύσταση:

0.05% v/v Tween20 σε 0.1 M TBS. Το blocking solution έχει σύσταση: 5% (w/v) BSA σε TBS-T και αφήνεται για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η επώαση της μεμβράνης για 20 λεπτά σε διάλυμα 0.1 M TBS-0.05% Tween 20, που περιείχε 5% γάλα σε σκόνη, προκειμένου να κορεσθούν οι θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του ορού και του γάλακτος. Με την δέσμηση αυτή αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται στη μεμβράνη. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T 10 λεπτών έκαστης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος κορεσμού και επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα για 16 ώρες (overnight) στους 4°C (cold room).

Τα αντισώματα διαλύονταν σε 0.1% (w/v) BSA σε TBS-T και χρησιμοποιούνταν σε συγκεντρώσεις όπως πρότεινε η εταιρεία κατασκευής τους.

Πίνακας 5 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	1 ^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	2 ^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ
P38	Rabbit anti-p38 (Cell Signaling) #9215S	1:1000	anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7074)	1:3000
P44/42	Rabbit anti-p44/42 MAPK (Cell Signaling) #9101s	1:1000	anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7074)	1:3000
D1	Rabbit anti-CCND1 (ABCAM) monoclonal ab16663 #GR27218-1	1:200	anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7074)	1:3000
B-AKTINH	Mouse anti-β-actin (Sigma A5316) #122M4755	1:3000	Anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7076)	1:2000

Το πρώτο αντίσωμα αφαιρέθηκε και ακολούθησαν 3 πλύσεις με TBS-T των 5 λεπτών έκαστη και η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με το 2^ο αντίσωμα. Το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος αφαιρέθηκε και ακολούθησαν 3 πλύσεις: 15 λεπτά με TBS-T, 5 λεπτά TBS-T και 5 λεπτά 0.1M TBS και η επώαση της μεμβράνης με διάλυμα 10ml λουμινόλης (1.25 mM σε 0.1M Tris-HCl, pH 8.5), που περιείχε 10μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM σε DMSO), για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε η εμφάνιση της σε UV Imager (Uvitec Cambridge).

Κάθε μεμβράνη επώαστηκε και με αντίσωμα για την β-ακτίνη (housekeeping πρωτεΐνη). Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για τον κυτταροσκελετό και εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εμπλέκεται στον έλεγχο βασικών λειτουργιών όπως

η διαίρεση, η μετανάστευση, η ανάπτυξη και διατήρηση του σχήματος των κυττάρων. (Khan, 2014). Έτσι στο dot blot χρησιμοποιείται ως απόδειξη για την ύπαρξη πρωτεΐνης στην μεμβράνης. Για να μπορέσει η μεμβράνη να χρησιμοποιηθεί ξανά για επώαση έναντι της β-ακτίνης, μετά την εμφάνιση της ακούθησε επώαση της σε διάλυμα Stripping Buffer (1.5% w/v glycine-1% w/v-SDS-1% w/v Tween 20-HCl pH 2.2) για δυο φορές για 10 λεπτά την κάθε φορά. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών έκαστη με 0.1 M TBS-0.05% Tween 20 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και 2 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών σε 0.1 M TBS-0.05% Tween 20 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την προηγούμενη ημέρα αλλά αυτή τη φορά με επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης.

2.4 Στατιστική Ανάλυση

Για τα πειράματα μελέτης του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ, χρησιμοποιήθηκαν ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου. Η κάθε συνθήκη επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. 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 t-test ή one-way ANOVA που ακολουθείται από τη δοκιμασία Sidak's multiple comparisons test ή Dunnett's multiple comparisons. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το $p < 0.05$.

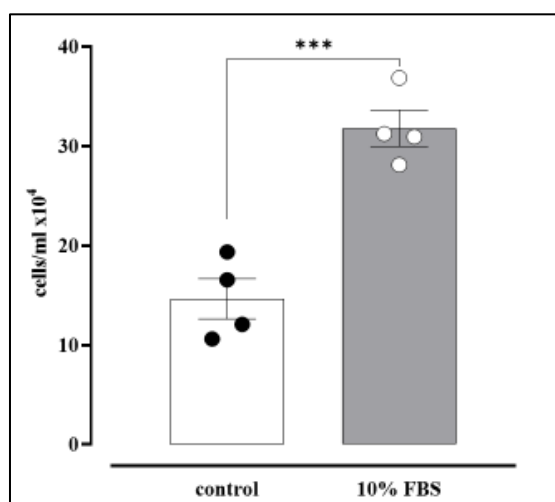
3. Αποτελέσματα

3.1. Η επίδραση του ορού στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

ΛΜΚ τραχείας κουνελιού (**Διάγραμμα 2**) και βρόγχων ανθρώπου (**Διαγράμματα 3**), επώαστηκαν για 48h με ορό (FBS) σε συγκέντρωση 10%. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 48h. Ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη χρώση Trypan Blue (**Διαγράμματα 2 και 3B**) και MTT (**Διάγραμμα 3A**).

3.1.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώατηκαν για 48 ώρες παρουσία ή απουσία 10% FBS και ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε μετά από χρώση Trypan Blue. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι ο ορός σε συγκέντρωση 10%, σε σύγκριση με το αρνητικό control, προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ με στατιστική σημαντικότητα $p=0.0008$ (**Διάγραμμα 2**). Συγκεκριμένα ο αριθμός των κυττάρων του αρνητικού control ήταν $146,600 \pm 20,160$ κύτταρα/ml, ενώ στην περίπτωση του ορού ήταν $318,000 \pm 18,330$ κύτταρα/ml.

