



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Π.Α. ΜΟΥΥΒΔΑΣ**

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ
ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO) ΣΤΟΥΣ ΑΕΡΑΓΩΓΟΥΣ**

**Ευδοξία Κιτσιοπούλου
Ιατρός Αναισθησιολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2012**

© 2012 Ευδοξία Κιτσιοπούλου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ (επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ (επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΧΑΤΖΗΘΕΟΦΙΛΟΥ

αφ. Καθηγητής Χειρουργικής

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΡΕΤΖΑΚΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Αναισθησιολογίας

ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας

ΧΡΥΣΑ ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΦΕΖΟΥΛΙΔΗΣ

**Στους δασκάλους μου,
Α. Χατζηευθυμίου, Π.Α. Μολοβδά, Κ. Γουργουλιάνη**

Στον Αργύρη και στον Δημοσθένη

Ευχαριστίες

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Α. Χατζηευθυμίου για την συνεχή και ουσιαστική καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε σε κάθε φάση της δημιουργίας της διδακτορικής μου διατριβής, για τις πολύτιμες συμβουλές και διορθώσεις της, καθώς και για τη συνεχή ανθρώπινη στήριξη σε κρίσιμες φάσεις της εργασίας μου.

Επίσης δεν θέλω να παραλείψω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον καθηγητή κ. Κ. Γουργουλιάνη και στον καθηγητή κ. Α.Π. Μολυβδά για τη δυνατότητα ανάληψης αυτής της διδακτορικής διατριβής και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στον τεχνικό του εργαστηρίου κ. Ι. Μακαντάση για την αποτελεσματική και άμεση παρέμβασή του σε οποιοδήποτε τεχνικό πρόβλημα προέκυψε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος ένα θερμό ευχαριστώ θέλω να απευθύνω στην μητέρα μου για τη συνολική της συμπαράσταση σε κάθε μου βήμα που επέτρεψε την επιτυχή διεκπεραίωση των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	19
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	37
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
1. Το αναπνευστικό σύστημα	39
2. Λείες μυϊκές ίνες (ΛΜΙ)	41
2.1 Δομή-Ταξινόμηση	41
2.2 Μηχανισμός σύσπασης	43
2.3 Ο ρόλος του φορτίου στη σύσπαση των ΛΜΙ	45
3. Ιοντικοί διάυλοι-αντλίες ιόντων στις λείες μυϊκές ίνες του αναπνευστικού	46
4. Το επιθήλιο των αεραγωγών	48
4.1 Δομή του επιθηλίου	48
4.2 Ο λειτουργικός ρόλος του επιθηλίου	50
4.3 Ο ρόλος του επιθηλίου στην παθογένεια νόσων του αναπνευστικού	52
5. Μονοξειδίο του αζώτου (NO)	53
5.1 Σύνθεση του NO	53
5.2 Δράση του NO	56
5.3 Δράση του NO στους αεραγωγούς	57
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	63
1. Προετοιμασία ιστού και πειράματα συστολών	65
2. Μελέτη της επίδρασης της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου	70
3. Μελέτη της επίδρασης φαρμακευτικών ουσιών	70
3.1 Αναστολείς της συνθέσεως του NO (NOS)	70
3.2 Αναστολείς φωσφορυλίωσης	70
3.3 Ανταγωνιστές τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου	70
3.4 Εξωγενής χορήγηση πρόδρομης ουσίας σχηματισμού NO	70
4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
1. Μελέτη της επίδρασης της τάσης ηρεμίας (RT) στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ	75
1.1. Μελέτη της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη (ACh) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM	75
1.2 Μελέτη της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 0.2 mM	76

1.3 Σύγκριση της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM υπό RT 0.5 g και 2.5 g	77
1.4 Μελέτη της επίδρασης της RT στην παθητική τάση των ΛΜΙ σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM	78
2. Μελέτη της επίδρασης της RT στην παραγωγή NO	79
2.1 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της NOS, L-NAME σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM	79
2.2 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της NOS, L-NAME στην παθητική τάση του ιστού που αναπτύσσεται όταν εφαρμόζεται στον ιστό RT 2.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM και 0.2mM	81
2.3 Μελέτη της επίδρασης του ειδικού ανταγωνιστή της iNOS, SMT σε συγκέντρωση ασβεστίου 2 mM	82
2.4 Μελέτη της επίδρασης του ειδικού ανταγωνιστή της nNOS, 7-NI σε συγκέντρωση ασβεστίου 2 mM	83
2.5 Μελέτη της επίδρασης του σχετικού ανταγωνιστή της eNOS, L-NIO σε συγκέντρωση ασβεστίου 2 mM	84
3. Μελέτη της επίδρασης της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου στην παραγωγή NO	85
3.1 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθάσης του NO, L-NAME υπό τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 0.2 mM	85
3.2 Μελέτη της επίδρασης του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh, σε τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM	87
4. Μελέτη της επίδρασης των αναστολέων φωσφορυλίωσης της τυροσίνης Erbstatin A και Genistein στην παραγωγή NO	88
4.1 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh, σε τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM	88
4.2 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Genistein στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh, σε τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM	89
5. Μελέτη της επίδρασης της L-αργινίνης στην παραγωγή NO	90
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	105
ABSTRACT	109
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Προσωπικά στοιχεία:

Όνοματεπώνυμο: Ευδοξία Κιτσιοπούλου

Πατρώνυμο: Αργύρης

Μητρώνυμο: Μαρία

Ημερομηνία γέννησης: 26/02/1966

Τόπος γέννησης: Θεσσαλονίκη

Διεύθυνση κατοικίας: Πέτρας 1, 40 Εκκλησιές, ΤΚ 54636, Θεσσαλονίκη

e-mail: ekitsiouroulou@yahoo.gr

Εκπαίδευση:

1983: Απολυτήριο 18^{ου} Γενικού Λυκείου Θεσσαλονίκης

1989: Πτυχίο Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επιστημών Υγείας του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης

2001: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με γενικό βαθμό «Λίαν καλώς»

2008: Απόκτηση τίτλου Ιατρικής ειδικότητας Αναισθησιολογίας

Μεταπτυχιακό:

2007-2008: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Επείγουσας Ιατρικής (ΕΠΙ) του ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκης.

Μετεκπαίδευση:

2002: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Advanced Trauma Life Support (ATLS) του Αμερικάνικου Κολεγίου Χειρουργών.

2004: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Advanced Life Support (ALS) του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης.

2005: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Basic Life Support (BLS). (Εκπαίδευση στην Βασική υποστήριξη της ζωής – Αυτόματη εξωτερική απινίδωση και Βασικοί χειρισμοί στον αεραγωγό) του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης.

2006: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Advanced Trauma Life Support (ATLS) του Αμερικάνικου Κολεγίου Χειρουργών.

2007: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Εξειδικευμένης Διαχείρισης του Αεραγωγού, Ελληνική Εταιρεία Διαχείρισης Αεραγωγού, ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκη.

2007: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Pediatric Life Support (PLS), Εθνική Επιτροπή Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης του ΚΕΣΥ, ΕΚΑΒ

Θεσσαλονίκη.

2007: Πιστοποιητικό συμμετοχής και επιτυχούς ολοκλήρωσης του προγράμματος Advanced Life Support (ALS) του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Αναζωογόνησης.

2007: Ολοκλήρωση των 6 (έξι) Σεμιναρίων Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στην Αναισθησιολογία, της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος υπό την Αιγίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FEEA)

2007: Παρακολούθηση του εκπαιδευτικού προγράμματος με θέμα «Patient-Crisis-Emergency Management» 46 ωρών του Berlin School of Economics και του Διαβαλκανικού Ινστιτούτου Δημόσιας Διοίκησης, Βερολίνο.

Επαγγελματική σταδιοδρομία:

1989-2001: Εργάστηκα ως Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων στο Ορολογικό Εργαστήριο, της έδρας της Μικροβιολογίας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

2001-2002: Εργάστηκα ως Αγροτικός Ιατρός στο Κ.Υ. Γόννων και στο “Κουτλιμπάνειο και Τριανταφύλλειο” Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

2002-2003: Εργάστηκα ως Ειδικευόμενη Αναισθησιολόγος στο Γενικό Νοσοκομείο Κατερίνης.

2003-2005: Εργάστηκα ως Ειδικευόμενη Αναισθησιολόγος στο ΠΠΓΝ Λάρισας.

