

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

ΚΑΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Ο ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ
ΜΑΚΡΟΛΙΔΩΝ ΣΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΤΩΝ
ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΧΡΗΣΤΟΥ Κ. ΔΑΕΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας (επιβλέπουσα)

ΖΩΗ ΔΑΝΙΗΛ

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ

Καθηγητής Φαρμακολογίας

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΖΩΗ ΔΑΝΙΗΛ

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας

ANNA ΒΑΣΙΛΑΚΗ

Λέκτορας Φαρμακολογίας

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

- Όνοματεπώνυμο:** Λάενας Χρήστος
- Πατρώνυμο:** Κωνσταντίνος
- Ημερομηνία γεννήσεως:** 05 – 12 – 1977
- Τόπος γεννήσεως:** Θεσσαλονίκη
- Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος
- Διεύθυνση κατοικίας:** Βονίτσης 14, Λάρισα 41335
Τηλ.: 2410628712 / 6932360321
- Διεύθυνση εργασίας:** Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας – 411 10 Λάρισα
Τηλ.: 2410-682896
- e-mail** daenaschristos001@yahoo.gr
- Μέση εκπαίδευση:** 1^ο Γενικό Λύκειο Βόλου 1995
Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα (19^{3/11})
- Ξένες Γλώσσες:** Zertifikat Deutch als Fremdsprache, 1992
Michigan Certificate of Proficiency in English, 1993
Cambridge Certificate of Proficiency in English, 1993

ΤΙΤΛΟΙ

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστήμιου του Αγίου Ανδρέα Πατρών, Μάρτιος 2002. Βαθμός Πτυχίου: Λίαν καλώς (7,32)

ΙΑΤΡΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ

- **18/7/2002 - 17/10/2002** : Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Ρόδου
- **20/10/2002- 29/10/2003:** Υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Καρπάθου
- **Ιανουάριος 2006- Μάιος 2006:** Ιατρός στο 412 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο

- **Νοέμβριος 2003- Φεβρουάριος 2007:** Επιστημονικός συνεργάτης Πνευμονολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **09/02/2007- σήμερα:** Ειδικευόμενος Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής Νοσοκομείου Λάρισας

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Συνεργάτης ως μεταφραστής και διορθωτής ιατρικών κειμένων του γραφείου Intertranslation του ομίλου Ξυνή και του εκδοτικού οίκου Βαγιονάκη από το 2004
- Συνεργάτης της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο πρόγραμμα ελέγχου του γενικού πληθυσμού για τη διάγνωση βρογχικού άσθματος, χρόνιας αναπνευστικής ανεπάρκειας και συνδρόμου απνοιών στον ύπνο στα Κέντρα Υγείας: Βελεστίνου (03/2004 και 05/2006), Φαρκαδώνας (03/04), Σοφάδων (04/2004), Ζαγοράς (06/2004), Κονιστρών (11/2004), Αγριάς (12/2004), Τυρνάβου (01/2005), Αργαλαστής (03/2005), Συκουρίου (05/2005), Φαρσάλων (06/2005), Αλμυρού (03/2006), Κύμης (05/2006), Ελασσόνας (09/2006)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- **Οκτώβριος 2004-Φεβρουάριος 2005:** Εκπαιδευτής στο μάθημα Ανατομίας-Φυσιολογίας στο ΙΕΚ Βόλου, τμήμα Νοσηλευτικής-Τραυματολογίας.
- **Μάρτιος 2005-Ιούνιος 2005:** Εκπαιδευτής στο μάθημα Ψυχιατρικής στο ΙΕΚ Βόλου, τμήμα Νοσηλευτικής-Τραυματολογίας.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ-ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- 4^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων, 3-5 Απριλίου 1998
- Ημερίδα της Επιστημονικής Εταιρίας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος με θέμα: «Σύγχρονες εξελίξεις στην ανθρώπινη αναπαραγωγή και στην υγεία της γυναίκας», Πάτρα, 19 Απριλίου 2000

- 6^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, 12-14 Μαΐου 2000
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Επιτροπής Ενδονοσοκομειακών Λοιμώξεων του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών από 6 ως 22 Μαρτίου 2001
- 7^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Λάρισα 27-29 Απριλίου 2001
- Ημερίδα «Επείγουσα Ιατρική και χρήση της τεχνολογίας της τηλεϊατρικής από τους γενικούς και αγροτικούς ιατρούς στα Δωδεκάνησα», Σύμη, Αύγουστος 2002
- Ημέρες Πνευμονολογίας, Αργαλαστή Πηλίου, 19-21 Σεπτεμβρίου 2003, που διοργανώθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 12^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 3-7 Δεκεμβρίου 2003
- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: «Νοσήματα του Υπεζωκότα», Λάρισα, 25-26 Φεβρουαρίου 2004, που διοργανώθηκε από την ομάδα Υπεζωκότα της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας
- Ημερίδα «Καρκίνος του Πνεύμονα: Σύγχρονες απόψεις για τη διάγνωση και τη θεραπεία του», Βόλος, 20 Μαρτίου 2004, που διοργανώθηκε από την Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία
- 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, 10-12 Ιουνίου 2004
- 13^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Πάτρα, 2-5 Δεκεμβρίου 2004
- Ημέρες Πνευμονολογίας, Νεοχώρι Καρδίτσας, 2-4 Σεπτεμβρίου 2005, που διοργανώθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 14^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 2005
- Ημέρες Πνευμονολογίας, Λάρισα, 22-24 Σεπτεμβρίου 2006, που διοργανώθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Ημερίδα «Αντιβιοτικά και αντιμετώπιση των λοιμώξεων», Λάρισα, 19 Οκτωβρίου 2006, που διοργανώθηκε από την Ελληνική Έρευνας Μελέτης και Εκπαίδευσης στις Λοιμώσεις
- 15^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Ηράκλειο, 2-5 Δεκεμβρίου 2006
- Ημέρες Πνευμονολογίας, Βόλος, 21-23 Σεπτεμβρίου 2007, που διοργανώθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Ημερίδα «Η θρομβοεμβολική νόσος υπό το πρίσμα της Ιατρικής Βασισμένης σε ενδείξεις», Τρίκαλα, 24 Νοεμβρίου 2007
- 16^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007
- Ημέρες Πνευμονολογίας, Καρδίτσα, 12-13 Σεπτεμβρίου 2008, που διοργανώθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αλεξανδρούπολη, 20-23 Νοεμβρίου 2008
- European Respiratory Society Annual Congress 2008, Berlin Germany, 4-8 October 2008

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Χ. Δάνας, Α. Χατζηευθυμίου, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς. Η αζιθρομυκίνη ασκεί σημαντική χαλαρωτική δράση στις λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών. 14^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 2005
2. Χ. Δάνας, Κ.Ι. Γουργουλιάνης. Ο ρόλος των μακρολιδών στη σύσπαση των αεραγωγών. Ημέρες Πνευμονολογίας, Βόλος, Σεπτέμβριος 2007
3. Χ. Δάνας, Α. Χατζηευθυμίου, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Π.Α. Μολυβδάς. Η αζιθρομυκίνη ελαττώνει την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών σε παράγοντες που προκαλούν σύσπαση. 15^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2006
4. Ε. Καρέτση, Χ. Δάνας, Δ. Παπαδόπουλος. Συζήτηση βρογχοσκοπικών ευρημάτων. Ημέρες Πνευμονολογίας, Βόλος, Σεπτέμβριος 2007

ΒΡΑΒΕΙΑ

Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση με τίτλο « Η ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ ΕΛΑΤΤΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΣΥΣΠΑΣΗ». 15^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2006

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. C. Daenas, K. Bartziokas, Z. Daniil, N. Kerenidi, D. Makris. VRI evaluation in patients and controls: preliminary results. European Respiratory Society Annual Congress 2008, Berlin, October 2008
2. K. Bartziokas, C. Daenas, P. Zygoulis, A. Triantaris, D. Makris, K.I. Gourgoulialis. VRI for the diagnosis of community acquired pneumonia: preliminary results. European Respiratory Society Annual Congress 2008, Berlin, October 2008

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. Eur J Pharmacol. 2006 Dec 28;553(1-3):280-7
2. Makris D, Papaioannou AI, Daenas C, Gourgoulialis KI. Septic embolism with subacute onset. J Infect. 2008 Apr;56(4):294-5

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	11
Συντομογραφίες.....	13
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1 ΣΥΣΠΑΣΗ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΙΩΝΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ	15
1.1 Γενικά.....	15
1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά των λείων μυών	15
1.1.2 Διάκριση λείων μυών σε υπότυπους.....	16
1.1.3 Δυναμικό μεμβράνης και ισορροπία ιόντων στο λείο μυϊκό κύτταρο.....	17
1.2 Μηχανισμός συστολής.....	20
1.2.1 Αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης	20
1.2.2 Ρόλος των κυκλικών νουκλεοτιδίων.....	22
1.2.3 Ισορροπία MLCK-MLCK	25
1.3 Σηματοδότηση για συστολή στο λείο μυϊκό κύτταρο.....	27
1.3.1 Προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη σύσπαση.....	27
1.3.2 Ρόλος του σαρκοπλασματικού δικτύου	30
1.3.3 Προκαλούμενη από διάλυμα KCl σύσπαση	31
1.4 Σηματοδότηση για χάλαση στο λείο μυϊκό κύτταρο	32
1.4.1 Ελάττωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων Ca^{+2}	32
1.4.2 Προκαλούμενη από β-αδρενεργικούς υποδοχείς χάλαση.....	33
1.4.3 Ρόλος του επιθηλίου στη χάλαση του λείου μυός	34
1.5 Παθολογικός μηχανισμός σύσπασης του λείου μυϊκού κυττάρου	35
2 ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ	37
2.1 Φαρμακολογικές ιδιότητες αζιθρομυκίνης	37
2.2 Ανοσοτροποποιητικός ρόλος των μακρολιδών	38
2.3 Κλινική χρήση μακρολιδών πέρα από τη βακτηριοστατική τους δράση. ...	40
2.3.1 Διάχυτη πανβρογχιολίτιδα	40
2.3.2 Κυστική ίνωση.....	41
2.3.3 Βρογχεκτασίες – Σύνδρομο αποφρακτικής βρογχιολίτιδας	41
2.3.4 Χρόνια παραρινοκολπίτιδα – Ρινικοί πολύποδες	42
2.3.5 Άσθμα	43
2.3.6 Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).....	49
2.4 Ρόλος των μακρολιδών στη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων.....	51
2.4.1 Δράση μακρολιδών στο μυομήτριο	51
2.4.2 Δράση μακρολιδών στο γαστρεντερικό σύστημα.....	52
2.4.3 Δράση μακρολιδών στο ουροποιητικό σύστημα	52
2.4.4 Δράση μακρολιδών στο αναπνευστικό σύστημα.....	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	55
4 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
4.1 Προετοιμασία ιστού και πειράματα συστολών.....	55
4.2 Εφαρμογή των προς μελέτη ουσιών	56
4.2.1 Επίδραση με καρβαχόλη.....	56
4.2.2 Επίδραση με διάλυμα KCl.....	58
4.2.3 Μελέτη του ρόλου του εξωκυττάρου ασβεστίου στη δράση της αζιθρομυκίνης.....	58
4.2.4 Μελέτη της επίδρασης της $Na^{+}-K^{+}$ ΑΤΡάσης, της SERCA, των επιπέδων cAMP και cGMP και των Rho κινασών	59
4.3 Φάρμακα και χημικές ουσίες	60
4.4 Στατιστική ανάλυση.....	60

5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
5.1	Επίδραση αζιθρομυκίνης στον βασικό τόνο των ΛΜΙ.....	61
5.2	Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ, με και χωρίς επιθήλιο, που βρίσκονται σε σύσπαση με 3×10^{-7} M καρβαχόλη.....	61
5.3	Η δράση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) συναρτήσει του χρόνου.	64
5.4	Ρόλος της προεπάσης των ιστοτεμαχίων με αζιθρομυκίνη, στη σύσπαση των ΛΜΙ με 3×10^{-7} M καρβαχόλη.	65
5.5	Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μέγιστη σύσπαση των ΛΜΙ με καρβαχόλη.	67
5.6	Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ, που βρίσκονται σε σύσπαση με διάλυμα 80 mM KCl.	68
5.6.1	Σύγκριση της επίδρασης της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ΛΜΙ, που έχουν προσυσπαστεί με καρβαχόλη (3×10^{-7} M) και KCl (80 mM).	70
5.6.2	Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ, που βρίσκονται σε σύσπαση με διάλυμα 80 mM KCl παρουσία ατροπίνης.	71
5.7	Ο ρόλος της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.....	73
5.7.1	Επίδραση αζιθρομυκίνης σε ΛΜΙ, απουσία εξωκυττάριας Ca^{2+}	73
5.7.2	Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΙ, παρουσία βεραπαμίλης.	74
5.8	Ρόλος της Na^{+} - K^{+} ΑΤΡάσης στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης....	77
5.9	Ο ρόλος της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.	78
5.10	Ο ρόλος της Rho-κινάσης στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.	81
5.11	Ο ρόλος των cAMP/cGMP στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.	83
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
6.1	Πιθανός μηχανισμός δράσης	92
6.2	Συμπεράσματα	94
6.3	Κλινική σημασία αποτελεσμάτων	95
7	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	96
8	ABSTRACT.....	97
9	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο σεβαστό μου Καθηγητή Πνευμονολογίας, Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κύριο Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, που με υποδέχτηκε με θέρμη στην επιστημονική του κοινότητα, σε ένα περιβάλλον με άρτια κατάρτιση, που ευνοεί την ανάπτυξη πολυμερούς δραστηριότητας. Μου παρείχε τα κατάλληλα ερεθίσματα, για να διευρύνω τις επιστημονικές μου αναζητήσεις, διακρίνοντας την αδιόρατη πλην όμως εγγύτατη σχέση ανάμεσα στην κλινική πράξη και το πείραμα, και πυροδότησε το ενδιαφέρον μου για τη βασική έρευνα. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγησή του. Οι παρατηρήσεις και οι συστάσεις του με βοήθησαν να ξεπεράσω κωλύματα και να παρακάμψω ατοπήματα, χωρίς να εξαντλούν ωστόσο τα περιθώρια πρωτοβουλίας και αυτενέργειας. Με μύησε στην ελευθεριότητα της ορθολογικής επιστημονικής σκέψης και στην εμπέδωση της βασισμένης σε ενδείξεις κλινικής πράξης. Πρωταρχικώς, δε, τον ευχαριστώ που δε διέψευσε τις προσδοκίες μου· σε όλη αυτή τη διαδρομή στάθηκε πρότυπο συνέπειας και αφοσίωσης.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω, επίσης, στον Καθηγητή Φυσιολογίας, κύριο Πασχάλη Αδάμ Μολυβδά για την πολύτιμη βοήθεια, την εποπτεία και την καθοδήγησή του. Μου παραχώρησε το Εργαστήριο Φυσιολογίας και εξασφάλισε την υλικοτεχνική υποδομή για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης. Τον ευχαριστώ για τις ουσιαστικές υποδείξεις του στην επίλυση πρακτικών ζητημάτων και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη στοιχειοθεσία του αντικειμενικού σκοπού της μελέτης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της. Οι διορθώσεις του συνέβαλαν ουσιαστικά στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου της διδακτορικής μου διατριβής.

Στην επιβλέπουσα τη διδακτορική μου διατριβή, Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας, κυρία Αποστολία Χατζηευθυμίου, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την αδιάλειπτη παρουσία της κατά τη διενέργεια των πειραμάτων και την αμέριστη συμπαράστασή της. Παράλληλα, θα ήθελα να καταθέσω το θαυμασμό μου για την προσωπικότητα και την έντονα δημιουργική ιδιοσυγκρασία της· έχει ανάγει το Εργαστήριο Φυσιολογίας σε ένα «φυτώριο πολυτεχνίας». Με μύησε στη μεθοδολογία του πειράματος, μου δίδαξε ότι η εξαγωγή συμπερασμάτων στα πλαίσια της βασικής έρευνας είναι μια διαδικασία επίπονη και

χρονοβόρα, αλλά, συγχρόνως, μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό και την καρτερικότητά της. Με ενέπνευσε με τη συγκρατημένη φιλοδοξία της και τη σεμνή επιστημονικότητά της. Η συνεισφορά της υπήρξε ανεκτίμητη σε όλα τα στάδια υλοποίησης της παρούσας μελέτης· επιδίωξε τελειοθηρικά την επιστημονικά έγκυρη και έγκαιρη ανακοίνωση των αποτελεσμάτων.

Θερμότερες ευχαριστήριες εκφράζω στην Επίκουρο Καθηγήτρια Πνευμονολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κυρία Ζωή Δανιήλ, για την εποπτεία και την καθοδήγησή της. Οι παρατηρήσεις και οι συστάσεις της υπήρξαν ουσιαστικές.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τις αξιόλογες συναδέλφους μου Βάσια Κουλουμέντα και Ελένη Καρέτση για τις υποδείξεις τους στα πρώτα βήματα μου στο Εργαστήριο και την άψογη συνεργασία τους σε ερευνητικό και κλινικό επίπεδο. Ευχαριστώ τον κύριο Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την έγκαιρη επίλυση των τεχνικής φύσης προβλημάτων και την καταλυτική συνεισφορά του στην εξέλιξη των πειραμάτων.

Το λιγότερο που θα μπορούσα να αποδώσω είναι ένα μεγάλο ευχαριστώ, για την αδιάλειπτη υποστήριξη, την καθημερινή συμπαράσταση και έμπνευση, στη σύντροφο της ζωής μου, Ρίτα.

Συντομογραφίες

AC: αδενυλική κυκλάση
ACh: ακετυλοχολίνη
ADP: διφωσφορική αδενοσίνη
ANP: νατριουρητικό πεπτίδιο των κόλπων
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη
BNP: νατριουρητικό πεπτίδιο του εγκεφάλου
CaD: καλδεσμόνη
cADPR: κυκλική ADP ριβόζη
cAMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cGMP: κυκλική μονοφωσφορική γουανίνη
CPA: κυκλοπιαζονικό οξύ
CPI-17: ειδικό για τους λείους μύες φωσφολιπίδιο
DAG: διακυλογλυκερόλη
ERK: ρυθμιζόμενες από εξωκυττάριο σήμα κινάσες
GC: γουανυλική κυκλάση
Gi /s: ανασταλτική/ διεγερτική πρωτεΐνη G
IBMX: 3-ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιόνη
IP₃: τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη
K_{ATP}: ATP-εξαρτώμενοι διάλυτοι καλίου
K_{Ca}: ασβεστιο-εξαρτώμενοι διάλυτοι καλίου
K_{IR}: προς τα έσω ανορθωτές διάλυτοι καλίου
K_v: τασεο-εξαρτώμενοι διάλυτοι καλίου
M_{1,2,3}: μουσκαρινικοί υποδοχείς
MAPK: ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες
MLCK: κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
MLCP: φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
NANC: μη-αδρενεργικό μη-χολινεργικό σύστημα
NO: μονοξειδίο του αζώτου
 cNOS: δομική μορφή της συνθετάσης του NO
 iNOS: επαγωγίμη μορφή της συνθετάσης του NO
 nNOS: νευρωνική μορφή της συνθετάσης του NO
PDE: φωσφοδιεστεράση
PKA: πρωτεϊνική κινάση A
PKC: πρωτεϊνική κινάση C
PKG: πρωτεϊνική κινάση G
PLC: φωσφολιπάση C
PIP₂: διφωσφορική-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
RhoA: μονομερής πρωτεϊνή RhoA
RhoK: Rho κινάση
RhoGEF: νουκλεοτιδικοί γουανινικοί παράγοντες ανταλλαγής
RyR: υποδοχείς ρυανοδίνης
SERCA: Ca⁺² ATPάση του ενδοπλασματικού δικτύου
Vm: δυναμικό κυτταροπλασματικής μεμβράνης
VDCC: τασεο-εξαρτώμενοι διάλυτοι ασβεστίου
VIP: αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο
Y-27632: [(R)-(+)-*trans*-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδροχλωρίδιο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδη

AZ: αζιθρομυκίνη
EM: ερυθρομυκίνη
KAM: κλαριθρομυκίνη
AMI: λείες μυϊκές ίνες
PEM: ροξιθρομυκίνη

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΣΥΣΠΑΣΗ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΕΙΑΣ

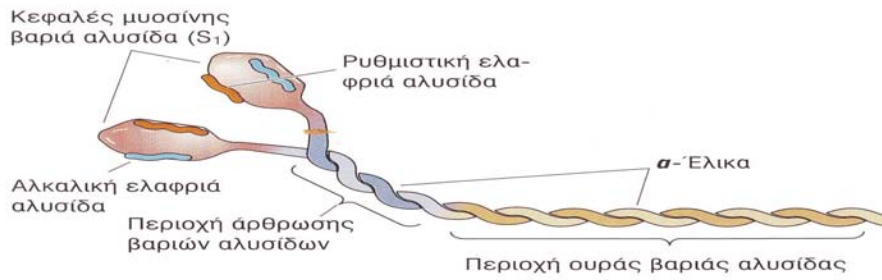
1.1 Γενικά

1.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά των λείων μυών

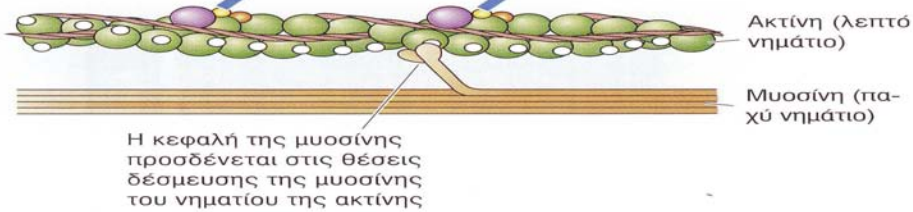
Πρόκειται για ατρακτοειδούς σχήματος κύτταρα, τα οποία δεν περιέχουν σαρκομερίδια (όπως οι γραμμωτοί μύες). Στο εσωτερικό του κυττάρου δεν υπάρχουν T-σωληνάκια, ενώ το σαρκοπλασματικό δίκτυο είναι πτωχότερα ανεπτυγμένο σε σχέση με τον γραμμωτό μυ. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη όμως του λείου μυϊκού κυττάρου δημιουργεί πολλές εγκολπώσεις, ώστε η είσοδος ιόντων Ca^{+2} να γίνεται γρηγορότερα. Μεταξύ γειτονικών λείων μυϊκών κυττάρων υπάρχουν χασματικές συνδέσεις (gap junctions) που επιτρέπουν την άμεση επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, άρα τη συντονισμένη συστολή τους.

Δεν υπάρχει τροπονίνη, ενώ ο ρόλος της μυοσίνης στη συστολή του κυττάρου είναι αναβαθμισμένος (1). Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από 6 υπομονάδες, από δύο βαριές αλυσίδες που καθεμιά αποτελείται από μία κεφαλή, μία ράβδο και μία ουρά, καθώς και 4 ελαφριές αλυσίδες, που γειτνιάζουν ανά 2 με κάθε κεφαλή μυοσίνης (Εικόνα 1). Στην περιοχή της άρθρωσης κάθε μυοσίνης, τα μόρια ανοίγουν για να σχηματίσουν δύο σφαιρικές κεφαλές, που αποτελούν τις εγκάρσιες γέφυρες μεταξύ των νηματίων μυοσίνης-ακτίνης (2). Καθεμιά από τις κεφαλές έχει μια θέση δέσμευσης για την ακτίνη και μια θέση για τη δέσμευση και τη υδρόλυση ενός μορίου ATP. Επιπλέον, η κεφαλή κάθε μυοσίνης συνδέεται με 2 ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης, την αλκαλική, που ρόλος της είναι η σταθεροποίηση της περιοχής της κεφαλής, καθώς και τη ρυθμιστική, που ρυθμίζει τη δραστηριότητα της μυοσίνης ως ATPάσης. Η βάση της μυϊκής συστολής είναι ένας κύκλος, όπου οι κεφαλές της μυοσίνης συνδέονται με τα νημάτια της ακτίνης, στη συνέχεια οι εγκάρσιες γέφυρες παραμορφώνονται και τελικά οι κεφαλές της μυοσίνης αποσυνδέονται από την ακτίνη.

ΜΟΡΙΟ ΜΥΟΣΙΝΗΣ



ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΛΕΠΤΟΥ ΚΑΙ ΠΑΧΕΩΣ ΝΗΜΑΤΙΟΥ

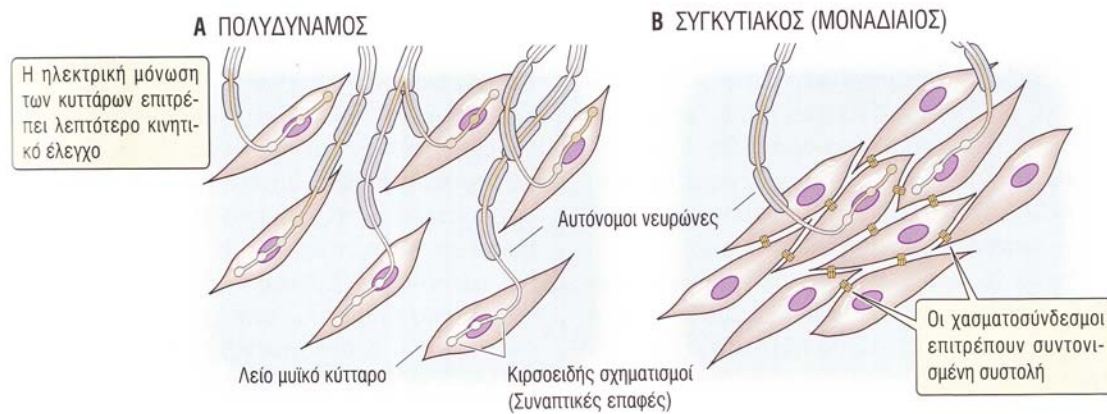


Εικόνα 1 Δομή λεπτών και παχίων νηματίων. Προσαρμογή από W. Boron and E. Boulpaer, *Medical Physiology, a cellular and molecular approach*, Elsevier Inc. 2005 (1)

1.1.2 Διάκριση λείων μυών σε υπότυπους

Η νεύρωση των λείων μυών γίνεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Σε αντίθεση με το σκελετικό μυϊκό κύτταρο που έχει μόνο μία νευρομυϊκή σύναψη, στο λείο μυϊκό κύτταρο ο νευρώνας κάνει πολλαπλές επαφές. Σε κάθε σημείο επαφής ο νευράξονας επεκτείνεται διαμορφώνοντας κίρσοειδείς σχηματισμούς, απ' όπου απελευθερώνονται σε προσχηματισμένα κυστίδια οι νευροδιαβιβαστές.

Ο υπότυπος των συγκυτιακών (single unit) λείων μυϊκών κυττάρων συναντάται στο έντερο, στο μυομήτριο, στην ουροδόχο κύστη, στους ουρητήρες και στα μικρά αγγεία. Τα κύτταρα αυτά έχουν πολλές χασματικές συνδέσεις μεταξύ τους και συσπώνται ρυθμικά σαν ενιαία μονάδα (Εικόνα 2). Συχνά παρουσιάζουν αυτόματη δραστηριότητα. Διαθέτουν πλαστικότητα, δηλαδή με την εφαρμογή μικρής τάσης η μυϊκή ίνα επιμηκύνεται (έτσι μπορεί η ουροδόχος κύστη να αποθηκεύει ούρα). Όταν όμως η τάση είναι μεγαλύτερη ή εφαρμοστεί γρήγορα προκαλείται εκπόλωση των κυττάρων και σύσπαση.



Εικόνα 2 Οι υπότυποι των λείων μυϊκών ινών. Α. Πολυδύναμα κύτταρα (multi unit), καθένα με τη δική του συναπτική είσοδο και Β. Συγκυτιακά κύτταρα (single unit), όπου μόνο λίγα φέρουν άμεση συναπτική είσοδο. Προσαρμογή από W. Boron and E. Boulpaep, *Medical Physiology, a cellular and molecular approach*, Elsevier Inc. 2005 (1)

Ο υπότυπος των πολυδύναμων (multi unit) λείων μυϊκών κυττάρων απαντάται στην τραχεία, στους βρόγχους, στα μεγάλα αγγεία, στους σφιγκτήρες, στους οφθαλμικούς και στους ορθωτήρες των τριχών μύες. Η νεύρωση μοιάζει με αυτήν του σκελετικού μύος, στο ότι κάθε κύτταρο δέχεται τη δική του συναπτική είσοδο. Η νεύρωση είναι πλουσιότερη σε σχέση με τους συγκυτιακούς λείους μύες και η ένταση της σύσπασης διαβαθμίζεται ανάλογα με το νευρικό ερέθισμα. Επιπρόσθετα, οι χασματικές συνδέσεις είναι λιγότερες, οι μυϊκές ίνες είναι δομικά ανεξάρτητες από τις υπόλοιπες και σπάνια παρατηρούνται αυτόματες εκπολώσεις.

Η προαναφερθείσα κατάταξη δεν είναι απόλυτη. Η λειτουργία των λείων μυών μπορεί να επηρεαστεί από ορμόνες, αυτοκρινικούς ή παρακρινικούς παράγοντες και άλλα χημικά σήματα. Για παράδειγμα, η προγεστερόνη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης προκαλεί ελάττωση του αριθμού των χασματικών συνδέσεων των ινών του μυομήτριου, που συμπεριφέρονται σαν πολλαπλές μονάδες. Το αντίθετο συμβαίνει με τα προοδευτικά αυξανόμενα επίπεδα οιστρογόνων, προετοιμάζοντας το μυομήτριο για τον τοκετό.

1.1.3 Δυναμικό μεμβράνης και ισορροπία ιόντων στο λείο μυϊκό κύτταρο

Η μεμβρανική φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα περιέχει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με πολλές λειτουργίες, περιλαμβανομένης και της εκλεκτικής διέλευσης ιόντων. Στους διαύλους η μετακίνηση των ιόντων οφείλεται στην ηλεκτροχημική τους κλίση, ενώ στις αντλίες απαιτείται κατανάλωση ενέργειας για την λειτουργία

τους (η μετακίνηση γίνεται ενάντια στην ιοντική κλίση συγκέντρωσης εντός κι εκτός του κυττάρου).

Η ροή ενός ιόντος X μέσω ενός διαύλου εξαρτάται από την ηλεκτροχημική του κλίση, η οποία αποτελεί το άθροισμα α) της διαφοράς δυναμικού από όλα τα ιόντα μεταξύ της μεμβράνης και β) της διαφοράς συγκέντρωσης του συγκεκριμένου ιόντος. Το δυναμικό της μεμβράνης (V_m) μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση του Goldman:

$$V_m = RT / F \ln \{ (P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_o) / (P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_i) \}$$

όπου R= σταθερά των αερίων, T = θερμοκρασία, F = σταθερά Faraday,

P = σταθερά διαπερατότητας για το συγκεκριμένο ιόν,

$[K^+]_o$ = εξωκυττάρια συγκέντρωση και $[K^+]_i$ = ενδοκυττάρια συγκέντρωση

Τα σημαντικότερα ιόντα που επηρεάζουν το μεμβρανικό δυναμικό (V_m) του λείου μυϊκού κυττάρου είναι το ιόν ασβεστίου (Ca^{+2}) και το ιόν καλίου (K^+). Το λείο μυϊκό κύτταρο, σε αντίθεση με το νευρικό κύτταρο, διαθέτει λίγους τασηο-εξαρτούμενους δίαυλους νατρίου (Na^+). Στο V_m ηρεμίας, η συγκέντρωση του K^+ είναι 35 φορές μεγαλύτερη εντός τους κυττάρου, ενώ του ιόντος νατρίου (Na^+) είναι 10 φορές μεγαλύτερη εξωκυτταρίως.

Η συγκέντρωση Ca^{+2} εντός του κυτταροπλάσματος υπολείπεται πολύ σε σχέση με την εξωκυττάρια, έτσι όταν οι δίαυλοι του ιόντος είναι ανοικτοί παρατηρείται ισχυρό ρεύμα προς το εσωτερικό του κυττάρου. Οι δίαυλοι Ca^{+2} είναι οι ακόλουθοι:

α) τασηο-εξαρτούμενοι (Voltage Dependent Calcium Channels, VDCC) ή L (long) τύπου δίαυλοι Ca^{+2} : Οι VDCC είναι δίαυλοι που ανοίγουν και κλείνουν σχετικά αργά (3). Χαρακτηριστικό των VDCC είναι ότι ανοίγουν (χωρίς άλλο ερέθισμα) σε ελαφρώς θετικά μεμβρανικά δυναμικά και κλείνουν όταν ελαττωθεί το V_m (στάδιο επαναπόλωσης της μεμβράνης). Όπως θα αναφερθεί σε επόμενα κεφάλαια, οι VDCC μπορούν να ενεργοποιηθούν και με άλλους τρόπους, όπως μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) ή των υποδοχέων ρυανοδίνης (RyR). Υπάρχουν αναστολείς αυτών των διαύλων ασβεστίου, πολλοί από τους οποίους χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη, όπως η νιφεδιπίνη, η βεραπαμίλη και η δελτιαζέμη (4, 5).

β) χημειο-εξαρτώμενοι διάλυτοι Ca^{+2} : ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση με κάποια ουσία

γ) T(fast)-τύπου διάλυτοι Ca^{+2} . Οι T-τύπου διάλυτοι Ca^{+2} ανοίγουν και κλείνουν γρήγορα, ενώ δεν αναστέλλονται από τους γνωστούς αναστολείς των διαύλων ασβεστίου, τύπου βεραπαμίλης. Απαντώνται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου του λείου μυϊκού κυττάρου.

Το ιόν καλίου (K^+) διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην επαναπόλωση της μεμβράνης (6). Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαύλων K^+ :

α) ασβεστιο-εξαρτώμενοι διάλυτοι K^+ (K_{Ca}): Διακρίνονται σε μεγάλους (maxi ή BK), ενδιάμεσους (IK_{Ca}) και μικρούς (SK_{Ca}) διαύλους K^+ (6, 7). Η αγωγιμότητά τους είναι πολύ μεγάλη. Ενεργοποιούνται από ιόντα Ca^{+2} , σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, άρα προϋποθέτουν την είσοδο Ca^{+2} προς το κυτταρόπλασμα. Όλοι οι K_{Ca} διάλυτοι αναστέλλονται από μη-ειδικούς αναστολείς, όπως το τετρααιθυλαμμώνιο (TEA) και την προκαΐνη. Οι BK διάλυτοι αναστέλλονται από τοξίνες σκορπιού, όπως την καρυμπτοξίνη και την ιβεριτοξίνη. Η απαμίνη, συστατικό του δηλητηρίου της μέλισσας, αναστέλλει εκλεκτικά τους SK_{Ca} διαύλους.

β) ATP-εξαρτώμενοι διάλυτοι K^+ (K_{ATP}): Παίζουν ρόλο στην επαναφορά του V_m στο επίπεδο ηρεμίας, άρα στη χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου. Οι K_{ATP} παρατηρούνται σε διάφορους τύπους λείων μυών (8). Συμμετέχουν στην επαναπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι σουλφονουλορίες, όπως η γλιβενκλαμίδα και γλιπιζίδα, αναστέλλουν εκλεκτικά τους K_{ATP} διαύλους. Η χρωμοκαλίνη και η λεμακαλίμη (8) ενεργοποιούν τους K_{ATP} διαύλους, προκαλώντας χάλαση των λείων μυών των αεραγωγών του εντέρου και του μυομητρίου. Το άνοιγμα των K_{ATP} έχει φανεί ότι in vivo αναστέλλει τον προκαλούμενο από ισταμίνη βρογχόσπασμο, περισσότερο στα υπεραντιδραστικά παρά στα φυσιολογικά ζώα (9).

γ) τασσεοεξαρτώμενοι διάλυτοι K^+ (delayed outward rectifier, K_V): Πρόκειται ουσιαστικά για τασσεο-εξαρτώμενους διαύλους, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαναπόλωση της μεμβράνης (6). Αναστολέας τους είναι η 4-αμινοπυριδίνη (4-AP).

δ) προς τα έσω ανορθωτές διάλυτοι K^+ (delayed inward rectifier, K_{IR}): Σε αντίθεση με τους K_{Ca} και τους K_V που ενεργοποιούνται με την εκπόλωση της μεμβράνης, οι K_{IR} ενεργοποιούνται στη φάση υπερπόλωσης της μεμβράνης. Πιστεύεται ότι αποτρέπουν την εκσεσημασμένη απώλεια ενδοκυττάρου K^+ και ότι αλληλεπιδρούν με την Na^+-K^+ ATPάση της μεμβράνης (6).

Στην κατάσταση ηρεμίας του λείου μυϊκού κυττάρου οι διάλυτοι K^+ είναι κλειστοί. Μόλις διεγερθεί η μεμβράνη (άρα ξεκινούν οι διαδικασίες για τη σύσπαση του κυττάρου), ανοίγουν οι διάλυτοι K_v και ακολούθως οι K_{Ca} . Λόγω της μεγάλης χημικής κλίσης του K^+ και του τεράστιου αριθμού των διαύλων στη μεμβράνη, το K^+ κυριαρχεί στον καθορισμό του μεμβρανικού δυναμικού (V_m). Τα υπόλοιπα κατιόντα, όπως το Ca^{+2} και το Na^+ , δεν μπορούν να συναγωνιστούν την αθρόα κίνηση του K^+ . Το V_m αλλάζει, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η ηλεκτρική κλίση των ιόντων Ca^{+2} και να κλείνουν οι διάυλοί τους (3).