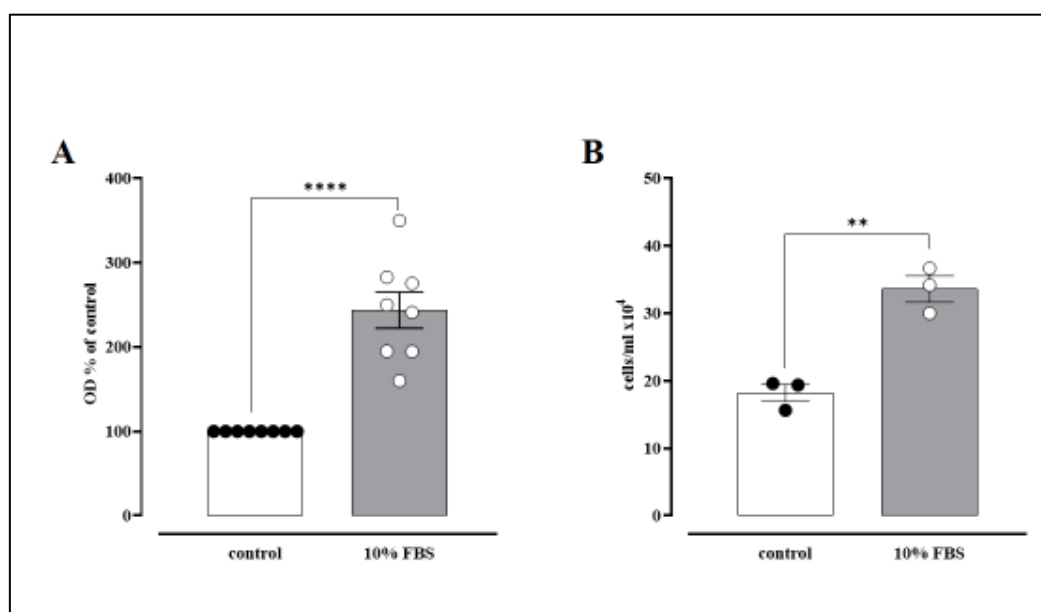


Διάγραμμα 2. Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού παρουσία 10% ορού (FBS) όπως εκτιμήθηκε με τη χρώση Trypan Blue. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control.

3.1.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Η επίδραση του ορού (10%) στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ανθρώπου εκτιμήθηκε αρχικά με την μέθοδο MTT και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών εκφράστηκαν ως ποσοστό της οπτικής πυκνότητας (OD) του control. Ο ορός, σε συγκέντρωση 10%, προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σύγκριση με το αρνητικό control ($p < 0.0001$, **Διάγραμμα 2A**).

Η μέθοδος MTT, στηρίζεται στην δράση της μιτοχονδριακής δεϋδρογονάσης η οποία απορροφά και μετατρέπει την υδατοδιαλυτή κίτρινη χρωστική MTT στο αδιάλυτο έγχρωμο προϊόν formazan. Έτσι κύτταρα με έντονη μιτοχονδριακή δράση είναι δυνατόν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Ενότητα 2.2.2). Για τον λόγο αυτό ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ, μετά από επώαση τους για 48 ώρες παρουσία ορού 10% εκτιμήθηκε και με χρώση Trypan Blue. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ορός (10%), σε σχέση με το αρνητικό control, προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ($p=0.003$, Διάγραμμα 2B). Συγκεκριμένα ο αριθμός των κυττάρων ήταν $181,900 \pm 12,860$ και $336,100 \pm 19,440$ κύτταρα/ml, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία 10% ορού αντίστοιχα (Διάγραμμα 3B).



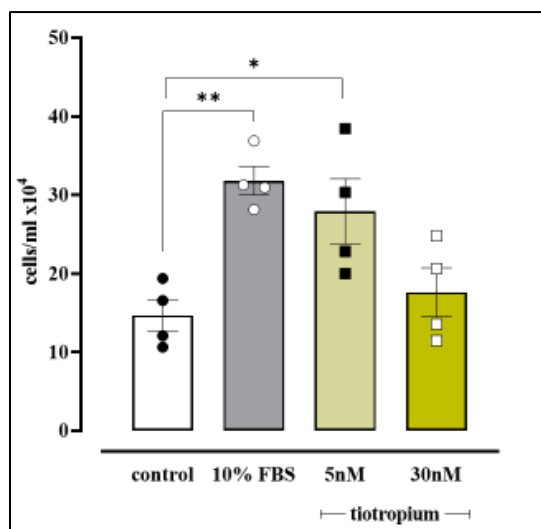
Διάγραμμα 3: Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου παρουσία 10% ορού (FBS) όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο MTT (A) και με τη χρώση Trypan Blue (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 3-8 ανεξάρτητα πειράματα. ** $p < 0.01$ και **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control.

3.2. Η επίδραση του τιτροπίου στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

3.2.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν για 48h παρουσία του μουσκαρινικού ανταγωνιστή τιτροπίου σε συγκεντρώσεις 5nM και 30nM. Οι μετρήσεις έγιναν μετά το πέρας των 48 ωρών, με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) και μετρήθηκαν τα ζωντανά ΛΜΚ κύτταρα.

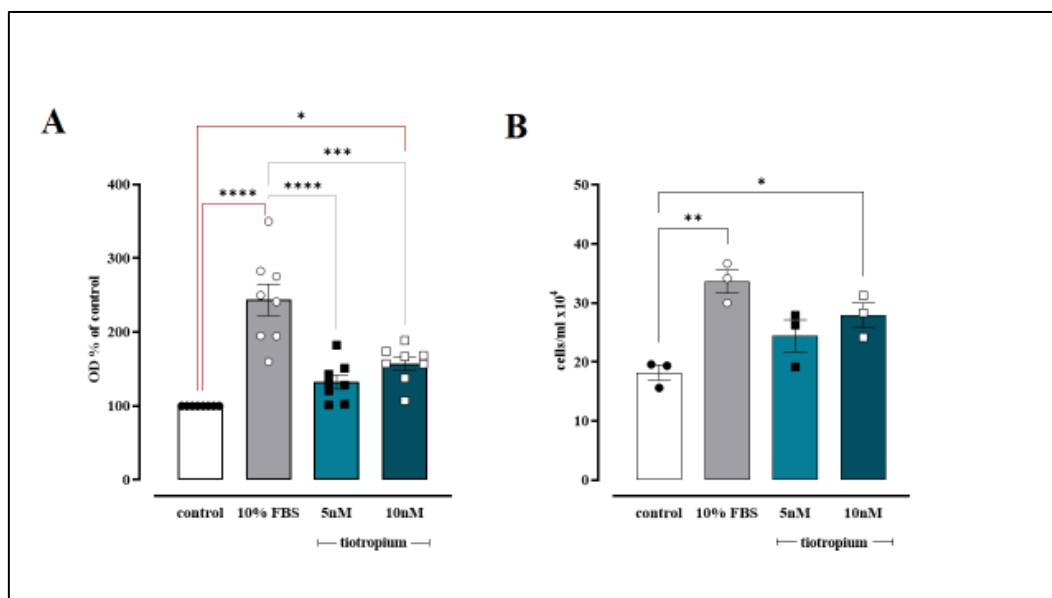
Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το τιτροπίο σε συγκέντρωση 5nM επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του ορού ($p=0.03$, Διάγραμμα 3), καθώς αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων από $146,600 \pm 20,160$ (αρνητικό control) σε $278,900 \pm 41,350$ κύτταρα/ml. Αντίθετα, παρουσία 30nM τιτροπίου, ο αριθμός των ΛΜΚ δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με το αρνητικό control ($p=0.9322$, Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού παρουσία 10% ορού (FBS), 5nM και 30nM τιτροπίου, όπως εκτιμήθηκε με τη χρώση Τρυφαν Blue. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 4 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με το αρνητικό control.