2005-2008: Εργάστηκα ως Ειδικευόμενη Αναισθησιολόγος στο ΠΠΓΝ Θεσσαλονίκης “ΑΧΕΠΑ”.

2008-2009: Εργάστηκα ως Αναισθησιολόγος στη Γενική κλινική Θεσσαλονίκης.

2009 μέχρι και σήμερα εργάζομαι ως Αναισθησιολόγος στο ΠΓΝ Θεσσαλονίκης “Παπαγεωργίου”.

Εκπαιδευτική εμπειρία:

Δίδαξα στη σχολή «Διασωστών – Πληρωμάτων Ασθενοφόρων» του ΙΕΚ ΕΚΑΒ Λάρισας κατά το β' εξάμηνο του 2004-2005, τις ενότητες «Δηλητηριάσεις» και «Εξαρτησιογόνα».

Δίδαξα στη σχολή «Διασωστών – Πληρωμάτων Ασθενοφόρων» του ΙΕΚ ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκης κατά το α' εξάμηνο του 2005-2006, την ενότητα «Επισκόπηση πάσχοντος».

Συμμετείχα στο Επιστημονικό, Εργαστηριακό, Προπτυχιακό και Μετεκπαιδευτικό έργο της Κλινικής Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας του ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ του ΑΠΘ κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2007-2008 και συγκεκριμένα στο πρόγραμμα «Αναισθησιολογία», στους φοιτητές του Ζ' Εξαμήνου της Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ.

Επιστημονικές εργασίες:

1. Περιφερικοί νευρικοί αποκλεισμοί: Αναισθησία και αναλγησία σε ορθοπαιδικές επεμβάσεις κάτω άκρων. Η εμπειρία ενός χρόνου. Γ Σταματίου, Μ Σημαιοφορίδου, Σ Γεωργοπούλου, Ε Θεοδώρου, Ε Κιτσιοπούλου, Δ Μπάγκα, Χ Δηλημίτης, Β Μήτηλης, Δ Μιχαλούδης. Αναισθησιολογική κλινική

ΠΠΝΛ. Β Ζάχος, . Ζιμπής, Μ Χαντές, Θ Καραχάλιος. Ορθοπαιδική κλινική ΠΠΝΛ. (Ανακοινώθηκε στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιφερειακής Αναισθησίας, Θεραπείας Πόνου και Παρηγορητικής Αγωγής). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

2. Η διεγχειρητική χορήγηση λορνοξικάμης μειώνει τις ανάγκες για μετεγχειρητική αναλγησία μετά από επεμβάσεις για αποκατάσταση κήλης με υπαραχοειδή αναισθησία. Α Τσιρογιάννη, Γ Μούτσιανος, Ι Σούμπασης, Ε Κιτσιοπούλου, Β Φυντανίδου, Ι Γκέκας, Ν Μένος. Ανασθησιολογικό τμήμα ΓΝΚατερίνης. (Ανακοινώθηκε στο 8ο Συνέδριο Ανασθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

3. Thoracic epidural blockade with chirocaine vs ropivacaine: effects on heart rate variability. Simeoforidou M, Skoularigis J, Stamatiou G, Kitsiopolou E, Tarenidis P, Kiparisopoulos D, Triposkiadis F, Michaloudis D. University Hospital of Larissa, Mezourlo Larissa, Greece. (XXIV Annual ESRA Congress, Berlin, 2005). Supplement to Regional Anesthesia and Pain Medicine, September-October 2005, Volume 30, Number 5, Supplement 1

4. Surgery on the foot and ankle performed with peripheral nerve blocks at the knee. Varitimidis SE, Poultsidis LA, Dailiana Z, Passias A, Kitsiopolou E, Malizos KN. University Hospital of Larissa, Mezourlo Larissa, Greece. The Journal of Bone & Joint Surgery – British Volume, Vol 88-B, Issue SUPP I, 21

5. Resting Tension Affects eNOS Activity in a Calcium-Dependent Way in Airways. Kitsiopolou E, Hatziefthimiou A, Gourgoulisanis K¹, Molyvdas PA. Department of Physiology, Medical School, University of Thessaly, Greece. ¹Department of Respiratory Medicine, Medical School, University of Thessaly, Greece. Mediators of Inflammation, vol. 2007, Article ID 24174, 6 pages, 2007

6. Διαχωριστικά ανευρύσματα ανιούσας θωρακικής αορτής: Συσχέτιση διεγχειρητικών τιμών εγκεφαλικής οξυμετρίας και νευρολογικής έκβασης των ασθενών. Αργυριάδου Ε, Δρακωτού Λ, Γερολιόλιου Α, Θωμαΐδου Ε, Κανναμίμπου Ν, Κιτσιοπούλου Ε, Κώτσο Ε, Βασιλάκος Δ. Κλινική Ανασθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. Παπακωνσταντίνου Χ. Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς και Θώρακα ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

7. Η αναλγησία μετά από θωρακοτομή με συνεχή χορήγηση ροπιβακαΐνης μέσω υποπλεύριου καθετήρα επηρεάζει την ταχύτητα αποδέσμευσης από τον μηχανικό αερισμό και την συνολική διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ. Αργυριάδου Ε, Κτενιαδάκης Ν, Παπακωνσταντίνου Π, Θωμαΐδου Ε, Κιτσιοπούλου Ε, Κανναμίμπου Ν, Παρλαπάνη Α. Κλινική Ανασθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. Φορούλης Χ, Παπακωνσταντίνου Χ. Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς και Θώρακα ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

8. Η κλίμακα Euroscore και οι χρόνοι εξώσωματικής και αποκλεισμού της αορτής συνιστούν

παράγοντες κινδύνου σε ασθενείς μετά αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Αργυριάδου Ε, Κανναμίμπονα Ν, Κτενιαδάκης Ν, Θωμαΐδου Ε, Κιτσιοπούλου Ε, Γερολιόλιου Α, Παρλαπάνη Α. Κλινική Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

9. Η τιμή εκκίνησης της εγκεφαλικής οξυμετρίας σε καρδιοχειρουργικούς ασθενείς ως προγνωστικός δείκτης. Αργυριάδου Ε, Κτενιαδάκης Ν, Κιτσιοπούλου Ε, Θωμαΐδου Ε, Κώτσο Ε, Κανναμίμπονα Ν, Βασιλάκος Δ. Κλινική Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

10. Monitoring αναισθητικών αερίων (πτητικά, N₂O, N₂) Κιτσιοπούλου Ε. Κλινική Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. Δημοσιεύτηκε στο περιοδικό «Θέματα Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής» έκδοση της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος

11. Αδυναμία προσδιορισμού εγκεφαλικής οξυμετρίας σε ασθενή με αλκαπτονουρία. Αργυριάδου Ε, Θωμαΐδου Ε, Κανναμίμπονα Ν, Κιτσιοπούλου Ε, Κλινική Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. Αναστασιάδης Κ. Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς και Θώρακα ΑΠΘ ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

12. Τιτλοποίηση της δόσης της πρεγκαμπαλίνης σε συνδυασμό με περιφερικούς αποκλεισμούς, για την αντιμετώπιση της μεθερπητικής νευραλγίας στους ηλικιωμένους ασθενείς. Μαϊδάτση Π, Ζαραλίδου Α, Κιτσιοπούλου Ε, Αμανίτη Α, Χατζάρας Π, Βασιλάκος Δ. Αναισθησιολογική Κλινική ΑΠΘ, Μονάδα Πόνου ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος– Επιλεγμένη εργασία). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

13. Μεταβολές του διαφασματικού δείκτη (BIS) σε ασθενείς με σημειολογία εγκεφαλικού θανάτου: Νεότερα δεδομένα. Γροσομανίδης Β, Ουραήλογλου Β, Χατζάρας Π, Κιτσιοπούλου Ε, Τσακιρίδου Σ, Θεοδοσιάδης Π, Σκούρτης Χ. Κλινική Αναισθησιολογίας και Μονάδας Εντατικής Θεραπείας ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος– Επιλεγμένη εργασία). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

14. Συγκριτική κλινική εκτίμηση του συστήματος Flotrac/Vigileo™ με καθιερωμένη μέθοδο μέτρησης συνεχούς καρδιακής παροχής σε χειρουργικές επεμβάσεις κοιλίας. Καρακούλας Κ, Τρικούπη Α, Τσαούση Γ, Κιτσιοπούλου Ε, Γεωργιάδης Μ, Κολέττας Α, Βασιλάκος Δ. Κλινική Αναισθησιολογίας και Μονάδας Εντατικής Θεραπείας ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ. (Ανακοινώθηκε στο 10ο

Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος– Επιλεγμένη εργασία). Δημοσιεύτηκε στο τεύχος περιλήψεων

15. Intraoperative anaphylaxis caused by penicilline in a paediatric patient. A case report. 2011. Kitsiopolou E, Soumpasis I, Zarmakoupis A, Schiza E, Bacola A, Petropoulou P. Department of Anaesthesiology, Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece (Ανακοινώθηκε στο 3ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Παιδιατρικής Αναισθησιολογίας).