Οι λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών διαθέτουν μια λειτουργική Na^+-K^+ αντλία, που συμμετέχει στη ρύθμιση του δυναμικού ηρεμίας των αεραγωγών (10). Η αντλία αυτή βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δουλεύει μεταφέροντας $3Na^+$ εντός του κυττάρου μαζί με $2K^+$ εκτός του κυττάρου. Επειδή η κίνηση αυτών των ιόντων συμβαίνει ενάντια στην κλίση συγκέντρωσής τους, η αντλία καταναλώνει ενέργεια με τη μορφή ATP. Η λειτουργία της αντλίας είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του V_m , αφού εξασφαλίζει την κλίση συγκέντρωσης του K^+ εκατέρωθεν της μεμβράνης. Ένας γνωστός αναστολέας της Na^+-K^+ ATPάσης είναι η ουαμπαΐνη (11).

1.2 Μηχανισμός συστολής

1.2.1 Αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης

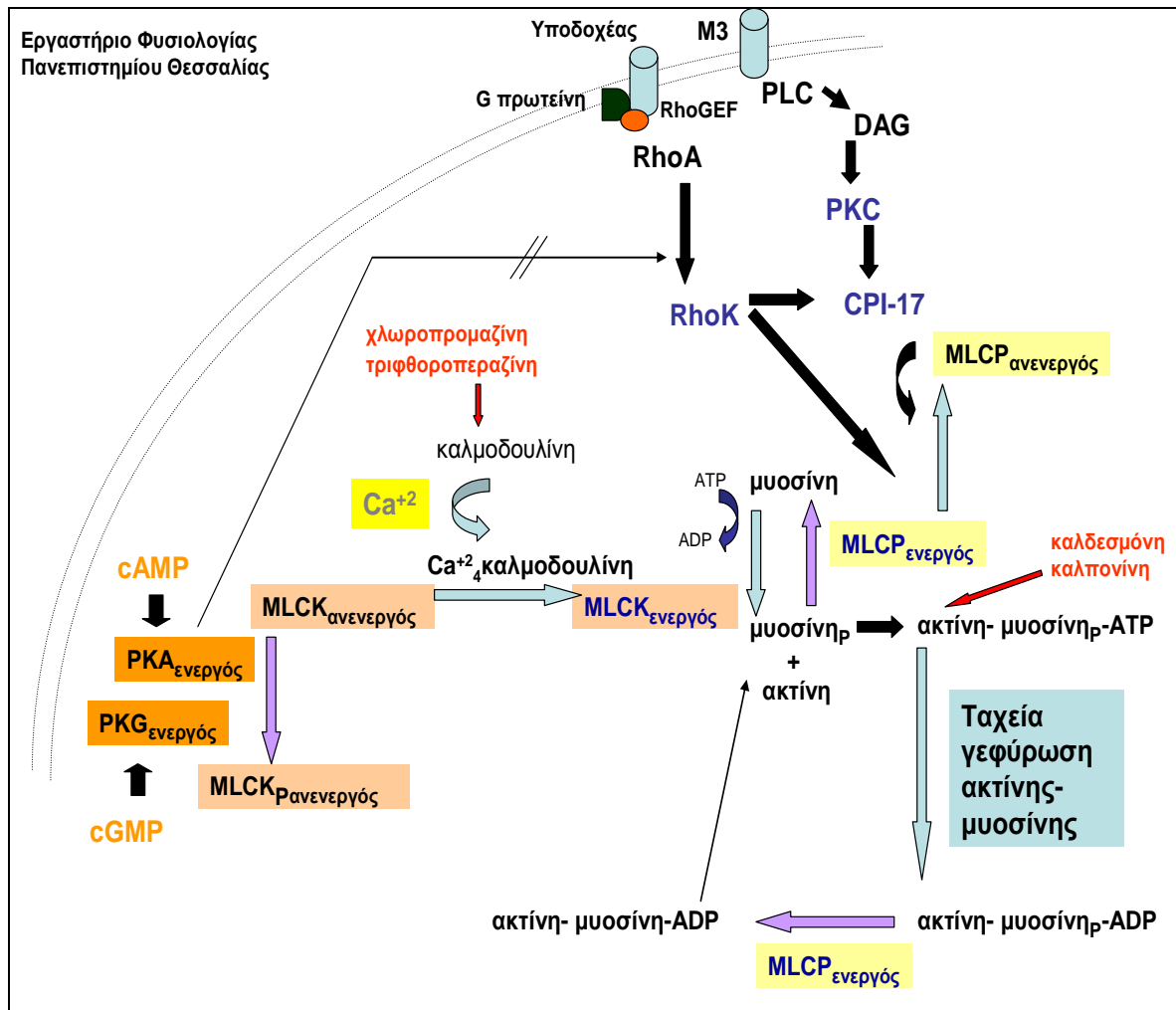
Ο ακρογωνιαίος λίθος της συστολής του λείου μυϊκού κυττάρου είναι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{+2} (Εικόνα 3). Ο μηχανισμός σύσπασης στηρίζεται στο σχηματισμό εγκάρσιων γεφυρών (cross bridging) μεταξύ των ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης.

Το Ca^{+2} συνδέεται με την πρωτεΐνη καλμοδουλίνη (σε αναλογία 4:1) και με τη σειρά του το σύμπλεγμα αλληλεπιδρά με την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης ($MLCK_{ανενεργός}$), ενεργοποιώντας το ένζυμο. Το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα Ca^{+2} -καλμοδουλίνη- $MLCK_{ενεργός}$ φωσφορυλιώνει μια σερίνη στη ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης. Η διαδικασία απαιτεί ενέργεια, η οποία παρέχεται από την υδρόλυση ενός μορίου ATP. Η φωσφορυλίωση της μυοσίνης (μυοσίνη_p) αλλάζει τη διαμόρφωση της κεφαλής, κάτι που αυξάνει κατά πολύ τη δραστηριότητά της ως ATPάσης.

Απουσία ATP, στο σύμπλοκο ακτίνη-μυοσίνη_p η κεφαλή της μυοσίνης βρίσκεται σε γωνία 45° με τα νημάτια ακτίνης και το σύστημα θα μπορούσε να

παραμένει σε αυτή την κατάσταση για απροσδιόριστα μεγάλο διάστημα, όπως συμβαίνει με την πρωματική ακαμψία. Η δέσμευση ενός μορίου ATP στην κεφαλή της μυοσίνης, μειώνει τη συγγένεια ακτίνης-μυοσίνης αναγκάζοντας τα δύο μόρια να απομακρυνθούν μεταξύ τους. Η διάσπαση του ATP σε ADP και οργανικό φώσφορο πάνω στη μυοσίνη, αλλάζει τη θέση της κεφαλής από 45° σε 90° σε σχέση με το νημάτιο ακτίνης. Ακολουθεί η πρόσδεση κεφαλής μυοσίνης-ακτίνης και η δημιουργία μια εγκάρσιας γέφυρας. Η απομάκρυνση του φωσφόρου κάμπτει την κεφαλή της μυοσίνης κατά 45°, με αποτέλεσμα το νημάτιο της ακτίνης να συρθεί πάνω στο νημάτιο της μυοσίνης, παράγοντας δύναμη και κίνηση. Ένα άλλο ένζυμο με σημαντική αξία, είναι η φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCP), η οποία δρα αποφορλιώνοντας τις ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης και ξεκινά ουσιαστικά τη διαδικασία της χάλασης.

Υπάρχουν αναστολείς της καλμοδουλίνης όπως η τριφθοροπεραζίνη και η χλωροπρομαζίνη, οι οποίες αναστέλλουν τη σύνδεσή της με το Ca^{+2} . Άλλα μόρια, όπως η καλδεσμόνη και η καλπονίνη, αναστέλλουν *in vitro* την παραγωγή συμπλεγμάτων ακτίνης-μυοσίνης με υψηλή δραστηριότητα ATPάσης. Έχει φανεί, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και τεχνικών τρισδιάστατης απεικόνισης μεμονωμένων λείων μυϊκών ινών, πως τα μόρια της καλπονίνης και της καλδεσμόνης δεσμεύονται περιφερικά στον άξονα της ακτίνης (12, 13).



Εικόνα 3 Μηχανισμός σύσπασης του λείου μυϊκού κυττάρου.

Τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{+2}) ενώνονται με τη καλμοδουλίνη και το σύμπλοκο ενεργοποιεί την κίνηση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK). Η φωσφορυλιωμένη μυοσίνη (μυοσίνη_p) ενώνεται με την ακτίνη και το όλο σύμπλεγμα έχει υψηλή δραστηριότητα ΑΤΡάσης. Ακολουθεί η δέσμευση και η υδρόλυση του ΑΤΡ, ο σχηματισμός εγκάρσιων γεφυρών και τελικά η ολίσθηση των νηματίων ακτίνης-μυοσίνης. Η MLCK αδρανοποιείται από τις πρωτεϊνικές κινάσες Α (PKA) και G (PKG).

Η φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCP) αποφωσφορυλιώνει τη μυοσίνη_p. Η MLCP απενεργοποιείται από το ειδικό για τους λείους μύες φωσφοπεπτίδιο CPI-17 και την Rho-κίνηση (RhoK). Μετά τη διέγερση του M₃ μουσκαρινικού υποδοχέα, ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C (PLC), που καταλύει την παραγωγή της διακυλογλυκερόλης (DAG), που με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Η PKC τελικά ενεργοποιεί το CPI-17.

Μετά τη σύνδεση μιας συσπαστικής ουσίας στο μεμβρανικό της υποδοχέα και με τη βοήθεια των νουκλεοτιδικών γουανινικών παραγόντων ανταλλαγής (RhoGEF), ενεργοποιείται η μονομερής πρωτεΐνη RhoA. Η RhoA τελικά ενεργοποιεί την RhoK.

1.2.2 Ρόλος των κυκλικών νουκλεοτιδίων

Τα κυκλικά νουκλεοτίδια cAMP και cGMP παράγονται από τις αντίστοιχες κυκλάσες (αδενυλική AC και γουανυλική GC) και συμμετέχουν σε πολλές διαφορετικές διεργασίες στο κύτταρο (γλυκονεογένεση, γλυκογονόλυση, λιπογένεση,

έκκριση ορμονών, ρύθμιση της αγωγιμότητας διαμεμβρανικών καναλιών, παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, σύσπαση, διαφοροποίηση, αύξηση κυττάρου και απόπτωση) (14).

Η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η κυκλική μονοφωσφορική γουανίνη (cGMP) ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G (PKG). Η PKG περιλαμβάνει δύο τύπους, I και II. Στο λείο μυϊκό κύτταρο κυριαρχεί ο τύπος I. Από τη δεκαετία του 1990 κυκλοφορούν ουσίες αναστολείς των πρωτεϊνικών κινάσεων A και G, όπως το ισομερές 8-(4-χλωροφαινυλοθειο) κυκλικό γουανόσινο 3', 5'-μονοφωσφοροθειόνη [8-pCPT-cyclic GMPS] και το ισομερές 8-βρωμοφαινυλο-1- κυκλικό αιθενογουανόσινο 3', 5'-μονοφωσφοροθειόνη [8-bromo-PET-cyclic GMPS] (15). Αυτές οι ουσίες όμως δεν έχουν μελετηθεί καθόλου στους αεραγωγούς.

Έχει φανεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις το cAMP μπορεί να ενεργοποιήσει ακόμα και την PKG (16). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης των PKA και PKG, που όλοι τους έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της σύσπασης του λείου μυϊκού κυττάρου (

Εικόνα 4 Εικόνα 4).

Συνοπτικά, οι PKA και PKG:

α) φωσφορυλιώνουν (αδρανοποιούν) την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), του κύριου ενζύμου στο οποίο στηρίζεται η συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου,

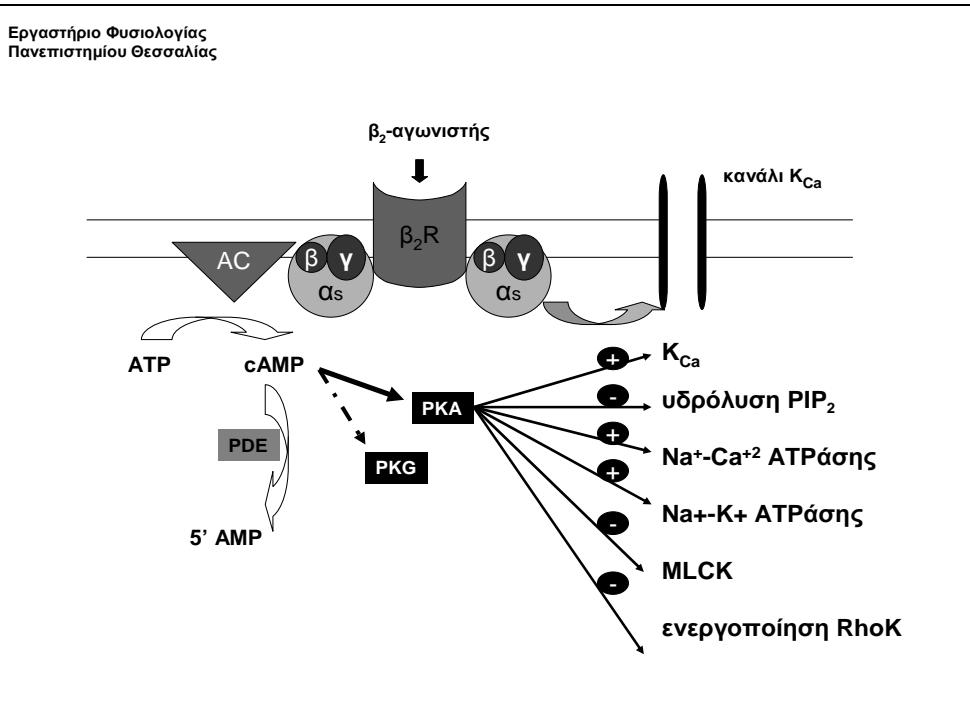
β) ενεργοποιούν την K^+-Na^+-ATP άση, επιταχύνοντας την επαναπόλωση της μεμβράνης,

γ) ενεργοποιούν την $Ca^{+2}-Na^+-ATP$ άση, με αποτέλεσμα την ελάττωση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} ,

δ) αναστέλλουν την υδρόλυση της διφωσφορικής-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP_2) σε DAG και IP_3 , δηλαδή ανταγωνίζονται τη δράση της φωσφολιπάσης C (PLC) και

ε) ανταγωνίζονται την ενεργοποίηση της Rho κινάσης (RhoK) από την RhoA

στ) φωσφορυλιώνουν (ενεργοποιούν) τους ασβεστιο-εξαρτώμενους διαύλους K^+ (K_{Ca}), τα οποία συμμετέχουν στην επαναπόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (17).



Εικόνα 4 Δράσεις των κυκλικών νουκλεοτιδίων. Ο β-αδρενεργικός υποδοχέας συνδέεται με τη διεγερτική πρωτεΐνη G (Gs), η οποία ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC), αυξάνοντας τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και δευτερευόντως την πρωτεϊνική κινάση G (PKG), ενώ αδρανοποιείται από τις φωσφοδιεστεράσες (PDE). Η PKA έχει ποικίλες δράσεις: αναστέλλει την υδρόλυση της διφωσφορικής-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP₂), αδρανοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), ενώ ενεργοποιεί τις Na⁺-Ca²⁺ και K⁺-Na⁺ ATPάσες. Οι ασβεστιο-εξαρτώμενοι διάλυοι K⁺ (K_{Ca}) ενεργοποιούνται τόσο άμεσα από την α_s υπομονάδα της μεμβρανικής G πρωτεΐνης, όσο και έμμεσα από την PKA.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχει ολόκληρη οικογένεια ενζύμων, που αδρανοποιούν τα κυκλικά νουκλεοτίδια και τερματίζουν το ενδοκυττάριο μήνυμα, οι φωσφοδιεστεράσες. Προς το παρόν έχουν αναγνωρισθεί 9 διαφορετικά ισόενζυμα φωσφοδιεστερασών, ενώ υπάρχουν και υπο-οικογένειες με ένζυμα που παρουσιάζουν 70-90% ομογένεια αλλά ελέγχονται από απομακρυσμένα γονίδια. Οι φωσφοδιεστεράσες τύπου III και IV υδρολύουν αποκλειστικά το cAMP, ενώ η φωσφοδιεστεράση τύπου V, που έχει απομονωθεί στα λεία μυϊκά κύτταρα πνευμόνων, αγγείων και βρόγχων, υδρολύει μόνο το cGMP (18). Όσο αφορά τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών, με βεβαιότητα υπάρχουν οι τύποι III, IV και V. Στις ΛΜΙ τραχείας σκύλου και βοδιού παρατηρήθηκαν επίσης οι τύποι I και II (19), ενώ στις ΛΜΙ μικρών βρόγχων η εικόνα είναι πιο συγκεχυμένη.

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα των cAMP και cGMP ουσιαστικά ελέγχονται από τις φωσφοδιεστεράσες (PDE). Όταν τα επίπεδα των κυκλικών νουκλεοτιδίων είναι υψηλά, η ρύθμιση της συγκέντρωσής τους βασίζεται στη δραστηριότητα των φωσφοδιεστερασών και, η έτσι και αλλιώς αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου που παράγει το cAMP, της αδενυλικής κυκλάσης AC, έρχεται σε δεύτερη μοίρα. Παρομοίως, όταν τα επίπεδα του cAMP είναι χαμηλά, παρά την ελαττωμένη δραστηριότητα της AC οι φωσφοδιεστεράσες έχουν το ρόλο κλειδί στην περαιτέρω αυξομείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cAMP. Οι πρώτες προσπάθειες ρύθμισης της συστολής σε λείους μύες αεραγωγών μέσω επίδρασης στις φωσφοδιεστεράσες έγιναν στην αρχή της δεκαετίας του 1990 (20).

Ο έλεγχος της συστολής με τη βοήθεια δεύτερων μηνυτόρων δεν είναι μια δυσδιάστατη διαδικασία που μπορεί απλά να απεικονιστεί σε κάποιο χάρτη. Ολοένα και περισσότερες είναι οι ενδείξεις, ότι πρόκειται για μια περίπλοκη και το σημαντικότερο, δυναμική και τρισδιάστατη διαδικασία. Πειράματα με φορσκολίνη και ισοπρεναλίνη κατέδειξαν ότι στην τραχεία του σκύλου, τα διάφορα συστατικά των cAMP/ PKA που μετέχουν στη μυϊκή συστολή κατανέμονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (14). Η επίδραση των ουσιών στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ελέγχουν τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης, επίσης φαίνεται να χαρακτηρίζεται από τοπογραφική διαφοροποίηση (21, 22).

1.2.3 Ισοροπία MLCK-MLCP

Ο λόγος MLCK/ MLCP καθορίζει το αν θα γίνει συστολή ή όχι. Όταν το ενδοκυττάριο Ca^{+2} είναι αυξημένο, ο λόγος κλείνει καθαρά προς την MLCK. Όταν το Ca^{+2} είναι σε χαμηλά επίπεδα, κυριαρχεί η MLCP και στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν κυρίως μυσίνη ή ακτίνη-μυσίνη-ADP. Το σύμπλοκο ακτίνη-μυσίνη-ADP έχει χαμηλή δραστηριότητα ATPάσης, οπότε αν και τα ινίδια ακτίνης και μυσίνης είναι συνδεδεμένα δεν παρατηρείται βράχυνση. Πιστεύεται ότι σε αυτή την αντίδραση οφείλεται ο παρατηρούμενος τόνος των λείων μυών. Οι λείοι μύες παραμένουν λειτουργικοί, απουσία εξωτερικού ερεθίσματος, με την ελάχιστη κατανάλωση ενέργειας.

Ένας από τους μηχανισμούς δράσης των κυκλικών νουκλεοτιδίων αφορά την φωσφορυλίωση της ανενεργού μορφής της MLCK. Το τελικό προϊόν, η $MLCK_p$ ανενεργός, έχει χαμηλή συγγένεια με το σύμπλεγμα Ca^{+2}_4 -καλμοδουλίνη, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί το ένζυμο και να μην ολοκληρώνεται η διαδικασία

της συστολής. Μπορεί η MLCK να είναι το ένζυμο που άμεσα συμμετέχει στο μηχανισμό της σύσπασης, όμως τα τελευταία χρόνια ολοένα και μεγαλύτερη σημασία αποκτά η θέση της MLCP στη ρύθμιση της συστολής των λείων μυϊκών κυττάρων.

Κύριος ρόλος της MLCP είναι η αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας υψηλής ενέργειας από την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης (23-27). Το μόριο της φωσφατάσης περιλαμβάνει 3 υπομονάδες: μια μονάδα 37-kDa που δρα σαν καταλύτης, μια μονάδα 20-kDa και μια μονάδα 110-kDa που συνδέεται με τη μυοσίνη. Αν φωσφορυλιωθεί η μονάδα σύνδεσης με τη μυοσίνη, αναστέλλεται η καταλυτική δράση της MLCP, με αποτέλεσμα η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης να παραμένει φωσφορυλιωμένη (μυοσίνη_p) και να επιτρέπεται η ολοκλήρωση της συστολής.

Εκτός από την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} , αυτό που έχει σημασία είναι η ύπαρξη ενός μηχανισμού που θα εξασφαλίζει την ευαισθησία στο Ca^{+2} . Έχει αποδειχτεί ότι στο λείο μυϊκό κύτταρο υπάρχει ένα σύστημα Rho-πρωτεϊνών που ελέγχει τη λειτουργία της MLCP (28-32). Φαίνεται ότι βασικός παίκτης στη διαδικασία της συστολής είναι η Rho-κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει την MLCP και αναστέλλει τη δράση της, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία στα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca^{+2} (33-35). Σύμφωνα με τη σύγχρονη θεωρία, η ενεργοποίηση ενός μεμβρανικού υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεΐνη οδηγεί στην ακόλουθη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rho-A, η οποία στο μεταξύ έχει μετακινηθεί από το κυτταρόπλασμα προς την μεμβράνη. Στην ενεργοποίηση της Rho-A συμμετέχουν νουκλεοτιδικοί γουανινικοί παράγοντες ανταλλαγής ή RhoGEF (Εικόνα 3). Η αλληλεπίδραση των RhoGEF με τη μεμβρανική G πρωτεΐνη είναι που καθορίζει την ένταση και τη διάρκεια της σηματοδότησης για συστολή. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 70 RhoGEF, αλλά στο λείο μυϊκό κύτταρο έχουν αναγνωριστεί μόνο 3. Η αυξημένη έκφραση και/ή δραστηριότητα των RhoGEF πρωτεϊνών ενισχύει την αντίδραση στα συσταλτικά ερεθίσματα, συνεπώς μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο σε νόσους που χαρακτηρίζονται από υπεραντιδραστικότητα των λείων μυών σε ερεθίσματα που προκαλούν σύσπαση (π.χ. άσθμα, υπέρταση) (27).

Ένα άλλο μόριο που αναστέλλει την MLCP είναι το ειδικό για τους λείους μύες φωσφοπεπτίδιο CPI-17 (32). Το CPI-17 αποτελείται από 4 έλικες (36). Η φωσφορυλίωση μιας θρεονίνης στη θέση 38 προκαλεί αναδιάταξη της μίας έλικας, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης του μορίου κατά 1000 φορές. Η φωσφορυλίωση του CPI-17 μπορεί να γίνει είτε από τη Rho-κινάση, είτε από την

πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Το CPI-17 μπορεί να αποτελέσει στόχο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις (25).

Φαρμακολογικοί αναστολείς της Rho-κινάσης, όπως το [(R)-(+)-*trans*-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδροχλωρίδιο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδης] (Y-27632) και η φασουλίδη, αναστέλλουν τη δράση της Rho-κινάσης ανταγωνιζόμενοι για τη θέση σύνδεσης με το ATP. Η αναστολή της Rho-κινάσης προκαλεί χάλαση σε μεμονωμένα τεμαχίδια λείου μυϊκού ιστού, που έχουν συσπαστεί μετά από την επίδραση διαφόρων αγωνιστών. Πράγματι, προξενούν χάλαση στους λείους μύες των αρτηριών, με αποτέλεσμα την ελάττωση της αρτηριακής πίεσης (37, 38).

Συμπερασματικά, η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} , αν και αποτελεί το κύριο γεγονός της συστολής, συμπληρώνεται από την ανάγκη ύπαρξης ενός μηχανισμού που θα εξασφαλίζει ευαισθησία στο Ca^{+2} . Όταν η φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης είναι ανενεργός (φωσφορυλιωμένη), αρκεί μικρή συγκέντρωση ασβεστίου για να προκληθεί συστολή των μυών, κάτι που αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε κλινικό επίπεδο. Πράγματι, η έκφραση και η λειτουργία των Rho-A και CPI-17 αυξάνονται *in vitro* από προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και *in vivo* σε πειραματικά, ζωικά μοντέλα με άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (39)

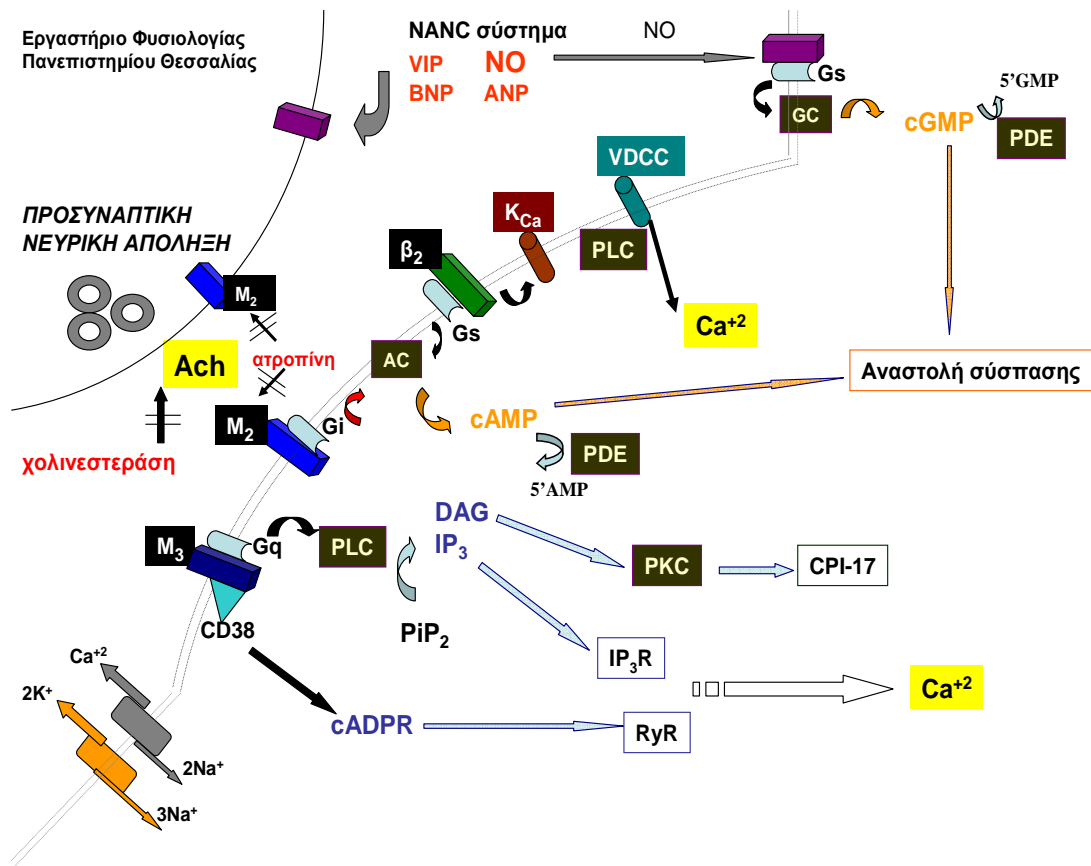
1.3 Σηματοδότηση για συστολή στο λείο μυϊκό κύτταρο

Η πρόσδεση κάποιου αγωνιστή σε έναν υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του λείου μυϊκού κυττάρου προκαλεί την παραγωγή ενδοκυττάρου μηνύματος, που με τη σειρά του δρα σε διάφορα στάδια του καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγούν στη συστολή του κυττάρου. Το σύστημα μηνυτόρων έχει δύο βασικά συστατικά: το σύστημα της φωσφολιπάσης C, (PLC) - τριφωσφορικής 1,4,5 ινοσιτόλης, (IP_3) και τις G-πρωτεΐνες. Στις επόμενες παραγράφους γίνεται διάκριση του μηχανισμού σηματοδότησης για συστολή με βάση τον αρχικό παράγοντα που δρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

1.3.1 Προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη σύσπασση

Η ακετυλοχολίνη είναι αποθηκευμένη σε κυστίδια στη νευρική απόληξη, απελευθερώνεται στη σύναψη και δρα σε μουσκαρινικούς υποδοχείς στη μεμβράνη του λείου μυϊκού κυττάρου. Άλλοι μουσκαρινικοί αγωνιστές είναι η μεταχολίνη και η

καρβαχόλη. Η ακετυλοχολίνη καταβολίζεται από τις χολινεστεράσες, οι οποίες και τερματίζουν τη δράση της. Η μεταχολίνη και η καρβαχόλη, όμως, δεν



Εικόνα 5 Σηματοδότηση για σύσπαση στο λείο μυϊκό κύτταρο.

Η ακετυλοχολίνη (ACh) απελευθερώνεται από το προσυναπτικό νευρικό κύτταρο, δρα σε μουςκαρινικούς υποδοχείς (δράση που ανταγωνίζεται η ατροπίνη) και αδρανοποιείται από τις χολινεστεράσες.

Ο M₃ συνδέεται με την πρωτεΐνη Gq, η οποία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC). Η PLC ενεργοποιεί τους τάση-εξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (VDCC), με αποτέλεσμα την είσοδο Ca²⁺ στο κύτταρο. Επίσης, η PLC υδρολύει τη διφωσφορική-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη (IP₃). Η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία μέσω ενεργοποίησης του ειδικού για τους λείους μύες φωσφοπεπτιδίου CPI-17 αδρανοποιεί τη φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Ο M₃ συνδέεται και με τη πρωτεΐνη CD38, η οποία μετέχει σε αύξηση των επιπέδων της κυκλικής ADP ριβόζης (cADPR). Η cADPR και η IP₃ δρουν σε υποδοχείς του σαρκοπλάσματικού δικτύου, προκαλώντας απελευθέρωση αποθηκευμένου ασβεστίου (Ca²⁺).

Ο M₂ υποδοχέας συνδέεται με την ανασταλτική πρωτεΐνη Gi, η οποία αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση (AC), με συνέπεια την ελάττωση των ενδοκυττάρων επιπέδων των cAMP και cGMP, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της σύσπασης. Τα κυκλικά μονονουκλεοτίδια αδρανοποιούνται από τις φωσφοδιεστεράσες (PDE).

Ο β₂-αδρενεργικός υποδοχέας μέσω της διεγερτικής πρωτεΐνης Gs ενεργοποιεί την AC. Επίσης, ενεργοποιεί τους ασβεστιο-εξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (K_{Ca}). Το μη-αδρενεργικό-μη-χολινεργικό σύστημα (NANC), που περιλαμβάνει διάφορους μηνύτορες όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), δρα τόσο προσυναπτικά, επηρεάζοντας την απελευθέρωση ACh, όσο και μετασυναπτικά, ενεργοποιώντας τη γουανυλική κυκλάση (GC).

καταβολίζονται από αυτές τις εστεράσες, προκαλώντας σταθερή σύσπαση του λείου μυός. Άλλες ουσίες, όπως η ατροπίνη, είναι μουσκαρινικοί ανταγωνιστές και παρεμποδίζουν τη δράση της ακετυλοχολίνης και καρβαχόλης σε μετασυναπτικό επίπεδο.

Υπάρχουν 5 τύποι μουσκαρινικών υποδοχέων, M_1 , M_2 , M_3 , M_4 και M_5 . Στους λείους μύες των αεραγωγών έχουν απομονωθεί οι M_2 και M_3 υποδοχείς. M_4 υποδοχείς έχουν απομονωθεί στο τοίχωμα των κυψελίδων κουνελιού, όχι όμως και σε άλλα είδη (40). Έχει βρεθεί, επίσης, ότι M_2 υποδοχείς υπάρχουν προσυναπτικά, στις παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες (41), στις οποίες ελέγχουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή (Εικόνα 5). Δυσλειτουργικοί μουσκαρινικοί υποδοχείς έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπους με ήπιο άσθμα (42).

Οι M_2 υποδοχείς συνδέονται με την ανασταλτική G πρωτεΐνη, $G_{\text{inhibitory}}$ (G_i). Η σύνδεση του μουσκαρινικού αγωνιστή στον υποδοχέα προκαλεί ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης. Με τη σειρά της, η G_i αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση (AC), με αποτέλεσμα την ελάττωση των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP (ισχυρού μηνύτορα για χάλαση) (43). Επίσης, η G_i ανταγωνίζεται τη δράση της διεγερτικής G πρωτεΐνης, $G_{\text{stimulating}}$ (G_s). Η G_s ενεργοποιεί τους ασβεστιο-εξαρτώμενους διαύλους K^+ (K_{Ca}) (17, 43), τα οποία διαδραματίζουν ρόλο στην επαναπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, άρα στην παύση της συστολής (Εικόνα 5).

Οι M_3 υποδοχείς συνδέονται με την G πρωτεΐνη G_q η οποία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC). Η PLC καταλύει την υδρόλυση της διφωσφορικής-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη, (IP_3) (44). Η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, (PKC), η οποία φωσφορυλιώνει (ενεργοποιεί) το CPI-17, μόριο που απενεργοποιεί την φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, άρα ευνοεί τη συστολή. Η IP_3 δρα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο του λείου μυϊκού κυττάρου, προκαλώντας απελευθέρωση αποθηκεμένου Ca^{+2} , αυξάνοντας περαιτέρω τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{+2} (4, 5, 24, 45). Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η σύνδεση του M_3 υποδοχέα με το μόριο CD38, μέσω ακόμα άγνωστου μηχανισμού, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της κυκλικής ADP ριβόζης (cADPR). Η cADPR δρα σε υποδοχείς ρυανοδίνης (RyR) στο σαρκοπλασματικό δίκτυο προκαλώντας πρόσθετη απελευθέρωση αποθηκεμένου Ca^{+2} στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 5 και 6). Η PLC μπορεί να έχει και άλλες δράσεις, ενισχύοντας το συσπαστικό ερέθισμα. Έτσι, μπορεί να φωσφορυλιώσει

(ενεργοποιήσει) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους τασεο-εξαρτώμενους διαύλους Ca^{+2} (VDCC), οδηγώντας σε είσοδο ασβεστίου ενδοκυτταρίως.

1.3.2 Ρόλος του σαρκοπλασματικού δικτύου

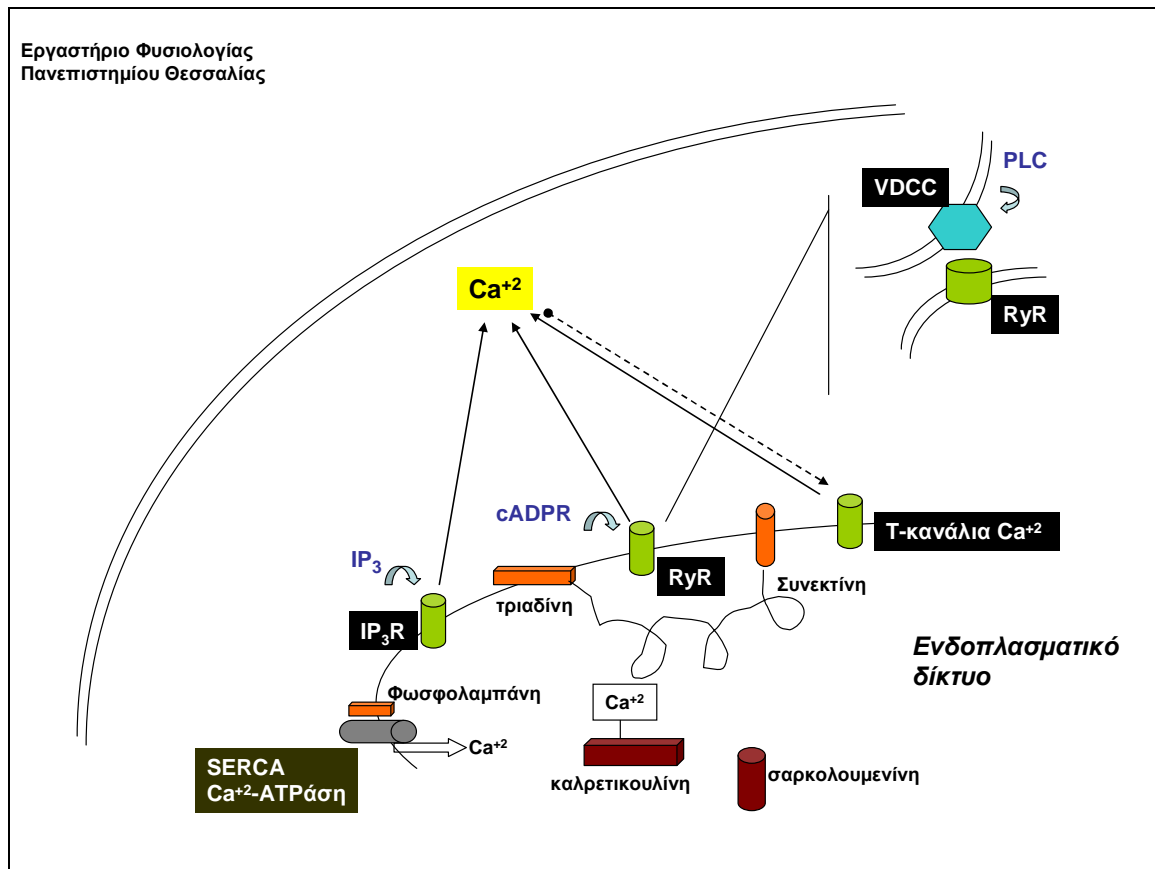
Η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} στηρίζεται τόσο στην είσοδο ιόντων από τον εξωκυττάριο χώρο, όσο και στην απελευθέρωσή τους από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του σαρκοπλασματικού δικτύου (46). Μεγαλύτερη σημασία έχει η απελευθέρωση του ενδογενώς αποθηκεμένου ασβεστίου, γι' αυτό το λόγο υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί που ελέγχουν την όλη διαδικασία.

Στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου υπάρχουν 3 ειδών πρωτεΐνες που επιτρέπουν την απελευθέρωση ασβεστίου προς το κυτταρόπλασμα: α) υποδοχείς που ενεργοποιούνται από την DAG, β) υποδοχείς ρυανοδίνης (RyR) που ενεργοποιούνται από τη cADPR και γ) T(fast)-τύπου διαύλους Ca^{+2} , οι οποίοι πιστεύεται ότι ευθύνονται για το φαινόμενο της Ca^{+2} -προκαλούμενης απελευθέρωσης Ca^{+2} (8). Η λειτουργία τους εξαρτάται από το ρυθμό αλλαγής της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{+2} και όχι από την απόλυτη τιμή της.

Με τις αναδιπλώσεις της μεμβράνης του σαρκοπλασματικού δικτύου στο χώρο, υπάρχουν περιοχές όπου οι RyR έρχονται σε επαφή με τους τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου, VDCC (3). Μετά την ενεργοποίηση των RyR (μέσω της cADPR) και την αλληλεπίδρασή με τους VDCC, οι τελευταίοι ανοίγουν επιτρέποντας την περαιτέρω ροή Ca^{+2} προς το κυτταρόπλασμα, λόγω της ηλεκτροχημικής του κλίσης (Εικόνα 6). Ο δεύτερος μηχανισμός μέσω του οποίου οι M_3 μουσκαρινικοί υποδοχείς ευνοούν τη σύσπαση είναι η άμεση ενεργοποίηση των VDCC από τη φωσφολιπάση C (Εικόνα 5) (47).

Εντός του σαρκοπλασματικού δικτύου έχουν αναγνωριστεί πλήθος πρωτεϊνών, οι περισσότερες εκ των οποίων έχουν αδιευκρίνιστο ακόμα ρόλο στο μηχανισμό της συστολής. Η καλσεκουεστρίνη, με τη βοήθεια της μεμβρανικής πρωτεΐνης τριαδίνης, συνδέεται με ιόντα Ca^{+2} συντελώντας στην αποθήκευσή τους (46). Για την καλρετικουλίνη και τη σαρκολουμενίνη δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο ρόλος τους. Στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου υπάρχει η φωσφολαμπάνη, πρωτεΐνη που μετέχει στην ενεργοποίηση της Ca^{+2} - Mg^{+2} αντλίας του σαρκοπλασματικού δικτύου, SERCA. Δουλειά της SERCA είναι η ενεργητική μεταφορά ιόντων Ca^{+2} προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο όπου και αποθηκεύονται, με

αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων Ca^{+2} στο κυτταρόπλασμα και την αναστολή της σύσπασης.



Εικόνα 6 Ρόλος του σαρκοπλασματικού δικτύου στη σύσπλη του κυττάρου.

Το αποθηκευμένο στο σαρκοπλασματικό δίκτυο ασβέστιο (Ca^{+2}) απελευθερώνεται από ειδικούς διαύλους, καθένας από τους οποίους ενεργοποιείται με διαφορετικό τρόπο. Οι υποδοχείς της τριφωσφορικής-1,4,5-ινοσιτόλης (IP_3R) απελευθερώνουν Ca^{+2} μετά τη σύνδεση της IP_3 . Οι υποδοχείς ρυανοδίνης (RyR) ενεργοποιούνται μέσω της κυκλικής ADP ριβόζης (cADPR). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των RyR είναι ότι όπως αναδιπλώνεται στο χώρο η σαρκοπλασματική μεμβράνη, υπάρχουν περιοχές που έρχεται κοντά με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε εκείνες τις θέσεις, οι RyR μπορούν να ενεργοποιήσουν γειτονικούς τασεο-εξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (VDCC), οδηγώντας σε αύξηση του εισερχόμενου στο κύτταρο Ca^{+2} . Οι τελευταίοι διάυλοι ασβεστίου είναι οι T-διάυλοι, οι οποίοι θεωρούνται υπεύθυνοι για το φαινόμενο της Ca-προκαλούμενης απελευθέρωσης Ca. Εντός του σαρκοπλασματικού δικτύου υπάρχει πλήθος πρωτεϊνών, όπως η καλρετικουλίνη-τραϊδίνη, η συνεκτίνη και σαρκολουμελίνη. Η φωσφολαμπάνη είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για τη δράση της Ca^{+2} -ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου (SERCA). Η SERCA ξαναγεμίζει τις ενδοκυττάρειες αποθήκες με ασβέστιο.

1.3.3 Προκαλούμενη από διάλυμα KCl σύσπληση

Το μεμβρανικό δυναμικό (V_m) ρυθμίζει την είσοδο Ca^{+2} στο κυτταρόπλασμα μέσω των VDCC (3). Αναλυτικότερα, μία αύξηση του εξωκυττάρειου K^+ θα μεταβάλλει το V_m , με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας και άλλων σημαντικών ιόντων, όπως του Na^+ , του Cl^- και του Ca^{+2} . Το άνοιγμα των καναλιών όλων αυτών των ιόντων θα ξαναλλάξει το V_m . Πράγματι, η αύξηση της

συγκέντρωσης του εξωκυττάρου K^+ περισσότερο από 40 mM, προκαλεί την εκπόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα VDCC ανοίγουν και λόγω της ισχυρής ηλεκτροχημικής του κλίσης, το Ca^{+2} εισέρχεται στο λείο μυϊκό κύτταρο. Επίσης, λόγω της υψηλότερης εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ αλλάζει η ηλεκτροχημική του κλίση, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαδικασία της επαναπόλωσης της μεμβράνης (συμμετέχουν οι διάλυτοι καλίου) και να παρατείνεται η σύσπαση του κυττάρου.

Όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ ξεπεράσει τα 40 mM, εκτός από τη μετασυναπτική ενεργοποίηση των VDCC, προκαλείται κι εκπόλωση του προσυναπτικού, νευρικού κυττάρου. Η προσυναπτική εκπόλωση προκαλεί αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, που με τη σειρά της δρα στους μουσκαρινικούς υποδοχείς μετασυναπτικά και πυροδοτεί τη συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου (48, 49).

1.4 Σηματοδότηση για χάλαση στο λείο μυϊκό κύτταρο

Η χάλαση του λείου μυός συμβαίνει είτε λόγω απομάκρυνσης του συσπαστικού ερεθίσματος, είτε με την απευθείας δράση μιας ουσίας που προκαλεί αναστολή του μηχανισμού συστολής. Τελικά, η διαδικασία της χάλασης πρέπει να περιλαμβάνει την ελάττωση των ενδοκυττάριας επιπέδων Ca^{+2} ή/και την αύξηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCP) (25, 50).

1.4.1 Ελάττωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων Ca^{+2}

Η ελάττωση των ενδοκυττάριας επιπέδων Ca^{+2} μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής μηχανισμούς:

α) Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η αντλία Ca^{+2} - Mg^{+2} . Υπάρχουν 2 είδη τέτοιας αντλίας. Η SERCA (Εικόνα 6) βρίσκεται στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου. Ουσιαστικά, πρόκειται για μια ATPάση που όταν φωσφορυλιωθεί (ενεργοποιηθεί) συνδέεται με $2Ca^{+2}$, τα οποία ακολούθως μετακινεί προς την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, υδρολύοντας ένα μόριο ATP. Το Mg^{+2} είναι απαραίτητο για τη δράση της αντλίας, γιατί συνδέεται στο καταλυτικό της κέντρο, επιτρέποντας τη δράση της. Η SERCA αναστέλλεται από διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες, όπως το κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA), τη βαναδάτη και τη θαμιγαργίνη. Το CPA αποδεδειγμένα αναστέλλει την ενεργητική πρόσληψη Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (46, 51, 52). Το δεύτερο

είδος Ca^{+2} - Mg^{+2} αντλίας βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτό το ένζυμο διαφέρει από τη SERCA γιατί διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης με την καλμοδουλίνη, η οποία και προκαλεί την ενεργοποίηση της αντλίας και δεν αναστέλλεται από το CPA.

β) Στο σαρκοπλασματικό δίκτυο υπάρχουν πρωτεΐνες που δεσμεύονται με ιόντα Ca^{+2} απομακρύνοντάς τα από το κυτταρόπλασμα. Στο λείο μυϊκό κύτταρο έχουν αναγνωριστεί η καλσεκουεστρίνη και η καλρετικουλίνη (46).

γ) Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη υπάρχει ο αντιμεταφορέας Na^+ - Ca^{+2} (Εικόνα 5). Με την κατανάλωση ενέργειας, ανταλλάζονται 2Na^+ (είσοδος σε κύτταρο) με 1Ca^{+2} (έξοδος). Η λειτουργία του εξαρτάται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{+2} , ενώ αναστέλλεται από την αμιλορίδη και την κινιδίνη.

δ) Η είσοδος του Ca^{+2} μπορεί να ανασταλεί αν μπλοκαριστούν οι χημειο-εξαρτώμενοι ή τασεο-εξαρτώμενοι (VDCC) διάυλοι ασβεστίου. Οι VDCC, όπως έχει αναφερθεί, αναστέλλονται από τη βεραπαμίλη, νιφεδιπίνη και δελτιαζέμη.

1.4.2 Προκαλούμενη από β-αδρενεργικούς υποδοχείς χάλαση

Τρεις διαφορετικοί β-υποδοχείς (β_1 , β_2 και β_3) έχουν βρεθεί και κλωνοποιηθεί ως σήμερα. Ο σημαντικότερος β υποδοχέας που οδηγεί σε χάλαση των λείων μυών των αεραγωγών είναι ο β_2 . Οι β_1 -υποδοχείς είναι σημαντικοί στη λειτουργία του μυοκαρδίου. Οι β_3 -υποδοχείς έχουν απομονωθεί στο λιπώδη ιστό, αλλά όχι στους πνεύμονες (53, 54). Η σύνδεση ενός β-αγωνιστή στον β-υποδοχέα, συνεπάγεται δομικές αλλαγές στην συνδεδεμένη με τον υποδοχέα G-πρωτεΐνη. Όσο αφορά τον β_2 -υποδοχέα, πρόκειται για την διεγερτική G πρωτεΐνη, [$G_{\text{stimulating}}$ (Gs)]. Η Gs προκαλεί την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC), η οποία καταλύει την παραγωγή cAMP. Το cAMP μέσω αρκετών μηχανισμών, οδηγεί τελικά σε χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου (Εικόνα 4).

Ένας από τους μηχανισμούς δράσης του cAMP περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των ασβεστιο-εξαρτώμενων διαύλων K^+ (K_{Ca}), τα οποία όπως έχει περιγραφεί παίζουν ρόλο στην επαναπόλωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο Kume (17, 43) έδειξε ότι οι K_{Ca} λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού ενεργοποιούνται μετά την εξωκυττάρια εφαρμογή του β-αγωνιστή ισοπρεναλίνη ή μετά από ενδοκυττάρια εφαρμογή της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Η ίδια ομάδα έδειξε, στη συνέχεια, ότι τα K_{Ca} μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από την ισοπρεναλίνη, μέσω της α-υπομονάδας της Gs, χωρίς καμία αλλαγή του cAMP (άρα και της PKA) (17).

1.4.3 Ρόλος του επιθηλίου στη χάλαση του λείου μυός

Το επιθήλιο βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με τα λεία μυϊκά κύτταρα, μέσω της δράσης παρακρινών ουσιών. Τα επιθηλιακά κι ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν NO, προσταγλανδίνες, βραδυκίνη και άλλες ουσίες που μπορούν να επάγουν χάλαση στους λείους μύες (48, 49). Το μη-αδρενεργικό-μη-χολινεργικό σύστημα (NANC) δρα κυρίως μέσω του μονοπατιού του NO και λιγότερο της βραδυκίνης. Η ανασταλτική επίδραση του επιθηλίου μπορεί να είναι είτε προσυναπτική (επηρεάζοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης), είτε άμεσα σε υποδοχείς της μεμβράνης του λείου μυϊκού κυττάρου (Εικόνα 5).

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παράγεται από συνθετάσες που καταλύουν την μετατροπή της L-αργινίνης σε κιτρουλλίνη. Έχουν αναγνωριστεί 3 διαφορετικά ισοένζυμα: η νευρωνική μορφή (neuronal, nNOS ή τύπου I NOS), η επαγώγιμη μορφή (inducible, iNOS ή τύπου II NOS) και η δομική μορφή (constitutive, cNOS ή τύπου III NOS). Αρχικά, η cNOS ήταν γνωστή ως eNOS γιατί ανακαλύφθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η cNOS μπορεί να απελευθερώσει picomoles μονοξειδίου του αζώτου μέσα σε δευτερόλεπτα ή λίγα λεπτά, μετά την ενεργοποίησή της από αγωνιστές όπως η ακετυλοχολίνη, η βραδυκίνη, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και η ισταμίνη (55). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδά της αυξάνονται στη χρόνια άσκηση (56). Το NO που παράγεται από την iNOS είναι της τάξης των nanomolar. Στους αεραγωγούς, το NO παράγεται από τα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, φλεγμονώδη και νευροαισθητικά κύτταρα. Σε φυσιολογικούς ανθρώπινους αεραγωγούς in vivo έχει φανεί ότι σημαντικότερο ισοένζυμο είναι το iNOS (57). Το iNOS σε ασθματικούς ασθενείς παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα (58).

Από πολύ παλιά είναι γνωστή η βρογχοδιασταλτική επίδραση των νιτροδών (59). Το NO μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεοτίδια. Στο μηχανισμό της συστολής του λείου μυϊκού κυττάρου το NO συμμετέχει μέσω ενεργοποίησης μιας ομάδας γουανυλικών κυκλασών (GC), η οποία μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους: τον τύπο που συνδέεται με μεμβρανικό υποδοχέα (receptor containing particulate, pGC) και τον τύπο που είναι διαλυτός στο κυτταρόπλασμα (soluble intracellular enzyme, sGC). Τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των GC είναι η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του cGMP, το οποίο μέσω αρκετών μηχανισμών οδηγεί στη χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου. Σε μερικές περιπτώσεις

η ενεργοποίηση των GC προκαλεί παράλληλη ενεργοποίηση και της αδενυλικής κυκλάσης (AC) με συνακόλουθη αύξηση των επιπέδων cAMP (16).

Ο τύπος pGS μπορεί να ενεργοποιηθεί από νατριουρητικά πεπτίδια [κόλπων (ANP), εγκεφάλου (BNP) και c-νατριουρητικά πεπτίδια (cNPs)] ή από το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP). Οι αναφερθέντες αγωνιστές του pGS έχει προταθεί ότι ανήκουν στο μη-αδρενεργικό-μη-χολινεργικό σύστημα (NANC). Στόχος του NANC, εκτός από το λείο μυϊκό κύτταρο, αποτελεί και ο νευρώνας, ρυθμίζοντας έτσι την προσυναπτική απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης (Εικόνα 5).

Έχει δειχτεί ότι σε φυσιολογικά άτομα *in vivo* (60) τα επίπεδα του εισπνεόμενου οξυγόνου ρυθμίζουν τη λειτουργικότητα των iNOS συνθετασών και την παραγωγή NO. Επίσης, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η σηματοδότηση από NO μπορεί να επιδράσει στη μεταγραφή διάφορων γονιδίων, μέσω ισχυρών μεταγραφικών παραγόντων όπως του NF-k-B και της ενεργοποιού πρωτεΐνης-1 (AP-1) (61). Επιπρόσθετα, η σηματοδότηση από NO μπορεί να έχει και μετα-εκφραστικές επιδράσεις, όπως στην περίπτωση ρύθμισης του αριθμού των μεμβρανικών υποδοχέων για το ασπαρτικό και στην τροποποίηση πρωτεϊνών-μηνυτόρων, όπως του p21^{ras} (62) και της πρωτεϊνικής κινάσης C.

1.5 Παθολογικός μηχανισμός σύσπασης του λείου μυϊκού κυττάρου

Έχει προταθεί ότι κάποιες παθοφυσιολογικές αλλαγές του μηχανισμού σύσπασης-χάλασης του λείου μυϊκού κυττάρου μπορεί να ευθύνονται για τα παθολογικά συσπαστικά φαινόμενα που παρατηρούνται σε διάφορους ιστούς και όργανα (24, 37, 63, 64). Για παράδειγμα, σε κάποιες μορφές υπέρτασης παρατηρήθηκαν αλλαγές στον αριθμό, στη συγγένεια ή στους υποτύπους των αδρενεργικών υποδοχέων, με τελικό κοινό αποτέλεσμα την αυξημένη αγγειοσύσπαση. Σε ανθρώπους με ήπιο άσθμα έχουν παρατηρηθεί δυσλειτουργικοί μουσκαρινικοί υποδοχείς (42), όπως και αυξημένη δραστηριότητα του συστήματος RhoA/RhoK.

Ειδικότερα στους ασθματικούς ασθενείς, πρόβλημα αποτελεί η ανάπτυξη ανοχής στη δράση των β₂-αγωνιστών. Ενώ η χρήση των β₂-αγωνιστών βραχείας δράσης στις παροξύνσεις άσθματος είναι αποτελεσματική και ασφαλής, η χρήση τους σαν θεραπεία συντήρησης έχει αμφισβητηθεί (65). Μάλιστα σε μια μελέτη στη Νέα

Ζηλανδία (66) η αυξανόμενη χρήση φενοτερόλης συσχετίστηκε με αυξημένη θνησιμότητα (42).

2 ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ

2.1 Φαρμακολογικές ιδιότητες αζιθρομυκίνης

Οι μακρολίδες στο μόριό τους περιλαμβάνουν ένα δακτύλιο λακτόνης. Γνωστότερα μακρολιδικά αντιβιοτικά είναι η ερυθρομυκίνη (EM), η ροξιθρομυκίνη (PXM), η κλαριθρομυκίνη (ΚΛΜ) και η αζιθρομυκίνη (AZ). Η EM πρωτοκυκλοφόρησε το 1952, ενώ η PXM, η ΚΛΜ και η AZ στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές του 1990. Οι κετολίδες αποτελούν τα νεότερα φάρμακα και ουσιαστικά αποτελούν υποκατηγορία των μακρολιδών. Οι μακρολίδες εμφανίζουν ευρύ όγκο κατανομής και επιτυγχάνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στους αναπνευστικούς ιστούς, στα φλεγμονώδη κύτταρα και στις βλεννώδεις εκκρίσεις, σε σύγκριση με το αίμα (67). Ένας βασικός λόγος που η ΚΛΜ και η AZ χορηγούνται περισσότερο είναι γιατί παρουσιάζουν λιγότερες γαστρεντερικές διαταραχές.

Ο χημικός τύπος της αζιθρομυκίνης είναι $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$ και το μοριακό της βάρος ισούται με 785. Η αζιθρομυκίνη απορροφάται ταχύτατα και κατανέμεται σε διάφορους ιστούς στο σώμα. Στους πνεύμονες, στην αμυγδαλή και στο στοματοφάρυγγα πετυχαίνει συγκεντρώσεις εκαντοταπλάσιες σε σχέση με τη συγκέντρωση στο αίμα, ενώ στο δέρμα τριανταπλάσιες. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι συγκεντρώνεται στα φαγοκύτταρα, κάτι που μπορεί να εξηγήσει την ευρεία κατανομή της στους φλεγμονώδεις ιστούς. Μετά από του στόματος χορήγηση 500 mg την πρώτη ημέρα και 250 mg τις επόμενες 4 ημέρες, η μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) στο κατώτερο αναπνευστικό ισούται με $8,93 \pm 2,05$ mg/lit, δηλαδή περίπου 10^{-6} M. Η C_{max} δεν διαφέρει την πρώτη και την τελευταία ημέρα, αλλά αργεί να επιτευχθεί χωρίς τη δόση φόρτισης. Ο μέσος χρόνος ημιζωής είναι 74 ώρες. Η χορήγηση 1000 mg αζιθρομυκίνης, όπως φάνηκε σε μετρήσεις στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, συνεπάγεται σχεδόν διπλασιασμό τόσο της C_{max} , όσο και του χρόνου ημιζωής (67, 68). Η αζιθρομυκίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ χρησιμοποιώντας το σύστημα του κυτοχρώματος P450, επηρεάζοντας το μεταβολισμό άλλων ουσιών, όπως της θεοφυλλίνης και της κορτιζόνης, ενώ απεκκρίνεται κυρίως στη χολή. Η αζιθρομυκίνη συνδέεται με τη ριβοσωμική υπομονάδα 50S των ευαίσθητων μικροοργανισμών, αναστέλλοντας έτσι τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση (βακτηριοστατική δράση). Το μικροβιακό της εύρος παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Μικροβιακό εύρος αζιθρομυκίνης.

in vivo και in vitro δεδομένα	in vitro δεδομένα
<p>Gram-θετικά αερόβια βακτήρια</p> <p>Staphylococcus aureus Streptococcus agalactiae Streptococcus pneumoniae Streptococcus pyogenes</p>	<p>Streptococci (ομάδες C,F,G).</p>
<p>Gram-αρνητικά αερόβια βακτήρια</p> <p>Haemophilus influenzae Haemophilus ducreyi Moraxella catarrhalis Neisseria gonorrhoeae</p>	<p>Bordetella pertussis Legionella pneumophila</p>
<p>Άτυποι μικροοργανισμοί</p> <p>Chlamydomphila pneumoniae Chlamydomphila trachomatis Mycoplasma pneumoniae</p>	

2.2 Ανοσοτροποποιητικός ρόλος των μακρολιδών

Με τον όρο ανοσοτροποποίηση αναφερόμαστε στον περιορισμό της διαδικασίας της φλεγμονής, χωρίς να φτάνουμε όμως στην πλήρη καταστολή της ανοσολογικής αντίδρασης.

Εικόνα 7 Ανοσοτροποποιητική δράση μακρολιδών (69)



Μη-ριβοσωμικές δράσεις μακρολιδών στα βακτήρια. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, παράγουν ένα βιολογικό στρώμα που τα προστατεύει από τη φαγοκυττάρωση και τη δράση μικροβιοκτόνων παραγόντων. Έχει φανεί ότι η ΚΛΜ, σε ποντίκια, μειώνει το κλάσμα των βακτηρίων που παράγουν το βιολογικό στρώμα (70). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός είναι μέσω αναστολής του κύκλου της γουανοσικής διφωσφορο-d-μανοζο-δεϋδρογενάσης (GMD) (71). Η φλαγγελίνη, ένα συστατικό των βακτηριακών νηματίων, επιτρέπει την κινητικότητα ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Οι μακρολίδες φάνηκε ότι ελαττώνουν την έκφραση της φλαγγελίνης, άρα και την κινητικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* (72). Επίσης, οι μακρολίδες καταστέλλουν τη σύνθεση της πρωτεΐνης-στρες Gro-EL, περιορίζοντας τη λοιμογόνο δύναμη της *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ μετά από παρατεταμένη επώαση προκαλούν βακτηριακό θάνατο (73).

Επίδραση στην παραγωγή βλέννας στο αναπνευστικό σύστημα. Η παραγωγή και η κάθαρση της βλέννας αποτελούν σημαντικό μηχανισμό τοπικής άμυνας του αναπνευστικού συστήματος. Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί διέγερση των goblet κυττάρων, υπερπλασία και υπερτροφία των υποβλεννογόνιων αδένων και τελικά υπερέκκριση βλέννας. Η EM φάνηκε ότι μειώνει την παραγωγή βλέννας σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων από τους αεραγωγούς (74). Η EM, η ΚΛΜ και η AZ καταστέλλουν την παραγωγή mRNA για δομικές πρωτεΐνες της βλέννας, όπως της μουκίνης MUC5AC (75). Επίσης, η EM ελέγχει την έκκριση ύδατος στη βλέννα, αναστέλλοντας τους ασβεστιο-εξαρτώμενους διαύλους Cl^- και τον διαμεμβρανικό ρυθμιστή αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης, CFTR (76). Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι μακρολίδες ενισχύουν την βλεννοκροσσωτή κάθαρση (77) και ελαττώνουν τη χρόνια παραγωγή βλέννας στους αεραγωγούς (78, 79).

Άμεση επίδραση σε φλεγμονώδη κύτταρα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα πολυμορφοπύρρηνα, μεταναστεύουν από τη συστηματική κυκλοφορία στους αεραγωγούς με τη βοήθεια μορίων προσκόλλησης και, τελικά, απελευθερώνουν λυσοσωμιακά ένζυμα και ρίζες οξυγόνου, βλάπτοντας τα κύτταρα των αεραγωγών. Η EM έχει φανεί ότι αναστέλλει την ανθρώπινη ουδετεροφιλική ελαστάση (80) κι ελαττώνει την παραγωγή υπεροξειδίων από τα διεγερμένα πολυμορφοπύρρηνα (81). Μία ακόμη παρατηρούμενη δράση της EM είναι η επιτάχυνση της απόπτωσης των ουδετερόφιλων κυττάρων, μέσω αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP (82). Οι μακρολίδες αναστέλλουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης. Έτσι, η EM ελαττώνει τα επίπεδα του υδατοδιαλυτού ενδοκυττάρου μορίου προσκόλλησης-1

(sICAM-1) σε καλλιέργειες βρογχικών κυττάρων (83) και μειώνει την έκφραση β2-ιντεγκρινών στα πολυμορφοπύρηνα (84).

Επίδραση στην παραγωγή κυτταροκινών και άλλων χημικών μεσολαβητών.

Η μακροχρόνια χορήγηση μακρολιδών φαίνεται να καταστέλλει την απελευθέρωση πολλών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η ΕΜ ελαττώνει τα επίπεδα της IL-1β και IL-8, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με διάχυτη πανβρογχιολίτιδα (85). In vitro, η ΕΜ και η ΚΑΜ καταστέλλουν την έκφραση του mRNA για την IL-8 (86) σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Γενικά, όλη η ομάδα των 14-μελών μακρολιδών καταστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την απελευθέρωση IL-8 από τα ηωσινόφιλα (79, 87). Οι μακρολίδες καταστέλλουν την παραγωγή της IL-1β και του παράγοντα ιστικής νέκρωσης-α (TNFα) στα μονοκύτταρα (88), ενώ μειώνουν την έκφραση της επαγωγίμης συνθετάσης του NO σε διεγερμένα κυψελιδικά μακροφάγα (89, 90).

2.3 Κλινική χρήση μακρολιδών πέρα από τη βακτηριοστατική τους δράση.

2.3.1 Διάχυτη πανβρογχιολίτιδα

Η επιστημονική κοινότητα εστίασε στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των μακρολιδών στις αρχές της δεκαετίας του 1980, όταν φάνηκε η ευεργετική τους επίδραση σε ασθενείς με διάχυτη πανβρογχιολίτιδα. Η διάχυτη πανβρογχιολίτιδα είναι μια χρόνια, αποφρακτική πνευμονική νόσος που παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά σε χώρες της Άπω Ανατολής. Συνήθως, εμφανίζεται στην τρίτη ή τέταρτη δεκαετία της ζωής και σπανιότερα στην εφηβεία. Τη στιγμή της διάγνωσης, ο ασθενής αναφέρει δύσπνοια προσπαθείας, συριγμό, απώλεια βάρους και παραγωγικό βήχα, ενώ για αρκετά χρόνια πριν συνυπάρχει ιστορικό χρόνιας παραρινοκολπίτιδας. Στη νόσο αυτή παρατηρείται φλεγμονή των βρογχιολίων, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία βρογχιολεκτασιών. Σταδιακά, ο ασθενής αποικίζεται από διάφορους μικροοργανισμούς, με κυρίαρχο την *Pseudomonas aeruginosa*. Πριν την εισαγωγή των μακρολιδών, η πενταετής επιβίωση πριν και μετά τον αποικισμό με *Pseudomonas* ήταν 63% και 8%, αντιστοίχως. Μετά τη χορήγηση καθημερινών, μικρών δόσεων ΕΜ ή ΚΑΜ το ποσοστό επιβίωσης εκτοξεύθηκε στο 92% (91-93). Το εντυπωσιακό ήταν ότι τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο, χωρίς να εκριζωθεί η *Pseudomonas*.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να δικαιολογήσουν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα (85, 94). Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη μακρολίδη (EM, ΚΛΜ, ΡΞΜ ή ΑΖ), η επίδραση στη χρόνια φλεγμονή παραμένει σταθερή. Η παραγωγή της βλέννας περιορίζεται, ενώ βελτιώνεται η βλεννοκροσώτη κάθαρση, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Σε χαμηλές ημερήσιες δόσεις οι μακρολίδες ελαττώνουν τον αριθμό των πολυμορφοπύρηνων στα βρογχιόλια, με το να μειώνουν την παραγωγή των χημειοτακτικών τους παραγόντων, με σημαντικότερο την IL-8. Παρατηρείται σταδιακή βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας κι ελάττωση της συχνότητας των παροξυσμών της νόσου. Η προτεινόμενη δοσολογία για τη νόσο (93) είναι 400-600 mg/ημέρα EM για τουλάχιστον 2 έτη. Σε περίπτωση δυσανεξίας λόγω παρενεργειών, στο εξάμηνο μπορεί να αλλάξει η αγωγή σε ΚΛΜ 200-400 mg/ημέρα ή ΡΞΜ 150-300 mg/ημέρα. Επί υποτροπής των συμπτωμάτων μετά τη διατροφή, ο ασθενής πρέπει να επαναλάβει την αγωγή.

2.3.2 Κυστική ίνωση

Η ευεργετική δράση των μακρολιδών αποδείχτηκε και στην περίπτωση ασθενών με κυστική ίνωση. (95). Τρεις μεγάλες μελέτες, η πρώτη σε παιδιά (n=41) (96), η δεύτερη σε ενήλικες (n=60) (97) και η τρίτη σε μικτό πληθυσμό (n=185) (98) οδήγησαν σε χρήσιμα συμπεράσματα. Σε όλες τις μελέτες χορηγήθηκε αζιθρομυκίνη, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις με το πλήθος των φαρμάκων που συγχωρηγούνται στους ασθενείς με κυστική ίνωση. Η σύγκριση βασίστηκε σε ομάδα ελέγχου, που λάμβανε εικονικό φάρμακο (placebo). Τα αποτελέσματα των μελετών ήταν σύμφωνα μεταξύ τους: η πνευμονική λειτουργία βελτιώθηκε (με βάση την μέτρηση του βίαιου εκπνεόμενου όγκου αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο, FEV₁), η ποιότητα ζωής καλυτέρευσε, η συχνότητα παροξυσμών και η ανάγκη χορήγησης αντιβιοτικών ελαττώθηκαν, η ανοχή στην άσκηση και το σωματικό βάρος των ασθενών αυξήθηκαν. Στη μελέτη με μικτό πληθυσμό (98) η καθημερινή χορήγηση αζιθρομυκίνης (250-500 mg/ημέρα) δεν παρουσίαζε διαφορά με τη χορήγησή της 3 φορές εβδομαδιαίως.

2.3.3 Βρογχεκτασίες – Σύνδρομο αποφρακτικής βρογχιολίτιδας

Κάποιες κλινικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση των μακρολιδών σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Οι Koh et al. (n=25) (99) χορήγησαν ΡΞΜ 4 mg/kg δύο φορές ημερησίως για 12 εβδομάδες, σε παιδιά με βρογχεκτασίες και

υπεραντιδραστικότητα βρόγχων. Παρατήρησαν βελτίωση της FEV₁, στατιστικά σημαντική βελτίωση στη δοκιμασία πρόκλησης με μεταχολίνη κι ελάττωση του όγκου των παραγόμενων πτυέλων. Οι Tsang et al. (n=25) (100) χορήγησαν EM 500 mg δύο φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες, σε ενήλικες με ιδιοπαθείς βρογχεκτασίες. Παρατήρησαν ελάττωση της 24ωρης παραγωγής πτυέλων, βελτίωση της FEV₁ κατά 13% και μείωση των επιπέδων της IL-1, του TNFα και των λευκοτριενίων (LTB₄) στα πτύελα. Οι δύο μελέτες έχουν επικριθεί (101) για τον τρόπο σχεδιασμού τους. Σε μια τρίτη μελέτη, οι Cymbala et al. (n=30) (102) χορήγησαν AZ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 6 μήνες σε ασθενείς με διαγνωσμένες, με υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία θώρακα, βρογχεκτασίες. Παρατήρησαν σημαντική μείωση της συχνότητας παροξυσμών, της 24ωρης παραγωγής πτυέλων και της ποιότητας ζωής, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε εικονικό φάρμακο.

Το σύνδρομο αποφρακτικής βρογχιολίτιδας θεωρείται μη αναστρέψιμη νόσος που, τελικά, χρειάζεται μεταμόσχευση πνευμόνων για την επιβίωση του ασθενούς. Οι Yates et al. (n=6) (103) χορήγησαν AZ 250 mg τρεις φορές εβδομαδιαίως για 14 εβδομάδες σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με αποφρακτική βρογχιολίτιδα. Παρατήρησαν σημαντική βελτίωση της FEV₁, η οποία διατηρήθηκε για αρκετούς μήνες μετά τη διακοπή της αγωγής. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι μακρολίδες όχι μόνο επιβραδύνουν, αλλά και αντιστρέφουν την εξέλιξη της νόσου. Και αυτή η μελέτη επικρίθηκε, καθώς δεν ξεκαθαρίστηκε αν το αποτέλεσμα προέκυψε από την αλληλεπίδραση της AZ με τα συγχορηγούμενα κυτταροστατικά φάρμακα (101), αν και ο λόγος που αρχικά επιλέχθηκε η AZ απ' όλες τις μακρολίδες ήταν ακριβώς ο χαμηλός βαθμός αλληλεπίδρασής της με άλλα φάρμακα.

2.3.4 Χρόνια παραρινοκολπίτιδα – Ρινικοί πολύποδες

Η χρόνια παραρινοκολπίτιδα παρουσιάζεται με ρινική συμφόρηση, ρινική καταρροή, αίσθημα βάρους και πόνο στο πρόσωπο, καθώς κι αίσθημα κακουχίας. Τυπικά, παρατηρείται υπερτροφία και υπερπλασία των αδένων της ρινός και των παραρίνιων κόλπων, ενώ το φλεγμονώδες διήθημα περιλαμβάνει λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ουδετερόφιλα και πολυμορφοπύρρηνα. (104) Οι υπερτροφικές αλλαγές του βλεννογόνου, λόγω στένωσης της οδού παροχέτευσης, παρεμποδίζουν την απομάκρυνση της βλέννας, κάτι που δυσχεραίνεται περαιτέρω λόγω της υπερέκκρισης της βλέννας. Χαρακτηριστικά, δημιουργείται περιβάλλον φτωχό σε οξυγόνο, που ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών, κυρίως αναερόβιων μικροβίων.

Σε αρκετές μελέτες έχει φανεί η επίδραση των μακρολιδών στην αντιμετώπιση της χρόνιας παραρινοκολπίτιδας. Έτσι, παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στις ρινικές εκκρίσεις και βελτίωση των συμπτωμάτων. Μετά τη χορήγηση ΚΛΜ 400 mg/ημέρα για 4 εβδομάδες (n=32) (105) υπήρχε σημαντική βελτίωση της βλεννοκροσώτης κάθαρσης, του όγκου των εκκρίσεων, του βήχα και της δύσπνοιας προσπαθείας. Η χορήγηση ΡΞΜ (n=12) (106) και (n=30) (88) ανακούφισε από τα συμπτώματα και ελάττωσε τα επίπεδα της IL-8 στις ρινικές εκκρίσεις. Η χορήγηση ΚΛΜ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 2 εβδομάδες (n=25) (107) είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων των μακροφάγων, της ελαστάσης, των IL-6 και IL-8, του TNFα και των ηωσινοφίλων στις παραγόμενες εκκρίσεις.

Η παρατηρούμενη φλεγμονή στους ασθενείς με ρινικούς πολύποδες είναι είτε ουδετεροφιλο-επικρατής (σημαντικότερη προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη είναι η IL-8), είτε ηωσινοφιλο-επικρατής. Η χορήγηση ΚΛΜ 400 mg/ημέρα για 4 ή 8 εβδομάδες (n=23) (108), προκάλεσε μείωση των επιπέδων της IL-8 και συρρίκνωση των ρινικών πολυπόδων. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν με ΡΞΜ 150 mg/ημέρα για 8 εβδομάδες (n=20) (109).