3.2.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν 48h παρουσία τιτροπίου σε συγκεντρώσεις 5 nM και 10 nM. Σε μετρήσεις που έγιναν με την μέθοδο MTT, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το τιτροπίο προάγει στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ στη συγκέντρωση 10 nM ($p = 0.0158$, **Διάγραμμα 5A**) αλλά όχι στο επίπεδο του 10% FBS ($p = 0.0002$ σε σύγκριση 10% FBS με 10nM τιτροπίου, **Διάγραμμα 5A**).



Διάγραμμα 5. Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου παρουσία 10% ορού (FBS), 5 nM και 10 nM τιτροπίου, όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο MTT (A) και με τη χρώση Τρυφαν Blue (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ από 3-8 ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με το αρνητικό control ή 10% FBS, όπως σημειώνεται.

Όπως και πριν, μετρήσεις έγιναν και με χρώση Trypan Blue για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι το τιτροπίο σε συγκέντρωση 10 nM, επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ($p = 0.0495$, **Διάγραμμα 5B**) περίπου στο επίπεδο του ορού (10%). Ειδικότερα ο αριθμός των κυττάρων ήταν $181,900 \pm 12,860$ κύτταρα/ml απουσία ορού και $336,100 \pm 19,440$ κύτταρα/ml ή $279,200 \pm 20,550$ όταν τα ΛΜΚ επωάστηκαν με 10% FBS ή 5 nM τιτροπίο αντίστοιχα.

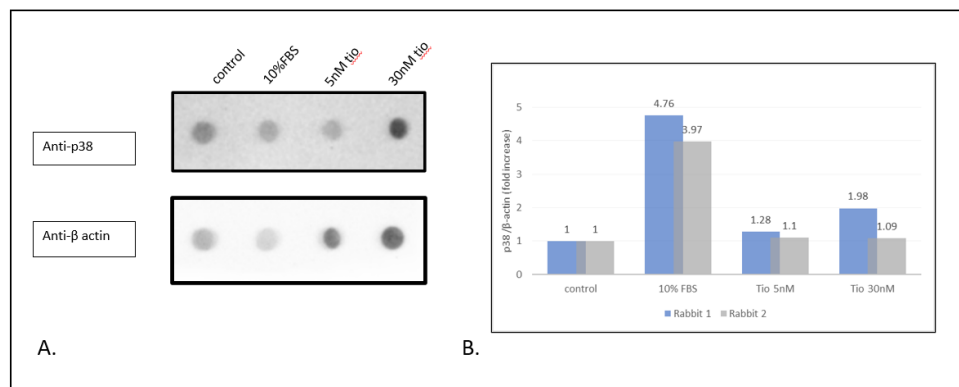
3.3. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην μιτογόνο δράση του τιτροπίου

Διερευνήσαμε περαιτέρω τα σηματοδοτικά μονοπάτια (ενότητα 1.1.4.1) που εμπλέκονται στον επαγόμενο από το τιτροπίο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Ειδικότερα μελετήθηκε η πιθανή επαγωγή της p38 και της p44/42 MAPK, όπως και της κυκλίνης D1, η οποία εμπλέκεται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (Yang, 2006)

Για την διερεύνηση των πιο πάνω μονοπατιών έγιναν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Dot Blot) και ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα ImageJ. Στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού διερευνήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών: p38 (**Διάγραμμα 6**), p44/42 (**Διάγραμμα 7**) και D1 (**Διάγραμμα 8**). Στα ΛΜΚ ανθρώπου εξετάστηκε μόνο η επαγωγή της πρωτεΐνης p38 από την επώαση των ΛΜΚ με 5 και 10nM τιτροπίου (**Διάγραμμα 9**).

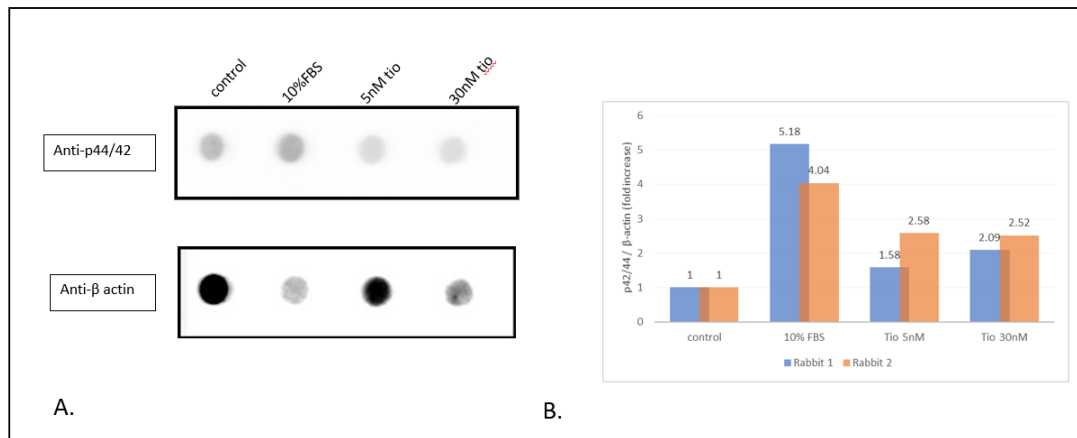
3.3.1. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Η πρωτεΐνη p38 (**Διάγραμμα 6**) εκφράζεται ~4 φορές περισσότερο στα κύτταρα που επωάστηκαν με 10% ορό για 4 ώρες σε σύγκριση με το αρνητικό control. Αντίθετα στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του μουσκαρινικού ανταγωνιστή, τιτροπίο η p38 ανιχνεύεται σε επίπεδα περίπου παρόμοια με το control όταν τα ΛΜΚ επωάζονται με 5 nM τιτροπίο και ~1.5 φορές υψηλότερα όταν επωάζονται με 30 nM τιτροπίο (**Διάγραμμα 6B**).