16. Comparison of two anaesthesia induction techniques on neuroendocrine stress response associated with laryngoscopy and endotracheal intubation (LETI) in paediatric surgical patients: a randomized prospective study (preliminary data). 2011. Kitsiopolou E¹, Zouka M¹, Polychroniou A¹, Mamyanidis E¹, Pavlitou A², Petropoulou P¹. ¹Department of Anesthesiology, “Papageorgiou” General Hospital, Thessaloniki, Greece ²Department of Immunology, “Papageorgiou” General Hospital, Thessaloniki, Greece (Ανακοινώθηκε στο 3ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Παιδιατρικής Αναισθησιολογίας).

Συνεχής κατάρτιση-Σεμινάρια-Συνέδρια:

09/2002: 7ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής, Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος, Καλλιθέα Χαλκιδικής.

09/2002: 1η Επιστημονική Ημερίδα Επείγουσας και Εντατικής Θεραπείας Παιδών Βορείου Ελλάδος, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδών ΓΠΝ Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης.

11/2002: 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Πόνου, Ελληνική Εταιρεία Πόνου, Ελληνικό Τμήμα της IASP, Καρπενήσι.

12/2002: Διήμερο Εντατικής Θεραπείας, Βασική και Κλινική Έρευνα, Αθήνα.

05/2003: 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας. Ελληνική Αναισθησιολογική Εταιρεία. Χερσόνησος Κρήτης.

10/2003: 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιτομικής Αναισθησίας, Θεραπείας Πόνου και Παρηγορητικής Αγωγής. Δελφοί.

10/2003: 2η Επιστημονική Ημερίδα Επείγουσας και Εντατικής Θεραπείας Παιδών Βορείου Ελλάδος, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδών ΓΠΝ Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης.

11/2003: Επιστημονική Ημερίδα της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος με θέμα: «Λειτουργία του Τμήματος Επειγόντων Περιστατικών». Νεοχώρι Καρδίτσας.

02/2004: Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα της Ομάδας Υπεζωκότα της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας, του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα: «Νοσήματα του Υπεζωκότα». Λάρισα.

03,04/2004: Σεμινάριο με θέμα «Πρακτική στατιστική ανάλυση δεδομένων – Στατιστικά πακέτα Η/Υ» του Εργαστηρίου Βιομαθηματικών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Λάρισα.

09/2004: 8ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής, Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος, Κασσάνδρα-Χαλκιδική.

10/2004: Κλινικό φροντιστήριο με θέμα «Ο Δύσκολος Αεραγωγός». Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος.

10/2004: 7ο Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος. Λάρισα.

11/2004: 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Πόνου. Ελληνική Εταιρεία Πόνου. Ελληνικό Τμήμα IASP & EFIC. Καστοριά.

12/2004: 1ο Σεμινάριο Μαιευτικής Αναισθησίας – Αναλγησίας με θέμα «Υπερτασική Νόσος της Κύησης». Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος. Θεσσαλονίκη.

03/2005: Σεμινάριο ταχείας διακίνησης στην αναισθησία (Fast Track Anesthesia) του Αναισθησιολογικού τμήματος του Αρεταίειου Νοσοκομείου της Ιατρικής σχολής του Καποδίστριου Πανεπιστημίου Αθηνών. Αθήνα

02/2006: 2ο Σεμινάριο Μαιευτικής Αναισθησίας – Αναλγησίας με θέμα «Μαιευτική Αναισθησία – Αιματολογικά Προβλήματα». Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος. Θεσσαλονίκη.

09/2006: 9ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής, Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος, Σιθωνία-Χαλκιδική.

09/2006: Κλινικό φροντιστήριο με θέμα: Βασική διοισοφάγειος υπερηχοκαρδιογραφία, Σιθωνία-Χαλκιδική.

09/2006: Κλινικό φροντιστήριο με θέμα: Εξειδικευμένη διοισοφάγειος υπερηχοκαρδιογραφία, Σιθωνία-Χαλκιδική.

02/2007: 3ο Σεμινάριο Μαιευτικής Αναισθησίας – Αναλγησίας με θέμα «Τοκετός, με πόνο ή χωρίς;». Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος. Θεσσαλονίκη.

02/2007: 4ο Διανοσοκομειακό Σεμινάριο με θέμα «Αναπνευστική ανεπάρκεια και αποκατάσταση. Απεικονιστικές μέθοδοι στη ΜΕΘ – Μη επεμβατικός Μηχανικός Αερισμός», ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκη.

02/2007: Εφαρμοσμένο σεμινάριο με θέμα «Ακτινογραφία πνεύμονα: ένα παλιό χρήσιμο μέσο», ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκη.

02/2007: Εφαρμοσμένο σεμινάριο με θέμα «Εφαρμογή υπερήχων στη ΜΕΘ», ΕΚΑΒ Θεσσαλονίκη.

03/2007: 4η Επιστημονική Ημερίδα Επείγουσας και Εντατικής Θεραπείας Παιδών Βορείου Ελλάδος, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδών ΓΠΝ Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης.

06/2007: 11ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο «Βασικές Αρχές Μηχανικού Αερισμού», Κλινική Εντατικής Θεραπείας Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτη.

11/2007: Παρακολούθηση του εκπαιδευτικού προγράμματος με θέμα «Patient – Crisis _ Emergency

Management” 46 ωρών του Berlin School of Economics και του Διαβαλκανικού Ινστιτούτου Δημόσιας Διοίκησης, Βερολίνο.

03/2008: Παρακολούθηση του σεμιναρίου «Κλινική Εφαρμογή Αναισθησίας με Εισπνεόμενα». ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ.

06/2008: Πανερωπαϊκό συνέδριο Αναισθησιολογίας, Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αναισθησιολογίας, Κοπεγχάγη, Δανία.

09/2008: 10ο Συνέδριο Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής, Εταιρεία Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδος, Σιθωνία-Χαλκιδική.

06/2010: Πανερωπαϊκό συνέδριο Αναισθησιολογίας, Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αναισθησιολογίας, Ελσίνκι, Φινλανδία.

09/2011: Πανερωπαϊκό συνέδριο Παιδιατρικής Αναισθησιολογίας, Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αναισθησιολογίας, Πάλμα ντε Μαγιόρκα, Ισπανία.

Ειδικές γνώσεις:

Γνώση Αγγλικών

Γνώση Η/Υ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NO: μονοξειδίο του αζώτου
NOS: συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
eNOS: δομική συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
iNOS: επαγωγίμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
nNOS: νευρωνική συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
eNOS: επιθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
ACh: ακετυλοχολίνη
AMI: λείες μυϊκές ίνες
RT: τάση ηρεμίας
cAMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
nAChR: νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης
mAChR: μουσκαρινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης
AChE: ακετυλοχολινεστεράση
KCl: χλωριούχο κάλιο
NANC: μη αδρενεργικό μη χολινεργικό νευρικό σύστημα
eNANC: διεγερτικό μη αδρενεργικό μη χολινεργικό νευρικό σύστημα
iNANC: ανασταλτικό μη αδρενεργικό μη χολινεργικό νευρικό σύστημα
VIP: αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο
NPY: νευροπεπτίδιο Y
SP: ουσία P
GABA: γ-αμινοβουτυρικό οξύ
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη
GC: γουανυλική κυκλάση
GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη
cGMP: κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
NKA: νευροκινίνη A
CGRP: πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης
MLC: ελαφρά αλύσος της μυοσίνης
SR: σαρκοπλασματικό δίκτυο
CAM: ασβεστιοκαλμοδουλίνη
MLCK: κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης
SERCA: ασβεστιοΑΤΡάση του σαρκοπλασματικού/ενδοπλασματικού δικτύου
EMTU: επιθηλιακή μεσεγχυματική τροφική μονάδα
L-NAME: Nω-Nitro-L-Arginine Methylester
XAI: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