2.3.5 Άσθμα

Παθογένεια άσθματος – ρόλος μακρολιδών

Το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από αναστρέψιμη στένωση των αεραγωγών και περιλαμβάνει τρία συστατικά: την αύξηση των εκκρίσεων, τη σύσπαση των λείων μυών και την πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών (110). Αν και η παθογένεια του άσθματος είναι ετερογενής, είναι γενικά αποδεκτό ότι η συμμετοχή φλεγμονωδών κυττάρων και η απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών διαδραματίζει κεντρικό ρόλο (111). Τα κύρια φλεγμονώδη κύτταρα που συμμετέχουν στην παθογένεια του άσθματος είναι τα T₂ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T_H2), τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα. Μετά τη διέγερση από τα αλλεργιογόνα, τα T_H2 ελευθερώνουν κυτταροκίνες (IL-4, IL-5, IL-13 και GM-CSF), που προκαλούν διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων προς παραγωγή ειδικών IgE αντισωμάτων. Τα IgE αντισώματα συνδέονται με τα μαστοκύτταρα, προκαλώντας έκκριση μεσολαβητών που προκαλούν βρογχόσπασμο (ισταμίνη, λευκοτριένια και καλλικρεΐνη) και κυτταροκινών (IL-4 και IL-5) που προκαλούν χημειοταξία των ηωσινοφίλων και πολλαπλασιασμό των T_H2 και των

μαστοκυττάρων (θετική παλίνδρομη ρύθμιση). Μετά την ενεργοποίησή τους από τα IgE αντισώματα, τα ηωσινόφιλα απελευθερώνουν τοξικές για το επιθήλιο ουσίες, όπως της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP), καθώς και IL-8, ενός παράγοντα χημειοτακτικού για τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα. Η ουδετεροφιλική φλεγμονή ενισχύεται με το πέρασμα του χρόνου και σχετίζεται με την απόφραξη των αεραγωγών που εμφανίζουν οι χρόνιαι ασθματικοί.

Ο ρόλος του επιθηλίου των αεραγωγών είναι σημαντικός στην έναρξη και διατήρηση της φλεγμονώδους απάντησης (110) μέσω παραγωγής χημοκινών, όπως των RANTES (ρυθμιζόμενων με ενεργοποίηση, παραγομένων και εκκρινόμενων από φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα χημοκινών), οι οποίες προσελκύουν ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και λεμφοκύτταρα στους αεραγωγούς. Επίσης, το επιθήλιο απελευθερώνει NO, το οποίο καταστέλλει τα TH₁-κύτταρα με αποτέλεσμα να ευνοεί την TH₂-αντίδραση, ενισχύοντας τη φλεγμονή στο άσθμα. Μέσω της διαδικασίας της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών, τα προαναφερθέντα γεγονότα της οξείας φλεγμονής μπορεί να οδηγήσουν σε υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων κι εναπόθεση κολλαγόνου κάτω από τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου. Η μετάβαση από την οξεία φλεγμονή στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών είναι μια πολυπαραγοντική, αδιευκρίνιστη ακόμα διαδικασία, που περιλαμβάνει την αλληλοεπίδραση μεταξύ γενετικής προδιάθεσης κι έκθεσης σε αλλεργιογόνα ή εξωτερικούς ερεθιστικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, την ατμοσφαιρική ρύπανση και τις λοιμώξεις του τραχειοβρογχικού δέντρου.

Οι μακρολίδες συμμετέχουν στην φλεγμονώδη διαδικασία του άσθματος σε διάφορα επίπεδα. Η υδροφοβική φύση του δακτυλίου λακτόνης επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτό μπορεί να συνεπάγεται αλλαγές των βιοφυσικών ιδιοτήτων διαφόρων φλεγμονωδών κυττάρων, άρα και της ρύθμισης μεταβολικών και μεταγραφικών μονοπατιών που συμμετέχουν στον καταρράκτη αντιδράσεων της ασθματικής φλεγμονής. Για παράδειγμα, οι μακρολίδες, μέσω του προαναφερθέντος μηχανισμού σταθεροποίησης της μεμβράνης, αναστέλλουν την απελευθέρωση μυελοπεροξειδάσης κι ελαστάσης από τα πολυμορφοπύρρηνα (112).

Οι μακρολίδες μπορούν να αναστείλουν την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων. Πράγματι, σε ποντίκια η χορήγηση EM ελάττωσε την παραγωγή ενός ουδετεροφιλικού χημειοτακτικού παράγοντα (CINC-1) από τα κυψελιδικά μακροφάγα (113). Σε ανθρώπους η απελευθέρωση IL-8 μειώθηκε μετά από χορήγηση

μακρολιδών, σε ατοπικά άτομα (87). Βρέθηκε, επίσης, ότι η ΚΛΜ αναστέλλει με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση του γονιδίου της IL-8, μέσω δράσης του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ (114). Όπως έχει αναφερθεί οι μακρολίδες ελαττώνουν την παραγωγή βλέννας και βελτιώνουν τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση.

Άλλοι μηχανισμοί των μακρολιδών περιλαμβάνουν την απόπτωση των ηωσινοφίλων (115), την αναστολή απελευθέρωσης των RANTES από ανθρώπινους ινοβλάστες *in vitro* (116) και GM-CSF από μονοκύτταρα και ινοβλάστες (117), την ελάττωση των απελευθερωμένων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (118) από τα ουδετερόφιλα και του TNFα από τα μαστοκύτταρα (119). Η χορήγηση μακρολιδών για 4 εβδομάδες προκάλεσε καταστολή της παραγωγής NO σε ποντίκια μετά από πολυσακχαριτιδική (μικροβιακή) διέγερση (120), τονίζοντας τη σημασία του μονοπατιού NO στη δράση αυτών των αντιβιοτικών. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά οι δράσεις των μακρολιδών στη φλεγμονή των αεραγωγών.

Πίνακας 2 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις μακρολιδών (111, 121-125)

Ελάττωση της βακτηριακής προσκολλητικότητας και του βιολογικού στρώματος των βακτηρίων
Ελάττωση της ηωσινοφιλικής φλεγμονής
Αναστολή χημειοταξίας
Αύξηση απόπτωσης
Επίδραση σε ουδετερόφιλα
Σταθεροποίηση μεμβράνης-αναστολή αποκοκκίωσης
Μειωμένη απελευθέρωση οξειδωτικών ριζών
Μειωμένη απελευθέρωση μυελοπεροξειδάσης κι ελαστάσης
Αναστολή χημειοταξίας
Αναστολή προσκόλλησης
Αναστολή φαγοκύττωσης
Αύξηση απόπτωσης
Αναστολή σύνθεσης ή/και απελευθέρωσης κυτταροκινών από άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως των IL-8, RANTES, GM-CSF, TNFα, NO
Ελάττωση της παραγωγής βλέννας
Μειωμένη ενεργοποίηση goblet κυττάρων
Μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών της βλέννας
Αύξηση της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης

Κλινικά πρωτόκολλα χορήγησης μακρολιδών στο άσθμα

Η πρώτη μακρολίδη που δοκιμάστηκε στην αντιμετώπιση του άσθματος ήταν η τρολεανδομυκίνη, πριν από περίπου 40 χρόνια (126). Στα 2/3 των ασθενών με πρεδνιζολόνο-εξαρτώμενο άσθμα παρατηρήθηκαν σημαντική ελάττωση του όγκου πτυέλων και της ανάγκης ανακουφιστικής θεραπείας με βρογχοδιασταλτικά, καθώς και βελτίωση της πνευμονικής τους λειτουργίας. Τα αποτελέσματα αποδόθηκαν στην τρολεανδομυκίνο-επαγόμενη αναστολή του μεταβολισμού της μεθυλπρεδνιζολόνης και της θεοφυλλίνης από το κυτόχρωμα P450 στο ήπαρ (126). Η δε χρήση της τρολεανδομυκίνης εγκαταλείφθηκε λόγω των προκαλούμενων από στεροειδή παρενεργειών, κυρίως της οστεοπόρωσης.

Σε μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη, με εικονικό φάρμακο-ελεγχόμενη μελέτη (111), χορηγήθηκε ΚΛΜ 500 mg 2 φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες σε ασθενείς (n=21) με κορτικο-εξαρτώμενο άσθμα (χρήση ≥ 5 mg πρεδνιζολόνης για ≥ 6 μήνες πριν την εισαγωγή στο πρωτόκολλο). Σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς, μετά τη διακοπή της θεραπείας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής βίαιης χωρητικότητας (FVC), βελτίωση της νυκτερινής δύσπνοιας και μείωση της θωρακικής δυσφορίας. Η βελτίωση της νυκτερινής δύσπνοιας αποτελεί ισχυρή ένδειξη κλινικής βελτίωσης. Κανένας ασθενής δεν χρειάστηκε να αυξήσει τη λήψη των στεροειδών. Μάλιστα σε μια άλλη μελέτη με ηλικιωμένους ασθενείς με κορτικο-εξαρτώμενο άσθμα (127), 2 στους 3 ασθενείς ελάττωσαν τη δοσολογία των στεροειδών.

Οι μακρολίδες έχουν φανεί αποτελεσματικές και σε ασθενείς με άσθμα, που δεν λαμβάνουν στεροειδή, γιατί ελαττώνουν τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και την ηωσινοφιλική φλεγμονή. Οι Miyatake et al. (128) χορήγησαν σε ασθενείς με άσθμα (n=23) χαμηλές δόσεις EM για 10 εβδομάδες κι εκτίμησαν τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, μετά από δοκιμασία πρόκλησης με μεταχολίνη. Παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις τιμές αναφοράς πριν την έναρξη της μελέτης. Αντιστοίχως, οι Amayasu et al. (129) χορήγησαν σε ασθενείς (n=17) με άσθμα ΚΛΜ 200 mg 2 φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες κι εκτίμησαν τον προκαλούμενο βρογχόσπασμο. Παρατήρησαν μείωση του αριθμού των ηωσινόφιλων του αίματος, ελάττωση των επιπέδων της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP) στα πτύελα και βελτίωση των τιμών PC20 στη δοκιμασία πρόκλησης με μεταχολίνη.

Αντιφλεγμονώδης δράση στους βρόγχους έχει αναφερθεί και με τη ΡΕΜ. Σε μια διπλά-τυφλή, ψευδοφάρμακο-ελεγχόμενη μελέτη (130) χορηγήθηκε σε ασθενείς

με επαγόμενο από ασπιρίνη άσθμα (n=14) ΡΞΜ 150 mg 2 φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε ελάττωση του αριθμού των ηωσινόφιλων στο περιφερικό αίμα και της ECP στα πτύελα. Η χορήγηση σε ασθματικούς ασθενείς (n=10) ΡΞΜ 150 mg/ημέρα για 3 μήνες (131), προκάλεσε μείωση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και της σύνθεσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Για να φανούν όμως τα αποτελέσματα χρειάστηκε τουλάχιστον δίμηνη αγωγή με το φάρμακο. Η χορήγηση σε ασθματικούς ασθενείς (n=11) χαμηλών δόσεων AZ, 250 mg/ημέρα για 8 εβδομάδες (132), επίσης βελτίωσε τις τιμές PC20 στη δοκιμασία πρόκλησης με μεταχολίνη.

Τέλος, οι μακρολίδες έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα και στη μη ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Simpson et al. (133) χορήγησαν σε ασθενείς (n=45) με ανθεκτικό άσθμα ΚΛΜ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες. Αυτοί οι ασθενείς παρουσίαζαν επιμονή των συμπτωμάτων τους, παρά τη μέγιστη χορηγούμενη θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και μακράς δράσης βρογχοδιασταλτικά. Μετά την ολοκλήρωση της αγωγής με ΚΛΜ, οι ασθενείς εμφάνισαν βελτίωση της ποιότητας ζωής τους και σημαντική μείωση των επιπέδων της IL-8, της ουδετεροφιλικής ελαστάσης και της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 στα πτύελά τους. Η ουδετεροφιλική φλεγμονή μειώθηκε και σε ασθματικά παιδιά (n=16), στα οποία χορηγήθηκε χαμηλή δόση AZ για 8 εβδομάδες (134). Παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση του FEV₁ κι ελάττωση του αριθμού των πολυμορφοπύρηνων σε προκλητά πτύελα στην ομάδα που έλαβε αζιθρομυκίνη.

Ρόλος χλαμυδίων στην παθογένεια του άσθματος

Τα *Chlamydomphila pneumoniae* αποτελούν συχνό αίτιο λοίμωξης του αναπνευστικού και σε αρκετές μελέτες διερευνήθηκε το ενδεχόμενο να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια του βρογχικού άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ). Αν ισχύει αυτό, οι μακρολίδες, λόγω της βακτηριοστατικής τους δράσης έναντι των άτυπων μικροοργανισμών, έχουν ένα επιπλέον λόγο να βελτιώνουν την κλινική εικόνα σε ασθενείς με αποφρακτικές νόσους των αεραγωγών.

Υποστηρίζεται ότι η οξεία λοίμωξη από *Chlamydomphila* ή *Mycoplasma pneumoniae* προκαλεί το 5% με 30% των επεισοδίων συριγμού και παροξυσμών άσθματος στα παιδιά (135). Σε δύο κλινικές μελέτες (136, 137) σχετίστηκε ο τίτλος των αντισωμάτων IgG και IgA έναντι των *C. pneumoniae* με τη βαρύτητα των

ασθματικών συμπτωμάτων. Στην πρώτη μελέτη (136) πραγματοποιήθηκε σε ασθματικούς ασθενείς (n=615) υπολογισμός του τίτλου των IgG και IgA αντισωμάτων, μέτρηση της πνευμονικής λειτουργίας και καταγραφή των συμπτωμάτων και της φαρμακευτικής αγωγής. Παρατηρήθηκε ότι ο τίτλος των IgG αντισωμάτων ήταν ανάλογος με την ανάγκη χρήσης υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών και αντιστρόφως ανάλογος με τη μετρούμενη FEV₁. Ο υψηλός τίτλος των IgA αντισωμάτων σχετίστηκε με μεγαλύτερα σκορ ημερησίων συμπτωμάτων. Στη δεύτερη μελέτη (137), εκτός από τους τίτλους αντισωμάτων και το ερωτηματολόγιο σχετικά με τα συμπτώματα, διενεργήθηκαν και δερματικές δοκιμασίες. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ τίτλου IgG και IgM αντισωμάτων με την συχνότητα εμφάνισης παραγωγικού βήχα και συριγμού, καθώς και με την ύπαρξη ατοπίας. Δεν υπάρχει ομοφωνία στο αν η οξεία ή η χρόνια λοίμωξη προδιαθέτει σε εμφάνιση άσθματος. Υπάρχουν μερικοί (138, 139) που υποστηρίζουν ότι οι ασθματικοί ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα IgG και IgA αντισωμάτων (δείκτες χρόνιας λοίμωξης) και μάλιστα τα IgA σχετίζονται περισσότερο με τη σοβαρότητα της νόσου. Άλλοι συγγραφείς (140), βρήκαν ότι ασθενείς με παροξυσμό άσθματος είχαν ταυτόχρονα οξεία λοίμωξη από άτυπους μικροοργανισμούς.

Οι μακρολίδες βελτιώνουν την πνευμονική λειτουργία σε ασθενείς με άσθμα και υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι χλαμυδίων ή μυκοπλάσματος. Η χορήγηση σε ασθενείς με σταθερό άσθμα (n=52) ΚΛΜ 500 mg 2 φορές ημερησίως (141) για 6 εβδομάδες, οδήγησε σε βελτίωση της FEV₁ μόνο στους θετικούς στην αντίδραση πολυμεράσης [PCR(+)] για χλαμύδια ή μυκόπλασμα ασθενείς. Η χορήγηση σε οροθετικούς (αντισώματα έναντι χλαμυδίων) ασθενείς (n=232) ΡΞΜ 150 mg 2 φορές ημερησίως (142) για 6 εβδομάδες, προκάλεσε βελτίωση της νυκτερινής μέγιστης εκπνευστικής ροής, όχι όμως και της ημερήσιας. Το αποτέλεσμα της ΡΞΜ εξαφανίστηκε 3 μήνες μετά τη διακοπή της αγωγής.

Συμπερασματικά, ο ρόλος των χλαμυδίων στο άσθμα και στη ΧΑΠ είναι ακόμα αμφισβητήσιμος (143). Στις μελέτες δεν υπάρχουν καθολικά αποδεκτά όρια στους τίτλους αντισωμάτων που να διαχωρίζουν την οξεία από τη χρόνια λοίμωξη. Επίσης, τα αποτελέσματα από τις ορολογικές μετρήσεις δεν συμβαδίζουν πάντα με αυτά των καλλιέργειών ή της αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Πολλοί ασθματικοί ασθενείς βελτιώνονται χωρίς αντιβιοτικά, ενώ άλλοι που έλαβαν αντιβιοτικά συνεχίζουν να έχουν θετικές καλλιέργειες για χλαμύδια. Χρειάζονται περισσότερες

μελέτες, με καλό σχεδιασμό για να ξεκαθαρίσουν αν η λοίμωξη από γλαμύδια προδιαθέτει σε άσθμα ή/και ΧΑΠ ή αν αυτοί οι ασθενείς είναι απλά πιο ευάλωτοι σε λοιμώξεις από άτυπους μικροοργανισμούς.

2.3.6 Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από προοδευτική απόφραξη της ροής αέρα λόγω φλεγμονώδους απάντησης των πνευμόνων σε ερεθιστικές ουσίες ή αέρια. Οι Benerjee et al. τυχαιοποίησαν ασθενείς (n=24) με μέτρια-προς-σοβαρή, σταθερή ΧΑΠ ($FEV_1 < 60\%$), να λάβουν ΚΛΜ 500 mg/ημέρα (144) ή εικονικό φάρμακο για 3 μήνες. Η ομάδα που έλαβε ΚΛΜ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων και στη δοκιμασία βάρδισης των 6 λεπτών. Όμως, ο ολικός αριθμός των λευκών και ο απόλυτος αριθμός των ουδετερόφιλων στα προκλητά πτύελα, που ήταν ελαττωμένοι σε όσους έλαβαν ΚΛΜ, φάνηκε να σχετίζεται με τα αναπνευστικά συμπτώματα και την ποιότητα ζωής.

Υπάρχει χώρος για τη χορήγηση μακρολιδών σε αποφρακτικές νόσους του αναπνευστικού;

Σαφής απάντηση δεν έχει δοθεί, αν και η χρήση των μακρολιδών δεν έχει περάσει στις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση του άσθματος και της ΧΑΠ. Η ομάδα για τις νόσους των αεραγωγών στη βάση δεδομένων Cochrane (145-147) φιλτράρισε μεγάλο αριθμό μελετών και κατέληξαν στο ότι οι μακρολίδες ελαττώνουν την ηωσινοφιλική φλεγμονή, βελτιώνουν τη μέγιστη εκπνευστική ροή (όχι όμως την FEV_1) και ανακουφίζουν από τα συμπτώματα του άσθματος. Όμως, ο αριθμός των μελετών που κάλυψε τα προτεινόμενα κριτήρια ήταν σχετικά μικρός, οπότε το τελικό συμπέρασμα για τον ρόλο των μακρολιδών στη θεραπεία του άσθματος δεν θεωρήθηκε ασφαλές. Οι Cazzola et al. (118, 148) αποδίδουν τη παρατηρούμενη βελτίωση στο κορτικο-εξαρτώμενο άσθμα στην τροποποίηση της ηωσινοφιλικής φλεγμονής και όχι στον ηπατικό μεταβολισμό των στεροειδών. Η ρύθμιση της μεταγραφής του mRNA πλήθους κυτταροκινών, η δραστική ελάττωση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και η αποτελεσματικότητα των μακρολιδών έναντι των άτυπων μικροβίων θεωρούνται, επίσης, σημαντικοί παράμετροι. Ορισμένοι συγγραφείς αποδέχονται ότι οι μακρολίδες μπορεί να έχουν επιπλέον και κάποιο βρογχοδιασταλτικό ρόλο (118), ο οποίος όμως δεν έχει ακόμα επαρκώς μελετηθεί και δεν μπορεί να συγκριθεί με τη θεμελιωμένη αντιφλεγμονώδη και βακτηριοστατική τους δράση.

Πίνακας 3 Κλινικές μελέτες μακρολιδών σε φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού

<i>Διάχυτη πανβρογχιολίτιδα</i>	
Kudoh et al. (92, 149)	EM 400-600 mg/ημέρα για τουλάχιστον 2 έτη
Yamamoto et al. (91)	EM 400-600 mg/ημέρα
Kadota et al. (94)	EM 200 mg x 3/ημέρα για 6-12 μήνες
Sakito et al. (85)	EM 600 mg/ημέρα για 16 μήνες ή PEM 150 mg/ημέρα για 5 μήνες
<i>Κυστική ίνωση - Βρογχεκτασίες - σύνδρομο αποφρακτικής βρογχιολίτιδας</i>	
Equi et al. (96)	AZ 250-500 mg/ημέρα για 6 μήνες
Wolter et al. (97)	AZ 250 mg/ημέρα για 3 μήνες
Salman et al. (98)	AZ 250-500 mg τρεις φορές εβδομαδιαίως για 168 ημέρες
Koh et al. (99)	PEM 4 mg/kg δύο φορές ημερησίως για 12 εβδομάδες, παιδιά
Tsang et al. (100)	EM 500 mg δύο φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες
Cymbala et al. (102)	AZ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 6 μήνες
Yates et al. (103)	AZ 250 mg τρεις φορές εβδομαδιαίως για 14 εβδομάδες
<i>Χρόνια παραρρινοκολπίτιδα – ρινικοί πολύποδες</i>	
Nishi et al. (105)	ΚΛΜ 400 mg/ημέρα για 4 εβδομάδες
Kimura et al. (106)	PEM 150 mg/ημέρα για 3 μήνες
Suzuki et al. (88)	PEM 150 mg/ημέρα για 3 μήνες
MacLeod et al. (107)	ΚΛΜ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 2 εβδομάδες
Yamada et al. (108)	ΚΛΜ 400 mg/ημέρα για 4 ή 8 εβδομάδες
Ichimura et al. (109)	PEM 150 mg/ημέρα για 8 εβδομάδες
<i>Άσθμα</i>	
Weinberger et al. (126)	Τρολεανδομυκίνη
Gotfried et al. (111)	ΚΛΜ 500 mg 2 φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες
Garey et al. (127)	ΚΛΜ 500 mg 2 φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες
Miyatake et al.(128, 150)	χαμηλές δόσεις EM για 10 εβδομάδες
Amayasu et al. (129)	ΚΛΜ 200 mg 2 φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες
Shoji et al. (133)	PEM 150 mg 2 φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες
Kamoi et al. (131)	PEM 150 mg/ημέρα για 3 μήνες
Ekici et al. (132)	AZ 250 mg/ημέρα για 8 εβδομάδες
Simpson et al. (133)	ΚΛΜ 500 mg δύο φορές ημερησίως για 8 εβδομάδες
Piacentini et al. (134)	χαμηλή δόση AZ για 8 εβδομάδες, παιδιά
<i>Άσθμα και άτυποι μικροοργανισμοί</i>	
Kraft et al. (141)	ΚΛΜ 500 mg 2 φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες
Black et al. (142)	PEM 150 mg 2 φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες
<i>ΧΑΠ</i>	
Benerjee et al. (144)	ΚΛΜ 500 mg/ημέρα για 3 μήνες

2.4 Ρόλος των μακρολιδών στη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων

Μετά την ανακάλυψη της ευεργετικής δράσης των μακρολιδών στη διάχυτη πανβρογχιολίτιδα, άνοιξε το κουτί της Πανδώρας και η έρευνα εστιάστηκε στις αντιφλεγμονώδεις, πέρα από τις γνωστές αντιμικροβιακές, δράσεις των μακρολιδών. Σε *in vitro* πειράματα φάνηκε, όμως, πως αυτά τα φάρμακα διαθέτουν και άλλες ιδιότητες. Πράγματι, υπάρχει πλήθος ενδείξεων ότι οι μακρολίδες επηρεάζουν τη συστολή διάφορων μυϊκών κυττάρων.

2.4.1 Δράση μακρολιδών στο μυομήτριο

Τα πρώτα πειράματα αφορούσαν ποντίκια. Σε μια μελέτη του 1998 σε έγκυα ποντίκια (151), σε ιστοτεμάχια μυομητρίου που είχαν εμβαπτισθεί σε λουτρά διαπότισης με διάλυμα Krebs, προκλήθηκε ισομετρική σύσπαση με καρβαχόλη (αγωνιστής μουσκαρινικών υποδοχέων) ή ωκυτοκίνη. Ακολούθως, προστέθηκε ερυθρομυκίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις και καταγράφηκε η προκαλούμενη αλλαγή στην ένταση συστολής των μυϊκών ινών. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η ερυθρομυκίνη προκαλούσε, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ελάττωση της σύσπασης, ανεξάρτητα από την ουσία που είχε προκαλέσει τη συστολή. Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα διαπιστώθηκε από τη συγκέντρωση 10^{-5} M, ενώ το μέγιστο καταγράφηκε στη συγκέντρωση 10^{-3} M ερυθρομυκίνης και μεταφράζονταν σε μείωση του μυϊκού τόνου κατά 22%. Η ομάδα των Celik et al. οδηγήθηκαν σε παρόμοια αποτελέσματα. Σε ιστοτεμάχια μυομητρίου μη-έγκυων ποντικών (152), η ερυθρομυκίνη ελάττωσε την ένταση συστολής που προκάλεσε η προσθήκη προσταγλανδίνης PGF_{2α}. Το αποτέλεσμα ήταν δοσοεξαρτώμενο, και στις συγκεντρώσεις 10^{-4} , 2×10^{-4} , 5×10^{-4} και 10^{-3} M προκλήθηκε μείωση της έντασης συστολής κατά 27%, 38%, 54% και 83%, αντιστοίχως. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ιστοτεμάχια από έγκυες γυναίκες (153). Η ομάδα των Celik et al. επιβεβαίωσαν τη δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση και με την κλαριθρομυκίνη (154). Άσχετα με την ουσία που προκάλεσε σύσπαση (ωκυτοκίνη, PGF_{2α} και διάλυμα KCl), οι μακρολίδες προκαλούν χάλαση στις λείες μυϊκές ίνες ανθρώπινου μυομητρίου. Κλινική εφαρμογή αυτής της παρατήρησης θα μπορούσε να βρεθεί στην πρωτοπαθή δυσμηνόρροια, όπου η PGF_{2α} φαίνεται να διαδραματίζει βασικό ρόλο.

2.4.2 Δράση μακρολιδών στο γαστρεντερικό σύστημα

Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η ερυθρομυκίνη προκαλούσε σύσπαση στους μύες του γαστρεντερικού σωλήνα. Ουσιαστικά, αύξανε την περίσταση, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η δράση αυτή σχετίστηκε με τους υποδοχείς μοτιλίνης (155), μιας ορμόνης του γαστρεντερικού συστήματος. Η ερυθρομυκίνη επηρέαζε τους γαστρεντερικούς μύες ανάλογα με την ανατομική τους εντόπιση, έτσι η προκαλούμενη σύσπαση ήταν εντονότερη στο δωδεκαδάκτυλο και στους κυκλοτερείς μύες του ανιόντος κόλου.

Αργότερα όμως, προέκυψαν τελείως διαφορετικά δεδομένα. Βασισμένοι στην κλινική παρατήρηση πως η ερυθρομυκίνη διεγείρει την κένωση της χοληδόχου κύστης σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με διαβητική αυτόνομη νευροπάθεια, οι Nissan et al. (156) διαπίστωσαν ότι όταν στο λουτρό διαπότισης (που περιέχει λείες μυϊκές ίνες χοληδόχου κύστης, προσυσπασμένες με καρβαχόλη ή ηλεκτρική διέγερση) προστεθεί ερυθρομυκίνη, μειώνεται η ένταση της συστολής. Η παρατηρούμενη δράση ήταν δοσοεξαρτώμενη και απουσίαζε στις προκαλούμενες από βραδυκινίνη συσπάσεις. Έτσι, σε συγκέντρωση 5×10^{-4} M η ερυθρομυκίνη ελάττωσε την αρχική συστολή κατά $71\% \pm 16\%$ και $53\% \pm 24\%$, στις προκαλούμενες από ηλεκτρική διέγερση και καρβαχόλη συσπάσεις, αντιστοίχως. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε πειράματα με λείους μύες από το λεπτό και παχύ έντερο (157). Η ερυθρομυκίνη 10^{-4} M ελάττωσε την προκαλούμενη από καρβαχόλη σύσπαση στο $77\% \pm 22\%$ και $78\% \pm 22\%$, σε ιστοτεμάχια από το λεπτό και το παχύ έντερο, αντιστοίχως. Οι ερευνητές δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στους ιστούς που είχαν συσπαστεί με μη-χολινεργικούς παράγοντες, υπονοώντας ότι η ερυθρομυκίνη ασκεί άμεση αντι-χολινεργική δράση.

2.4.3 Δράση μακρολιδών στο ουροποιητικό σύστημα

Η ερυθρομυκίνη παρουσίασε ανασταλτική στη σύσπαση δράση και στους λείους μύες από την ουροδόχο κύστη ποντικών (158). Το αποτέλεσμα ήταν δοσοεξαρτώμενο. Συγκεκριμένα, προκλήθηκε ελάττωση της προκαλούμενης από καρβαχόλη σύσπασης κατά 46% και 57% με συγκέντρωση ερυθρομυκίνης 5×10^{-4} και 10^{-3} M, αντιστοίχως. Η ερυθρομυκίνη όμως δεν είχε καμία επίδραση στην προκαλούμενη από βραδυκινίνη ή ουσία P σύσπαση. Η βραδυκινίνη δρα μέσω των B_1 και B_2 υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του λείου μυός, ενώ η ουσία P ανήκει στο μη-χολινεργικό-μη-αδρενεργικό σύστημα, το οποίο δρα

προσυναπτικά οδηγώντας σε αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από το νευρικό κύτταρο.

Οι England et al. μελέτησαν τη δράση της ερυθρομυκίνης στον εξωστήρα μυ ποντικών (159), προκαλώντας σύσπαση με καρβαχόλη 10^{-5} M, εξωκυττάριο διάλυμα KCl 80mM ή ηλεκτρική διέγερση των λείων μυών. Η προσθήκη ερυθρομυκίνης 5×10^{-4} M, είχε σαν συνέπεια την ελάττωση της αρχικής σύσπασης-αναφοράς με καρβαχόλη, διάλυμα KCl ή ηλεκτρική διέγερση κατά 62%, 17% και 38%, αντιστοίχως. Στα πλαίσια διευκρίνισης του πιθανού μηχανισμού δράσης της ερυθρομυκίνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο με και χωρίς την προσθήκη νιφεδιπίνης 10^{-8} και 10^{-6} M. Η νιφεδιπίνη είναι αναστολέας των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου, VDCC. Στα ιστοτεμάχια που είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο, η μέγιστη σύσπαση από καρβαχόλη ήταν κατά 42% μικρότερη της αντίστοιχης σε φυσιολογικό διάλυμα Krebs. Από την προσθήκη νιφεδιπίνης 10^{-8} M δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Όταν όμως στο λουτρό διαπότισης (με διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο) προστέθηκε νιφεδιπίνη 10^{-8} M και ερυθρομυκίνη 5×10^{-4} M, παρατηρήθηκε ελάττωση της σύσπασης κατά ένα επιπλέον 25%. Μια κλινική εφαρμογή της παρατηρηθείσας ανασταλτικής στη σύσπαση δράσης της ερυθρομυκίνης θα μπορούσε να υπάρξει στο σύνδρομο ασταθούς κύστης.

2.4.4 Δράση μακρολιδών στο αναπνευστικό σύστημα

Υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες που αφορούν τη δράση των μακρολιδών στους λείους μύες των αεραγωγών και τον τρόπο που επιδρούν στη συσταλτικότητα τους. Οι Tagaya και Tamaoki μελέτησαν την επίδραση της ερυθρομυκίνης στη σύσπαση λείων μυϊκών ινών από βρόγχους σκύλου (160). Προκάλεσαν ισομετρικές συσπάσεις μέσω ηλεκτρικής διέγερσης των ιστοτεμαχίων. Η ερυθρομυκίνη ελάττωσε τη συστολή με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και το μέγιστο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 3×10^{-4} M, οπότε η συστολή μειώθηκε περίπου στο μισό. Στην προσπάθειά τους να διευκρινίσουν το μηχανισμό δράσης της ερυθρομυκίνης πρόσθεσαν στο υγρό διαπότισης προπρανολόλη (β-αγωνιστή), ινδομεθακίνη (αναστολέα της κυκλοξυγενάσης, άρα της παραγωγής προσταγλανδινών) και ουαμπαΐνη (αναστολέα της Na^+ - K^+ -ATPάσης). Καμία από αυτές τις ουσίες, όπως και η μηχανική απομάκρυνση του επιθηλίου, δεν μετέβαλλαν τη δράση της ερυθρομυκίνης. Αντιθέτως, η προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη σύσπαση δεν

επηρεάστηκε από την ερυθρομυκίνη, οδηγώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι το φάρμακο δρα προσυναπτικά, εμποδίζοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από το νευρικό κύτταρο.

Αργότερα, οι ίδιοι ερευνητές επανέλαβαν τα πειράματα με ιστοτεμάχια από ανθρώπινους βρόγχους, μελετώντας την επίδραση της ερυθρομυκίνης, ροξιθρομυκίνης και κλαριθρομυκίνης (161). Παρατήρησαν δόσοεξαρτώμενη, ανασταλτική στην σύσπαση δράση με όλες τις χρησιμοποιούμενες μακρολίδες. Όσο αφορά το μηχανισμό κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μακρολίδες στοχεύουν το νευρικό κύτταρο και προκαλούν ελαττωμένη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή (ακετυλοχολίνης). Σε αεραγωγούς σκύλου, η αζιθρομυκίνη φάνηκε ότι επηρεάζει το Ca^{2+} -εξαρτώμενο ρεύμα Cl^- , χωρίς να δρα άμεσα στη συσπαστικότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών (162). Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι χρειάζονται επιπλέον μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των μακρολιδών στην αντιδραστικότητα των λείων μυών των αεραγωγών.

Πίνακας 4 In vitro μελέτες σχετικά με την ανασταλτική στη σύσπαση δράση των μακρολιδών.

Συγγραφείς	Πειραματική μονάδα	Μακρολίδη
Granovsky et al. (151)	Λείοι μύες μυομητρίου εγκύων ποντικών	EM
Celik et al. (152)	Λείοι μύες μυομητρίου μη-εγκύων ποντικών	EM
Celik et al. (153)	Λείοι μύες μυομητρίου ανθρώπου	EM
Celik et al. (154)	Λείοι μύες μυομητρίου ανθρώπου	ΚΑΜ
Nissan et al. (156)	Λείοι μύες χοληδόχου κύστης ανθρώπου	EM
Nissan et al. (157)	Λείοι μύες εντέρου ανθρώπου	EM
Nissan et al. (158)	Λείοι μύες ουροδόχου κύστης ποντικού	EM
England et al. (159)	Λείοι μύες ουροδόχου κύστης ποντικού	EM
Tagaya et al. (160)	Λείοι μύες βρόγχων σκύλου	EM
Tamaoki et al. (161)	Λείοι μύες βρόγχων ανθρώπου	EM, ΡΕΜ, ΚΑΜ
Janssen et al. (162)	Λείοι μύες αεραγωγών ανθρώπου	EM

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η δράση της αζιθρομυκίνης στη συσταλτικότητα των λείων μυϊκών ινών της τραχείας κουνελιού. Ειδικότερα, πρωταρχικός στόχος ήταν να διερευνηθεί εάν η αζιθρομυκίνη μπορεί να επιδρά ανασταλτικά στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών. Από εκεί και πέρα, σκοπός μας ήταν η ανάδειξη των συγκεντρώσεων της αζιθρομυκίνης με στατιστικά σημαντική επίδραση στη συστολή και η πρόταση ενός πιθανού μηχανισμού δράσης του φαρμάκου. Σαν πειραματική μονάδα χρησιμοποιήθηκε η τραχεία από κουνέλι. Για την πρόκληση σύσπασης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 3×10^{-7} M του μουσκαρινικού αγωνιστή καρβαχόλη ή εξωκυττάριο διάλυμα KCl 80mM.

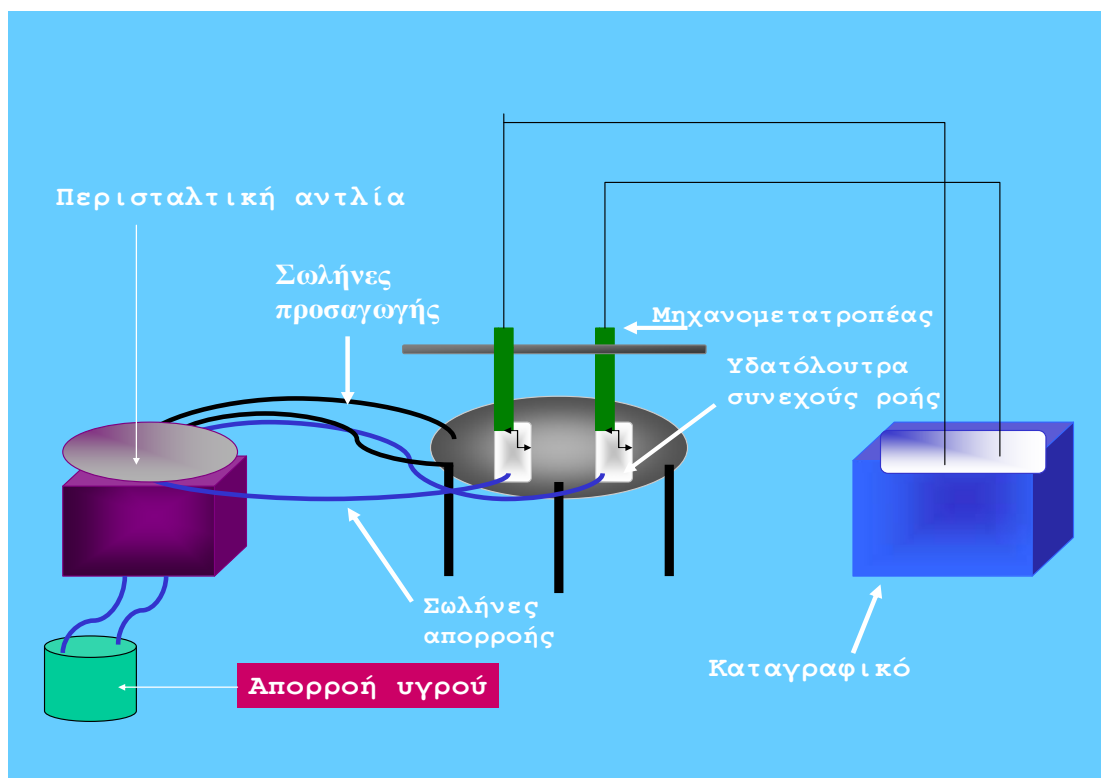
4 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Προετοιμασία ιστού και πειράματα συστολών.