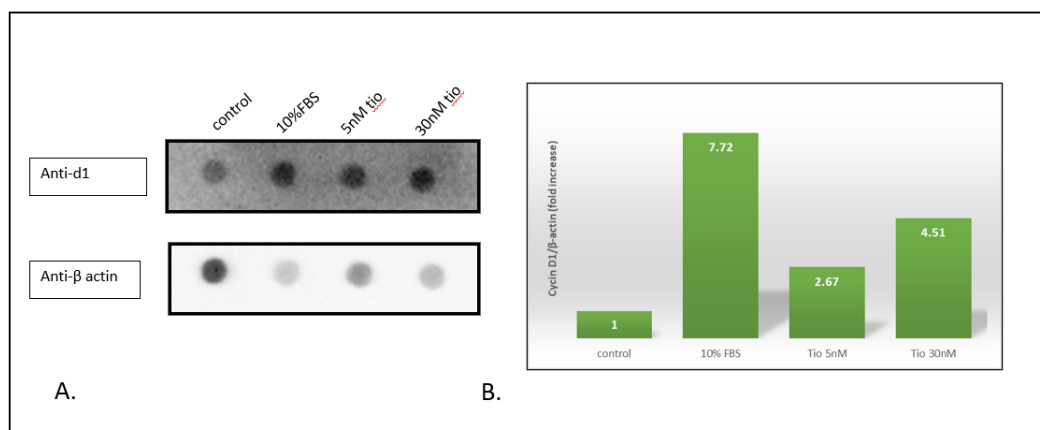
Διάγραμμα 6. A. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα για p38 ή β-actin σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίο για 4 ώρες B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της p38 ως προς β-actin στα control κύτταρα και τα κύτταρα που επωάστηκαν με 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίο. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Η πρωτεΐνη p44/42 (**Διάγραμμα 7**) εκφράζεται ~4.5 φορές περισσότερο στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% ορό για 4 ώρες σε σύγκριση με το αρνητικό control. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του ανταγωνιστή, τιτροπίου και στις δύο συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (5 και 30nM), η p44/42 φαίνεται να εκφράζεται περίπου σε διπλάσιο ποσό σε σχέση με το αρνητικό control, αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% ορού.



Διάγραμμα 7. Α. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα για p44/42 ή β-actin σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίου για 4 ώρες Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της p44/42 ως προς β-actin στα control κύτταρα και τα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίου. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

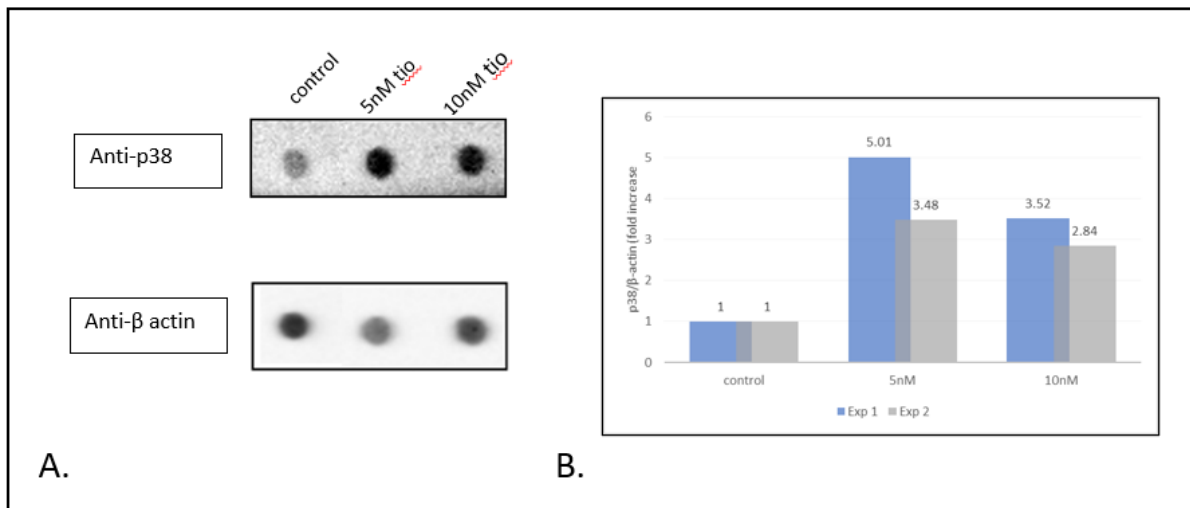
Η έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνης d1 (**Διάγραμμα 8**) σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επώαστηκα παρουσία ορού (10%) αλλά και τιτροπίου (5nM και 30nM) σε σχέση με αυτά που αποτελούν το αρνητικό control φαίνεται να αυξάνεται ~7.5 φορές στην περίπτωση του ορού και ~2.5 και ~4.5 φορές στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία τιτροπίου σε συγκέντρωση 5 nM και 30 nM αντίστοιχα.



Διάγραμμα 8. Α. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα για κυκλίνη D1 ή β-actin σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίου για 4 ώρες Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της D1 ως προς β-actin στα control κύτταρα και τα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS, 5nM και 30nM τιτροπίου. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 1 πείραμα.

3.3.2. ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Τέλος διερευνήθηκε και η έκφραση της πρωτεΐνης p38 σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου όταν αυτά επωάστηκαν παρουσία 5nM και 10nM τιτροπίου (**Διάγραμμα 9**). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η έκφραση της p38 αυξάνεται ~4 και ~3 φορές παρουσία 5nM και 10 nM τιτροπίου αντίστοιχα.