EDRF: ενδοθηλιακός παράγοντας χάλασης
NADPH: αναγόμενη μορφή του φωσφορικού νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου
FAD: φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
FMN: φλαβινομονονουκλεοτίδιο
FMNH: αναγόμενη μορφή του φλαβινομονονουκλεοτιδίου
H₄B: τετραϋδροβιοπτερίνη
NOSoxy: οξυγενάση
NMDA: ν-μεθυλικό-δ-ασπαρτικό οξύ
AHR: υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών
SMT: S-Methylsithiourea
7-NI: 7-Nitroindazole
L-NIO: L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride
DMSO: dimethyl sulfoxide
CCh: καρβαχόλη
ASM: λείες μυϊκές ίνες
PIP₂: φωσφατιδυλινοσιτόλη
IP₃: τριφωσφορική ινοσιτόλη
DAG: διακυλγλυκερόλη
AC: αδενυλική κυκλάση
MLCP: φωσφατάση της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης
PKC: πρωτεϊνική κινάση C
PKA: πρωτεϊνική κινάση A

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στους αεραγωγούς, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) εκλύεται από μια ποικιλία κυττάρων όπως επιθηλιακών, νευρικών και κυττάρων της φλεγμονής ^[1]. Το NO είναι το τελικό προϊόν της μετατροπής της L-αργινίνης σε L-κιτροουλίνη και η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Λειτουργικά, η NOS διακρίνεται στη δομική (cNOS) και στην επαγωγίμη μορφή (iNOS). Οι δομικές ισομορφές του ενζύμου, η νευρωνική (nNOS) και η επιθηλιακή (eNOS), φαίνεται πως προστατεύουν τους αεραγωγούς από την υπερβολική σύσπασή τους ενώ η επαγωγίμη μορφή (iNOS), έχει ενεργό ρόλο σε φλεγμονώδεις διαταραχές των αεραγωγών όπως το άσθμα ^[2].

Η cNOS ενεργοποιείται μετά από αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου. Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της καλμοδουλίνης στο ένζυμο, την ενεργοποίησή του και την επακόλουθη απελευθέρωση μικρών ποσοτήτων NO για μικρό χρονικό διάστημα ^[3].

Μελέτες που έγιναν σε αγγεία δείχνουν ότι η eNOS είναι δυνατό να διεγερθεί μέσω δυο τουλάχιστον οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει τη σύνδεση ακετυλοχολίνης (ACh), ισταμίνης ή βραδυκινίνης στον αντίστοιχο υποδοχέα και την επακόλουθη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου. Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την επίδραση ενός μηχανικού ερεθίσματος, όπως αυτό που προκαλεί η ροή του αίματος στο τοίχωμα των αγγείων (shear stress) που οδηγεί στην φωσφορυλίωση του ενζύμου και την ενεργοποίησή του ^[4].

Κατά τη διάρκεια της εισπνοής-εκπνοής μεταβάλλεται τόσο το μήκος των λείων μυϊκών ινών (ΛΜΙ) των αεραγωγών, όσο και το φορτίο που ασκείται σ' αυτές. Οι μεταβολές του μήκους των ΛΜΙ αποτελούν σήματα που μπορούν να ρυθμίσουν την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ. Εκτός από τους μηχανισμούς που αφορούν τις ΛΜΙ αυτές κάθε αυτές, το επιθήλιο φαίνεται να αποτελεί και αυτό σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα. Η διάταση του επιθηλίου οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης των προστανοειδών μέσω απενεργοποίησης της κυκλοοξυγενάσης. Μελέτες σε επιθηλιακά κύτταρα τραχείας κουνελιού υποδηλώνουν την ύπαρξη τασεο-εξαρτώμενων διαύλων με αποτέλεσμα ένα μηχανικό ερέθισμα να οδηγεί σε μεταβολές στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} και στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της σύσπασης των ΛΜΙ ^[5-8].

Από τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα φαίνεται ότι η ικανότητα των αεραγωγών να παράγουν NO μεταβάλλεται όταν μεταβάλλεται το φορτίο που επιδρά σε αυτούς. Συγκεκριμένα, στην τραχεία των κουνελιών το επιθήλιο των αεραγωγών επηρεάζει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ακετυλοχολίνη ανάλογα με την τάση ηρεμίας που εφαρμόζεται στον ιστό ^[9, 10]. Η ανταποκρισιμότητα αυτή επηρεάζεται, εν μέρει τουλάχιστον, μέσω της απελευθέρωσης NO. Ωστόσο δεν υπάρχουν, μέχρι σήμερα μελέτες που να διερευνούν κατά πόσο και με ποιο μηχανισμό η μεταβολή του φορτίου που ασκείται στους αεραγωγούς μπορεί να μεταβάλλει τη

δραστικότητα της συνθετάσης του NO.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσει με ποιον μηχανισμό οι μεταβολές του φορτίου που ασκείται στους αεραγωγούς μπορούν να μεταβάλλουν τη δραστικότητα της συνθετάσης και την παραγωγή του NO από τους αεραγωγούς. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της τάσης ηρεμίας (RT) στην παραγωγή του NO παρουσία και απουσία επιθηλίου. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ασβεστιοεξαρτώμενος τρόπος της αύξησης της δραστικότητας της NOS. Τέλος μελετήθηκαν η επίδραση των αποκλειστών τασεοεξαρτώμενων διαύλων ιόντων ασβεστίου, η επίδραση των αναστολέων φωσφορυλίωσης της τυροσίνης καθώς και η επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης L-αργινίνης, στην παραγωγή του NO.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το αναπνευστικό σύστημα

Ο πνεύμονας επικοινωνεί με την ατμόσφαιρα με ένα σύστημα αεραγωγών, τις αεροφόρους οδούς. Οι αεροφόροι οδοί που βρίσκονται μεταξύ της εισόδου της μύτης και του λάρυγγα ονομάζονται ανώτερες ενώ αυτές που περιλαμβάνονται μεταξύ λάρυγγα και κυψελίδων αναφέρονται ως κατώτερες. Οι κατώτερες αεροφόροι οδοί αποτελούνται από την τραχεία, τους δύο στελεχιαίους, τους λοβαίους και τους 19 τμηματικούς βρόγχους καθώς και το σύνολο των προοδευτικών διακλαδώσεων τους μέχρι και των τελικών βρογχιολίων που είναι οι μικρότεροι αεραγωγοί χωρίς κυψελίδες ^[11].

Οι αεροφόροι οδοί, μέχρι των τελικών βρογχιολίων καλύπτονται από ψευδοπολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο. Οι κροσσοί του επιθηλίου σκεπάζονται από ένα στρώμα βλέννας, που με τις κινήσεις τους μετατοπίζεται προς την τραχεία απομακρύνοντας μηχανικά με τον τρόπο αυτό διάφορα σωματίδια. Η βλέννα εκκρίνεται από τους βλεννογόνους αδένες και από τα καλυκοειδή κύτταρα τα οποία βρίσκονται μεταξύ των κυττάρων του κροσσωτού επιθηλίου. Μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων υπάρχουν τα κύτταρα Clara τα οποία εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα καθώς και νευροεπιθηλιακά σωματίδια, τα κύτταρα του Kulztschitzky, που εκκρίνουν αγγειοκινητικές ουσίες. Τέλος στους βρόγχους υπάρχει πλούσιο δίκτυο νευρικών ινών που σχηματίζουν τους διάφορους υποδοχείς οι οποίοι διεγείρονται από μηχανικά και από χημικά ερεθίσματα ^[12].

Με εξαίρεση τους πολύ μικρούς περιφερικούς αεραγωγούς όλοι οι αεραγωγοί έχουν λείες μυϊκές ίνες στα τοιχώματά τους και υπό την επίδραση του νευρικού συστήματος παρουσιάζουν τόνο. Ο τόνος ρυθμίζει τις διαστάσεις των αεροφόρων οδών, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται οι ελάχιστες δυνατές αντιστάσεις τους με τον ελάχιστο νεκρό χώρο. Η αύξηση του τόνου των λείων μυϊκών ινών προκαλεί στένωση των αεραγωγών και αυξάνει τις αντιστάσεις τους ^[13].