Ενήλικα κουνέλια (ηλικίας 6 εβδομάδων, με βάρος σώματος περίπου 2 Kg) θανατώνονται με ενδοφλέβια χορήγηση πεντοθάλης (Roche, Γαλλία) σε δόση 20mg/kg. Το εξωθωρακικό τμήμα της τραχείας αφαιρείται με προσοχή, καθαρίζεται από τον συνδετικό ιστό και τοποθετείται σε διάλυμα Krebs (διάλυμα όμοιας σύστασης με αυτή του εξωκυτταρίου υγρού), στο οποίο εφαρμόζεται συνεχής παροχή 95% O₂ και 5% CO₂. Η σύνθεση του διαλύματος Krebs σε mM ήταν η ακόλουθη: NaCl 110.9, KCl 5.9, MgCl₂ 1.1, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 1.2, γλυκόζη 9.6 και NaHCO₃ 25. Πριν την έναρξη των πειραμάτων διαπιστώθηκε πως το pH του διαλύματος δεν μεταβάλλονταν από την προσθήκη αζιθρομυκίνης και παρέμεινε ίσο με 7,4 στους 37 °C.

Ακολούθως, το μέσο τμήμα της τραχείας τεμαχίζεται σε κρίκους, 2 mm πλάτος, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (SZ30 Olympus, Japan), καθένας από τους οποίους περιέχει 2-3 ημικρίκια χόνδρου με το αντίστοιχο τμήμα των λείων μυϊκών ινών. Οι κρίκοι στη συνέχεια κόβονται κατά μήκος του χόνδρου απέναντι ακριβώς από την περιοχή των λείων μυϊκών ινών. Στα πειράματα με ιστό χωρίς επιθήλιο, η στιβάδα του επιθηλίου απομακρύνεται με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Κάθε ημικρίκιο τοποθετείται σε λουτρό διαπότισης, με την ενδοαυλική πλευρά προς τα πάνω και βρίσκεται υπό συνεχή διαπότιση με διάλυμα Krebs (pH 7.4 στους 37°C). Στον ιστό υπάρχει συνεχής χορήγηση μίγματος 95% O₂ και 5% CO₂. Η μια άκρη του

ημικρικού στερεώνεται στον πυθμένα του λουτρού διαπότισης με τη βοήθεια λεπτής βελόνης, ενώ η άλλη στο άκρο ενός μηχανομετατροπέα (Grass FT03C force Astro Med, Inc, USA). Τα ημικρικά τεντώνονται χειροκίνητα σε τάση ηρεμίας 1 g και ακολούθως αφήνονται να ισορροπήσουν για τουλάχιστον 60 λεπτά. Οι αλλαγές της τάσης καταγράφονται μέσω του μηχανομετατροπέα στο καταγραφικό μηχάνημα (Grass 7400 Physiological Recorder). Η πειραματική διάταξη παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης

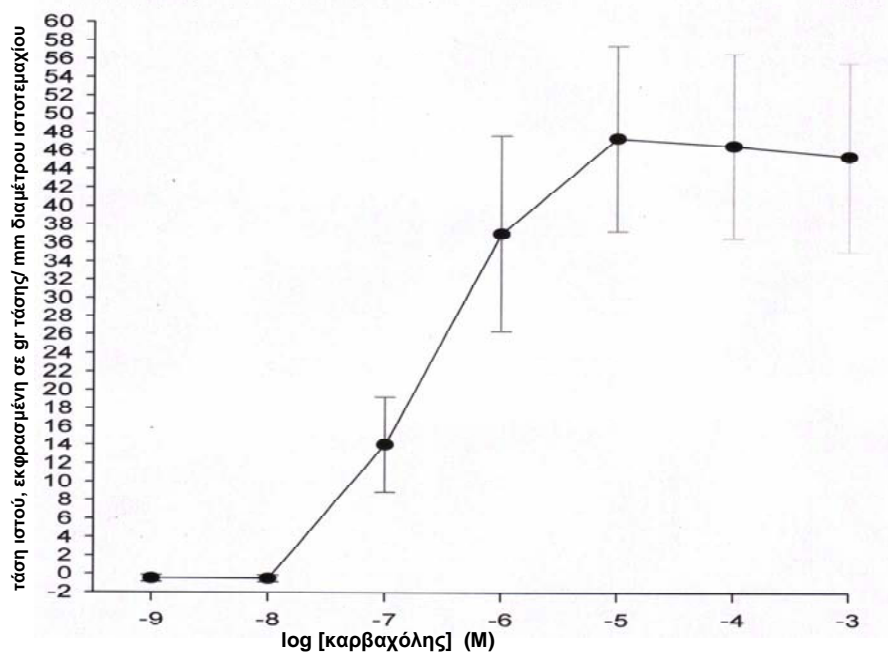
4.2 Εφαρμογή των προς μελέτη ουσιών

4.2.1 Επίδραση με καρβαχόλη

Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ιστοτεμάχια τραχείας κουνελιού. Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ιστό που βρίσκονταν σε κατάσταση ισορροπίας με διάλυμα Krebs. Μετά την περίοδο ισορροπίας του ιστού (διάρκειας 60 λεπτών), προστίθεται στο λουτρό διαπότισης αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-4} M. Οι ιστοί παρακολουθούνται για την επόμενη ώρα. Ταυτόχρονα, ιστοτεμάχια από το ίδιο ζώο παραμένουν σε διάλυμα Krebs και χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες.

Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις AMI με και χωρίς επιθήλιο που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη. Μετά την περίοδο εξισορρόπησης, τα

ιστοτεμάχια συσπώνται με διάλυμα καρβαχόλης 3×10^{-7} M για 20 λεπτά περίπου, μέχρι να φτάσουν σε κατάσταση ισορροπίας. Η συγκέντρωση 3×10^{-7} M επιλέχθηκε, γιατί σε προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριο φάνηκε ότι σε αυτή τη συγκέντρωση παρατηρείται το 50% της μέγιστης δράσης της καρβαχόλης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9 Επίδραση καρβαχόλης, σε συγκεντρώσεις από 10^{-9} M ως 10^{-3} M, στις λείες μύες τραχείας κουνελιού

Στη συνέχεια, προστίθεται στα λουτρά διαπότισης αζιθρομυκίνη, αθροιστικά, σε συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} και 10^{-4} M. Ο ιστός παραμένει σε κάθε συγκέντρωση για 20 λεπτά, στον οποίο χρόνο παρατηρείται και το μέγιστο αποτέλεσμα. Τόσο στους ιστούς με επιθήλιο, όσο και σε αυτούς χωρίς επιθήλιο πραγματοποιήθηκαν, ταυτόχρονα, πειράματα αναφοράς μόνο με καρβαχόλη 3×10^{-7} M.

Παρακολούθηση της δράσης της αζιθρομυκίνης, στη μέγιστη συγκέντρωση, συναρτήσει του χρόνου. Προσδιορίστηκε η επίδραση της μέγιστης χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης αζιθρομυκίνης, δηλαδή 10^{-4} M, σε συνάρτηση με το χρόνο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ιστοτεμάχια που βρίσκονταν σε σύσπαση με 3×10^{-7} M καρβαχόλη εκτέθηκαν σε διάλυμα 10^{-4} M αζιθρομυκίνης για 120 λεπτά.

4.2.2 Επίδραση με διάλυμα KCl

Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ που βρίσκονται σε σύσπαση με διάλυμα KCl. Σε αυτά τα πειράματα, σαν συσπαστική ουσία μετά την περίοδο εξισορρόπησης του ιστού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 80 mM KCl, ενώ η αζιθρομυκίνη χορηγήθηκε μόνο σε συγκέντρωση 10^{-4} M. Το διάλυμα KCl (80 mM) είχε κατά τα άλλα την ίδια σύσταση με το διάλυμα Krebs, εκτός από την ισομοριακή αντικατάσταση του NaCl από KCl. Ο ιστός παρέμεινε σε διάλυμα 80 mM KCl για 20 λεπτά και ακολούθως εμβαπτιζονταν σε διάλυμα [80 mM KCl + αζιθρομυκίνης 10^{-4} M], για άλλα 20 λεπτά. Σε πειράματα αναφοράς, τα οποία εκτελέστηκαν παράλληλα, ο ιστός παρέμεινε μόνο στο KCl.

Μελέτη του ρόλου του ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων, ατροπίνης, στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης. Η ίδια πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε για τη μελέτη της επίδρασης της αζιθρομυκίνης 10^{-4} M σε προσυσπασμένες ΛΜΙ με KCl, παρουσία του ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων ατροπίνης 10^{-4} M. Εκτός από τα πειράματα αναφοράς μόνο με KCl, σε ιστό από το ίδιο ζώο καταγράφηκε το αποτέλεσμα της ίδιας συγκέντρωσης αζιθρομυκίνης σε διάλυμα χωρίς ατροπίνη.

4.2.3 Μελέτη του ρόλου του εξωκυττάριου ασβεστίου στη δράση της αζιθρομυκίνης

1. Σε να διαφορετικό πρωτόκολλο εξετάστηκε η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην καρβαχόλη (3×10^{-7} M) μετά από προσθήκη αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M). Σε αυτά τα πειράματα, οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε καρβαχόλη για 15 λεπτά ώσπου να επιτευχθεί η μέγιστη σύσπαση και ακολούθως, ξεπλύθηκαν με διάλυμα Krebs που περιείχε αζιθρομυκίνη 10^{-6} M, ώσπου να επιστρέψει η τάση τους στον βασικό τόνο. Ακολούθως, στο υγρό διαπότισης εφαρμόστηκε διάλυμα με καρβαχόλη και αζιθρομυκίνη 10^{-6} M για 20 λεπτά, οπότε καταγράφηκε μια δεύτερη σύσπαση. Παρομοίως, μετά τη δεύτερη σύσπαση έγινε ξέπλυμα του ιστού με διάλυμα Krebs, μόνο που η συγκέντρωση της αζιθρομυκίνης αυξήθηκε στα 10^{-4} M. Ακολούθως, ο ιστός εμβαπτίστηκε σε διάλυμα καρβαχόλης με αζιθρομυκίνη 10^{-4} M, καταγράφοντας μια τρίτη σύσπαση σε διάστημα άλλων 20 λεπτών. Στη δεύτερη και στην τρίτη σύσπαση, υπολογίστηκε η τάση του ιστού σε σύγκριση με την παρατηρούμενη τάση της πρώτης σύσπασης. Πειράματα αναφοράς πραγματοποιήθηκαν με ημικρίκια τραχείας από το ίδιο ζώο, όπου στα διαλύματα δεν προστέθηκε αζιθρομυκίνη.

2. Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) σε συσπάσεις από καρβαχόλη 10^{-5} M. Στη συγκέντρωση 10^{-5} M, η καρβαχόλη προκαλεί τη μέγιστη δυνατή σύσπαση στις ΛΜΙ (Εικόνα 9). Προτιμήθηκαν οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις αζιθρομυκίνης, γιατί αυτή των 10^{-6} M πλησιάζει περισσότερο τη βιολογικά δραστική συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στους ανθρώπινους πνεύμονες, ενώ η συγκέντρωση των 10^{-4} M είναι η μέγιστη που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πραγματοποιηθέντα πειράματα και αυτή που προκάλεσε τα μέγιστα αποτελέσματα.

3. Με το ίδιο πρωτόκολλο, μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της αζιθρομυκίνης στο ρεύμα Ca^{2+} προς το εσωτερικό του κυττάρου. Σε αυτά τα πειράματα, μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ σε 3×10^{-7} M καρβαχόλης: α) σε φυσιολογικό διάλυμα Krebs, β) σε διάλυμα Krebs απουσίας Ca^{2+} και γ) παρουσίας του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων καναλιών Ca^{2+} , βεραπαμίλης (10^{-6} M).

4.2.4 Μελέτη της επίδρασης της $Na^{+}-K^{+}$ ΑΤΡάσης, της SERCA, των επιπέδων cAMP και cGMP και των Rho κινασών

Στα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν ο αναστολέας της $Na^{+}-K^{+}$ ΑΤΡάσης, ουαμπαΐνη (10^{-7} M και 10^{-5} M), ο αναστολέας της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου, κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA, 10^{-6} M), ο μη ειδικός αναστολέας των cAMP και cGMP φωσφοδιεστερασών, 3-Ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιόνη (IBMX, 10^{-6} M και 10^{-4} M) και ο αναστολέας της Rho κινάσης (R)-(+)-trans-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδροχλωρίδιο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδη (Y-27632, 10^{-6} M), οι ιστοί προεπωάζονταν για 20 λεπτά με τον εκάστοτε αναστολέα, πριν την προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M. Σαν συσπαστική ουσία χρησιμοποιήθηκε είτε διάλυμα 80 mM KCl (CPA, IBMX, Y-27632), είτε διάλυμα καρβαχόλης 3×10^{-7} M (ουαμπαΐνη, CPA, IBMX). Στα πειράματα αναφοράς, μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης απουσίας του αναστολέα (ουαμπαΐνη, CPA, IBMX, Y-27632), όπως επίσης και η επίδραση του αναστολέα μόνο του, χωρίς την προσθήκη αζιθρομυκίνης.

Ειδικότερα το IBMX μελετήθηκε και με διαφορετικό πρωτόκολλο. Μετά τη φάση εξισορρόπησης, προκαλείται σύσπαση των ιστών με διάλυμα 80 mM KCl, για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στα λουτρά διαπότισης αζιθρομυκίνη, διαδοχικά, σε συγκεντρώσεις 10^{-7} , 10^{-6} και 10^{-4} M. Σε μια ομάδα ιστοτεμαχίων όλα τα

διαλύματα περιέχουν IBMX 10^{-6} M. Στη δεύτερη ομάδα από το ίδιο ζώο, η συγκέντρωση του IBMX είναι 10^{-4} M. Η τρίτη είναι η ομάδα αναφοράς, που δεν περιέχει καθόλου IBMX.

4.3 Φάρμακα και χημικές ουσίες

Όλες οι χημικές ουσίες αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich Chemical (Γερμανία), εκτός από την αζιθρομυκίνη η οποία χορηγήθηκε από την Pfizer (ΗΠΑ). Η καρβαχόλη και η αζιθρομυκίνη διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό. Η ατροπίνη, η ουαμπαΐνη και η βεραπαμίλη διαλύθηκαν σε αιθυλική αλκοόλη. Η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης δεν ξεπέρασε το 0,1%, που σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ. Το Y-27632, IBMX και CPA παρασκευάστηκαν από αρχικά διαλύματα 10 μ M σε DMSO. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν φρέσκα καθημερινά.

4.4 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές εκφράζονται ως ποσοστό της αρχικής σύσπασης των ΛΜΙ παρουσία καρβαχόλης 3×10^{-7} M ή 80 mM KCl ή σαν τάση σε γραμμάρια ανά γραμμάριο ξηρού ιστού (g/ g). Όποτε χρησιμοποιήθηκε κάποιος αναστολέας (ουαμπαΐνη, CPA, IBMX and Y 27632), οι τιμές εκφράζονται ως το ποσοστό της τάσης του ιστού λίγο πριν την προσθήκη της αζιθρομυκίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm standard error mean (SEM). Ο αριθμός των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα αντιπροσωπεύεται με το N. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων αζιθρομυκίνης έγινε με τη χρήση του Wilcoxon related samples test. Οι συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων πειραμάτων έγινε με τη χρήση του Mann Whitney U unrelated test και για περισσότερες από δύο ομάδες, με one way analysis of variance (ANOVA), ενώ η εξακρίβωση τυχόν στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων έγινε με το Bonferroni's post-hoc test. Θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική κάθε διαφορά με $p < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS v12. Οι γραφικές παραστάσεις πραγματοποιήθηκαν με το γραφιστικό πακέτο Sigma Plot 2001.

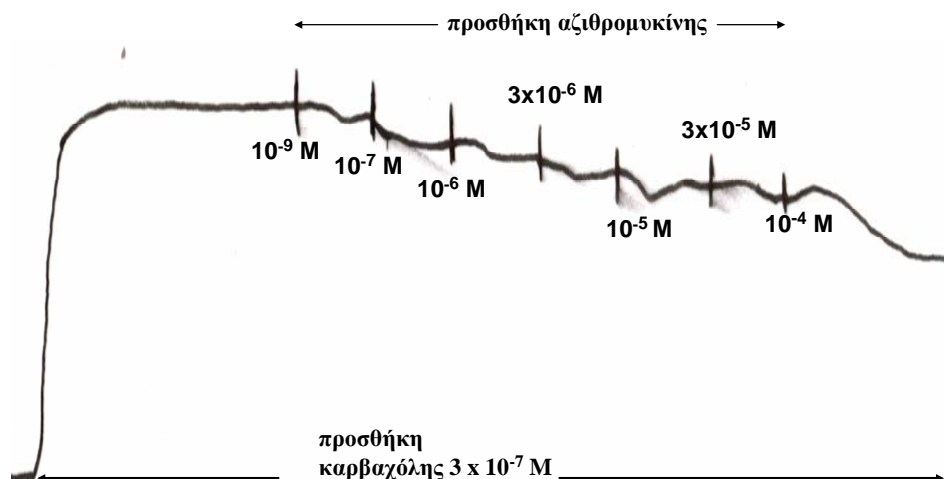
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Επίδραση αζιθρομυκίνης στον βασικό τόνο των ΛΜΙ

Από την εμφάνιση μη προσυσπασμένων ιστών σε διάλυμα αζιθρομυκίνης δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική δράση. Συνεπώς, η αζιθρομυκίνη δεν επηρεάζει το βασικό τόνο των ΛΜΙ (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

5.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ, με και χωρίς επιθήλιο, που βρίσκονται σε σύσπαση με 3×10^{-7} M καρβαχόλη.

Μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης στη σύσπαση ΛΜΙ, τόσο με επιθήλιο, όσο και μετά την αφαίρεση αυτού με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Μετά την περίοδο εξισορρόπησης, τα ιστοτεμάχια εμβαπτίζονται σε διάλυμα καρβαχόλης 3×10^{-7} M για 20 λεπτά περίπου, μέχρι να φτάσουν σε κατάσταση ισορροπίας. Στη συνέχεια, προστίθεται στα λουτρά διαπότισης αζιθρομυκίνη, αθροιστικά, σε συγκεντρώσεις 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} και 10^{-4} M. Ο ιστός παραμένει σε κάθε συγκέντρωση για 20 λεπτά (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Σύσπαση ιστοτεμαχίων τραχείας κουνελιού με διάλυμα καρβαχόλης 3×10^{-7} M και πρόσθκη αζιθρομυκίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις, με αθροιστικό τρόπο.

Η αζιθρομυκίνη προκάλεσε χάλαση των ΛΜΙ που βρίσκονταν σε σύσπαση με καρβαχόλη 3×10^{-7} M και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Πίνακας 5, Εικόνα 11). Η δράση αυτή της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ ήταν στατιστικά σημαντική από τη συγκέντρωση 10^{-6} M ($p < 0.05$, Πίνακας 5, Εικόνα 11). Έτσι, οι συγκεντρώσεις 10^{-6} M και 10^{-4} M, μείωσαν τον τόνο των ΛΜΙ στο 89.051 ± 3.380 % και 45.883 ± 9.440 %, αντίστοιχα, της αρχικής τάσης που αναπτύχθηκε παρουσία καρβαχόλης 3×10^{-7} M. την αρχική τιμή μετά τη σύσπαση με καρβαχόλη.

Πίνακας 5 Επίδραση αζιθρομυκίνης, σε συγκεντρώσεις από 10^{-9} M ως 10^{-4} M, σε ιστοτεμάχια τραχείας κουνελιού, με (Α) και χωρίς (Β) επιθήλιο, που βρίσκονται σε σύσπαση με 3×10^{-7} M καρβαχόλη. Οι τιμές εκφράζονται ως τάση του ιστού % της αρχικής σύσπασης.

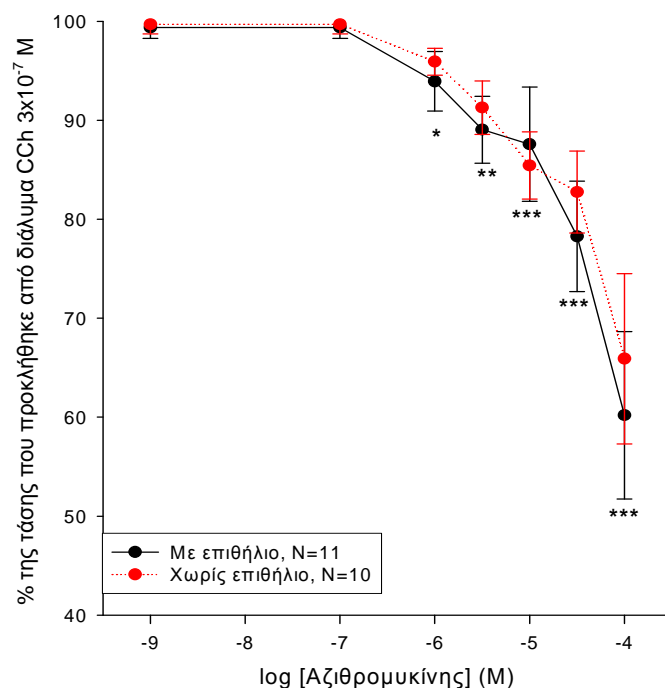
A. Ιστοί με επιθήλιο

	Συγκέντρωση αζιθρομυκίνης σε M						
	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}
means	99,378	93,931	89,051	87,578	78,271	60,199	45,883
strd error	1,092	3,014	3,380	5,776	5,581	8,453	9,444
N, αριθμός πειραματόζων	11						

B. Ιστοί χωρίς επιθήλιο

	Συγκέντρωση αζιθρομυκίνης σε M						
	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}
means	99,690	95,920	91,286	85,437	82,744	65,903	51,307
strd error	0,970	1,357	2,698	3,394	4,148	8,596	10,491
N, αριθμός πειραματόζων	10						

Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου δεν επηρεάζει τη δράση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη 3×10^{-7} M (Εικόνα 11). Στους ιστούς χωρίς επιθήλιο, η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) ελάττωσε τον τόνο των ΛΜΙ που βρίσκονταν σε σύσπαση με καρβαχόλη στο 51.307 ± 10.491 % της αρχικής σύσπασης (Εικόνα 11).

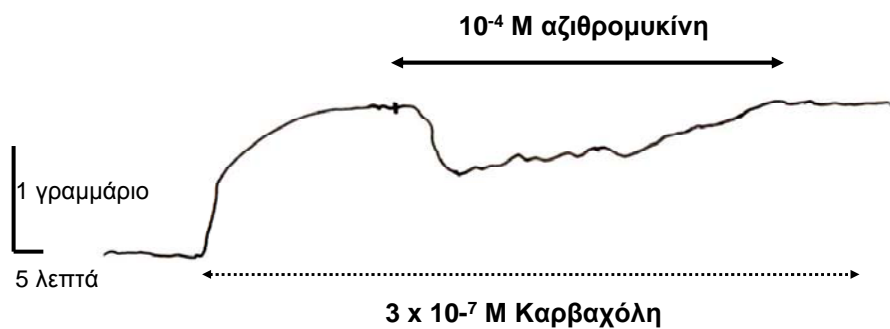


Εικόνα 11 Η δράση της αζιθρομυκίνης σε λείες μυϊκές ίνες με και χωρίς επιθήλιο, που είχαν συσπαστεί με καρβαχόλη 3×10^{-7} M. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζων που μελετήθηκαν. Στατιστικά σημαντική χάλαση παρουσία αζιθρομυκίνης με $p < 0.05$ (*), (**)= $p < 0.01$ και (***)= $p < 0.001$, Wilcoxon related samples test.

Η τιμή EC_{50} της αζιθρομυκίνης, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται το 50% της μέγιστης παρατηρούμενης δράσης της ουσίας, ήταν 3.5×10^{-5} M στους ιστούς με επιθήλιο και 2.79×10^{-5} M στους ιστούς χωρίς επιθήλιο, αντίστοιχα.

5.3 Η δράση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) συναρτήσει του χρόνου.

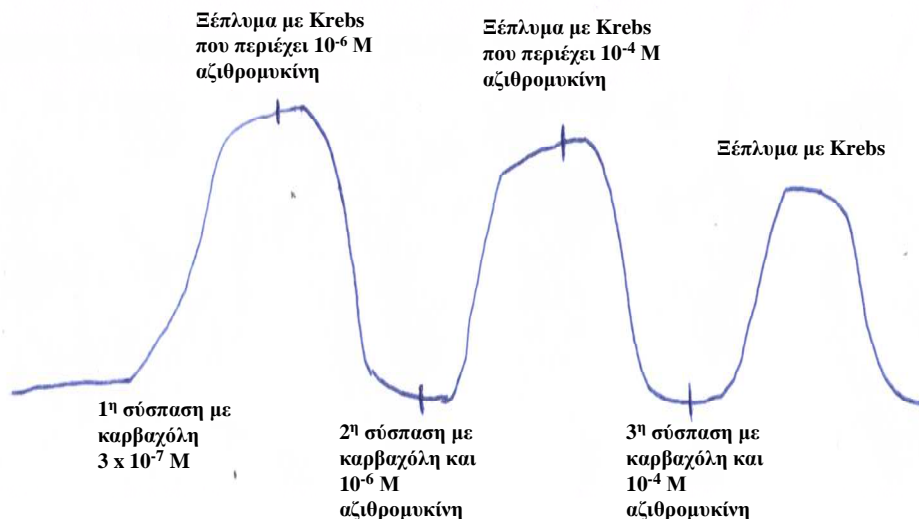
Η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών εντός των πρώτων 5 λεπτών μετά την προσθήκη της στο υγρό διαπότισης, ενώ το μέγιστο αποτέλεσμα παρατηρείται μετά από 20 λεπτά (Εικόνα 12). Στα περισσότερα πειράματα με συνεχή παρουσία αζιθρομυκίνης, η τάση του ιστού επέστρεψε στη βασική γραμμή, δηλαδή στην τάση που είχε αναπτύξει ο ιστός παρουσία μόνο καρβαχόλης. Αυτό το αποτέλεσμα παρατηρείται 60 με 70 λεπτά μετά την προσθήκη αζιθρομυκίνης, σε συγκέντρωση 10^{-4} M.



Εικόνα 12 Αντιπροσωπευτική καμπύλη καταγραφής, που δείχνει τη χάλαση που προκαλεί η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) σε ΛΜΙ που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη (3×10^{-7} M), σε χρονικό διάστημα 60 λεπτών.

5.4 Ρόλος της προεπώασης των ιστοτεμαχίων με αζιθρομυκίνη, στη σύσπαση των ΛΜΙ με 3×10^{-7} M καρβαχόλη.

Υπολογίστηκε η μέση δύναμη συστολής των μυϊκών ινών (εκφρασμένη ως % της αρχικής σύσπασης που προκάλεσε η προσθήκη 3×10^{-7} M καρβαχόλης) μετά από προεπώαση σε διάλυμα αζιθρομυκίνης, 10^{-6} M και 10^{-4} M (Εικόνα 13). Σε αυτά τα πειράματα, οι ιστοί μετά τη σύσπαση με καρβαχόλη ξεπλένονταν με διάλυμα Krebs, το οποίο περιείχε αζιθρομυκίνη 10^{-6} M και αργότερα 10^{-4} M. Ακολούθως, εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα καρβαχόλης με αζιθρομυκίνη, στη συγκέντρωση που προηγουμένως είχε γίνει το ξέπλυμα.



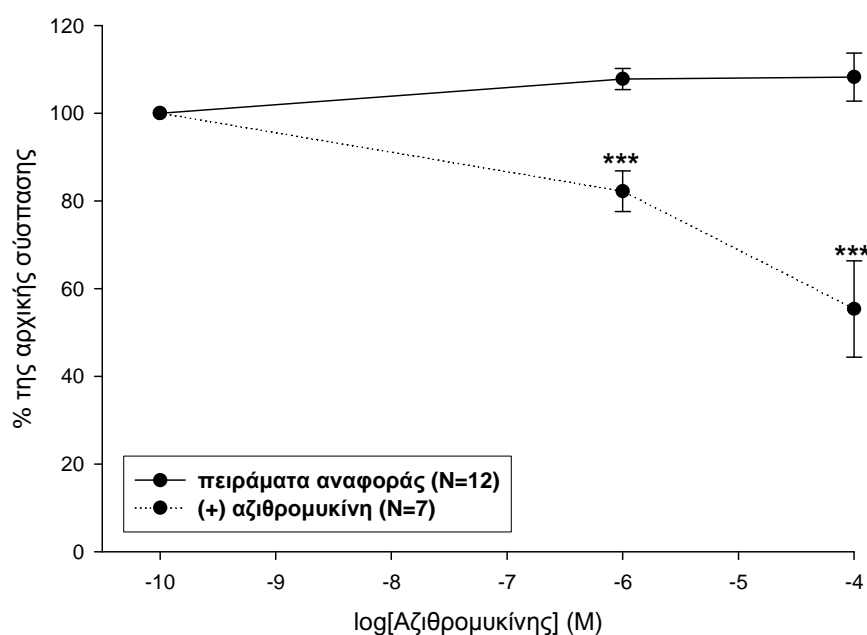
Εικόνα 13 Σχηματική παρουσίαση της αλληλουχίας των βημάτων στο πρωτόκολλο, όπου οι ιστοί εκτίθενται στη συσπαστική ουσία (3×10^{-7} M καρβαχόλη), παρουσία αζιθρομυκίνης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10^{-6} και 10^{-4} M).

Απουσία αζιθρομυκίνης, το ύψος της επαγόμενης από την καρβαχόλη σύσπασης δεν μεταβάλλεται σε τρεις διαδοχικές συσπάσεις. Η προεπώαση των παρασκευασμάτων με 10^{-6} M αζιθρομυκίνη ελάττωσε την επαγόμενη από την καρβαχόλη σύσπαση στο $82.2 \pm 4.6\%$ της αρχικής (απουσίας του φαρμάκου) σύσπασης ($p < 0.01$, Πίνακας 6 και Εικόνα 14) και με 10^{-4} M αζιθρομυκίνη στο $55.3 \pm 10.9\%$ ($p < 0.001$, Πίνακας 6 και Εικόνα 14).

Πίνακας 6 Η επίδραση της προεπάσης του ιστού με αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) στη σύσπαση με καρβαχόλη (3×10^{-7} M) σε φυσιολογικό διάλυμα Krebs.

τάση % της αρχικής σύσπασης			
Διάλυμα	1 ^η σύσπαση	2 ^η σύσπαση	3 ^η σύσπαση
Πειράματα αναφοράς, μόνο καρβαχόλη 3×10^{-7} M	100 ± 0	$107 \pm 2,4$	$108 \pm 5,5$
Αζιθρομυκίνη 10^{-6} M	100 ± 0	$82,2 \pm 4,6$ §§	-
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	-	$55,3 \pm 10,9$ §§§

§§ $\rho < 0,01$ και §§§ $\rho < 0,001$ σε σύγκριση με την πρώτη σύσπαση του εκάστοτε διαλύματος, Wilcoxon related samples test



Εικόνα 14 Η αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) όταν προστεθεί στο λουτρό διαπότισης πριν την εφαρμογή διαλύματος καρβαχόλης (3×10^{-7} M), έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μικρότερης σύσπασης των ΛΜΙ, σε σχέση με τη σύσπαση απουσίας του φαρμάκου (πειράματα αναφοράς).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρατηρούμενη σύσπαση παρουσία αζιθρομυκίνης με $\rho < 0.001$ (***) , Mann Whitney U unrelated sample test.

Συνεπώς, η δράση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ των αεραγωγών ήταν ανεξάρτητη από τον τρόπο που προστέθηκε το φάρμακο. Δηλαδή, η επίδρασή της ήταν παρόμοια σε παρασκευάσματα όπου η αζιθρομυκίνη προστέθηκε μετά την σύσπαση των ΛΜΙ με 3×10^{-7} M καρβαχόλη (Εικόνα 11), με εκείνη όπου η αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) χορηγήθηκε πριν την προσθήκη της καρβαχόλης στο υγρό διαπύκνωσης (Εικόνα 14).

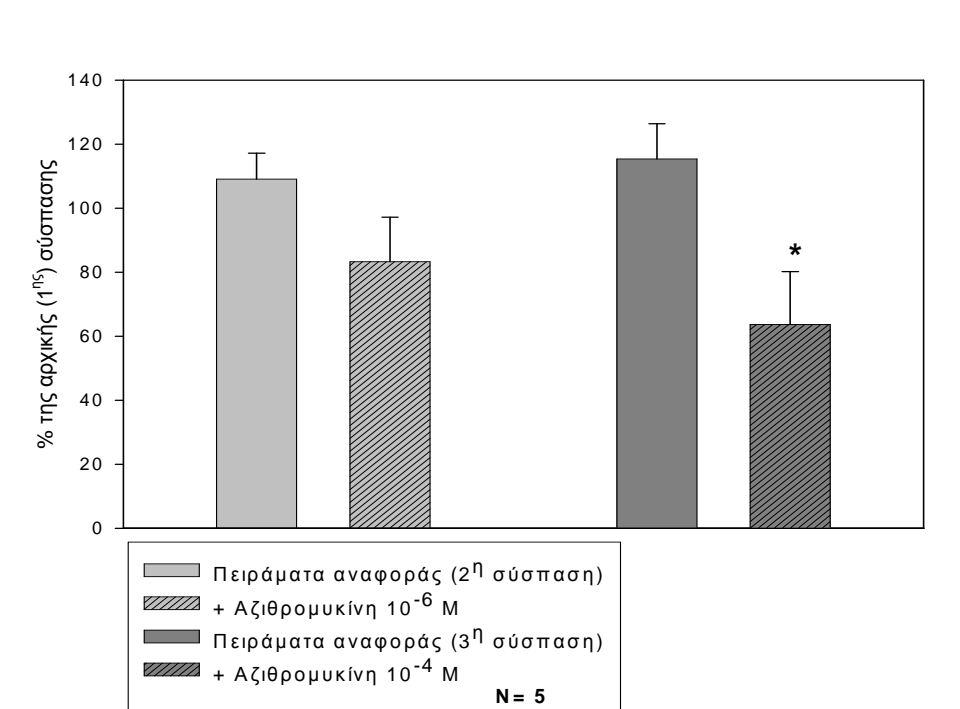
5.5 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μέγιστη σύσπαση των ΛΜΙ με καρβαχόλη.

Η μέγιστη παρατηρούμενη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού παρατηρείται με συγκέντρωση καρβαχόλης 10^{-5} M (Εικόνα 9). Η αζιθρομυκίνη ελάττωσε τη μέγιστη, παρατηρούμενη με καρβαχόλη σύσπαση (Πίνακας 7 και Εικόνα 15). Έτσι, παρουσία 10^{-4} M αζιθρομυκίνης, οι επαγόμενες από 10^{-5} M καρβαχόλη συσπάσεις μειώθηκαν στο $63,7 \pm 16,5\%$ της αρχικής σύσπασης ($p < 0,05$, Πίνακας 7).

Πίνακας 7 Η επίδραση της προεπάσης του ιστού με αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) στη μέγιστη προκαλούμενη σύσπαση με καρβαχόλη (10^{-5} M).

Διάλυμα	τάση % της αρχικής σύσπασης		
	1 ^η σύσπαση	2 ^η σύσπαση	3 ^η σύσπαση
Πειράματα αναφοράς, μόνο καρβαχόλη 10^{-5} M	100 ± 0	$109,1 \pm 8,0$	$114,3 \pm 11,0$
Αζιθρομυκίνη 10^{-6} M	100 ± 0	$83,2 \pm 13,9$	-
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	-	$63,7 \pm 16,5$ §

§ $p < 0,05$ σε σύγκριση με την πρώτη σύσπαση, Mann Whitney U unrelated sample test.



Εικόνα 15 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη σύσπαση ΛΜΙ με καρβαχόλη 10⁻⁵ M. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ±SEM από 5 πειράματα. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν. Στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύσπαση των ΛΜΙ παρουσία και απουσία (πείραμα αναφοράς) 10⁻⁴ M αζιθρομυκίνης με $p < 0.05$, ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

5.6 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛΜΙ , που βρίσκονται σε σύσπαση με διάλυμα 80 mM KCl.