Διάγραμμα 9. Α. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα για p38 ή β-actin σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου που καλλιεργήθηκαν παρουσία 5nM και 10nM τιτροπίου για 4 ώρες Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της p38 ως προς β-actin στα control κύτταρα και τα κύτταρα που επωάστηκαν με 5nM και 10nM τιτροπίου. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

4. Συζήτηση

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως στο άσθμα και στην ΧΑΠ, παρουσιάζεται συχνά αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών (remodeling), που μεταξύ των άλλων περιλαμβάνει και υπερπλασία / υπερτροφία των λείων μυών. (Yan et al, 2018; Jindal, 2016; Chung, 2005). Οι δομικές μεταβολές στο τοίχωμα των αεραγωγών οδηγούν σε μείωση της διαμέτρου τους, που στους ασθενείς συχνά εκδηλώνεται με δύσπνοια. Μείωση στην διάμετρο των αεραγωγών μπορεί να προκαλέσει επίσης η αυξημένη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών π.χ. ακετυλοχολίνης που προκαλούν σύσπαση των λείων μυών. Η αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, που παρατηρείται σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη λειτουργία των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων που οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα των παρασυμπαθητικών νευρώνων, με αποτέλεσμα την υπερέκκριση βλέννας, αγγειοδιαστολή και ενισχυμένη βρογχοσυστολή. (Coulson & Fryer, 2003; Lam, Lamanna & Bourke, 2019).

Τα ΛΜΚ πολλαπλασιάζονται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες κ.α. Μέσω δέσμευσης των παραγόντων αυτών στους αντίστοιχους υποδοχείς (π.χ RTKs, GPCRs και nRTKs) ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK (p38, p44/42) και/ή της PI3K/Akt, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της κυκλίνης D1, που προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (Yan et al, 2019). Μεταξύ αυτών των οδών πολλαπλασιασμού, οι Walker et al. (1998), έδειξαν ότι σε ΛΜΚ βοοειδών, το κύριο μεταγωγικό μονοπάτι, για τον πολλαπλασιασμό είναι αυτό της PI3K, ενώ το μονοπάτι της ERK- p44/42 έχει συμπληρωματικό ρόλο (Walker et al, 1998). Ο πολλαπλασιασμός φαίνεται να συνδέεται άμεσα με αυξημένη μάζα, μετανάστευση αλλά και μειωμένη απόπτωση των ΛΜΚ. Διάφορα μόρια έχουν βρεθεί να ρυθμίζουν όλα τα παραπάνω όπως ο STAT3, ο JNK και η κυκλίνη D1, με αποτέλεσμα τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού. (Gerthoffer et al, 2012; Yan et al, 2019)

Ο ορός είναι γνωστό ότι προκαλεί πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, σε συγκεντρώσεις >0.5%, έπειτα από 48h επώασης (Stamatiou et al, 2012). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των μονοπατιών των MAPKs ή/και PI3Ks. Από προηγούμενες μελέτες, ο ορός σε συγκέντρωση 10% προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού και μέσω του μονοπατιού της PI3K, καθώς αναστολείς της, όπως το LY294002, αναστέλλουν τον επαγόμενο από τον ορό πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (Stamatiou et al, 2014). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα βρίσκονται και τα αποτελέσματα μας, που δείχνουν ότι ο ορός (10%) προκαλεί πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK, συγκεκριμένα της p38 και ERK-p44/42, επάγοντας την έκφραση κυκλίνης D1. Στην παρούσα μελέτη δεν διερευνήθηκε η επαγωγή της Akt από τον ορό.

Για την θεραπεία του άσθματος και της ΧΑΠ, χρησιμοποιούνται αντιχολινεργικά φάρμακα μακράς διαρκείας, όπως το τιοτρόπιο, λόγω του ότι εμφανίζουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τους βραχείας δράσης όσον αφορά τη διατήρηση της βρογχοδιαστολής για 24 ώρες. (Pelaia et al, 2015). Το τιοτρόπιο ήταν ο πρώτος μουσκαρινικός ανταγωνιστής μακράς διαρκείας που διατέθηκε για χρήση στην αντιμετώπιση της ΧΑΠ και φαίνεται να βελτιώνει τη λειτουργία των πνευμόνων των ασθενών. Αν και ανήκει στους ανταγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων των αεραγωγών, πρόσφατες μελέτες των Kistemaker, L. et al. (2019) υποστηρίζουν ότι το τιοτρόπιο έχει δύο θέσεις δέσμησης στον υποδοχέα M3, εμποδίζοντας τη δράση της ACh τόσο με πρόσδεση στην ορθοστερική θέση όσο και σε αλλοστερική θέση. (Kistemaker et al, 2019). Σε μελέτες κινητικής, φαίνεται το τιοτρόπιο να παραμένει συνδεδεμένο στον M3 υποδοχέα περισσότερο χρόνο από ότι στον M2, αν και στους δύο υποδοχείς προσδέεται με την ίδια χημική συγγένεια. (Kruse et al, 2012).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση του τιοτροπίου σε ΛΜΚ από τραχεία κουνελιού και βρόγχους ανθρώπου. Οι μετρήσεις έγιναν μετά από χρώση με Trypan Blue και την μέθοδο MTT. Το τιοτρόπιο χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5nM και 10nM για ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου και σε συγκεντρώσεις 5nM και 30nM για τα ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι στα ΛΜΚ του ανθρώπου, το τιοτρόπιο στη συγκέντρωση των 10nM επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όσον αφορά τα ΛΜΚ τραχείς κουνελιού το τιοτρόπιο σε συγκέντρωση 5nM επάγει τον πολλαπλασιασμό τους αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση των 30nM δεν έχει καμία επίδραση. Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με εκείνα πρόσφατης μελέτης που δείχνει ότι αλλοστερικοί τροποποιητές των μουσκαρινικών υποδοχέων, όπως η γαλαμίνη, αλλά και κλασικοί ανταγωνιστές, όπως η ατροπίνη, προκαλούν πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ απουσία αγωνιστή μέσω των μονοπατιών των PI3K και MAPK. Ειδικότερα, η ατροπίνη προκαλεί πολλαπλασιασμό μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις <1nM, ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις (10nM) έχει αντίθετα αποτελέσματα. Η γαλαμίνη εμφανίζεται να έχει δοσοεξαρτώμενη δράση στον πολλαπλασιασμό και δρα ανεξάρτητα από την ACh χωρίς να επηρεάζει τον φαινότυπο των κυττάρων. Συνδέεται στους M2 υποδοχείς σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει αλλοστερική δράση. (Stamatiou, 2018)