Ο τόνος ηρεμίας (βαθμός σύσπασης) ελέγχεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Η ισορροπία μεταξύ συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών ερεθισμάτων διατηρεί φυσιολογικό τον τόνο των λείων μυϊκών ινών. Γενικά η διέγερση των παρασυμπαθητικών απολήξεων προκαλεί βρογχόσπασμο ενώ των συμπαθητικών απολήξεων (μέσω β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων) προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Συγκεκριμένα, η διέγερση των β_2 -υποδοχέων προκαλεί την ενεργοποίηση του ενζύμου αδενυλική κυκλάση που καταλύει τη σύνθεση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία διαχεόμενη μέσα στο κύτταρο της λείας μυϊκής ίνας προκαλεί χάλαση και βρογχοδιαστολή ^[14].

Στις συνάψεις του παρασυμπαθητικού η διαβιβαστική ουσία που απελευθερώνεται τόσο από τους προγαγγλιακούς όσο και τους μεταγαγγλιακούς νευρώνες είναι η ακετυλοχολίνη (ACh). Οι

υποδοχείς της ACh είναι δύο ειδών: οι νικοτινικοί (nAChR), οι οποίοι βρίσκονται στην δεκτική ζώνη των μεταγαγγλιακών νευρώνων στα γαγγλιακά κύτταρα του παρασυμπαθητικού και είναι ευαίσθητοι στη νικοτίνη (το κύριο αλκαλοειδές του καπνού) και οι μουσκαρινικοί (mAChR), οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στη μουσκαρίνη (ένα αλκαλοειδές που προέρχεται από τον μύκητα *Amanita muscaria*) και οι οποίοι βρίσκονται στα τελικά εκτελεστικά όργανα τα οποία δέχονται ώσεις από το αυτόνομο νευρικό σύστημα όπως είναι οι λείοι μύες των αεραγωγών. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς παρεμποδίζονται εκλεκτικά από την ατροπίνη ^[15, 16].

Η ακετυλοχολίνη προκαλεί σύσπαση των ΛΜΙ μέσω ενεργοποίησης των μουσκαρινικών υποδοχέων η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της. Μετά τη δέσμευση της ACh στην α ομάδα των υποδοχέων της και τη διάνοιξη των ιοντικών διαύλων, επέρχεται ταχύτατα η υδρόλυσή της σε οξεικό οξύ και χολίνη, με τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE), τα μόρια του οποίου βρίσκονται διάσπαρτα στη συναπτική σχισμή. Από τα προϊόντα της υδρόλυσης η χολίνη επαναπροσλαμβάνεται από το προσυναπτικό άκρο και συμμετέχει εκ νέου στη σύνθεση των μορίων της ACh. Η ACh προκαλεί σύσπαση μέσω απελευθέρωσης Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες, καθώς και εισόδου ιόντων Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο ^[17].

Το χλωριούχο κάλιο (KCl) προκαλεί σύσπαση στις λείες μυϊκές ίνες η οποία εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωσή του Ca^{2+} δρώντας με τρόπο διαφορετικό από αυτόν της ACh. Η σύσπαση προκαλείται μέσω εκπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης και διάνοιξης των τασεο-εξαρτώμενων διαύλων ιόντων Ca^{2+} οι οποίοι εντοπίζονται πάνω στις ΛΜΙ με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο. Επίσης η αυξημένη συγκέντρωση KCl μπορεί να προκαλέσει εκπόλωση των μεταγαγγλιακών νευρώνων του παρασυμπαθητικού και απελευθέρωσης ACh και κατά συνέπεια σύσπαση των ΛΜΙ ^[18].

Εκτός από τα κλασσικά χολινεργικό και αδρενεργικό νευρικά συστήματα τα οποία ρυθμίζουν τον τόνο των ΛΜΙ των βρόγχων, στους αεραγωγούς των ανθρώπων και των ζώων, υπάρχει και ένα άλλο νευρικό σύστημα, το μη αδρενεργικό μη χολινεργικό νευρικό σύστημα (NANC) το οποίο μεσολαβεί στη σύσπαση ή στη χάλαση των ΛΜΙ των αεραγωγών ^[19, 20]. Το σύστημα αυτό ανήκει στις μη-αδρενεργικές, μη-χολινεργικές (no Adrenergic non Cholenergetic, NANC) νευρικές ίνες και διακρίνεται σε διεγερτικό (excitatory no Adrenergic non Cholenergetic - eNANC) και ανασταλτικό (inhibitory no Adrenergic non Cholenergetic - iNANC). Κύριοι νευροδιαβιβαστές του συστήματος αυτού είναι κυρίως νευροπεπτίδια όπως το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), το νευροπεπτίδιο Y (NPY), η ουσία P (SP), καθώς και άλλες ουσίες όπως το NO, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η ντοπαμίνη. Το NO και το VIP απελευθερώνονται από τις νευρικές απολήξεις του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος αλλά έχουν επίσης βρεθεί σε συμπαθητικά και αισθητικά νεύρα. Μελέτες στους αεραγωγούς έχουν δείξει ότι το NO και το VIP δρουν ως νευροδιαβιβαστες του iNANC

συστήματος και μάλιστα στον άνθρωπο είναι οι αποκλειστικοί νευροδιαβιβαστές της απάντησης του iNANC συστήματος στους κεντρικούς και περιφερικούς αεραγωγούς ^[21-23]. Το NO ενεργοποιεί το ένζυμο γουανυλική κυκλάση (GC). Η GC ενεργοποιεί με τη σειρά της την τριφωσφορική γουανοσίνη GTP και σχηματίζεται κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP). Η cGMP προκαλεί ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των Ca^{2+} και επέρχεται χάλαση των ΛΜΙ. Το VIP απελευθερώνεται από τις νευρικές απολήξεις από τις οποίες απελευθερώνεται η ACh και πιθανά τροποποιεί τη δράση της. Το VIP ενεργοποιεί το ένζυμο αδενολική κυκλάση. Η αδενολική κυκλάση μετατρέπει το ATP σε κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP). Τα αυξημένα επίπεδα cAMP όπως και cGMP προκαλούν ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των Ca^{2+} και χάλαση του μυός ^[24]. Επίσης το NO και το VIP δρουν σαν λειτουργικοί ανταγωνιστές ενάντια σε ερεθίσματα τα οποία προκαλούν βρογχόσπασμο ^[25-27]. Στους ανθρώπινους αεραγωγούς νευροδιαβιβαστές με διεγερτική δράση υπάρχουν σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους αεραγωγούς των ζώων. Η SP και η νευροκινίνη Α (NKA) απελευθερώνονται από τις νευρικές απολήξεις αισθητικών νεύρων ^[28]. Είναι οι κύριοι νευροδιαβιβαστές οι οποίοι απελευθερώνονται από το eNANC σύστημα και προκαλούν βρογχόσπασμο, μετά από επίδραση κάποιου ερεθίσματος και φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος ^[29, 30]. Ένα ακόμη νευροπεπτίδιο που απελευθερώνεται με την SP είναι το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP) και η δράση του είναι ισχυρή στους ανθρώπινους αεραγωγούς. Το NANC σύστημα φαίνεται να ρυθμίζει επίσης την παραγωγή βλέννης και την μικροκυκλοφορία στους βρόγχους ^[31].

Ο βρογχικός τόνος εμφανίζει φυσιολογικά μια 24ωρη διακύμανση με ένα μέγιστο βρογχόσπασμο νωρίς το πρωί (04.00-06.00) και ένα ελάχιστο τις απογευματινές ώρες (16.00-18.00). Η διακύμανση αυτή σχετίζεται με τους κικάρδιους ρυθμούς και είναι εντονότερη σε ασθματικούς ασθενείς ^[32, 33].

2. Λείες μυϊκές ίνες

2.1 Δομή-Ταξινόμηση

Οι ΛΜΙ είναι σημαντικό δομικό και προπαντός λειτουργικό στοιχείο πολλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του αναπνευστικού, και αποτελούν μείζονα στόχο στη φαρμακευτική αγωγή σε πολλές παθολογικές διαταραχές (π.χ. χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, άσθμα κλπ). Οι ΛΜΙ περιέχονται γενικά στα τοιχώματα κοίλων οργάνων και η λειτουργία τους έγκειται κυρίως στην αυξομείωση του όγκου των κοιλοτήτων των οργάνων αυτών.