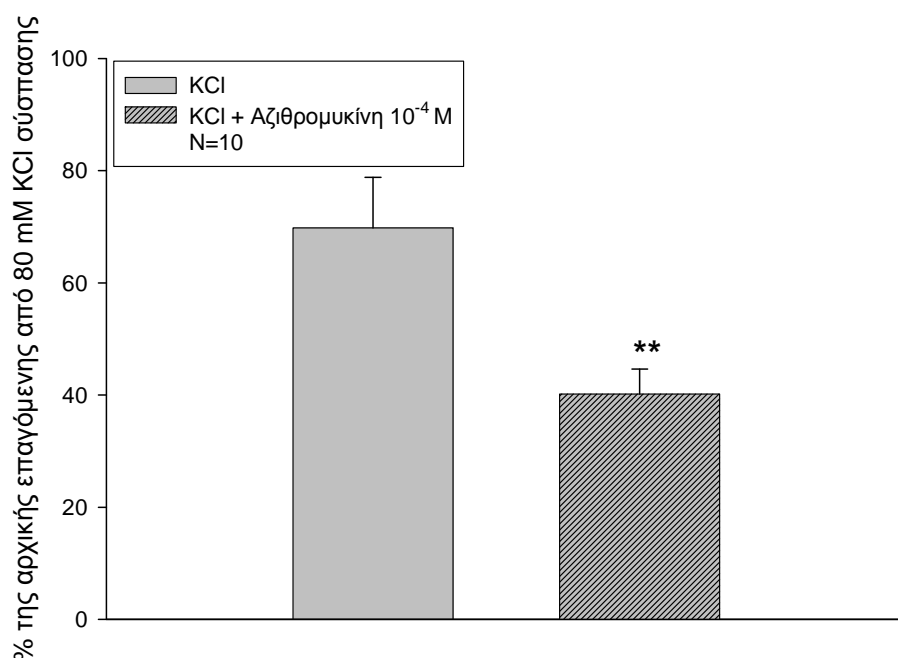
Μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης στη σύσπαση των ΛΜΙ με διάλυμα 80 mM KCl. Μετά την αρχική πρόκληση σύσπασης με KCl, το λουτρό διαπότισης εμπλουτιζόταν με διάλυμα αζιθρομυκίνης 10⁻⁴ M και λαμβανόταν μέτρηση της τάσης των ιστών σε 20 λεπτά. Τα πειράματα αναφοράς δεν περιλάμβαναν αζιθρομυκίνη. Οι ιστοί που παρέμειναν σε διάλυμα 80 mM KCl, με την πάροδο του χρόνου, παρουσίασαν μείωση της αρχικής τους τάσης. Όμως, η προσθήκη αζιθρομυκίνης (10⁻⁴ M) προκάλεσε στον ίδιο χρόνο περαιτέρω χάλαση, που ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς. Παρουσία αζιθρομυκίνης, η παρατηρούμενη τάση μειώθηκε στο 40.19±4.43% της αρχικής σύσπασης, ενώ απουσία της στο 69.79±8.97% ($p < 0.01$, Πίνακας 8 και Εικόνα 16).

Πίνακας 8 Επίδραση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ιστοτεμάχια που βρίσκονται σε σύσπαση με 80 mM KCl

τάση % της αρχικής σύσπασης		
Διάλυμα	αρχική σύσπαση	Μετά από 20 λεπτά
Πειράματα αναφοράς, μόνο διάλυμα 80 mM KCl	100 ± 0	$69,79 \pm 8,97$ ***
Προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M	100 ± 0	$40,19 \pm 4,43$ *** §§

*** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την αρχική σύσπαση, Wilcoxon related samples test

§§ $p < 0,01$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, απουσία αζιθρομυκίνης, Mann Whitney U unrelated sample test.



Εικόνα 16 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ιστοτεμάχια που έχουν συσπαστεί με 80mM KCl.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στη συσταλτική αντίδραση παρουσία και απουσία (πείραμα αναφοράς) αζιθρομυκίνης με $p < 0.01$ (**), Mann Whitney U unrelated sample test.

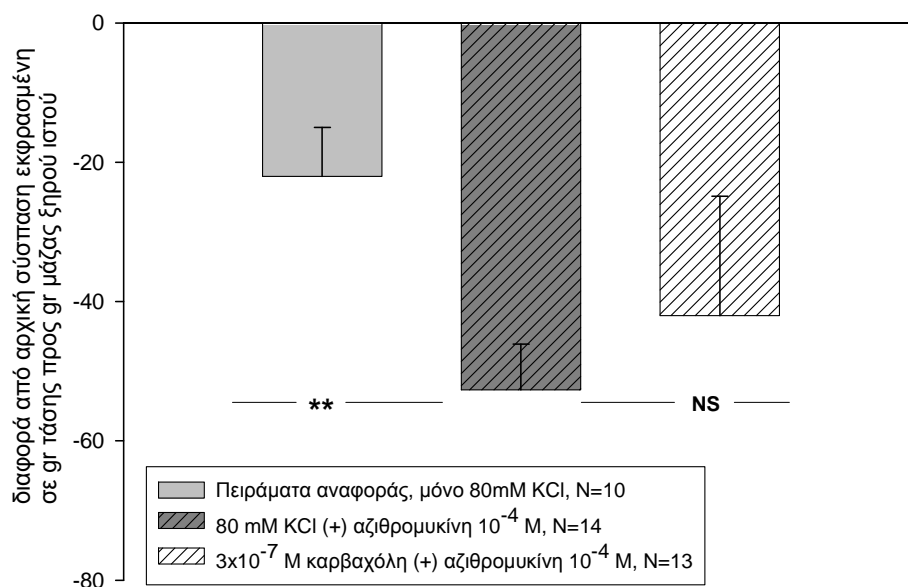
5.6.1 Σύγκριση της επίδρασης της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ΛΜΙ , που έχουν προσυσπαστεί με καρβαχόλη (3×10^{-7} M) και KCl (80 mM).

Συγκρίθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ιστούς που είχαν συσπαστεί με καρβαχόλη (3×10^{-7} M) και KCl (80 mM), ώστε να εξακριβωθεί αν η επιλογή της συσπαστικής ουσίας διαφοροποιεί το τελικό αποτέλεσμα της αζιθρομυκίνης.

Πίνακας 9 Σύγκριση επίδρασης της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ΛΜΙ συσπασμένες με KCl και καρβαχόλη. Οι τιμές εκφράζονται σε gr τάσης προς gr μάζας ξηρού ιστού. Το N είναι ο αριθμός των πειραματόζων που μελετήθηκαν.

	Διαφορά από αρχική σύσπασση, εκφρασμένη σε gr τάσης προς gr μάζας ξηρού ιστού		
	μόνο 80mM KCl	80mM KCl και 10^{-4} M αζιθρομυκίνη	3×10^{-7} M καρβαχόλη και 10^{-4} M αζιθρομυκίνη
means	-22,018	-52,690	-42,040
strd error	7,010	7,433	9,789
N	10	14	13

Το μέγεθος της επαγόμενης από την αζιθρομυκίνη χάλασης ήταν στατιστικά παρόμοιο στις ΛΜΙ που είχαν συσπαστεί με KCl [52.7 ± 7.4 gr/gr (N=14)] και καρβαχόλη [42.0 ± 9.8 gr/gr (N=13)], όπως φαίνεται στον Πίνακα 9 και στην Εικόνα 17. Οι ιστοί που είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα 80 mM KCl και δεν εκτέθηκαν σε αζιθρομυκίνη, παρουσίασαν μείωση της αρχικής τους τάσης με την πάροδο του χρόνου. Η προσθήκη αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) προκάλεσε, στον ίδιο χρόνο, περαιτέρω, στατιστικά σημαντική χάλαση (Πίνακας 8 και 9)



Εικόνα 17 Σύγκριση επίδρασης της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ιστούς που είχαν προσυσπαστεί με καρβαχόλη (3×10^{-7} M) ή 80mM KCl, εκφρασμένη σε gr τάσης προς gr μάζας ξηρού ιστού.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

(**) $p < 0.01$ μεταξύ πειραμάτων αναφοράς (KCl χωρίς αζιθρομυκίνη) και πειραμάτων με KCl και προσθήκη αζιθρομυκίνης. NS, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ καρβαχόλης- KCl, ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

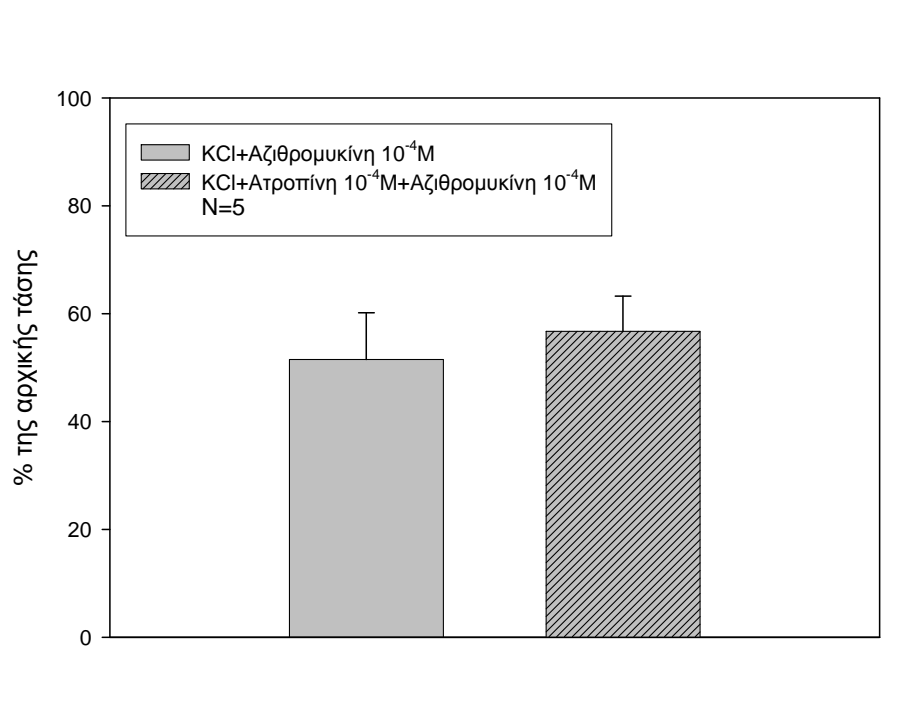
5.6.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στις ΛMI, που βρίσκονται σε σύσπασση με διάλυμα 80 mM KCl παρουσία ατροπίνης.

Παρουσία διαλύματος KCl οι λείες μυϊκές ίνες συσπώνται για δύο λόγους. Αφενός, η είσοδος ιόντων K^+ προσυναπτικά οδηγεί σε απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τη νευρική απόληξη και αφετέρου, μετασυναπτικά προκαλείται αύξηση της εισόδου ιόντων Ca^{+2} , πυροδοτώντας τη σύσπασση της μυϊκής ίνας. Τα γάγγλια του παρασυμπαθητικού βρίσκονται πολύ κοντά στο λείο μυϊκό κύτταρο. Για αυτό το λόγο, όλα τα παρασκευάσματα ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνουν ολόκληρες τις μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού. Η ατροπίνη είναι ο ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων. Παρουσία ατροπίνης στο υγρό διαπότισης, παρεμποδίζεται η δράση της ακετυλοχολίνης που απελευθερώνεται από τις μεταγαγγλιακές ίνες του παρασυμπαθητικού.

Πίνακας 10 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε ιστούς που είχαν συσπαστεί με KCl 80mM, απουσία (πειράματα αναφοράς) και παρουσία ατροπίνης (10^{-4} M).

	% αρχικής σύσπασης με 80mM KCl	
	80mM KCl + αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	KCl + αζιθρομυκίνη 10^{-4} M + ατροπίνη 10^{-4} M
means	51,528	56,762
strd error	8,623	6,535

Στη βιβλιογραφία (159, 163), για τη μελέτη της προσυναπτικής αναστολής ή διέγερσης έχει χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση ατροπίνης 10^{-4} M. Παρουσία ατροπίνης (10^{-4} M), η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) προκάλεσε ελάττωση της τάσης στο $56.8 \pm 6.5\%$ της αρχικής σύσπασης ($p < 0.001$), ενώ απουσία ατροπίνης η αντίστοιχη ελάττωση έφτασε στο $51.5 \pm 8.6\%$ ($P < 0.001$, Πίνακας 10). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίδραση της αζιθρομυκίνης παρουσία και απουσία ατροπίνης (Πίνακας 10 και Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Ρόλος της ατροπίνης στη δράση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M), σε ιστοτεμάχια που έχουν συσπαστεί με 80mM KCl.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη χάλαση που προκαλεί η αζιθρομυκίνη παρουσία και απουσία ατροπίνης, Mann Whitney U unrelated sample test.

5.7 Ο ρόλος της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

5.7.1 Επίδραση αζιθρομυκίνης σε ΛΜΙ, απουσία εξωκυττάριας Ca^{2+} .

Διερευνήσαμε το ενδεχόμενο η αζιθρομυκίνη να επηρεάζει το ρεύμα εισόδου Ca^{2+} στο λείο μυϊκό κύτταρο, με την εκτέλεση πειραμάτων σε διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} . Τα πειράματα βασίστηκαν στο πρωτόκολλο που απεικονίζεται στην Εικόνα 13.

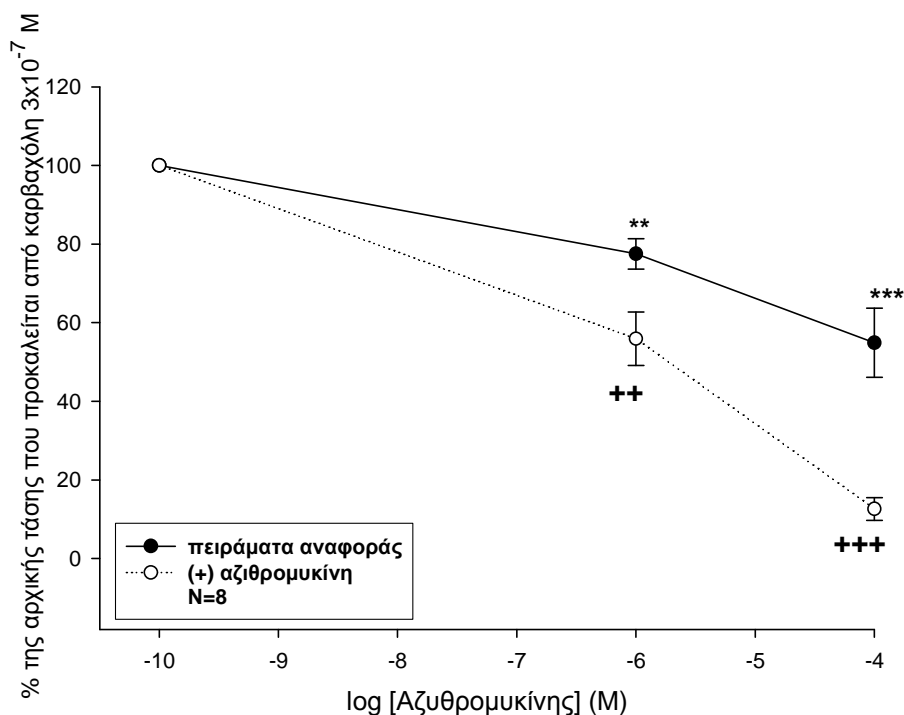
Πίνακας 11 Επίδραση της αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) στη σύσπαση των ΛΜΙ με καρβαχόλη (3×10^{-7} M), απουσία Ca^{2+} στο διάλυμα διαπότισης.

τάση % της αρχικής σύσπασης			
Διάλυμα	1 ^η σύσπαση	2 ^η σύσπαση	3 ^η σύσπαση
Πειράματα αναφοράς, μόνο διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+}	100 ± 0	77,51 ± 3,87 *	54,87 ± 8,78 ***
Διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} μαζί με αζιθρομυκίνη 10^{-6} M	100 ± 0	55,9 ± 6,82 *** §§	-
Διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} μαζί με αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	-	12,61 ± 2,9*** §§§

* $\rho < 0,05$ και *** $\rho < 0,001$ σε σύγκριση με την πρώτη σύσπαση, Wilcoxon related samples test

§§ $\rho < 0,01$ και §§§ $\rho < 0,001$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, απουσία αζιθρομυκίνης, Mann Whitney U unrelated sample test.

Στο διάλυμα χωρίς Ca^{2+} , η επαγόμενη από καρβαχόλη (3×10^{-7} M) τάση των ΛΜΙ μειώθηκε στο $77.5 \pm 3.9\%$ και $54.9 \pm 8.7\%$ της αρχικής σύσπασης στη δεύτερη και τρίτη σύσπαση, αντιστοίχως ($\rho < 0.05$ και < 0.001 , για τη δεύτερη και τρίτη σύσπαση αντιστοίχως, Πίνακας 11). Η αζιθρομυκίνη μείωσε ακόμα περισσότερο αυτήν την τάση. Οι επαγόμενες από την καρβαχόλη συσπάσεις μειώθηκαν στο $55.9 \pm 6.8\%$ και $12.6 \pm 2.9\%$ της αρχικής σύσπασης, με την προσθήκη 10^{-6} M και 10^{-4} M αζιθρομυκίνης, αντιστοίχως ($\rho < 0.01$ και $\rho < 0.001$ αντιστοίχως, Πίνακας 11 και Εικόνα 19). Η ελάττωση της τάσης των ιστών ήταν στατιστικά σημαντική στα πειράματα με αζιθρομυκίνη σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς ($\rho < 0,01$ και $\rho < 0,001$ στις συγκεντρώσεις 10^{-6} M και 10^{-4} M, αντιστοίχως).



Εικόνα 19 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4}) στη σύσπαση των ΛΜΙ με καρβαχόλη (3×10^{-7} M), σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

Οι προκαλούμενες από καρβαχόλη συσπάσεις ($2^{\text{η}}$ και $3^{\text{η}}$), απουσία εξωκυττάριου ασβεστίου, είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες από την αρχική σύσπαση, $p < 0.01$ (**)

και $p < 0.001$ (***), αντίστοιχα, Wilcoxon related samples test. Στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρατηρούμενη σύσπαση παρουσία αζιθρομυκίνης (10^{-6} M όσο και 10^{-4}) σε σχέση με τις αντιστοίχου χρόνου συσπάσεις των πειραμάτων αναφοράς, $p < 0.01$ (++) και $p < 0,001$ (+++), Mann Whitney U unrelated sample test.

5.7.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΙ, παρουσία βεραπαμίλης.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακολουθώντας το προηγούμενο πρωτόκολλο, σε διάλυμα Krebs με φυσιολογικό ασβέστιο κι εξαρχής παρουσία βεραπαμίλης (10^{-6} M). Η βεραπαμίλη είναι ανταγωνιστής των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} , ο ρόλος των οποίων, τα τελευταία χρόνια, αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία στη μελέτη της συστολής των λείων μυϊκών ινών. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση των β -αναστολέων είναι εκείνη των 10^{-6} M (159).

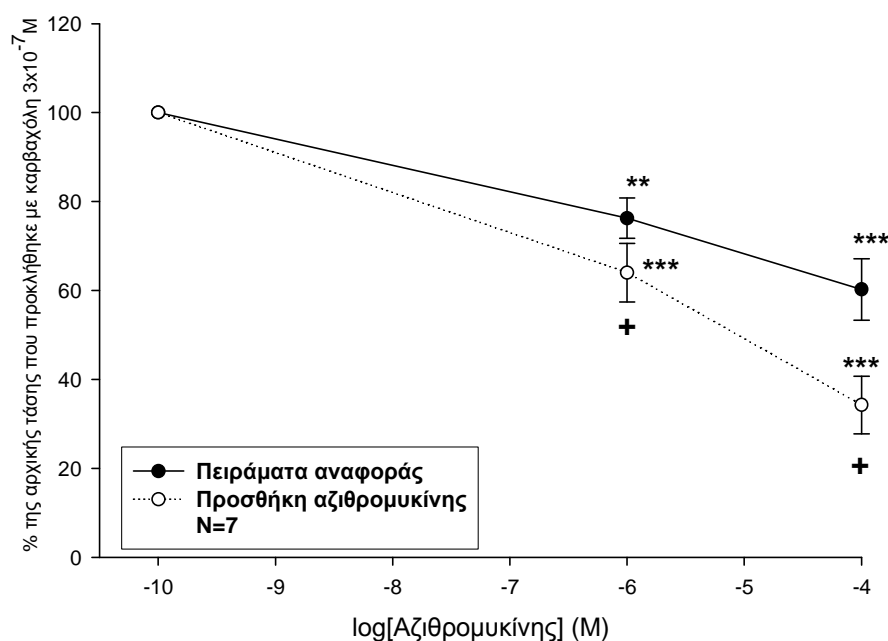
Πίνακας 12 Επίδραση της αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) στη σύσπαση από καρβαχόλη (3×10^{-7} M), παρουσία βεραπαμίλης (10^{-6} M) στο υγρό διαπύκνωσης των ιστοτεμαχίων

τάση % της αρχικής σύσπασης			
Διάλυμα	1 ^η σύσπαση	2 ^η σύσπαση	3 ^η σύσπαση
Πειράματα αναφοράς, μόνο βεραπαμίλη 10^{-6} M	100 ± 0	$76,28 \pm 4,55$ **	$60,23 \pm 6,90$ ***
Βεραπαμίλη 10^{-6} M και αζιθρομυκίνη 10^{-6} M	100 ± 0	$64,02 \pm 6,58$ *** §	-
Βεραπαμίλη 10^{-6} M και αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	-	$34,25 \pm 6,46$ *** §

** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την πρώτη σύσπαση, Wilcoxon related samples test

§ $p < 0,05$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, απουσία αζιθρομυκίνης, Mann Whitney U unrelated sample test.

Όπως και στο διάλυμα χωρίς Ca^{2+} , έτσι και η παρουσία βεραπαμίλης στο εξωκυττάριο υγρό προκάλεσε μείωση των επαγομένων από την καρβαχόλη συσπάσεων. Η τάση των ιστών στη δεύτερη και τρίτη σύσπαση μειώθηκε στο $76.2 \pm 4.55\%$ ($p < 0,01$) και στο $64.02 \pm 6.58\%$ ($p < 0,001$) της πρώτης σύσπασης, αντίστοιχα (Πίνακας 12, Εικόνα 20). Η προεπώση των ιστοτεμαχίων με αζιθρομυκίνη, 10^{-6} M και 10^{-4} M, ελάττωσε ακόμα περισσότερο την παρατηρούμενη σύσπαση στην καρβαχόλη, στο $60.23 \pm 6.9\%$ και $34.25 \pm 6.46\%$ της αρχικής (απουσία αζιθρομυκίνης) σύσπασης, αντιστοίχως (Πίνακας 12, Εικόνα 20). Παρουσία αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) η ελάττωση της τάσης των ιστών ήταν στατιστικά σημαντικότερη, σε σύγκριση με τα πειράματα που περιείχαν μόνο βεραπαμίλη και όχι αζιθρομυκίνη στο υγρό διαπύκνωσης ($p < 0,05$, Πίνακας 12, Εικόνα 20).



Εικόνα 20 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) στη σύσπαση των ΛΜΙ με καρβαχόλη 3×10^{-7} M, παρουσία βεραπαμίλης.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζων που μελετήθηκαν.

Παρουσία βεραπαμίλης και απουσία αζιθρομυκίνης, οι προκαλούμενες από καρβαχόλη (3×10^{-7} M) συσπάσεις ($2^{\text{η}}$ και $3^{\text{η}}$), είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες από την πρώτη σύσπαση, $p < 0.01$ (**), $p < 0,001$ (***), Wilcoxon related samples test

Η σύσπαση των ιστών που είχαν προεπωαστεί με αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) ήταν μικρότερη, σε σχέση με την αρχική σύσπαση απουσίας αζιθρομυκίνης, $p < 0.001$ (***), Wilcoxon related samples test

Στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρατηρούμενη σύσπαση παρουσία αζιθρομυκίνης (10^{-6} M όσο και 10^{-4} M) σε σχέση με τις αντιστοίχου χρόνου συσπάσεις των πειραμάτων αναφοράς, $p < 0.05$ (+), Mann Whitney U unrelated sample test.

5.8 Ρόλος της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης, μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε προσυσυσπασμένους με καρβαχόλη 3×10^{-7} M ιστούς, απουσία και παρουσία του αναστολέα της ΑΤΡάσης, ουαμπαΐνης, σε συγκεντρώσεις 10^{-7} M και 10^{-5} M. Στα πειράματα με ουαμπαΐνη οι ιστοί επωάζονταν για 20 λεπτά στο εκάστοτε διάλυμα ουαμπαΐνης, πριν την προσθήκη αζιθρομυκίνης. Σε μερικά πειράματα, η ουαμπαΐνη εμφάνισε διφασική επίδραση στον τόνο των ΛΜΙ, όπου μια αρχική αύξηση του τόνου ακολουθήθηκε από μια παροδική μείωση, ώσπου τελικά να σταθεροποιηθεί ο τόνος σε μια κατάσταση ηρεμίας. Συνεπώς, στα παρασκευάσματα που προεπώστηκαν με ουαμπαΐνη, η αζιθρομυκίνη χορηγούταν μόλις η τάση του ιστού έφτανε σε κατάσταση ισορροπίας (περίπου μετά από 20 λεπτά).

Πίνακας 13 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) στη σύσπαση των ΛΜΙ με διάλυμα 3×10^{-7} M καρβαχόλης, παρουσία ουαμπαΐνης (10^{-7} M και 10^{-5} M)

τάση % της αρχικής σύσπασης		
Διάλυμα	αρχική σύσπαση	20 λεπτά μετά την προσθήκη αζιθρομυκίνης
Πειράματα αναφοράς, αζιθρομυκίνη 10^{-4} M χωρίς ουαμπαΐνη	100 ± 0	$57,95 \pm 5,61$ ***
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M και ουαμπαΐνη 10^{-7} M	100 ± 0	$53,62 \pm 4,63$ *** NS
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M και ουαμπαΐνη 10^{-5} M	100 ± 0	$71,70 \pm 3,94$ ** NS

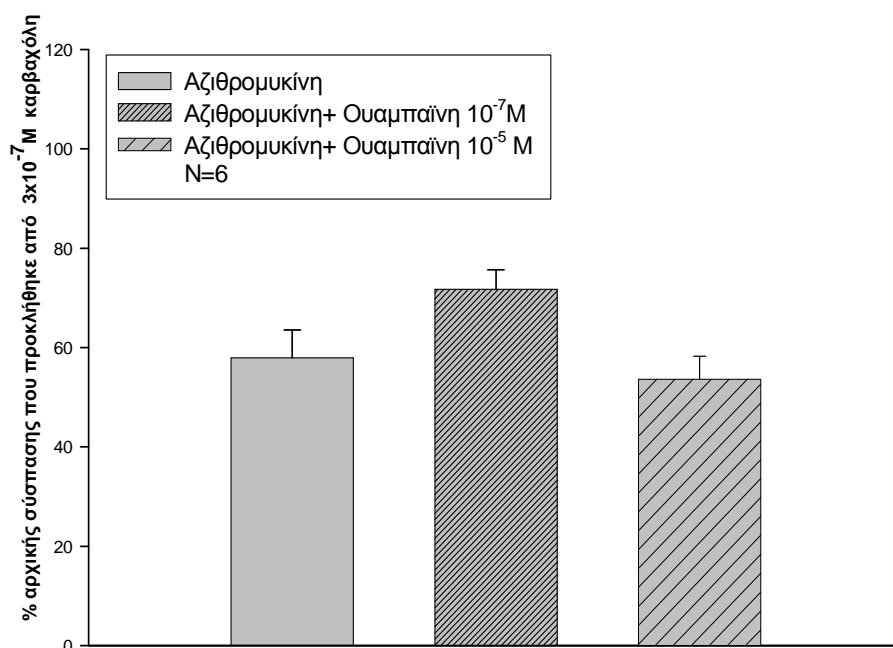
** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την αρχική σύσπαση, Wilcoxon related samples test

NS: καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, απουσία ουαμπαΐνης, Mann Whitney U unrelated sample test.

Η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) προκάλεσε ελάττωση της αρχικής σύσπασης με καρβαχόλη (3×10^{-7} M):

- α) στο $58.0 \pm 5.6\%$ σε διάλυμα χωρίς ουαμπαΐνη,
- β) στο $53.6 \pm 4.6\%$ σε διάλυμα με 10^{-7} M ουαμπαΐνη και
- γ) στο $71.7 \pm 4.0\%$ σε διάλυμα με 10^{-5} M ουαμπαΐνη.

Η προσθήκη ουαμπαΐνης (10^{-7} M και 10^{-5} M) στο υγρό διαπότισης δεν επηρέασε την επίδραση της αζιθρομυκίνης (Πίνακας 13 και Εικόνα 21).



Εικόνα 21 Δράση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M), παρουσία του αναστολέα της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPάσης, ουαμπαΐνης (10^{-7} M και 10^{-5} M), σε ιστοτεμάχια που είχαν συσπαστεί με 3×10^{-7} M καρβαχόλη.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζων που μελετήθηκαν.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στη δράση της αζιθρομυκίνης μεταξύ πειραμάτων αναφοράς (χωρίς ουαμπαΐνη) και πειραμάτων με ουαμπαΐνη, ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

5.9 Ο ρόλος της Ca^{2+} -ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

Ακολουθως, μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της αζιθρομυκίνης στην απελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρουσία του αναστολέα της Ca^{2+} -ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου

κυκλοπιαζονικού οξέος, CPA (10^{-6} M). Έχει δειχθεί ότι το CPA σε συγκέντρωση 10^{-6} περιορίζει σημαντικά τη δραστηριότητα της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης (52).

Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων, όπου η αρχική σύσπαση προκαλούταν είτε με διάλυμα καρβαχόλης (3×10^{-7} M), είτε με διάλυμα KCl (80mM). Οι ιστοί προεπώζονταν για 20 λεπτά σε διάλυμα CPA (10^{-6} M) πριν την προσθήκη αζιθρομυκίνης. Μετρήθηκε η τάση των ιστών 20 λεπτά μετά την προσθήκη αζιθρομυκίνης. Στα πειράματα αναφοράς, μελετήθηκε: α) η επίδραση της αζιθρομυκίνης απουσία CPA, οπότε μετρήθηκε η τάση του ιστού 20 λεπτά μετά την προσθήκη αζιθρομυκίνης κι εκφράστηκε ως % της τάσης πριν την προσθήκη του φαρμάκου και β) η επίδραση του CPA από μόνο του, οπότε μετρήθηκε η τάση του ιστού 40 λεπτά μετά την προσθήκη διαλύματος CPA 10^{-6} M κι εκφράστηκε ως % της αρχικής τάσης ισορροπίας μετά την προσθήκη του διαλύματος που προκάλεσε την σύσπαση.

Πίνακας 14 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) στη σύσπαση ΛΜΙ με διάλυμα KCl 80mM (Α) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλης (Β), παρουσία και απουσία κυκλοπιαζονικού οξέος (CPA, 10^{-6} M).

Α. τάση % της αρχικής σύσπασης με 80mM KCl		
Διάλυμα	αρχική τάση	μετρούμενη τάση ιστού
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M για 20 λεπτά	100 ± 0	$50,49 \pm 12,40$ ***
CPA 10^{-6} M για 40 λεπτά, χωρίς αζιθρομυκίνη	100 ± 0	$79,33 \pm 1,13$ **
CPA 10^{-6} M για 20 λεπτά και προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M για άλλα 20 λεπτά	100 ± 0	$44,12 \pm 11,22$ *** § NS
Β. τάση % της αρχικής σύσπασης με 3×10^{-7} M καρβαχόλη		
Διάλυμα	αρχική τάση	μετρούμενη τάση ιστού
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M για 20 λεπτά	100 ± 0	$52,56 \pm 8,90$ ***
CPA 10^{-6} M για 40 λεπτά, χωρίς αζιθρομυκίνη	100 ± 0	$76,12 \pm 4,81$ **
CPA 10^{-6} M για 20 λεπτά και προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M για άλλα 20 λεπτά	100 ± 0	$49,11 \pm 10,34$ *** § NS

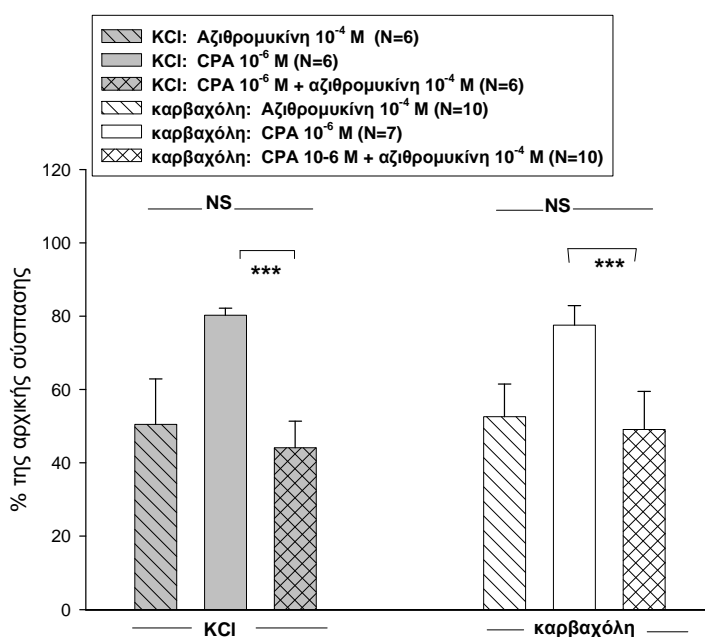
** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την αρχική σύσπαση, Wilcoxon related samples test

§ $p < 0,05$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα με CPA χωρίς αζιθρομυκίνη, Mann Whitney U unrelated sample test.

NS: καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, με αζιθρομυκίνη απουσία CPA, Mann Whitney U unrelated sample test.

Το CPA από μόνο του (ΛΜΙ που συσπάστηκαν με 80mM KCl ή 3×10^{-7} M καρβαχόλη και προστέθηκε CPA) προκάλεσε βαθμιαία χάλαση. Έτσι, μετά από 40 λεπτά, η τάση των ιστών σε διάλυμα KCl και καρβαχόλης έφτασε στο $79.3 \pm 1.1\%$ και $76.1 \pm 4.8\%$ της αρχικά παρατηρούμενης σύσπασης, αντίστοιχα ($p < 0.01$, Πίνακας 14 και Εικόνα 22). Σε παρασκευάσματα που είχαν επωαστεί με CPA για 20 λεπτά, η προσθήκη αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) προκαλεί περαιτέρω, στατιστικά σημαντικότερη χάλαση των προσυσπαμένων με KCl ιστών στο $44.1 \pm 11.2\%$ και των προσυσπασμένων με καρβαχόλη ιστών στο $49.1 \pm 10.3\%$ της αρχικής σύσπασης ($p < 0.001$, Πίνακας 14 και Εικόνα 22).

Σε ιστούς που δεν χρησιμοποιήθηκε CPA, η αζιθρομυκίνη ελάττωσε την αρχικά παρατηρούμενη σύσπαση από καρβαχόλη και KCl, στο $50.5 \pm 12.4\%$ και $52.6 \pm 8.9\%$ της τάσης αναφοράς, αντίστοιχα (Πίνακας 14). Συμπερασματικά, η χάλαση των ΛΜΙ που προκαλεί η αζιθρομυκίνη είναι παρόμοια παρουσία και απουσία CPA (Εικόνα 22).



Εικόνα 22 Η χάλαση των ΛΜΙ που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl (80mM) ή καρβαχόλη (3×10^{-7} M) παρουσία αζιθρομυκίνης δεν μεταβάλλεται (NS) από την παρουσία του αναστολέα της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης, κυκλοπιαζονικό οξύ.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραμάτων σε διαφορετικά ζώα.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στον τόνο των ΛΜΙ παρουσία και απουσία αζιθρομυκίνης με $p < 0.001$ (***), ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

5.10 Ο ρόλος της Rho-κινάσης στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

Η μελέτη της πιθανής εμπλοκής της Rho-κινάσης στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης περιέλαβε πειράματα με τον αναστολέα της Rho-κινάσης, [(R)-(+)-*trans*-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδροχλωρίδο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδης] (Y-27632) σε συγκέντρωση 10^{-6} M. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων, όπου η αρχική σύσπαση προκαλούταν είτε με διάλυμα καρβαχόλης (3×10^{-7} M), είτε με διάλυμα KCl (80mM). Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο όπως και με το CPA.

Πίνακας 15 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) στη σύσπαση ΛΜΙ με διάλυμα KCl 80mM (A) ή 3×10^{-7} M καρβαχόλης (B), παρουσία και απουσία Y-27632 (10^{-6} M).

A. τάση % της αρχικής σύσπασης με 80mM KCl		
Διάλυμα	αρχική τάση	μετρούμενη τάση ιστού
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M για 20 λεπτά	100 ± 0	$51,48 \pm 6,86$ ***
Y-27632 10^{-6} M για 40 λεπτά, χωρίς αζιθρομυκίνη	100 ± 0	$74,53 \pm 9,36$ **
Y-27632 10^{-6} M για 20 λεπτά και προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M για άλλα 20 λεπτά	100 ± 0	$39,39 \pm 9,30$ *** § NS
B. τάση % της αρχικής σύσπασης με 3×10^{-7} M καρβαχόλη		
Διάλυμα	αρχική τάση	μετρούμενη τάση ιστού
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M για 20 λεπτά	100 ± 0	$55,08 \pm 6,04$ ***
Y-27632 10^{-6} M για 40 λεπτά, χωρίς αζιθρομυκίνη	100 ± 0	$82,25 \pm 4,39$ *
Y-27632 10^{-6} M για 20 λεπτά και προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M για άλλα 20 λεπτά	100 ± 0	$43,35 \pm 7,83$ *** §§ NS

* $\rho < 0,05$ ** $\rho < 0,01$ και *** $\rho < 0,001$ σε σύγκριση με την αρχική σύσπαση, Wilcoxon related samples test

§ $\rho < 0,05$ και §§ $\rho < 0,01$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα με Y-27632 χωρίς αζιθρομυκίνη, Mann Whitney U unrelated sample test.