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επαγωγή της MAPK-p38, από την επώαση των ΛΜΚ του ανθρώπου με τιοτρόπιο για 4 ώρες. Το τιοτρόπιο περίπου τριπλασιάζει την έκφραση της p38 και είναι πιθανό το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι να εμπλέκεται στον επαγόμενο από το τιοτρόπιο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ του ανθρώπου. Όταν αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες ή άλλα μόρια συνδεθούν στους RTKs υποδοχείς, αυτοί φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Ras, με την σειρά της ενεργοποιεί τις MAPKKK και MAPKK, κινάσες των MAPK (p38). Τελικά η p38 μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού ενεργοποιεί την pRB, η οποία προάγει τον κυτταρικό κύκλο από την φάση G1 στην S,

προκαλώντας πολλαπλασιασμό του κυττάρου. (Yar et al., 2019). Έτσι η επαγωγή της p38 παρουσία τιτροπίου υποδηλώνει ότι εμπλέκεται στη μιτογόνο δράση του στα ΛΜΚ του ανθρώπου. Στα ΛΜΚ κουνελιού όταν επωάστηκαν με 5 nM ή 30 nM τιτροπίο, δεν φαίνεται να επάγεται η MAPK-p38 καθώς τα επίπεδα της ανιχνεύονται σε αυτά του αρνητικού control. Αντίθετα η παρουσία 10% FBS στην καλλιέργεια (θετικό control) περίπου τετραπλασιάζει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Το τιτροπίο λοιπόν, αντίθετα από ότι στα ΛΜΚ του ανθρώπου, δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της MAPK-p38 στα ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού.

Στα ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού, το τιτροπίο περίπου διπλασιάζει την έκφραση της MAPK-p44/42 σε σχέση με το αρνητικό control στις 4 ώρες. Η έκφραση της MAPK-p44/42 είναι παρόμοια και στις δύο συγκεντρώσεις του τιτροπίου (5 και 30 nM), αν και στη συγκέντρωση των 30 nM το τιτροπίο δεν φαίνεται να έχει μιτογόνο δράση. Πειράματα στα οποία ελέγχθηκε η ικανότητα διαφόρων παραγόντων (PDGF, IL-1 β κ.α.), να ενεργοποιούν την p44/p42 MAPK σε ανθρώπινα ΛΜΚ αεραγωγών με χρονοεξαρτώμενο τρόπο, βρέθηκε ότι η μέγιστη ενεργότητα της p44/p42 διέφερε χρονικά, σε παρουσία διαφορετικών ενεργοποιητών του μονοπατιού (Orsini et al, 1999). Επίσης η συγκέντρωση της p44/42 παρουσιάζει διακυμάνσεις στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου με τα επίπεδα της να μειώνονται σημαντικά σε κάποιες περιπτώσεις (φάση S και G2 ή λόγω δράσης της nocodazole) (Edelmann et al, 1996). Είναι λοιπόν πιθανό, ο διπλασιασμός των επιπέδων της MAPK-p44/42 που παρατηρήθηκε να μην συνδέεται με τον επαγόμενο από το τιτροπίο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ή τα επίπεδα της πρωτεΐνης να μεταβάλλονται διαφορετικά σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία χαμηλής (5 nM) ή υψηλής (30 nM) συγκέντρωσης τιτροπίου. Μελέτες έδειξαν ότι στα ΛΜΚ το μονοπάτι της PI3K/Akt είναι το κύριο μονοπάτι που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό τους ενώ το μονοπάτι της ERK είναι δευτερεύον (Walker et al, 1998). Χρειάζεται λοιπόν να διερευνηθεί αν το τιτροπίο ενεργοποιεί την PI3K/Akt και αν η ενεργοποίηση της εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του.

Η έκφραση της κυκλίνης D1 διερευνήθηκε στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το τελικό μόριο που ενεργοποιείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της p44/42 και PI3K/Akt, ώστε να προάγει τον κυτταρικό κύκλο, προκαλώντας πολλαπλασιασμό. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας η κυκλίνη D1 διπλασιάζεται σε σχέση με το αρνητικό control παρουσία του τιτροπίου 5nM ενώ σε συγκέντρωση 30nM η έκφραση της τετραπλασιάζεται. Η έκφραση της κυκλίνης D1 είναι αυξημένη, όταν τα κύτταρα επωάζονται με 30 nM τιτροπίο, συγκέντρωση που δεν παρουσιάζει μιτογόνο δράση στα κύτταρα κουνελιού. Τα επίπεδα της κυκλίνης D1 αρχίζουν να αυξάνονται στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και αυτό συνεχίζεται μέχρι το τέλος της φάσης αυτής λίγο πριν το κύτταρο εισέλθει στην S φάση. Όταν το κύτταρο είναι σε φάση S τα επίπεδα της κυκλίνης D1 μειώνονται γρήγορα λόγω μείωσης της σταθερότητας της ή λόγω αποικοδόμησης της.

Στην φάση S το κύτταρο διπλασιάζει το γενετικό του υλικό και είναι απαραίτητο η κυκλίνη να μην είναι παρούσα καθώς εμποδίζει την σύνθεση του DNA. (Alao, 2007) . Σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν έντονη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, ενδογενείς ενώσεις (ραπαμυκίνη), προκαλούν αποικοδόμηση της κυκλίνης D1. (Alao, 2007). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας τα ΛΜΚ παρουσία τιτροπίου 5 ή 30 nM φαίνεται να φτάνουν το σημείο όπου το γενετικό τους υλικό διπλασιάζεται αλλά δεν πολλαπλασιάζονται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης τιτροπίου (30 nM). Είναι πιθανόν στην περίπτωση αυτή η κυκλίνη D1 να είναι παρούσα αλλά όχι δραστική καθώς μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση της κυκλίνης επιδέχεται αυστηρό έλεγχο από πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως συμβαίνει σε ηπατοκύτταρα ποντικών, ώστε να μην υπάρχει υπέρμετρος πολλαπλασιασμός των κυττάρων. (Klein & Assoian, 2008).