Οι βασικές αρχές της λειτουργίας τους είναι παρόμοιες με εκείνες των γραμμωτών μυϊκών ινών, υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές στην οργάνωση και στη ρύθμιση της λειτουργίας τους. Οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ ινιδίων μυοσίνης και ακτίνης οι οποίες προκαλούν σύσπασση στις ΛΜΙ

είναι ίδιες με αυτές των γραμμωτών μυών αλλά η εσωτερική διάταξη των ινιδίων τους διαφέρει. Συγκεκριμένα η απουσία γραμμώσεως οφείλεται στην έλλειψη σαφούς εγκάρσιας διάταξης των λεπτών και παχέων νηματίων. Τα λεπτά νηματία που περιέχουν τροπομυοσίνη αλλά όχι τροπονίνη σταθεροποιούνται στα άκρα τους στα δεσμοσωμάτια ή πυκνά σωμάτια ή πυκνές περιοχές της μεμβράνης που αναλογούν στους Z-δίσκους των σκελετικών μυικών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή των παρακείμενων κυττάρων με τα δεσμοσωμάτια, επιτρέπει η δύναμη της σύσπασης να μεταδίδεται από το ένα κύτταρο στο άλλο ^[34]. Το σαρκοπλασματικό δίκτυο υπάρχει αλλά δεν είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένο. Τα ινίδια μυοσίνης είναι διάσπαρτα μεταξύ των ινιδίων ακτίνης και η διάμετρός τους είναι πάνω από το διπλάσιο της διαμέτρου των ινιδίων ακτίνης. Έτσι οι λείοι μύες έχουν τη δυνατότητα διατήρησης αργών παρατεταμένων συσπάσεων με ελάχιστη κατανάλωση ενέργειας (που κυμαίνεται από το 1/10 έως το 1/300 της ενέργειας η οποία απαιτείται για τη σύσπαση των γραμμωτών μυών), δέχονται νεύρωση αποκλειστικά από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και διατηρούν ακόμη και κατά τη χάλαση μια συνεχή σύσπαση κυμαινόμενης εντάσεως που χαρακτηρίζεται ως “τόνος”, δηλαδή μια ενδογενή τάση επί της οποίας αναπτύσσονται οι συσπάσεις ^[21].

Οι ΛΜΙ περιέχουν λίγα μιτοχόνδρια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την γλυκόλυση για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Το γεγονός ότι εργάζονται με μεγάλη ενεργειακή οικονομία είναι κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία των οργάνων. Αρκούνται στην κατανάλωση ATP κυρίως με οξειδωτική φωσφορυλίωση και παρουσιάζουν περιορισμένη ποικιλία τύπων μυοσίνης. Οι λειτουργικές διαφορές των ΛΜΙ στα διάφορα όργανα οφείλονται στις ιδιότητες των κυτταρικών τους μεμβρανών και στον τρόπο με τον οποίο τα ιόντα Ca^{2+} ρυθμίζουν τη λειτουργία των εγκαρσίων γεφυρών ^[35].

Παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία τους, οι ΛΜΙ υποδιαιρούνται σε δυο κατηγορίες, τις ίνες σπλαχνικού τύπου και τις μονήρεις μυϊκές ίνες. Οι ΛΜΙ σπλαχνικού τύπου εμφανίζουν στενότατη επαφή μεταξύ τους μέσω στερεών συνδέσεων (gap-junction) και λειτουργούν ως συγκύτιο, έτσι ώστε τα δυναμικά να μεταδίδονται από τη μια ίνα στην άλλη, με αποτέλεσμα αυτές να συσπώνται ταυτόχρονα. Εκατοντάδες έως εκατομύρια μυϊκά ινίδια μπορούν να συσπώνται ταυτόχρονα. Το δυναμικό της μεμβράνης στις ΛΜΙ σπλαχνικού τύπου είναι κυμαινόμενο και ασταθές. Οι ίνες αυτές χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση αυτόματης ενεργοποίησης της σύσπασης, ανεξάρτητα από τη νεύρωσή τους, η οποία αρχίζει σε κάποιες ειδικές “βηματοδοτικές” περιοχές του ιστού και από κει διαχέεται σε όλο το μυ. Παρόλο όμως που η αυτοματία τους είναι μυογενής, τροποποιείται και ρυθμίζεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Χαρακτηριστικό αυτών των ΛΜΙ είναι και η ικανότητά τους να απαντούν στη διάτασή τους με σύσπαση.

Οι μονήρεις ΛΜΙ συνήθως δεν ενεργοποιούνται αυτόματα αλλά μετά από νευρική διέγερση. Η κινητική τους νεύρωση είναι συνήθως πολλαπλή δηλαδή έχουν συνάψεις σε περισσότερες από

μία περιοχές της κυτταρικής τους μεμβράνης. Κάθε μονήρης ΛΜΙ μπορεί να συσπάται ανεξάρτητα από τις άλλες. Οι ίνες αυτές δεν απαντούν με σύσπαση σε μία παθητική διάταση αλλά είναι οργανωμένες σε κάποιας μορφής “κινητικές μονάδες”. Επιπλέον υπάρχουν ΛΜΙ που δεν εμπίπτουν ούτε στην μία κατηγορία ούτε στην άλλη, οι οποίες παρουσιάζουν αυτοματία, όμως απαντούν άμεσα και σε εξωγενή νευρική διέγερση.

Πολυάριθμες ορμόνες ή νευροδιαβιβαστικές ουσίες (όπως επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη, ACh, NO, αγγειοτενσίνη, σεροτονίνη, ισταμίνη κλπ) επηρεάζουν τη συστολή των σπλαχνικών ΛΜΙ εφόσον υπάρχουν στο μυ υποδοχείς για τη συγκεκριμένη ουσία. Οι υποδοχείς των ουσιών αυτών στην μεμβράνη των ΛΜΙ, είναι δυνατό να ανοίγουν διαύλους Na^+ και Ca^{2+} και να προκαλούν εκπόλωση της μεμβράνης. Αυτή η εκπόλωση προκαλεί είσοδο ιόντων Ca^{2+} στην ίνα, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν το μηχανισμό της σύσπασης. Αντίθετα άλλοι υποδοχείς αναστέλλουν τη σύσπαση με το κλείσιμο των διαύλων Na^+ και Ca^{2+} και την προκλήση υπερπολώσεως. Η επενέργεια αυτών των δραστικών ουσιών δεν είναι ίδια σε όλους τους τύπους των ΛΜΙ, έτσι σε άλλους δρουν διεγερτικά και σε άλλους ισχύει το αντίθετο. Γενικά η δράση των ουσιών αυτών καθορίζεται από το είδος των υποδοχέων που διαθέτει η μεμβράνη της κάθε ΛΜΙ [36].

Η διεγερσιμότητα των ινών αυτών αυξάνεται επίσης από τυχόν διάτασή τους η οποία προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από το βαθμό της διατάσεως. Η ιδιότητα αυτή των σπλαχνικών ΛΜΙ είναι ενδογενής και δεν εξαρτάται από τη νεύρωσή τους [37].