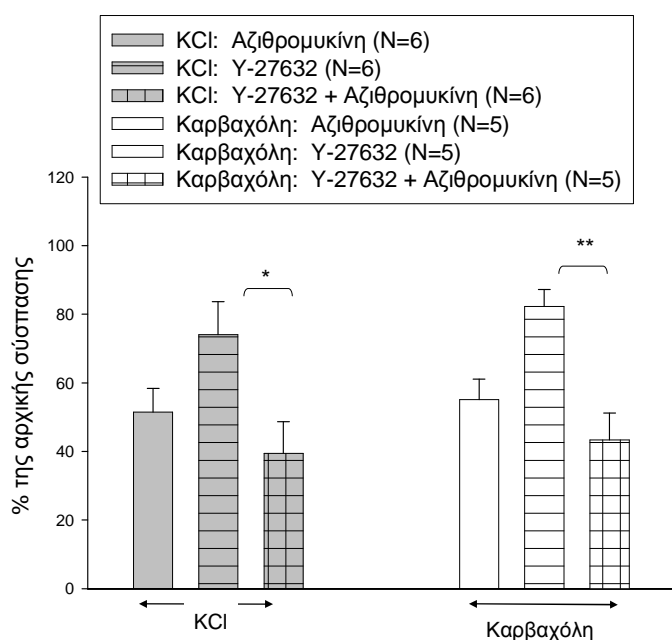
NS: καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, με αζιθρομυκίνη απουσία Y-27632, Mann Whitney U unrelated sample test.

Η επώαση των παρασκευασμάτων με τον αναστολέα της Rho κινάσης, Y-27632 (10^{-6} M) για 40 λεπτά, από μόνη της προκάλεσε μείωση του τόνου των ΛΜΙ των αεραγωγών, που είχαν συσπαστεί με 80mM KCl ή 3×10^{-7} M καρβαχόλη. Έτσι, η αρχική τάση των ιστοτεμαχίων μειώθηκε στο $74.1 \pm 9.6\%$ ($\rho < 0,01$) και στο $82.2 \pm 4.9\%$ ($\rho < 0,05$) στα διαλύματα με KCl και καρβαχόλη, αντίστοιχα (Πίνακας 15 και Εικόνα 23). Σε παρασκευάσματα που είχαν επωαστεί με Y-27632, η αζιθρομυκίνη 10^{-4} M προκαλεί περαιτέρω χάλαση των προσυσπασμένων με KCl ιστών

στο $39.4 \pm 9.3\%$ και των προσυσπασμένων με καρβαχόλη ιστών στο $43.4 \pm 7.8\%$ της αρχικής σύσπασης (Πίνακας 15 και Εικόνα 23). Η προκαλούμενη μείωση της τάσης ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με την ελάττωση της τάσης που παρατηρήθηκε μετά από επώαση των παρασκευασμάτων με μόνο το Y-27632, χωρίς τη χορήγηση αζιθρομυκίνης ($p < 0,05$ για το KCl και $p < 0,01$ για την καρβαχόλη, Πίνακας 15)

Απουσία Y-27632 (πειράματα αναφοράς), η αζιθρομυκίνη (10^{-4} M) σε 20 λεπτά προκάλεσε ελάττωση της αρχικής σύσπασης στο $51.5 \pm 6.9\%$ και στο $55.1 \pm 6.1\%$ στα διαλύματα με KCl και καρβαχόλη, αντίστοιχα ($p < 0.001$, Πίνακας 15)

Παρουσία Y-27632, το μέγεθος της επαγόμενης από την αζιθρομυκίνη χάλασης στις ΛΜΙ που είχαν συσπαστεί με 80mM KCl και 3×10^{-7} M καρβαχόλη ήταν στατιστικά παρόμοιο της αντίστοιχης χάλασης που παρατηρήθηκε απουσία του Y-27632 ($p = 0,45$ και $0,27$). Συμπερασματικά, το Y-27632 δεν επηρέασε τη δράση της αζιθρομυκίνης.



Εικόνα 23 Η χάλαση των λείων μυϊκών ινών που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl (80mM) ή καρβαχόλη (3×10^{-7} M) παρουσία 10^{-4} M αζιθρομυκίνης δεν μεταβάλλεται από την παρουσία του αναστολέα της Rho κινάσης, [(R)-(+)-trans-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδρογλωρίδιο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδης], Y-27632 (10^{-6} M).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραμάτων σε διαφορετικά ζώα.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στον τόνο των λείων μυϊκών ινών παρουσία και απουσία αζιθρομυκίνης με $p < 0.05$ (*) και $p < 0.01$ (**), ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

5.11 Ο ρόλος των cAMP/cGMP στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

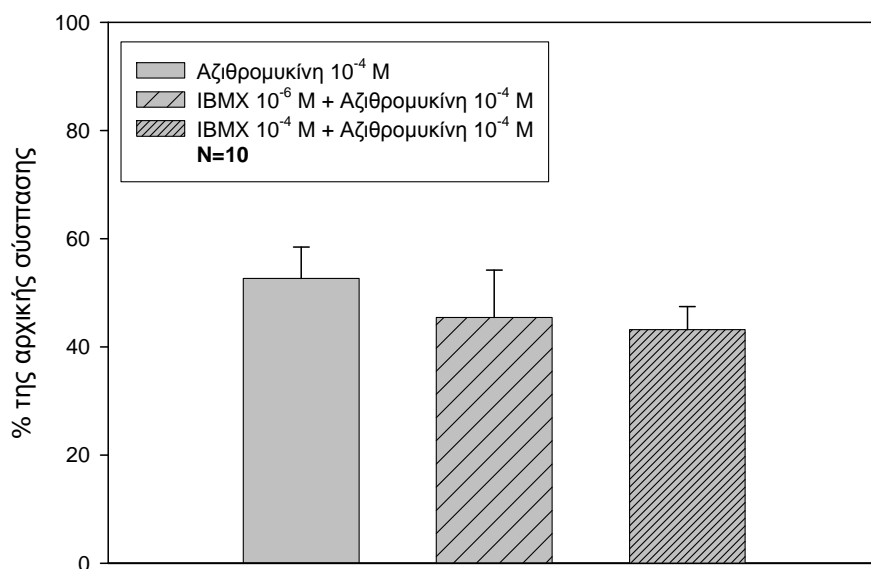
Η πιθανή συμμετοχή του σχηματισμού cAMP/cGMP στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης, μελετήθηκε με την επώαση των ιστών με τον μη ειδικό αναστολέα των φωσφοδιεστερασών 3-ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιόνη, IBMX. Το IBMX σε συγκεντρώσεις 10^{-6} M και 10^{-4} M προκαλεί αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP και cGMP (164). Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας 2 συγκεντρώσεις IBMX, ήταν γιατί στη μελέτη του Hall et al. η επίδραση του IBMX στη σύσπαση των μυών τραχείας από καρβαχόλη και μεταχολίνη διέφερε ανάλογα με τη συγκέντρωση.

Πίνακας 16 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) στη σύσπαση ΛΜΙ με διάλυμα KCl 80mM παρουσία και απουσία IBMX (10^{-6} M ή 10^{-4} M).

τάση % της αρχικής σύσπασης με 80mM KCl		
Διάλυμα	αρχική σύσπαση	μετρούμενη τάση ιστού
Πειράματα αναφοράς, μόνο αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	$52,66 \pm 5,80$ ***
IBMX 10^{-6} M και αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	$45,45 \pm 8,73$ *** NS
IBMX 10^{-4} M και αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	100 ± 0	$43,21 \pm 4,22$ *** NS

*** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την αρχική σύσπαση, Wilcoxon related samples test
NS: καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με την αντίστοιχη σύσπαση στα πειράματα αναφοράς, με αζιθρομυκίνη απουσία IBMX, Mann Whitney U unrelated sample test.

Σε προσυσπασμένες με KCl 80mM η αζιθρομυκίνη 10^{-4} M ελάττωσε τη αρχική σύσπαση στο $52.66 \pm 5.80\%$. Η συνύπαρξη στο υγρό διαπότισης αζιθρομυκίνης και IBMX, 10^{-6} M ή 10^{-4} M, δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την επίδραση της αζιθρομυκίνης. Έτσι, παρατηρήθηκε μείωση της σύσπασης αναφοράς στο $45.45 \pm 8.73\%$ και $43.21 \pm 4.33\%$ με διάλυμα IBMX 10^{-6} M και 10^{-4} M, αντιστοίχως (Πίνακας 16 και Εικόνα 24)



Εικόνα 24 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-4} M) σε προσυσπασμένους ιστούς με 80mM KCl, απουσία και παρουσία IBMX (10^{-6} M και 10^{-4} M).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στη δράση της αζιθρομυκίνης μεταξύ πειραμάτων αναφοράς (χωρίς IBMX) και πειραμάτων με IBMX, ANOVA με Bonferroni's post-hoc test.

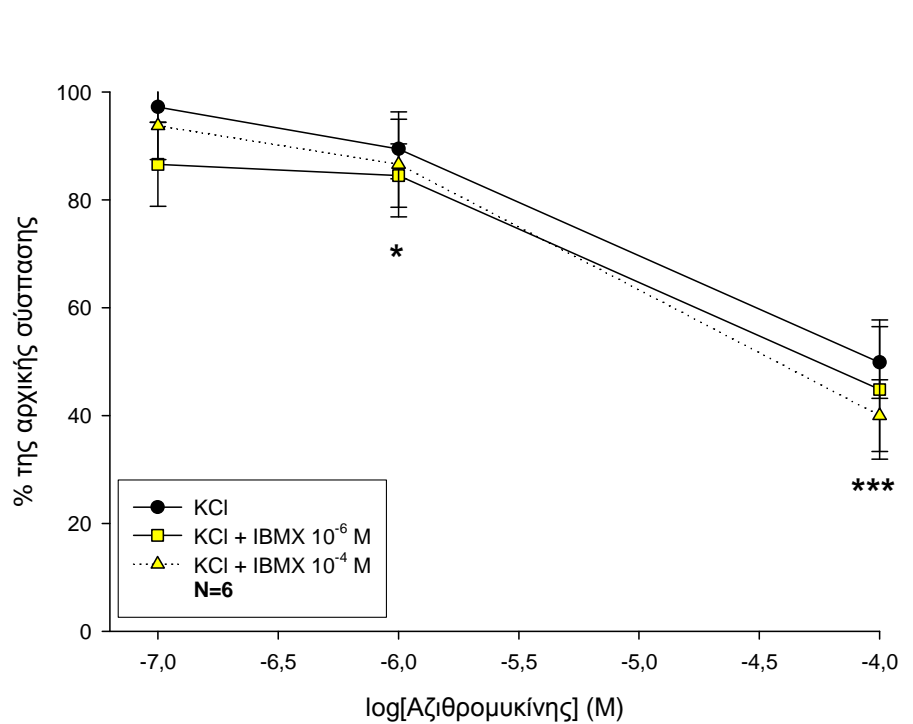
Πολλά φάρμακα και ουσίες επιδρούν στη σύσπαση του λείου μυϊκού κυττάρου μέσω ρύθμισης των ενδοκυττάριων επιπέδων ενδοκυττάριων επιπέδων cAMP και cGMP. Ο αποκλεισμός αυτής της οδού δράσης για την αζιθρομυκίνη είχε ιδιαίτερη σημασία, για αυτό το λόγο επιμείναμε με περισσότερα πειράματα. Σε ένα διαφορετικό πρωτόκολλο, αρχικά οι ΛΜΙ συσπώνται με διάλυμα KCl 80 mM και στη συνέχεια προστίθεται στα λουτρά διαπότισης αζιθρομυκίνη, διαδοχικά, σε συγκεντρώσεις 10^{-7} , 10^{-6} και 10^{-4} M. Υπάρχουν 3 ομάδες ιστοτεμαχίων, στην πρώτη (ομάδα αναφοράς) τα διαλύματα δεν περιέχουν IBMX, στη δεύτερη η συγκέντρωση του IBMX είναι 10^{-6} M και στην τρίτη είναι 10^{-4} M. Στην δεύτερη και τρίτη ομάδα, οι ιστοί επωάζονταν για 20 λεπτά στην αντίστοιχη συγκέντρωση IBMX, πριν την εμφάνισή τους διάλυμα IBMX και αζιθρομυκίνης.

Πίνακας 17 Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-7} M, 10^{-6} M και 10^{-4} M) στη σύσπαση ΛΜΙ με διάλυμα KCl 80mM παρουσία και απουσία IBMX (10^{-6} M ή 10^{-4} M).

τάση % της αρχικής σύσπασης με καρβαχόλη (3×10^{-7} M)			
Διάλυμα	Χωρίς IBMX	IBMX 10^{-6} M	IBMX 10^{-4} M
Αζιθρομυκίνη 10^{-7} M	97,22 ± 2,78	86,61 ± 7,77	93,76 ± 6,21
Αζιθρομυκίνη 10^{-6} M	87,44 ± 5,56 *	84,52 ± 5,88 *	83,6 ± 9,72 *
Αζιθρομυκίνη 10^{-4} M	49,88 ± 6,66 ***	44,85 ± 12,89 ***	39,99 ± 6,67 ***

* $p < 0,05$ και *** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την πρώτη σύσπαση με καρβαχόλη (3×10^{-7} M), Mann Whitney U unrelated sample test.

Η επώαση των ιστών με IBMX για 20 λεπτά, από μόνη της προκάλεσε πολύ μικρή, μη-σημαντική μεταβολή της αρχικής σύσπασης. Στην ομάδα αναφοράς η αζιθρομυκίνη προκάλεσε μείωση της αρχικής σύσπασης στο $87.4 \pm 5.6\%$ και $49.9 \pm 6.7\%$, στις συγκεντρώσεις 10^{-6} και 10^{-4} M, αντιστοίχως (Πίνακας 17 και Εικόνα 25). Στη δεύτερη ομάδα οι αντίστοιχες τιμές ήταν $84.5 \pm 5.9\%$ και $44.9 \pm 12.9\%$, ενώ στην τρίτη ομάδα με IBMX 10^{-4} M οι τιμές ισοδυναμούσαν με 83.6 ± 9.7 και $40.0 \pm 6.7\%$. Συμπερασματικά, η παρουσία του IBMX (10^{-6} M ή 10^{-4} M) δεν επηρέασε τη διασταλτική δράση της αζιθρομυκίνης (10^{-6} M και 10^{-4} M) στις προσυσπασμένες με KCl λείες μυϊκές ίνες (Εικόνα 25)



Εικόνα 25 Η χάλαση των λείων μυϊκών ινών που βρίσκονται σε σύσπαση με KCl (80mM) παρουσία αζιθρομυκίνης (10^{-4} M και 10^{-6} M) δεν μεταβάλλεται από την παρουσία του αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης, [3-Ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιόνη] (IBMX, 1 μ M και 100 μ M). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραματόζωων που μελετήθηκαν. Ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη IBMX, παρατηρείται ελάττωση της αρχικής σύσπασης με την προσθήκη αζιθρομυκίνης σε συγκέντρωση 10^{-6} M, $p < 0.01$ (*) και 10^{-4} M, $p < 0.001$ (***), Wilcoxon related samples test.

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα ιστοτεμάχια τραχείας που δεν είχαν συσπαστεί με κάποια ουσία, η προσθήκη αζιθρομυκίνης δεν επέφερε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή. Συνεπώς, φαίνεται ότι η αζιθρομυκίνη δεν επηρεάζει το βασικό τόνο των λείων μυών της τραχείας κουνελιού.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 11 δείχνουν ότι η αζιθρομυκίνη ασκεί ανασταλτική στη σύσπαση δράση, η οποία είναι σημαντική και δοσοεξαρτώμενη. Στατιστικά σημαντική δράση παρουσιάστηκε από τη συγκέντρωση 10^{-6} M, ενώ η μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση αζιθρομυκίνης που χρησιμοποιήθηκε, 10^{-4} M, προκάλεσε ελάττωση της σύσπασης αναφοράς περίπου στο μισό ($45.9 \pm 9.4\%$, Πίνακας 5). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η επίδραση της αζιθρομυκίνης στους αεραγωγούς διαφέρει από αυτήν των υπόλοιπων μακρολιδών, καθώς από τη βιβλιογραφία προκύπτει πως οι υπόλοιπες μακρολίδες δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανταποκρισιμότητα των λείων μυών στην εξωγενώς χορηγούμενη ακετυλοχολίνη (161) ή στην καρβαχόλη (162). Οι μελέτες, βέβαια, που προαναφέρθηκαν αφορούσαν αεραγωγούς σκύλου ή ανθρώπου, ενώ η αζιθρομυκίνη δεν δοκιμάστηκε. Συνεπώς, δεν μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε αν η διαφορετική δράση της αζιθρομυκίνης που παρατηρήσαμε οφείλεται σε αυτό κάθε αυτό το φάρμακο ή στο πειραματόζωο που χρησιμοποιήσαμε.

Η παρατηρούμενη δράση της αζιθρομυκίνης ξεκινά εντός 5 λεπτών μετά την προσθήκη του φαρμάκου, φτάνει στο μέγιστο σε περίπου 20 λεπτά κι έχει την τάση να εξαφανίζεται μετά από περίπου μια ώρα (Εικόνα 12). Η ταχεία έναρξη δράσης της αζιθρομυκίνης σημαίνει ότι οι θέσεις δέσμευσής της βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε στο προσυναπτικό-νευρικό, είτε στο μετασυναπτικό-λείο μυϊκό κύτταρο. Η επιστροφή της τάσης στον αρχικό τόνο, μία ώρα μετά την προσθήκη της αζιθρομυκίνης, θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στο ότι η ουσία αλληλοεπιδρά με μικρή χημική συγγένεια και αντιστρεπτό τρόπο με τις θέσεις δέσμευσής της, είτε στο ότι ο παράγοντας που αυτή ρυθμίζει και ασκεί τη δράση της, σταδιακά εξαντλείται. Οι θέσεις δέσμευσης μπορεί να είναι είτε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-υποδοχείς, οι οποίες μέσω αλληλεπίδρασης με μόρια-μηνύτορες επηρεάζουν έμμεσα τη συστολή του μυϊκού κυττάρου, είτε τμήματα καναλιών ιόντων ή αντλιών, που ρυθμίζουν το μεμβρανικό δυναμικό ή/και την ισορροπία των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου.

Η μηχανική απομάκρυνση του αναπνευστικού επιθηλίου δεν μετέβαλλε τη δράση της αζιθρομυκίνης (Εικόνα 11). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ρυθμιστικά μόρια της ανταποκρισιμότητας των λείων μυϊκών ινών που παράγονται από το επιθήλιο, όπως το μονοξειδίο του αζώτου ή οι προσταγλανδίνες (48, 49) δεν συμμετέχουν στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης. Η δράση του μη-αδρενεργικού-μη-χολινεργικού συστήματος (NANC) αφορά το νευρικό κύτταρο, αναστέλλοντας ή ενισχύοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, αλλά και το λείο μυϊκό κύτταρο. Το NO έχει γνωστή βρογχοδιασταλτική δράση κι επεμβαίνει στη συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου μέσω ενεργοποίησης μιας ομάδας γουανυλικών κυκλασών (16, 59).

Η δράση της αζιθρομυκίνης ήταν παρόμοια σε παρασκευάσματα όπου η αζιθρομυκίνη προστέθηκε μετά την σύσπαση των λείων μυών με 3×10^{-7} M καρβαχόλη (Εικόνα 11), με εκείνη όπου η αζιθρομυκίνη (10^{-6} M και 10^{-4} M) χορηγήθηκε πριν την προσθήκη της καρβαχόλης στο υγρό διαπότισης (Εικόνα 14), δηλαδή ήταν ανεξάρτητη από τον τρόπο που προστέθηκε το φάρμακο.

Επίσης, η επίδραση της αζιθρομυκίνης παρατηρείται ακόμα και όταν η συγκέντρωση της καρβαχόλης αυξάνεται στα 10^{-5} M, δηλαδή στη συγκέντρωση που η καρβαχόλη προκαλεί τη μέγιστη σύσπαση (Πίνακας 7 και Εικόνα 15). Το αποτέλεσμα αυτό αποκτά ιδιαίτερη αξία, γιατί στις φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού, όπως το άσθμα, διάφοροι μεσολαβητές (για παράδειγμα ο παράγοντας ιστικής νέκρωσης άλφα, TNF α) μπορούν να ενισχύσουν την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στους αεραγωγούς (165-167).

Το KCl και η καρβαχόλη θεωρούνται ότι προκαλούν σύσπαση στους μύες αεραγωγών μέσω διαφορετικών μηχανισμών, αν και μοιράζονται κάποια κοινά μονοπάτια. Η υψηλή εξωκυττάρια συγκέντρωση K⁺ προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης και είσοδο Ca²⁺ από τα σεοεξαρτώμενους διαύλους Ca²⁺ (VDCC). Επίσης, προκαλεί απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τους προσυναπτικούς νευρώνες (48). Τόσο η είσοδος Ca²⁺ στο λείο μυϊκό κύτταρο, όσο και η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης προκαλούν σύσπαση. Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε εξωκυττάριο διάλυμα KCl 80mM για την πρόκληση σύσπασης, η προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M ελάττωσε τον τόνο αναφοράς των λείων μυϊκών ινών (Εικόνα 16). Η παρατηρούμενη δράση της αζιθρομυκίνης ήταν στατιστικά σημαντική από τη συγκέντρωση 10^{-6} M. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το μέγεθος της επαγόμενης από την αζιθρομυκίνη χάλασης ήταν στατιστικά παρόμοιο στις λείες

μυϊκές ίνες που είχαν συσπαστεί με KCl 80mM και καρβαχόλη 3×10^{-7} M (Εικόνα 17). Συνεπώς, η επιλογή της συσπαστικής ουσίας δεν διαφοροποιεί το τελικό αποτέλεσμα της αζιθρομυκίνης.

Για να εξετάσουμε πιθανή προσυναπτική δράση της αζιθρομυκίνης, μέσω αναστολής ή ανταγωνισμού στην απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, πειράματα έγιναν παρουσία ατροπίνης, ενός ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων (Εικόνα 18). Στα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με την παρουσία ατροπίνης στο διάλυμα. Ανεξάρτητα με τον τρόπο που συντελείται, η προσυναπτική αναστολή στηρίζεται στην ελάττωση της απελευθερούμενης ακετυλοχολίνης από το νευρικό κύτταρο. Τα πειράματα της μελέτης μας με ατροπίνη αποδεικνύουν ότι η αζιθρομυκίνη δεν δρα προσυναπτικά, αλλά έχει άμεση, μετασυναπτική δράση στις προσυσπασμένες με KCl λείες μυϊκές ίνες. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα περισσότερα δημοσιευμένα ευρήματα (160, 161) σχετικά με το μηχανισμό δράσης των μακρολιδών στους μύες των αεραγωγών, που πρότειναν σαν πιθανό κύτταρο-στόχο το προσυναπτικό κύτταρο και πιο πιθανό μηχανισμό δράσης την ελαττωμένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης.

Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές προκαλούν σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων στους αεραγωγούς τόσο μέσω απελευθέρωσης Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες, όσο και αυξάνοντας την είσοδο Ca^{2+} από το εξωκυττάριο υγρό προς το εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 5). Η συμμετοχή των VDCC στην επαγομένη από μουσκαρινικούς αγωνιστές είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο έχει αμφισβητηθεί (46), αν και αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή των VDCC στην επαγομένη από καρβαχόλη σύσπαση (47) και στην αναπλήρωση των αποθηκών Ca^{2+} (168, 169). Από την άλλη μεριά, μελέτες σε λείους μύες έδειξαν ότι οι μακρολίδες μπορεί να αναστείλλουν την είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο μέσω δράσης τους στα VDCC (159, 163). Διερευνήσαμε το ενδεχόμενο η αζιθρομυκίνη να επηρεάζει το ρεύμα εισόδου Ca^{2+} στο λείο μυϊκό κύτταρο, με την εκτέλεση πειραμάτων σε διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} , όπως και παρουσία του ανταγωνιστή των VDCC, βεραπαμίλης. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα VDCC συμμετέχουν στην επαγομένη από την καρβαχόλη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, όπως φάνηκε από την ελάττωση της αρχικής σύσπασης μετά την προσθήκη βεραπαμίλης (Πίνακας 12, Εικόνα 20). Το σπουδαιότερο συμπέρασμα όμως (πίνακες 11, 12 και εικόνες 19, 20) ήταν ότι η δράση της αζιθρομυκίνης επιμένει σε διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{2+} ή παρουσία

βεραπαμίλης. Καταλήγουμε λοιπόν, ότι η αζιθρομυκίνη δεν επηρεάζει την είσοδο Ca^{2+} στις λείες μυϊκές ίνες αεραγωγών κουνελιού.

Οι λείες μυϊκές ίνες των αεραγωγών διαθέτουν μια λειτουργική $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ αντλία, που ρυθμίζει τον τόνο των αεραγωγών (10, 11). Από την άλλη μεριά, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μακρολίδες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης στη νήστιδα κουνελιού (170) και στο ήπαρ ποντικού (171). Μελετήθηκε η πιθανή επίδραση της αζιθρομυκίνης στη λειτουργικότητα της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης, με την εκτέλεση πειραμάτων παρουσία του αναστολέα της αντλίας, ουαμπαϊνη. Η ουαμπαϊνη δεν μετέβαλλε τη δράση της αζιθρομυκίνης (Εικόνα 21), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή της λειτουργικότητας της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

Η Ca^{2+} -ΑΤΡάση του σαρκοπλασματικού δικτύου, SERCA, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συστολής των λείων μυών, καθώς είναι υπεύθυνη για την ενεργητική επαναπλήρωση των ενδοκυττάρων αποθηκών με Ca^{2+} (Εικόνα 6). Στην προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο ρόλος της αζιθρομυκίνης στην απελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρουσία του αναστολέα της SERCA κυκλοπιαζονικού οξέος, CPA. Το CPA αναστέλλει την ενεργητική πρόσληψη Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο οδηγώντας σε προοδευτική ελάττωση των αποθηκών ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (46, 51, 52), αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{+2}$ ΑΤΡάση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Το CPA από μόνο του, σε ιστοτεμάχια που είχαν προσυσπαστεί τόσο με KCl 80mM όσο και με καρβαχόλη 3×10^{-7} M, προκαλεί βαθμιαία χάλαση (Εικόνα 22). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το ότι με την SERCA ανενεργό, το ενδοπλασματικό δίκτυο ουσιαστικά ξεπλένεται από Ca^{+2} . Έτσι, δεν υπάρχει άλλο ασβέστιο για να απελευθερωθεί μέσω των T-διαύλων και των υποδοχέων ρυανοδίνης (Εικόνα 6), με αποτέλεσμα να αναστέλλεται μερικώς η συστολή. Η προσθήκη όμως αζιθρομυκίνης 10^{-4} M προκαλεί περαιτέρω, στατιστικά σημαντικότερη χάλαση των προσυσπασμένων ινών. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το CPA δεν έχει επίδραση στην επαγόμενη από την αζιθρομυκίνη χάλαση των λείων μυϊκών ινών, που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη ή KCl (Πίνακας 14 και Εικόνα 22). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι ο μηχανισμός δράσης της αζιθρομυκίνης δεν εμπλέκει την αναστολή απελευθέρωσης Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες.

Στις ΛΜΙ των αεραγωγών η μονομερής πρωτεΐνη RhoA ενεργοποιείται με τη βοήθεια των νουκλεοτιδικών γουανινικών παραγόντων ανταλλαγής RhoGEF και με τη σειρά της ενεργοποιεί την Rho-εξαρτώμενη κινάση, RhoK (Εικόνα 3). Η RhoK καταστέλλει τη λειτουργία της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, ευνοώντας έτσι τη συστολή (33-35). Θεωρητικά, μια πιθανή ανασταλτική δράση της αζιθρομυκίνης στο μονοπάτι RhoA / RhoK θα μπορούσε να εξηγήσει τη δράση της. Μελετήσαμε την επίδραση της αζιθρομυκίνης παρουσία του αναστολέα της RhoK, [(R)-(+)-*trans*-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδύλ) διυδροχλωρίδιο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδης], Y-27632. Η επώαση των παρασκευασμάτων με Y-27632 (10^{-6} M), από μόνη της προκάλεσε μείωση του τόνου των ΛΜΙ των αεραγωγών, που είχαν συσπαστεί με KCl ή καρβαχόλη (Πίνακας 15 και Εικόνα 23), υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι RhoA / RhoK εμπλέκεται στην επαγόμενη από KCl ή καρβαχόλη σύσπαση. Ωστόσο, παρουσία Y-27632 η αζιθρομυκίνη συνεχίζει να προκαλεί στατιστικά σημαντική χάλαση των ΛΜΙ, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός δράσης της αζιθρομυκίνης είναι ανεξάρτητος από το μονοπάτι RhoA / RhoK.

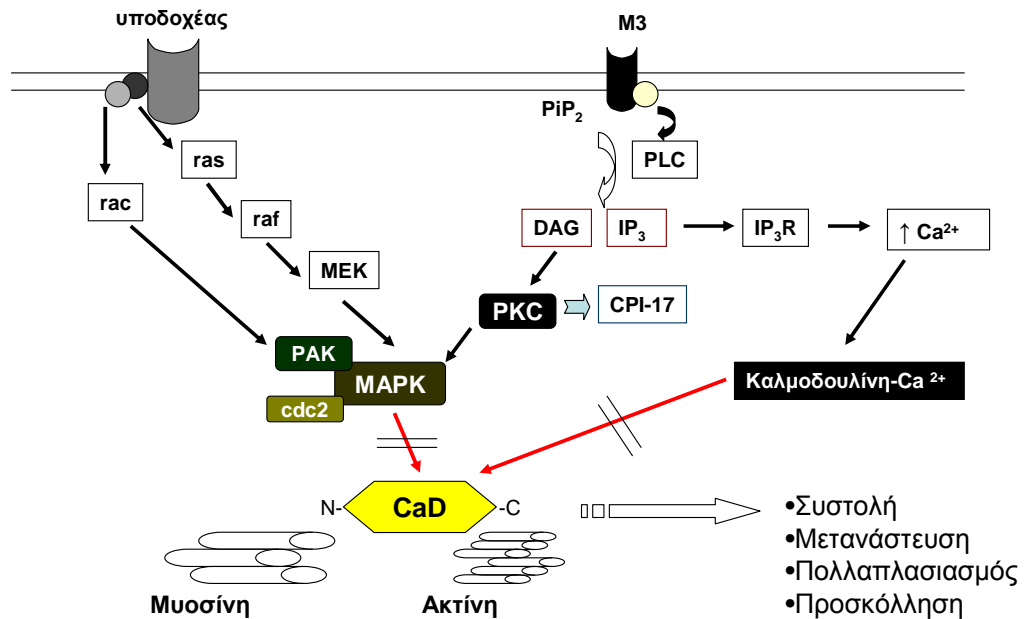
Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι το cGMP και cAMP είναι σημαντικά μόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του τόνου στους αεραγωγούς μέσω αρκετών μονοπατιών (Εικόνα 4). Πολλές ουσίες ασκούν βρογχοδιασταλτική δράση μέσω cAMP ή cGMP εξαρτώμενου μηχανισμού, δρώντας σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-υποδοχείς κι εμπλέκοντας τις G πρωτεΐνες. Η παραγωγή των κυκλικών νουκλεοτιδίων στηρίζεται σε δύο οικογένειες ενζύμων, την αδενυλική και γουανυλική κυκλάση, AC και GC. Οι AC και GC συνθέτουν cAMP και cGMP από τα αντίστοιχα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια. Ουσιαστικά όμως, το κλειδί στη ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP και cGMP δεν βρίσκεται στην παραγωγή αλλά στην υδρόλυση και απενεργοποίηση αυτών των μορίων, που πραγματοποιείται από τις φωσφοδιεστεράσες, PDE (Εικόνα 3). Λαμβάνοντας υπόψη την ταχεία έναρξη δράσης της αζιθρομυκίνης (Εικόνα 12) και τη διαφαινόμενη, άμεση δράση της στο λείο μυϊκό κύτταρο, η εμπλοκή των AC και GC ή των PDE στο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου αποτέλεσε μια σημαντική πιθανότητα. Διερευνήθηκε η πιθανή συμμετοχή του cAMP ή cGMP στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης, με την εκτέλεση πειραμάτων παρουσία του μη ειδικού αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης 3-ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιδόνη, IBMX. Τα αποτελέσματά μας (Πίνακες 16, 17 και εικόνες 24, 25) έδειξαν ότι η προσθήκη αζιθρομυκίνης 10^{-4} M στο υγρό διαπύκνωσης, απουσία ή παρουσία IBMX (10^{-6} M ή 10^{-4} M) προκάλεσε

στατιστικά σημαντική μείωση της σύσπασης αναφοράς. Η συνύπαρξη IBMX δεν επηρέασε το τελικό αποτέλεσμα της αζιθρομυκίνης, άσχετα με το ποιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε. Συμπερασματικά, ο σχηματισμός ενδοκυττάρου cAMP ή cGMP δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό δράσης της αζιθρομυκίνης.

6.1 Πιθανός μηχανισμός δράσης

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν πολλά, ρυθμιστικά της συστολής του λείου μυϊκού κύτταρου μονοπάτια, αλλά δεν κατέστη δυνατή η αποκάλυψη του ακριβή μηχανισμού δράσης της αζιθρομυκίνης. Η χρησιμοποιούμενη πειραματική διάταξη (Εικόνα 8) βασίζεται στην ισομετρική συστολή των λείων μυϊκών ινών και στην εφαρμογή διαφόρων ουσιών, προς μελέτη της συμμετοχής τους στη ρύθμιση της έντασης της συστολής. Τα αποτελέσματα για να είναι αξιόπιστα πρέπει να καταγράφονται εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος, το οποίο δεν μπορεί να ξεπεράσει τις λίγες ώρες. Με τα συγκεκριμένα πειράματα δεν μπορεί να διερευνηθούν πιο μακροπρόθεσμες επιδράσεις μιας ουσίας στη φυσιολογία του λείου μυϊκού κυττάρου, κάτι που επιτυγχάνεται με καλλιέργειες κυττάρων, χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και τεχνικών ανοσοφθορισμού.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει το μόριο της καλδεσμόνης, CaD. Στα λεία μυϊκά κύτταρα υπάρχει η βαριά ισομορφή του μορίου (h-CaD) (172). Το N-άκρο της h-CaD συνδέεται με τη μυοσίνη και το C-άκρο της με την ακτίνη, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης και το σχηματισμό συμπλόκων με υψηλή δραστηριότητα ATPάσης (Εικόνα 26). Στα μη-μυϊκά κύτταρα, υπάρχει η ελαφριά ισομορφή της καλδεσμόνης (l-CaD). Η l-CaD συνδέεται με την ακτίνη σταθεροποιώντας τον κυτταροσκελετό (173). Είναι γνωστό ότι κυτταρικές διεργασίες, όπως η διαίρεση, η μετανάστευση και η προσκόλληση, προϋποθέτουν δυναμικές αλλαγές (ουσιαστικά πρόκειται για αναδιαμόρφωση) του κυτταροσκελετού των νηματίων ακτίνης (174). Δεν υπάρχουν πολλές γνωστές πρωτεΐνες, που να μπορούν να συνδέονται με την ακτίνη και, μέσω φωσφορυλίωσής τους, να ρυθμίζουν την κατάσταση του κυτταροσκελετού. Η λειτουργία της CaD ενδεχομένως να αποτελεί μια βασική οδό ελέγχου του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των κυττάρων, με εξέχοντα ρόλο στην επούλωση τραυμάτων ή στη μετάσταση καρκινικών κυττάρων (175).



Εικόνα 1 Ο ρόλος της καλδεσμόνης

Η καλδεσμόνη, CaD, συνδέεται με την ακτίνη και τη μυοσίνη, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους. Η CaD απενεργοποιείται από τις κινάσες MAPK και από το σύμπλεγμα καλμοδουλίνης- Ca^{2+} . Οι MAPK, όπως οι PAK και η cdc2, ενεργοποιούνται μέσω δευτέρων μηνυτόρων, μετά τη σύνδεση μιας ουσίας με κάποιο διαμεμβρανικό υποδοχέα. Δύο γνωστά μονοπάτια, είναι του rac (που τελικά ενεργοποιεί την PAK) και του ras (που ενεργοποιεί την κινάση MEK). Επίσης, οι MAPK ενεργοποιούνται από την πρωτεϊνική κινάση C, PKC. Η PKC ενεργοποιείται από τη διακυλογλυκερόλη (DAG), που μαζί με την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) αποτελούν τα προϊόντα υδρόλυσης της διφωσφορικής-4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP_2). Η υδρόλυση της PIP_2 καταλύεται από την φωσφολιπάση C (PLC), η οποία ενεργοποιείται μέσω G πρωτεϊνών μετά τη σύνδεση ενός μουσκαρινικού αγωνιστή στον M3 υποδοχέα. Η IP_3 δρα σε υποδοχείς του σαρκοπλασματικού δικτύου, προκαλώντας απελευθέρωση αποθηκευμένου Ca^{2+} . Η PKC μέσω ενεργοποίησης του ειδικού για τους λείους μύες φωσφοπεπτιδίου CPI-17 αδρανοποιεί τη φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, ευοδώνοντας τη συστολή.