Συμπερασματικά, το τιτροπίο, είναι ικανό να προάγει πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ τόσο ανθρώπου όσο και κουνελιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση του είναι ειδική και μεσολαβείται μέσω δέσμευσης του στους μουσκαρινικούς υποδοχείς αλλοστερικά είτε ανταγωνιστικά στην ορθοστερική θέση (Kistemaker et al, 2019). Το τιτροπίο επάγει τις MAPK, p38 στα ΛΜΚ του ανθρώπου και p44/42 στα ΛΜΚ του κουνελιού, καθώς και την κυκλίνη D1, σε επίπεδα όμως πολύ χαμηλότερα από αυτά του ορού (θετικό control).

Βιβλιογραφία

- Alao. (2007). The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer*, 6(24). Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-24>
- Amrani & Panettieri. (2003). Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(3), 272-6. doi:doi: 10.1016/s1357-2725(02)00259-5. PMID: 12531237.
- An et al. (2007). Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *European Respiratory Journal*, 29(5), 834-860. doi:doi:10.1183/09031936.00112606
- Anzueto & Miravittles. (2020). Tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease - a review of clinical development. *Respiratory research*, 21(1), 199. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01407-y>
- Athari. (2019). Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(45). doi: 10.1038/s41392-019-0079-0.
- Avelar-Freitas, B. A.-F.-V.-M. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 47(4), 307–315. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143437>
- Baldin, V. L. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes*, 7(5), 812-821. doi:doi: 10.1101/gad.7.5.812.

- Black, J. L. (2012). Airway Smooth Muscle in Asthma. *Clinics in Chest Medicine*, 33(3), 543–558. doi:doi:10.1016/j.ccm.2012.05.002
- Broc, Wenrich & Trumbo. (2012). Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 428(2), 93-95. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.014>
- Cazzola, Calzetta & Matera. (2021). Long-acting muscarinic antagonists and small airways in asthma: Which link? *Allergy*, 76(7), 1990–2001. doi:doi:10.1111/all.14766
- Cazzola, Page & Matera. (2013). Long-acting muscarinic receptor antagonists for the treatment of respiratory disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(3), 307-317. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.12.006>
- Chen et al. (2019). Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. *Surgical Oncology*, 31, 46-53. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2019.09.003>
- Cheng, L. T. (2019). Development of a quick dot blot assay for the titring of bovine ephemeral fever virus. *BMC veterinary research*, 15(1), 313. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2059-6>
- Cheyne, Irvin-Sellers & White . (2015). Tiotropium versus ipratropium bromide for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9. doi:DOI: 0.1002/14651858.CD009552.pub3.
- Chung. (2005). The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(4), 347-372. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1513/pats.200504-028SR>
- Coulson & Fryer. (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 98(1), 59-69. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00004-4)
- Disse et al. (1999). Tiotropium (SPIRIVA™): Mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sciences*, 64(6-7), 457-464. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00588-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00588-8)
- Edelmann et al. (1996). Cell Cycle Regulation of p70 S6 Kinase and p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases in Swiss Mouse 3T3 Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 963-971. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.963>.
- Fujita et al. (2012). Mechanisms of Immune Tolerance to Allergens. *Chemical immunology and allergy*, 96(12), 30-8. doi:10.1159/000331868.
- Gerthoffer et al. (2012). Motility, survival, and proliferation. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 255–281. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1002/cphy.c110018>
- Goldring, J. P. (2018). Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Electrophoretic Separation of Proteins*, 31-39. doi: doi:10.1007/978-1-4939-8793-1_3
- Gonzalez-Mariscal L, C. R. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am J Physiol.*, 259(6(Pt1)), 978-986. doi:doi: 10.1152/ajpcell.1990.259.6.C978.

- Gosens & Gross. (2018). The mode of action of anticholinergics in asthma. *The European respiratory journal*, 52(4). doi: 10.1183/13993003.01247-2017
- Greig, Reale & Tata. (2013). New pharmacological approaches to the cholinergic system: an overview on muscarinic receptor ligands and cholinesterase inhibitors. *Recent patents on CNS drug discovery*, 8(2), 123–141. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/ph3092838>
- Gu & Lee. (2006). Neural Control of Airway Smooth Muscle. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, 138–145. doi:doi:10.1016/b0-12-370879-6/00253-2
- Halayko & Solway. (2001). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 1985, 90(1), 358-68. doi:doi: 10.1152/jappl.2001.90.1.358.
- Heredia . (2009). Tiotropium bromide: an update. *The open respiratory medicine journal*, 3, 43–52. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2174/1874306400903010043>
- Jakubík & El-Fakahany. (2010). Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(9), 2838–2860. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/ph3092838>
- Jakubik & El-Fakahany. (2020). Current Advances in Allosteric Modulation of Muscarinic Receptors. *Biomolecules*, 10(2), 325. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/biom10020325>
- Jindal. (2016). Remodeling in asthma and COPD-recent concepts. *Lung India : official organ of Indian Chest Society*, 33(1), 1-2. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.4103/0970-2113.173074>
- Khan et al. (2014). Cell-type specificity of β -actin expression and its clinicopathological correlation in gastric adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology*, 20(34), 12202-12211. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12202>
- Kistemaker & Prakash. (2016). Airway Innervation and Plasticity in Asthma. *Physiology (Bethesda)*, 34(4), 283-298. doi:doi:10.1152/physiol.00050.2018
- Kistemaker et al. (2019). Second M3 muscarinic receptor binding site contributes to bronchoprotection by tiotropium. *British journal of pharmacology*, 176(16), 2864–2876. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1111/bph.14707>
- Klein & Assoian. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *Journal of cell science*, 121(23), 3853–3857. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1242/jcs.039131>
- Kruse et al. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552–556. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/nature10867>
- Kruse et al. (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 504(7478), 101–106.
- Kruse et al. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(7), 549–560. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/nrd4295>
- Kumar, P. N. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). doi:doi:10.1101/pdb.prot095505
- Lam, Lamanna & Bourke. (2019). Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease. *Smooth Muscle Spontaneous Activity*, 381–422. doi:10.1007/978-981-13-5895-1_16