2.2 Μηχανισμός σύσπασης ΛΜΙ

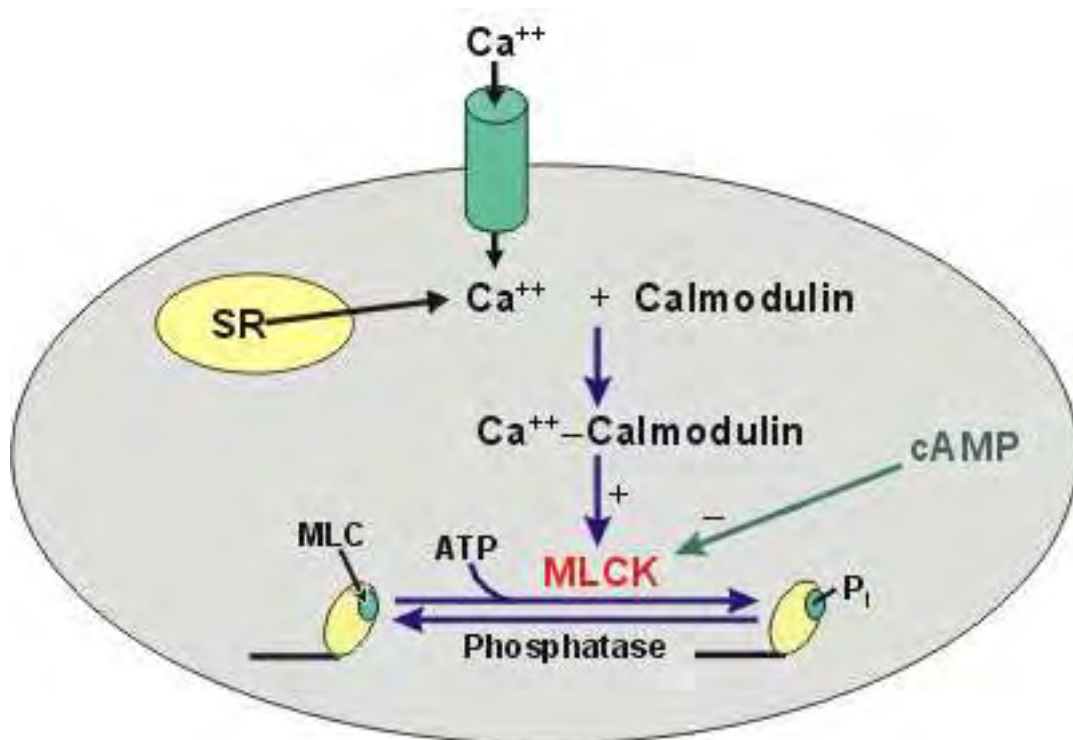
Οι ΛΜΙ δεν περιέχουν τροπονίνη αλλά μια άλλη ρυθμιστική πρωτεΐνη την καλμοδουλίνη. Αυτή αποτελείται από 148 αμινοξέα και διαθέτει 4 θέσεις δέσμευσης Ca^{2+} . Το σύμπλεγμα καλμοδουλίνης- Ca^{2+} ρυθμίζει τη δράση αρκετών ενζύμων συμπεριλαμβανομένης της κινάσης της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης. Για την έναρξη της σύσπασης απαιτούνται ιόντα Ca^{2+} , αλλά για να μπορέσει η μυοσίνη να ενεργοποιηθεί, να δράσει σαν ΑΤΡάση και να δημιουργηθούν οι συνδέσεις των εγκαρσίων γεφυρών, πρέπει αυτή πρώτα να φωσφορυλιωθεί. Τα ιόντα Ca^{2+} δεσμεύονται στην καλμοδουλίνη και το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια ενεργοποιεί την κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης, ένα ένζυμο που καταλύει τη φωσφορυλίωση της μυοσίνης. Η φωσφορυλίωση αυτή επιτρέπει τη διολίσθηση της ακτίνης στη μυοσίνη και τη σύσπαση του μυ [14, 38].

Η ρύθμιση της σύσπασης γίνεται με την κινητοποίηση ιόντων Ca^{2+} τόσο από το σαρκοπλασματικό δίκτυο όσο και από τον εξωκυττάριο χώρο διαμέσου τασεοευαίσθητων διαύλων. Η απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο ακολουθείται από την είσοδο του σε αυτό κατά τον τερματισμό της μυϊκής σύσπασης. Στη ρύθμιση της σύσπασης εκτός από το σαρκοπλασματικό δίκτυο συμμετέχει και η κυτταρική μεμβράνη των ΛΜΙ η οποία έχει διαύλους

Na⁺ και Ca²⁺.

Η φωσφατάση της μυοσίνης είναι σημαντική για τον τερματισμό της σύσπασης. Όταν η συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺ πέσει κάτω από μια κριτική τιμή, η διαδικασία σύσπασης αυτόματα αντιστρέφεται, εκτός από την αποφωσφορυλίωση της μυοσίνης. Η φωσφατάση απαιτείται για τον διαχωρισμό του φωσφορικού άλατος από την ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης ώστε να διακοπεί η σύσπαση (Εικόνα 1).

Εικόνα 1: Μηχανισμός σύσπασης ΑΜΙ. Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων Ca²⁺ επιτυγχάνεται είτε με είσοδο ιόντων Ca²⁺ διαμέσου διαύλων ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης είτε με κινητοποίηση ιόντων Ca²⁺ από ενδοκυττάρια αποθήκες π.χ. σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR). Η αύξηση αυτή έχει επακόλουθο τη σύνδεση του ασβεστίου σε ειδικές θέσεις σύνδεσης της πρωτεΐνης καλμοδουλίνης. Το σύμπλοκο ασβεστιοκαλμοδουλίνης ενεργοποιεί την κινάση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK) η οποία παρουσία ATP, φωσφορυλιώνει την ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης (MLC). Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί στη δημιουργία των εγκαρσίων γεφυρών μεταξύ της κεφαλής της μυοσίνης και των ινιδίων της ακτίνης και ο μυς συσπάται. Η αύξηση του cAMP αναστέλει τη φωσφορυλίωση αυτή και η διαδικασία αντιστρέφεται. (Cardiovascular Physiology Concepts, 2nd edition, a textbook published by Lippincott Williams & Wilkins, 2011)



Η αποφωσφορυλίωση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (MLC) δεν οδηγεί από μόνη της σε χάλαση του μυός. Εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί. Ένας από αυτούς είναι ο μηχανισμός “μάνταλο”, με τον οποίο η σύνδεση της μυοσίνης με την ακτίνη παραμένει ακόμη και μετά την ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} . Η σημασία του μηχανισμού αυτού έγκειται στο γεγονός ότι ο μυς μπορεί να παραμένει σε παρατεταμένη τονική σύσπαση με την ελάχιστη δυνατή κατανάλωση ενέργειας. Πιθανολογείται ότι ο μηχανισμός αυτός εμπλέκεται στην μη αποτελεσματική αναστροφή της απόφραξης των αεραγωγών, σε ασθματικούς ασθενείς, μετά από βαθειά εισπνοή όπως συμβαίνει σε υγιείς ^[39].

Η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής. Είναι λοιπόν αναμενόμενο να μεταβάλλεται και η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών σαν απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα. Η μεταβολή αυτή είναι σημαντική από τη γέννηση μέχρι και την ενηλικίωση. Από κει και πέρα η μεταβολή αυτή είτε είναι πολύ μικρή είτε σύμφωνα με κάποιες μελέτες δεν υφίσταται ^[40, 41]. Αυτό οφείλεται σε λειτουργικές και δομικές διαφορές των αεραγωγών σε διαφορετικές ηλικίες ^[42-45]. Με την ωρίμανση μεταβάλλεται το μέγεθος των αεραγωγών, η ποσότητα του χόνδρινου τμήματος, η απόλυτη ποσότητα της μυϊκής τους μάζας, η αναλογία μυϊκής μάζας προς το συνολικό ιστό των αεραγωγών καθώς και η αναλογία και δραστική ικανότητα των μουσκαρινικών υποδοχέων ^[46, 47].

2.3 Ο ρόλος του φορτίου στη σύσπαση των ΛΜΙ

Η διατήρηση του τόνου των αεραγωγών είναι μια από τις λειτουργίες των ΛΜΙ. Οι ΛΜΙ αλλάζουν μήκος και φορτίο κατά τη διάρκεια της εισπνοής και της εκπνοής και οι μεταβολές αυτές του μήκους επηρεάζουν τη διάμετρο των αεραγωγών και κατά συνέπεια τη ροή του αέρα προς τους πνεύμονες. Αυτές οι μεταβολές του μήκους επιφέρουν αλλαγές στην τάση (ενεργή και παθητική) που αναπτύσσουν οι ΛΜΙ ^[48, 49]. Η παθητική τάση η οποία αναπτύσσουν οι ΛΜΙ είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΙ των αεραγωγών στην επίδραση συσπαστικών παραγόντων και φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεση των αποφρακτικών νόσων των αεραγωγών όπως είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το άσθμα ^[9].

Ένα ειδικό χαρακτηριστικό των ΛΜΙ είναι η ικανότητα μεταβολής της τάσης η οποία ασκείται σε δεδομένο μήκος. Εάν ένα κομμάτι ΛΜΙ τεντωθεί, αρχικά η τάση αυξάνει. Αν όμως ο μυς διατηρηθεί στο μεγαλύτερο μήκος μετά το τέντωμα, η τάση σταδιακά μειώνεται. Μερικές φορές η τάση μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά πριν το τέντωμα του μυ. Κατά συνέπεια είναι αδύνατο να συσχετισθεί με ακρίβεια το μήκος σε σχέση με την τάση και να προσδιοριστεί το μήκος του μυ σε ηρεμία. Οι ΛΜΙ λοιπόν συμπεριφέρονται μάλλον σαν μια εύπλαστη μάζα, παρά σαν άκαμπτο δομικό συστατικό και αυτή τους η ιδιότητα αναφέρεται ως δομική πλαστικότητα των

ΛΜΙ ^[50]. Οι περιοδικές μεταβολές της διαμέτρου τους, που υφίστανται οι αεραγωγοί κατά τη φυσιολογική λειτουργία τους, δεν αποτελούν απλά παθητικές μεταβολές εξαιτίας μεταβολών στην εσωτερική ή διατοιχωματική πίεση, αλλά σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από την δομική πλαστικότητα των ΛΜΙ. Η ικανότητα της προσαρμογής των ΛΜΙ σε μεγάλες αλλαγές του μήκους, ώστε η παθητική τάση να είναι ανεξάρτητη του μήκους, γίνεται διαμέσου δομικής διαμόρφωσης του μηχανισμού σύσπασης καθώς και του κυτταρικού σκελετού των ΛΜΙ ^[51, 52]. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι οποίες έγιναν σε τεμάχια τραχείας προβάτου η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στα δεσμοσωμάτια ^[53].