Η δράση της h-CaD στο λείο μυϊκό κύτταρο αναστέλλεται είτε μετά τη σύνδεση του μορίου με το σύμπλεγμα Ca^{2+} -καλμοδουλίνης, είτε μετά από φωσφορυλίωση της h-CaD από συγκεκριμένες κινάσες (Εικόνα 26). Το σύμπλεγμα Ca^{2+} -καλμοδουλίνης, προϋποθέτει την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} και αποτελεί την πρώτη αντίδραση στον καταρράκτη που οδηγεί στη σύσπαση του κυττάρου. Είναι λογικό ότι για την ολοκλήρωση της συστολής πρέπει να αρθεί η σύνδεση CaD-ακτίνης, ώστε να επιτραπεί η ακόλουθη γεφύρωση ακτίνης-μυοσίνης.

Οι κινάσες που απενεργοποιούν την h-CaD, ανήκουν στην ομάδα των MAPK (ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες), όπως η Pak και η p34^{cdc2} (172). Η πρωτεϊνική κινάση C, που ενεργοποιείται από την διακυλογκυκερόλη, DAG (Εικόνα 5 και 26), μπορεί να ενεργοποιήσει τις MAPK. Στο μόριο της CaD υπάρχουν ειδικές θέσεις για τις ERK (ρυθμιζόμενες από εξωκυττάριο σήμα κινάσες). Η ενεργοποίηση των ERK προϋποθέτει τη σύνδεση μιας ουσίας με έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα και την παραγωγή δεύτερου, ενδοκυττάριου μηνύματος. Δύο μονοπάτια που έχουν περιγραφεί είναι του *ras* (προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης MEK, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τις MAPK) και του *rac* (τελικά προκαλεί ενεργοποίηση της Pak).

6.2 Συμπεράσματα

Ο πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης επιτεύχθηκε, καθώς δείξαμε ότι η αζιθρομυκίνη ασκεί δόσοεξαρτώμενη, ανασταλτική δράση στους λείους μύες αεραγωγών, που έχουν προσυσπαστεί με καρβαχόλη ή KCl. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό από τη συγκέντρωση 10^{-6} M, εμφανίζεται ταχέως, φαίνεται να υποχωρεί μετά από μία ώρα, ενώ επιμένει ανεξάρτητα από τη συσπαστική ουσία που χρησιμοποιείται και τον τρόπο που αυτή προστίθεται. Η προσθήκη αζιθρομυκίνης μαζί με τη συσπαστική ουσία, σε ιστοτεμάχια σε κατάσταση ισορροπίας, οδήγησε σε μικρότερη σύσπαση σε σύγκριση με τη σύσπαση αναφοράς απουσία αζιθρομυκίνης.

Στα πλαίσια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης, καταλήξαμε στο ότι η επίδραση της αζιθρομυκίνης είναι επιθηλιο-ανεξάρτητη και δεν πραγματοποιείται μέσω προσυναπτικής αναστολής, αλλά είναι άμεση στο λείο μυϊκό κύτταρο της τραχείας κουνελιού. Η επαγόμενη από την αζιθρομυκίνη χάλαση δεν προκαλείται από αναστολή του ρεύματος εισόδου Ca^{2+} προς το λείο μυϊκό κύτταρο ή από αναστολή απελευθέρωσης Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Επίσης, η δράση της αζιθρομυκίνης δεν τροποποιείται από μεταβολή στη δραστηριότητα της Na^+-K^+ ATPάσης, από διακυμάνσεις της παραγωγής των cAMP/cGMP ή από την ενεργοποίηση του μονοπατιού RhoA/RhoK.

Η ταχεία, άμεση δράση της αζιθρομυκίνης θα μπορούσε να στηρίζεται σε μηχανισμό που να περιλαμβάνει τις ERK, αφού αυτές βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στα πραγματοποιηθέντα πειράματα της παρούσης μελέτης διερευνήθηκαν πολλά, βασικά μονοπάτια που θα μπορούσαν να επηρεάσουν

τη συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου. Τα μονοπάτια μέσω των οποίων οι ERK ασκούν τη δράση τους (ras και rac) είναι ανεξάρτητα από εκείνα που αποκλείστηκαν στα πραγματοποιηθέντα πειράματα. Αν ισχύει κάτι τέτοιο, τότε η αζιθρομυκίνη δρώντας μέσω της CaD, μπορεί να επηρεάζει και άλλες κυτταρικές διαδικασίες εκτός από τη συστολή, όπως τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Η απόδειξη αυτών των δράσεων ξεφεύγει από τις δυνατότητες της χρησιμοποιούμενης στην παρούσα μελέτη, πειραματικής διαδικασίας. Οι καλλιέργειες κυττάρων, η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και τεχνικών ανοσοφθορισμού θα μπορούσαν να προσφέρουν περισσότερα συμπεράσματα σχετικά με την αποσαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού δράσης της αζιθρομυκίνης.

6.3 Κλινική σημασία αποτελεσμάτων

Η από του στόματος χορήγηση 500 mg αζιθρομυκίνης την πρώτη ημέρα και 250 mg τις επόμενες 4 ημέρες, συνεπάγεται μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) στο κατώτερο αναπνευστικό ίση με $8,93 \pm 2,05$ mg/lit, δηλαδή περίπου 10^{-6} M (68). Αυτή η βιολογικά δραστική συγκέντρωση περιλαμβάνεται εντός του εύρους, στο οποίο παρατηρήσαμε ότι η αζιθρομυκίνη προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών. Σε αρκετές μελέτες έχει δειχθεί ότι η μακροχρόνια, σε χαμηλές δόσεις, χορήγηση αζιθρομυκίνης σε ασθενείς με άσθμα (132) ή βρογχιολίτιδα (103) βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία. Η συσχέτιση των εργαστηριακών και των κλινικών ευρημάτων, αν και ενδιαφέρουσα, είναι παρακινδυνευμένη και ξεφεύγει από τους στόχους της παρούσας μελέτης. Η αζιθρομυκίνη προκαλεί χάλαση στους λείους μύες τραχείας κουνελιού. Παρά τις άφθονες ομοιότητες στη φυσιολογία της σύσπασης, οι αεραγωγοί του κουνελιού δεν συμπεριφέρονται πανομοιότυπα με τους ανθρώπινους. Επίσης, είναι γνωστό ότι στα αποφρακτικά νοσήματα των πνευμόνων οι μεγάλοι αεραγωγοί ευθύνονται για μικρό μόνο ποσοστό της παρατηρούμενης απόφραξης. Η νεύρωση και η κατανομή των λείων μυών όσο προχωράμε στο τραχειοβρογχικό δέντρο μεταβάλλεται, συνεπώς τα αποτελέσματα της αζιθρομυκίνης στην τραχεία δεν προδικάζουν την ίδια επίδραση και στους μικρούς βρόγχους. Παρόλα αυτά, η πληροφορία ότι η αζιθρομυκίνη προκαλεί άμεση, ανασταλτική στη σύσπαση δράση προσθέτει ένα ακόμα στοιχείο στην πολυμελετημένη δράση των μακρολιδών. Σίγουρα, χρειάζεται περισσότερο έρευνα για να αποσαφηνιστεί μια ενδεχόμενη βρογχοδιασταλτική επίδραση, πόσο μάλλον να συγκριθεί με τις μικροβιοστατικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αυτών των φαρμάκων.

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης δράση των μακρολιδών είναι καλά τεκμηριωμένες, ενώ λίγα είναι γνωστά για το βρογχοδιασταλτικό τους ρόλο.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Η διερεύνηση της δράσης της αζιθρομυκίνης στον τόνο των λείων μυϊκών ινών (ΛΜΙ) αεραγωγών που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη (300nM) ή KCl (80mM).

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Έγιναν in vitro πειράματα συστολών σε παρασκευάσματα ΛΜΙ τραχείας ενήλικων κουνελιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η αζιθρομυκίνη (1μM-100μM) προκάλεσε χάλαση των, σε σύσπαση με καρβαχόλη, ΛΜΙ. Ενδεικτικά, 100μM αζιθρομυκίνη ελαττώνουν την τάση των ΛΜΙ στο 55.4% της αρχικής σύσπασης. Επιπλέον, η αζιθρομυκίνη (1 μM και 100μM) ελάττωσε την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ σε 300nM ή 10 μM καρβαχόλης. Η αφαίρεση του επιθηλίου δεν επηρέασε τη δράση της αζιθρομυκίνης.

Η αζιθρομυκίνη (100 μM) προκάλεσε χάλαση των ΛΜΙ που βρίσκονταν σε σύσπαση με KCl, ακόμα και παρουσία ατροπίνης (100μM).

Η δράση της αζιθρομυκίνης παρατηρήθηκε απουσία ασβεστίου από το υγρό διαπότισης του ιστού, παρουσία του ανταγωνιστή διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη.

Επίσης, η ανασταλτική της δράση δεν επηρεάστηκε από την προεπώαση των ΛΜΙ με αναστολείς της Ca²⁺-ΑΤΡάσης (κυκλοπιαζονικό οξύ), Na⁺-K⁺ ΑΤΡάσης (ουαμπαΐνη), Rho-εξαρτώμενης κινάσης [(R)-(+)-trans-4-(1-αμινοαιθυλ)-N-(4-πουριδυλ) διυδροχλωρίδο κυκλοεξανοκαρβοξαμίδη] ή με τον μη ειδικό αναστολέα των cAMP/GMP φωσφοδιεστερασών [3-Ισοβουτυλ-1-μεθυλο-2,6(1H,3H)-πουρινεδιόνη].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι η αζιθρομυκίνη ασκεί δόσοεξαρτώμενη, επιθηλιο-ανεξάρτητη, άμεση ανασταλτική δράση στις προσυσπασμένες ΛΜΙ τραχείας κουνελιού. Η δράση αυτή της αζιθρομυκίνης δεν οφείλεται σε αναστολή εισόδου Ca²⁺ στις ΛΜΙ ή σε παρεμπόδιση απελευθέρωσης Ca²⁺ από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Επίσης, στον μηχανισμό δράσης της δεν εμπλέκεται η Na⁺-K⁺ ΑΤΡάση, ο σχηματισμός cAMP/cGMP ή το μονοπάτι Rho/Rho-εξαρτώμενης κινάσης.

8 ABSTRACT

Macrolides have been proven to have beneficial bacteriostatic and anti-inflammatory properties, but very little is known about the potential value of their bronchodilatory effect. Therefore, in the present study we investigated the effect of azithromycin on contractile responses of isolated rabbit tracheal strips to carbachol or KCl.

Azithromycin has a relaxant, concentration-dependent effect on tracheal strips precontracted with carbachol (300 nM), significant from the concentration of 1 μ M. The mechanical removal of epithelium did not alter the effect of azithromycin. Azithromycin (100 μ M) also relaxed tracheal strips precontracted with KCl (80 mM) even in the presence of atropine (100 μ M). Moreover, azithromycin (100 μ M) decreased contractions induced by 300 nM and 10 μ M carbachol to 55.4% and 80.5% of initial contraction, respectively.

The relaxant effect of azithromycin persisted in both calcium free solution and in the presence of the calcium channel antagonist, verapamil. The relaxant effect of azithromycin was not altered by the pre-treatment of preparations with the inhibitors of Ca^{2+} -ATPase (cyclopiazonic acid), Na^{+} - K^{+} ATPase (ouabain), Rho-associated kinase [(R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride] (Y-27632) or the non-specific cAMP and cGMP phosphodiesterases inhibitor 3-Isobutyl-1-methyl-2,6(1H,3H)-purinedione (IBMX).

These results suggest that azithromycin has a concentration-dependent, epithelium-independent, direct relaxant effect on precontracted tracheal strips that is not mediated via inhibition of Ca^{2+} influx or Ca^{2+} release from intracellular stores. Also, it is not due to alteration of the function of Na^{+} - K^{+} ATPase and does not depend on the formation of cAMP/cGMP or the Rho/ Rho-activated kinase pathway.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. W. Boron, E. Boulpaep, Medical Physiology, a cellular and molecular approach. Elsevier Inc. 2005
2. Quevillon-Cheruel S, Foucault G, Desmadril M, Lompre AM, Bechet JJ. Role of the C-terminal extremities of the smooth muscle myosin heavy chains: implication for assembly properties. FEBS Lett 1999;454(3):303-6.
3. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. Am J Physiol 1990;259(1 Pt 1):C3-18.
4. Morgan KG. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca²⁺ indicator aequorin. Cardiovasc Drugs Ther 1990;4(5):1355-62.
5. Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. Mol Cell Endocrinol 2001;177(1-2):135-43.
6. Hille B. Pumping Ions. Science 1992;255(5045):742.
7. Benham CD, Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells of rabbit jejunum and guinea-pig mesenteric artery. J Physiol 1986;371:45-67.
8. Cook NS. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. Trends Pharmacol Sci 1988;9(1):21-8.
9. Chapman ER, Estep RP, Storm DR. Palmitoylation of neuromodulin (GAP-43) is not required for phosphorylation by protein kinase C. J Biol Chem 1992;267(35):25233-8.
10. Chideckel EW, Frost JL, Mike P, Fedan JS. The effect of ouabain on tension in isolated respiratory tract smooth muscle of humans and other species. Br J Pharmacol 1987;92(3):609-14.
11. Espinosa-Tanguma R, Valle-Aguilera JR, Zarazua-Garcia O, Navarro-Huerta MP, Pecina C, Sanchez-Armass S. Mechanism of ouabain-induced contractions in guinea-pig tracheal rings. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004;31(10):710-5.
12. Hodgkinson JL, el-Mezgueldi M, Craig R, Vibert P, Marston SB, Lehman W. 3-D image reconstruction of reconstituted smooth muscle thin filaments containing calponin: visualization of interactions between F-actin and calponin. J Mol Biol 1997;273(1):150-9.
13. Lehman W, Vibert P, Craig R. Visualization of caldesmon on smooth muscle thin filaments. J Mol Biol 1997;274(3):310-7.
14. Hempel CM, Vincent P, Adams SR, Tsien RY, Selverston AI. Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuit. Nature 1996;384(6605):166-9.
15. Butt E, Pohler D, Genieser HG, Huggins JP, Bucher B. Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. Br J Pharmacol 1995;116(8):3110-6.
16. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. FASEB J 1993;7(2):328-38.
17. Kume H, Graziano MP, Kotlikoff MI. Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(22):11051-5.
18. Souness JE, Brazdil R, Diocee BK, Jordan R. Role of selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibition in the myorelaxant actions of M&B 22,948, MY-5445, vinpocetine and 1-methyl-3-isobutyl-8-(methylamino)xanthine. Br J Pharmacol 1989;98(3):725-34.

19. Torphy TJ, Cieslinski LB. Characterization and selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1990;37(2):206-14.
20. Souness JE, Villamil ME, Scott LC, Tomkinson A, Giembycz MA, Raeburn D. Possible role of cyclic AMP phosphodiesterases in the actions of ibudilast on eosinophil thromboxane generation and airways smooth muscle tone. *Br J Pharmacol* 1994;111(4):1081-8.
21. Faux MC, Scott JD. More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem Sci* 1996;21(8):312-5.
22. Rubin CS. A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1994;1224(3):467-79.
23. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(1):32-9.
24. Chitale K, Webb RC. Microtubule depolymerization facilitates contraction of vascular smooth muscle via increased activation of RhoA/Rho-kinase. *Med Hypotheses* 2001;56(3):381-5.
25. Solaro RJ. Myosin light chain phosphatase: a Cinderella of cellular signaling. *Circ Res* 2000;87(3):173-5.
26. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand* 1998;164(4):437-48.
27. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000;522 Pt 2:177-85.
28. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, et al. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274(52):37385-90.
29. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999;68:459-86.
30. Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takawa Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278(1):C57-65.
31. Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 2000;522 Pt 1:33-49.
32. Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Brautigam DL. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 2000;275(14):9897-900.
33. Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, et al. Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(6):1190-200.
34. Miyazaki K, Yano T, Schmidt DJ, Tokui T, Shibata M, Lifshitz LM, et al. Rho-dependent agonist-induced spatio-temporal change in myosin phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277(1):725-34.

35. Gosens R, Schaafsma D, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA. Role of Rho-kinase in maintaining airway smooth muscle contractile phenotype. *Eur J Pharmacol* 2004;483(1):71-8.
36. Ohki S, Eto M, Kariya E, Hayano T, Hayashi Y, Yazawa M, et al. Solution NMR structure of the myosin phosphatase inhibitor protein CPI-17 shows phosphorylation-induced conformational changes responsible for activation. *J Mol Biol* 2001;314(4):839-49.
37. Chitale K, Weber D, Webb RC. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2001;3(2):139-44.
38. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389(6654):990-4.
39. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006;7:73.
40. Roffel AF, Meurs H, Elzinga CR, Zaagsma J. No evidence for a role of muscarinic M2 receptors in functional antagonism in bovine trachea. *Br J Pharmacol* 1995;115(4):665-71.
41. Ten Berge RE, Roffel AF, Zaagsma J. The interaction of selective and non-selective antagonists with pre- and postjunctional muscarinic receptor subtypes in the guinea pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1993;233(2-3):279-84.
42. Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1989;67(6):2461-5.
43. Kume H, Kotlikoff MI. Muscarinic inhibition of single K_{Ca} channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G protein. *Am J Physiol* 1991;261(6 Pt 1):C1204-9.
44. Eglen RM, Reddy H, Watson N. Selective inactivation of muscarinic receptor subtypes. *Int J Biochem* 1994;26(12):1357-68.
45. Pidaparti RM, Liu Y, Meiss RA. A viscoelastic material model to represent smooth muscle shortening. *Biomed Mater Eng* 1997;7(3):171-7.
46. Marthan R. Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(5):L907-8.
47. Kajita J, Yamaguchi H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1993;264(5 Pt 1):L496-503.
48. Hatziefthimiou AA, Karetsi E, Pratzoudis E, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Resting tension effect on airway smooth muscle: the involvement of epithelium. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;145(2-3):201-8.
49. Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Epithelium-dependent effect of L-glutamate on airways: involvement of prostaglandins. *Mediators Inflamm* 2002;11(1):33-8.
50. Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;134:201-34.
51. Ethier MF, Yamaguchi H, Madison JM. Effects of cyclopiazonic acid on cytosolic calcium in bovine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(1):L126-33.
52. Martinez-Azorin F. Cyclopiazonic acid reduces the coupling factor of the Ca²⁺-ATPase acting on Ca²⁺ binding. *FEBS Lett* 2004;576(1-2):73-6.

53. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989;245(4922):1118-21.
54. Thomas RF, Liggett SB. Lack of beta 3-adrenergic receptor mRNA expression in adipose and other metabolic tissues in the adult human. *Mol Pharmacol* 1993;43(3):343-8.
55. Calignano A, Whittle BJ, Di Rosa M, Moncada S. Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility in vivo. *Eur J Pharmacol* 1992;229(2-3):273-6.
56. Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery* 1994;116(2):439-44; discussion 444-5.
57. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):7809-13.
58. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342(8886-8887):1510-3.
59. Gilman A, Goodman LS. The Secretion Of An Antidiuretic Hypophyseal Hormone In Response To The Need For Renal Water Conservation. *Science* 1936;84(2166):24-25.
60. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest* 1998;101(3):660-6.
61. Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR. Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* 1995;9(7):552-8.
62. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 1995;270(36):21195-8.
63. Jin L, Linder AE, Mills TM, Webb RC. Inhibition of the tonic contraction in the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7(2):265-76.
64. Mills TM, Lewis RW, Wingard CJ, Chitale K, Webb RC. Inhibition of tonic contraction--a novel way to approach erectile dysfunction. *J Androl* 2002;23(5):S5-9.
65. Ullman A. beta-Adrenoceptor agonists in future asthma therapy. *Pharmacol Toxicol* 1995;77 Suppl 3:36-9.
66. Crane J, O'Donnell TV, Prior IA, Waite DA. The relationships between atopy, bronchial hyperresponsiveness, and a family history of asthma: a cross-sectional study of migrant Tokelauan children in New Zealand. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84(5 Pt 1):768-72.
67. Di Paolo A, Barbara C, Chella A, Angeletti CA, Del Tacca M. Pharmacokinetics of azithromycin in lung tissue, bronchial washing, and plasma in patients given multiple oral doses of 500 and 1000 mg daily. *Pharmacol Res* 2002;46(6):545-50.
68. Danesi R, Lupetti A, Barbara C, Ghelardi E, Chella A, Malizia T, et al. Comparative distribution of azithromycin in lung tissue of patients given oral daily doses of 500 and 1000 mg. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(4):939-45.
69. Shinkai M, Rubin BK. Macrolides and airway inflammation in children. *Paediatr Respir Rev* 2005;6(3):227-35.

70. Yanagihara K, Tomono K, Imamura Y, Kaneko Y, Kuroki M, Sawai T, et al. Effect of clarithromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(5):867-70.
71. Mitsuya Y, Kawai S, Kobayashi H. Influence of macrolides on guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase activity in *Pseudomonas* biofilm. *J Infect Chemother* 2000;6(1):45-50.
72. Kawamura-Sato K, Iinuma Y, Hasegawa T, Horii T, Yamashino T, Ohta M. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(10):2869-72.
73. Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Kobayashi T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress response. *J Infect Chemother* 2000;6(1):1-7.
74. Goswami SK, Kivity S, Marom Z. Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(1):72-8.
75. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(5):581-7.
76. Shibuya Y, Wills PJ, Cole PJ. The effect of erythromycin on mucociliary transportability and rheology of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum. *Respiration* 2001;68(6):615-9.
77. Takeyama K, Tamaoki J, Chiyotani A, Tagaya E, Konno K. Effect of macrolide antibiotics on ciliary motility in rabbit airway epithelium in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 1993;45(8):756-8.
78. Irokawa T, Sasaki T, Shimura S, Sasamori K, Oshiro T, Nara M, et al. Cholinomimetic action of macrolide antibiotics on airway gland electrolyte secretion. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 1):L951-7.
79. Tagaya E, Tamaoki J, Kondo M, Nagai A. Effect of a short course of clarithromycin therapy on sputum production in patients with chronic airway hypersecretion. *Chest* 2002;122(1):213-8.
80. Gorrini M, Lupi A, Viglio S, Pamparana F, Cetta G, Iadarola P, et al. Inhibition of human neutrophil elastase by erythromycin and flurythromycin, two macrolide antibiotics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(4):492-9.
81. Mitsuyama T, Tanaka T, Hidaka K, Abe M, Hara N. Inhibition by erythromycin of superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes through the action of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Respiration* 1995;62(5):269-73.
82. Aoshiba K, Nagai A, Konno K. Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(4):872-7.
83. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davies RJ. Effect of erythromycin on *Haemophilus influenzae* endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1995;8(9):1451-7.
84. Lin HC, Wang CH, Liu CY, Yu CT, Kuo HP. Erythromycin inhibits beta2-integrins (CD11b/CD18) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils. *Respir Med* 2000;94(7):654-60.

85. Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 1996;63(1):42-8.
86. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M, et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):266-71.
87. Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, Akiyama N, Sato M, Ito K. Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(4):907-11.
88. Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Oshima T, Takasaka T. Effects of long-term low-dose macrolide administration on neutrophil recruitment and IL-8 in the nasal discharge of chronic sinusitis patients. *Tohoku J Exp Med* 1997;182(2):115-24.
89. Tamaoki J, Kondo M, Kohri K, Aoshiba K, Tagaya E, Nagai A. Macrolide antibiotics protect against immune complex-induced lung injury in rats: role of nitric oxide from alveolar macrophages. *J Immunol* 1999;163(5):2909-15.
90. Kohri K, Tamaoki J, Kondo M, Aoshiba K, Tagaya E, Nagai A. Macrolide antibiotics inhibit nitric oxide generation by rat pulmonary alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2000;15(1):62-7.
91. Yamamoto M, Kondo A, Tamura M, Izumi T, Ina Y, Noda M. [Long-term therapeutic effects of erythromycin and newquinolone antibacterial agents on diffuse panbronchiolitis]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1990;28(10):1305-13.
92. Kudoh S, Uetake T, Hagiwara K, Hirayama M, Hus LH, Kimura H, et al. [Clinical effects of low-dose long-term erythromycin chemotherapy on diffuse panbronchiolitis]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1987;25(6):632-42.
93. Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):1829-32.
94. Kadota J, Sakito O, Kohno S, Sawa H, Mukae H, Oda H, et al. A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(1):153-9.
95. Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(1):21-8.
96. Equi A, Balfour-Lynn IM, Bush A, Rosenthal M. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* 2002;360(9338):978-84.
97. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002;57(3):212-6.
98. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Jama* 2003;290(13):1749-56.
99. Koh YY, Lee MH, Sun YH, Sung KW, Chae JH. Effect of roxithromycin on airway responsiveness in children with bronchiectasis: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Respir J* 1997;10(5):994-9.
100. Tsang KW, Ho PI, Chan KN, Ip MS, Lam WK, Ho CS, et al. A pilot study of low-dose erythromycin in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999;13(2):361-4.
101. Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and

- chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* 2005;55(1):10-21.
102. Cymbala AA, Edmonds LC, Bauer MA, Jederlinic PJ, May JJ, Victory JM, et al. The disease-modifying effects of twice-weekly oral azithromycin in patients with bronchiectasis. *Treat Respir Med* 2005;4(2):117-22.
103. Yates B, Murphy DM, Forrest IA, Ward C, Rutherford RM, Fisher AJ, et al. Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(6):772-5.
104. Georgitis JW, Matthews BL, Stone B. Chronic sinusitis: characterization of cellular influx and inflammatory mediators in sinus lavage fluid. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;106(4):416-21.
105. Nishi K, Mizuguchi M, Tachibana H, Ooka T, Amemiya T, Myou S, et al. [Effect of clarithromycin on symptoms and mucociliary transport in patients with sino-bronchial syndrome]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1995;33(12):1392-1400.
106. Kimura N, Nishioka K, Nishizaki K, Ogawa T, Naitou Y, Masuda Y. Clinical effect of low-dose, long-term roxithromycin chemotherapy in patients with chronic sinusitis. *Acta Med Okayama* 1997;51(1):33-7.
107. MacLeod CM, Hamid QA, Cameron L, Tremblay C, Brisco W. Anti-inflammatory activity of clarithromycin in adults with chronically inflamed sinus mucosa. *Adv Ther* 2001;18(2):75-82.
108. Yamada T, Fujieda S, Mori S, Yamamoto H, Saito H. Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. *Am J Rhinol* 2000;14(3):143-8.
109. Ichimura K, Shimazaki Y, Ishibashi T, Higo R. Effect of new macrolide roxithromycin upon nasal polyps associated with chronic sinusitis. *Auris Nasus Larynx* 1996;23:48-56.
110. Hatipoglu U, Rubinstein I. Low-dose, long-term macrolide therapy in asthma: An overview. *Clin Mol Allergy* 2004;2(1):4.
111. Gotfried MH. Macrolides for the treatment of chronic sinusitis, asthma, and COPD. *Chest* 2004;125(2 Suppl):52S-60S; quiz 60S-61S.
112. Garey KW, Alwani A, Danziger LH, Rubinstein I. Tissue reparative effects of macrolide antibiotics in chronic inflammatory sinopulmonary diseases. *Chest* 2003;123(1):261-5.
113. Sugiyama Y, Yanagisawa K, Tominaga SI, Kitamura S. Effects of long-term administration of erythromycin on cytokine production in rat alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999;14(5):1113-6.
114. Abe S, Nakamura H, Inoue S, Takeda H, Saito H, Kato S, et al. Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22(1):51-60.
115. Adachi T, Motojima S, Hirata A, Fukuda T, Kihara N, Kosaku A, et al. Eosinophil apoptosis caused by theophylline, glucocorticoids, and macrolides after stimulation with IL-5. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(6 Pt 2):S207-15.
116. Sato E, Nelson DK, Koyama S, Hoyt JC, Robbins RA. Erythromycin modulates eosinophil chemotactic cytokine production by human lung fibroblasts in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):401-6.
117. Morikawa K, Watabe H, Araake M, Morikawa S. Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(6):1366-70.

118. Cazzola M, Salzillo A, Diamare F. Potential role of macrolides in the treatment of asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000;55(3):231-6.
119. Shimane T, Asano K, Mizutani T, Suzaki H. Inhibitory action of roxithromycin on tumour necrosis factor- α production from mast cells in vitro. *In Vivo* 1999;13(6):503-6.
120. Terao H, Asano K, Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitsu T, et al. Suppressive activity of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Mediators Inflamm* 2003;12(4):195-202.
121. Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1-3):209-29.
122. Jaffe A, Bush A. Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2001;31(6):464-73.
123. Rubin BK, Tamaoki J. Macrolide antibiotics as biological response modifiers. *Curr Opin Investig Drugs* 2000;1(2):169-72.
124. Zalewska-Kaszubska J, Gorska D. Anti-inflammatory capabilities of macrolides. *Pharmacol Res* 2001;44(6):451-4.
125. Anderson R, Theron AJ, Feldman C. Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation* 1996;20(6):693-705.
126. Weinberger M, Hudgel D, Spector S, Chidsey C. Inhibition of theophylline clearance by troleandomycin. *J Allergy Clin Immunol* 1977;59(3):228-31.
127. Garey KW, Rubinstein I, Gotfried MH, Khan IJ, Varma S, Danziger LH. Long-term clarithromycin decreases prednisone requirements in elderly patients with prednisone-dependent asthma. *Chest* 2000;118(6):1826-7.
128. Miyatake H, Suzuki K, Taki F, Takagi K, Satake T. Effect of erythromycin on bronchial hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma. *Arzneimittelforschung* 1991;41(5):552-6.
129. Amayasu H, Yoshida S, Ebana S, Yamamoto Y, Nishikawa T, Shoji T, et al. Clarithromycin suppresses bronchial hyperresponsiveness associated with eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84(6):594-8.
130. Shoji T, Yoshida S, Sakamoto H, Hasegawa H, Nakagawa H, Amayasu H. Anti-inflammatory effect of roxithromycin in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29(7):950-6.
131. Kamoi H, Kurihara N, Fujiwara H, Hirata K, Takeda T. The macrolide antibacterial roxithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in patients with asthma. *J Asthma* 1995;32(3):191-7.
132. Ekici A, Ekici M, Erdemoglu AK. Effect of azithromycin on the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *J Asthma* 2002;39(2):181-5.
133. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(2):148-55.
134. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, Pigozzi R, Costella S, Loiacono A, et al. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007;28(2):194-8.
135. Esposito S, Principi N. Asthma in children: are chlamydia or mycoplasma involved? *Paediatr Drugs* 2001;3(3):159-68.

136. Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR, Blasi F, Allegra L, Wlodarczyk J, et al. Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J* 2000;15(2):254-9.
137. Ferrari M, Poli A, Olivieri M, Verlato G, Tardivo S, Nicolis M, et al. Respiratory symptoms, asthma, atopy and *Chlamydia pneumoniae* IgG antibodies in a general population sample of young adults. *Infection* 2002;30(4):203-7.
138. Gencay M, Rudiger JJ, Tamm M, Soler M, Perruchoud AP, Roth M. Increased frequency of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1097-100.
139. Von HL, Vasankari T, Liippo K, Wahlstrom E, Puolakkainen M. *Chlamydia pneumoniae* and severity of asthma. *Scand J Infect Dis* 2002;34(1):22-7.
140. Cosentini R, Tarsia P, Canetta C, Graziadei G, Brambilla AM, Aliberti S, et al. Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir Res* 2008;9:48.
141. Kraft M, Cassell GH, Pak J, Martin RJ. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: effect of clarithromycin. *Chest* 2002;121(6):1782-8.
142. Black PN, Blasi F, Jenkins CR, Scicchitano R, Mills GD, Rubinfeld AR, et al. Trial of roxithromycin in subjects with asthma and serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(4):536-41.
143. Clementsen P, Permin H, Norn S. *Chlamydia pneumoniae* infection and its role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2002;12(2):73-9.
144. Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. The effect of oral clarithromycin on health status and sputum bacteriology in stable COPD. *Respir Med* 2005;99(2):208-15.
145. Graham V, Lasserson T, Rowe BH. Antibiotics for acute asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(3):CD002741.
146. Richeldi L, Ferrara G, Fabbri LM, Gibson PG. Macrolides for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2002(1):CD002997.
147. Richeldi L, Ferrara G, Fabbri LM, Lasserson TJ, Gibson PG. Macrolides for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(4):CD002997.
148. Cazzola M, Matera MG, Blasi F. Macrolide and occult infection in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10(1):7-14.
149. Kudoh S. Erythromycin treatment in diffuse panbronchiolitis. *Curr Opin Pulm Med* 1998;4(2):116-21.
150. Miyatake H, Taki F, Taniguchi H, Suzuki R, Takagi K, Satake T. Erythromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Chest* 1991;99(3):670-3.
151. Granovsky-Grisaru S, Ilan D, Grisaru D, Lavie O, Aboulafia I, Diamant YZ, et al. Effects of erythromycin on contractility of isolated myometrium from pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(1 Pt 1):171-4.
152. Celik H, Ayar A, Baltaci A, Tug N. Erythromycin inhibits prostaglandin F₂α-induced contractions of myometrium isolated from non-pregnant rats. *Bjog* 2002;109(9):1036-40.
153. Celik H, Ayar A, Sapmaz E. Effects of erythromycin on stretch-induced contractile activity of isolated myometrium from pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(8):697-701.
154. Celik H, Ayar A. Clarithromycin inhibits myometrial contractions in isolated human myometrium independent of stimulus. *Physiol Res* 2002;51(3):239-45.

155. Koutsoviti-Papadopoulou M, Kounenis G, Elezoglou V. Effect of erythromycin on different parts of the rabbit intestine: comparison with motilin. *Gen Pharmacol* 1994;25(1):93-6.
156. Nissan A, Mashriki Y, Zhang JM, Haskel Y, Freund HR, Hanani M. Direct inhibitory effect of erythromycin on the gallbladder muscle. *J Gastrointest Surg* 1997;1(4):331-6.
157. Nissan A, Freund HR, Hanani M. Direct inhibitory effect of erythromycin on human alimentary tract smooth muscle. *Am J Surg* 2002;183(4):413-8.
158. Nissan A, Maudlej N, Beglaibter N, Haskel Y, Freund HR, Hanani M. A direct inhibitory effect of erythromycin on rat urinary bladder smooth muscle. *J Urol* 1999;161(3):1006-9.
159. England RC, Norman RI, Elliott RA. Direct inhibition of rat detrusor muscle contraction by erythromycin. *Neurourol Urodyn* 2004;23(3):273-9.
160. Tagaya E, Tamaoki J, Konno K. Erythromycin inhibits cholinergic neuro-effector transmission in canine airway smooth muscle. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994;85(2):181-92.
161. Tamaoki J, Tagaya E, Sakai A, Konno K. Effects of macrolide antibiotics on neurally mediated contraction of human isolated bronchus. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95(4):853-9.
162. Janssen LJ, Wattie J. Electrophysiological effects of erythromycin, but lack of mechanical effects, in airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2003;475(1-3):93-7.
163. Liu H, Zhu T, Ma Y, Qu S. Effect of erythromycin on contractile response of uterine smooth muscle strips in non-pregnant rats. *Pol J Pharmacol* 2003;55(1):57-62.
164. Vaali K, Li L, Lahteenmaki T, Vapaatalo H. Role of BK(Ca) channels and cyclic nucleotides in synergistic relaxation of trachea. *Eur J Pharmacol* 2000;399(1):75-84.
165. Sukkar MB, Hughes JM, Armour CL, Johnson PR. Tumour necrosis factor-alpha potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* 2001;6(3):199-203.
166. Anticevich SZ, Hughes JM, Black JL, Armour CL. Induction of human airway hyperresponsiveness by tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Pharmacol* 1995;284(1-2):221-5.
167. Sakai H, Otogoto S, Chiba Y, Abe K, Misawa M. Involvement of p42/44 MAPK and RhoA protein in augmentation of ACh-induced bronchial smooth muscle contraction by TNF-alpha in rats. *J Appl Physiol* 2004;97(6):2154-9.
168. Bourreau JP, Abela AP, Kwan CY, Daniel EE. Acetylcholine Ca²⁺ stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol* 1991;261(3 Pt 1):C497-505.
169. Qian Y, Bourreau JP. Two distinct pathways for refilling Ca²⁺ stores in permeabilized bovine trachealis muscle. *Life Sci* 1999;64(22):2049-59.
170. Navarro H, Arruebo MP, Alcalde AI, Sorribas V. Effect of erythromycin on D-galactose absorption and sucrase activity in rabbit jejunum. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71(3-4):191-4.
171. Gaeta GB, Utili R, Adinolfi LE, Abernathy CO, Giusti G. Characterization of the effects of erythromycin estolate and erythromycin base on the excretory function of the isolated rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;80(2):185-92.
172. Huang R, Wang CL. A caldesmon peptide activates smooth muscle via a mechanism similar to ERK-mediated phosphorylation. *FEBS Lett* 2006;580(1):63-6.

173. Kordowska J, Huang R, Wang CL. Phosphorylation of caldesmon during smooth muscle contraction and cell migration or proliferation. *J Biomed Sci* 2006;13(2):159-72.
174. Wang CL. Caldesmon and smooth-muscle regulation. *Cell Biochem Biophys* 2001;35(3):275-88.
175. Mirzapoiiazova T, Kolosova IA, Romer L, Garcia JG, Verin AD. The role of caldesmon in the regulation of endothelial cytoskeleton and migration. *J Cell Physiol* 2005;203(3):520-8.