- Lüllmann et al. (1969). Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *European Journal of Pharmacology*, 6(3), 241-247,.
Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(69\)90181-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(69)90181-2)
- Martinsen et al. (2014). Myosin light chain kinase controls voltage-dependent calcium channels in vascular smooth muscle. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466, 1377–1389.
doi:doi.org/10.1007/s00424-013-1380-3
- Matera & Cazzola. (2016). Muscarinic Receptor Antagonists. *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*, 41–62. doi:doi:10.1007/164_2016_68
- Meloche & Pouyssegur. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26(22), 3227–3239.
doi:doi:10.1038/sj.onc.1210414
- Neumeister et al. (2003). Cyclin D1 Governs Adhesion and Motility of Macrophages. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 2005–2015. doi: doi:10.1091/mbc.02-07-0102
- Nussinov & Tsai. (2012). The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs. *Current pharmaceutical design*, 18(9), 1311–1316. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2174/138161212799436377>
- Oenema et al. (2013). Cross-Talk between Transforming Growth Factor-β1 and Muscarinic M2 Receptors Augments Airway Smooth Muscle Proliferation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(1), 18–27. doi:10.1165/rcmb.2012-0261oc
- Orsini et al. (1999). MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(3), L479-L488. doi:doi:10.1152/ajplung.1999.277.3.L479
- p44-42-mapk-erk1-2-antibody*. (χ.χ.). Ανάκτηση από cellsignal:
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/p44-42-mapk-erk1-2-antibody/9102>
- Pagès, G. (1999). Defective Thymocyte Maturation in p44 MAP Kinase (Erk 1) Knockout Mice. *Science*, 286(5443), 1374–1377. doi:10.1126/science.286.5443.1374
- Patwa & Shah. (2015). Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth*, 59(9), 533-541. doi:10.4103/0019-5049.165849
- Pavalko et al. (1995). Phosphorylation of dense-plaque proteins talin and paxillin during tracheal smooth muscle contraction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(3), 563–571. doi:doi:10.1152/ajpcell.1995.268.3.c5
- Pedram, Razandi & Levin . (1998). Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 273, 26722–8.
- Pelaia et al. (2008). Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respiratory Medicine*, 102(8), 1173–1181. doi: 10.1016/j.rmed.2008.02.020

- Pelaia et al. (2015). Pharmacologic rationale underlying the therapeutic effects of tiotropium/olodaterol in COPD. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 1563–1572. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2147/TCRM.S84151>
- Pintor, A. V. (2020). MTT versus other cell assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials. A systematic review. *International Endodontic Journal*. doi:doi:10.1111/iej.13353
- Placeres-Uray et al. (2013). M2 Muscarinic acetylcholine receptor modulates rat airway smooth muscle cell proliferation. *The World Allergy Organization journal*, 6(1), 22. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-22>
- Pleuvry . (2004). Receptors, agonists and antagonists. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 5(10), 350-352. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1383/anes.5.10.350.52312>
- Qie & Diehl . (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*, 94(12), 1313-1326. doi:doi: 10.1007/s00109-016-1475-3
- Roux & Blenis. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), 320–344. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Ruvolo, P. (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia*, 15, 1153–1160. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402197>
- Sherwood, L. (2016). *Εισαγωγή στην Φυσιολογία του Ανθρώπου: Από τα κύτταρα στα συστήματα* (8th edition εκδ.). (μ. Μ. Τζιρογιάννης, Μεταφρ.) Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Smith . (1971). *Anatomy and Physiology of the Respiratory System*. *SAE Technical Paper Series*. doi:10.4271/710297
- Soares-Silva, M. D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, 7. Ανάκτηση από <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00183>
- Stamatiou et al. (2012). Cytokines and growth factors promote airway smooth muscle cell proliferation. *ISRN Inflamm*. doi: 10.5402/2012/731472
- Stamatiou et al. (2014). Long-term exposure to muscarinic agonists decreases expression of contractile proteins and responsiveness of rabbit tracheal smooth muscle cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 14(1). doi:10.1186/1471-2466-14-39
- Stamatiou, Paraskeva, Vasilaki et al. (2019). The muscarinic antagonist gallamine induces proliferation of airway smooth muscle cells regardless of the cell phenotype. *Pharmacol. Rep*, 71, 225–232. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.10.010>.
- Stamatiou, R. P. (2018). The muscarinic antagonist gallamine induces proliferation of airway smooth muscle cells regardless of the cell phenotype. *Pharmacological Reports*. doi:doi:10.1016/j.pharep.2018.10.010
- Strober . (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

- Thébaud et al. (2019). Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 78. doi:doi: 10.1038/s41572-019-0127-7.
- Tsetlin . (2020). Acetylcholine and Acetylcholine Receptors: Textbook Knowledge and New Data. *Biomolecules*, 10(6), 852. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/biom10060852>
- Verheijen, M. L. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro . *Sreports*, 9(1), 4641. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Walker et al. (1998). Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol. Pharmacol.*, 54, 1007–1015. doi: 10.1124/mol.54.6.1007
- Wang, Pavalko & Gunst. (1996). Tyrosine phosphorylation of the dense plaque protein paxillin is regulated during smooth muscle contraction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), 1594–1602. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1>
- Whitehouse. (2014). Nicotinic Receptors. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 587–589. doi:10.1016/b978-0-12-385157-4.00070-1
- Wright et al. (2013). Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 26(1), 42–49. doi:10.1016/j.pupt.2012.08.005
- Yan et al. (2018). Roles of airway smooth muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). doi:10.1186/s12967-018-1635-z
- Yang, K. H. (2006). Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell division*, 1(32). doi:10.1186/1747-1028-1-32
- Yap et al. (2019). Crosstalk Between Signaling Pathways Involved in the Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Hyperplasia. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi:10.3389/fphar.2019.01148
- Yoo et al. (2017). Phosphoinositide 3-Kinase in Asthma: Novel Roles and Therapeutic Approaches. *American journal of respiratory cell and molecular biology*,, 56(6), 700-707. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0308TR>
- Zhang and Liu. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhou et al. (2017). Tiotropium in Early-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New. England Journal of Medicine*, 377(10), 923-935. doi:10.1056/NEJMoa1700228
- Zuyderduyn et al. (2008). Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *European Respiratory Journal*,, 32(2), 265–274. doi:10.1183/09031936.00051407
- Ζίφα, Α. (2019). *Διακυτταρική Επικοινωνία - Μεταγωγή Σήματος* (4η έκδοση εκδ.). Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.