Στις ΛΜΙ, ένα μηχανικό ερέθισμα είναι πιθανό να μετατρέπεται, μέσω τασεοϋποδοχέων, σε χημικό ερέθισμα ^[54, 55]. Ένα μηχανικό ερέθισμα έχει τη δυνατότητα να τροποποιήσει τη μορφολογία και τη λειτουργία ενός ιστού. Μελέτες σε αγγεία δείχνουν πως η εφαρμογή ενός μηχανικού ερεθίσματος μπορεί να μεταβάλει τους κυτταρικούς υποδοχείς ή τη δομή των G-πρωτεϊνών οδηγώντας σε κάποιο μεταβολικό δρόμο ^[56].

Η μέγιστη εισπνοή έχει ευεργετική επίδραση στους αεραγωγούς υγιών ατόμων. Η δράση είναι βρογχοπροστατευτική (εμποδίζει τη βρογχοσύσπαση) και βρογχοδιασταλτική (αναστρέφει τη απόφραξη των βρόγχων), με την βρογχοπροστατευτική δράση να είναι ισχυρότερη. Τα δυο αυτά φαινόμενα οφείλονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Πιθανολογείται ότι η βρογχοδιαστολή η οποία προκαλείται από την μέγιστη εισπνοή οφείλεται σε αναστολή του χολινεργικού τόνου ή σε ενεργοποίηση του NANC συστήματος ^[58]. Και τα δυο φαινόμενα της βρογχοπροστασίας και της βρογχοδιαστολής μετά από βαθειά εισπνοή, είναι ελαττωμένα ή απουσιάζουν στους ασθματικούς ασθενείς, με πιο έντονη την απουσία της βρογχοπροστασίας και αυτό πιθανά οφείλεται σε διαταραχή λειτουργίας του συσπαστικού μηχανισμού των ΛΜΙ ^[59].

3. Ιοντικοί διάυλοι - αντλίες ιόντων στις ΛΜΙ των αεραγωγών

Η μετακίνηση ιόντων διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών είναι ένας σημαντικός μηχανισμός της διατήρησης ή της μεταβολής του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης. Η μετακίνηση αυτή πραγματοποιείται διαμέσου ιοντικών διαύλων ή αντλιών που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη. Η δύναμη που ωθεί τα ιόντα να μετακινηθούν διαμέσου ιοντικών διαύλων, από τη μία πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης στην άλλη, είναι η διαφορά της ηλεκτροχημικής διαβάθμισης μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου. Αντίθετα στην περίπτωση της διακίνησης ιόντων διαμέσου αντλιών απαιτείται ενέργεια η οποία αντλείται από την υδρόλυση του ATP. Οι περισσότεροι ιοντικοί διάυλοι είναι εκλεκτικοί δηλαδή διαπερατοί μόνο σε ορισμένα ιόντα.

Η διάνοιξη των διαύλων επιτυγχάνεται είτε εξαιτίας ενός ηλεκτρικού δυναμικού το οποίο προκαλεί την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, όπως συμβαίνει με τους ευαίσθητους στη

διαφορά δυναμικού ή τασεοεξαρτώμενους διαύλους, είτε εξαιτίας της απελευθέρωσης ενός νευροδιαβιβαστή ο οποίος συνδέεται στον υποδοχέα του και προκαλεί την διάνοιξη του διαύλου. Υπάρχουν επίσης διάυλοι οι οποίοι είναι ευαίσθητοι τόσο στη μεταβολή του ηλεκτρικού δυναμικού όσο και στη δράση νευροδιαβιβαστών. Η μεμβράνη των ΛΜΙ έχει πολύ περισσότερους ηλεκτροευαίσθητους διάλους Ca^{2+} και πολύ λιγότερους διαύλους Na^+ από ότι των γραμμωτών μυών. Στις ΛΜΙ σημαντικό ρόλο παίζουν οι διάυλοι Ca^{2+} και K^+ [60].

Στις ΛΜΙ υπάρχουν δύο επιμέρους τύποι διαύλων Ca^{2+} . Οι L-τύπου βραδείς διαύλοι (long-lasting) οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τη μακρά διάρκεια ενεργοποίησης και τη μεγάλη αγωγιμότητα Ca^{2+} και οι T-τύπου ταχείς διαύλοι (transient) οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παροδική και περιοδική είσοδο Ca^{2+} . Οι T-τύπου διάυλοι ενεργοποιούνται από μια ποικιλία φυσικών και χημικών ερεθισμάτων [61]. Στις ΛΜΙ υπάρχουν σε αφθονία L-τύπου βραδείς διάυλοι οι οποίοι απαντούν στην εκπόλωση του κυττάρου με αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} . Όσον αφορά την ενεργοποίησή τους οι διάυλοι μπορεί να είναι τασεο-εξαρτώμενοι (voltage-gated Ca^{2+} channels) ή να επηρεάζονται από διασυνδεδετικά μόρια (ligand-gated Ca^{2+} channels).

Ο ρόλος των διαύλων K^+ είναι να σταθεροποιούν το δυναμικό της μεμβράνης. Αυτοί διακρίνονται σε ασβεστιοεξαρτώμενους (K_{Ca}), εξαρτώμενους από το ATP (K_{ATP}), τασεοεξαρτώμενους (K_{V}) και εσώτροπους ανορθωτικούς (K_{IR}). Οι K_{Ca} θεωρούνται οι σημαντικότεροι στη ρύθμιση της αγωγιμότητας της μεμβράνης στα K^+ εξαιτίας της μεγάλης τους αγωγιμότητας, της ευαισθησίας τους στη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, της ευαισθησίας τους στο δυναμικό της μεμβράνης καθώς και του μεγάλου αριθμού τους στην κυτταρική μεμβράνη των ΛΜΙ. Οι K_{Ca} είναι ασβέστιο- και τασεοεξαρτώμενοι και παίζουν σημαντικό ρόλο στην χάλαση των ΛΜΙ των αεραγωγών ανθρώπων και ζώων [62-64].

Στις ΛΜΙ των αεραγωγών υπάρχει αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, όπως υπάρχει σε όλες τις μεμβράνες του σώματος, η οποία μεταφέρει το Na^+ από το εσωτερικό του κυττάρου προς τα έξω και το K^+ προς την αντίθετη φορά, συμμετέχοντας στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας. Απαιτεί ενέργεια η οποία προέρχεται από την υδρόλυση του ATP από την $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPάση. Το νάτριο και το κάλιο διέρχονται από ξεχωριστούς πόρους και για κάθε τρία Na^+ που εξέρχονται, εισέρχονται δύο K^+ .

Στη μεμβράνη των ΛΜΙ υπάρχει και ο μηχανισμός ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ κατά τον οποίο ανταλλάσσονται ένα Ca^{2+} με τρία Na^+ . Η διαφορά στη συγκέντρωση του Na^+ για την έξοδο του Ca^{2+} από το εσωτερικό του κυττάρου και η μείωση της συγκέντρωσης του, οδηγεί τελικά σε χάλαση των ΛΜΙ [65].

Εκτός από τους διαμεμβρανικούς διαύλους υπάρχουν και ενδοκυττάρια διάυλοι οι οποίοι ρυθμίζουν την απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Στις ΛΜΙ υπάρχει η ασβεστιοATPάση του σαρκοπλασματικού/ενδοπλασματικού δικτύου (SERCA2b). Ανήκει στις P-τύπου ATPάσες οι οποίες ευθύνονται για την μεταφορά ιόντων διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών

χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP ^[66]. Είναι η κυριότερη από τις ισομορφές του ενζύμου SERCA. Το σαρκοπλασματικό δίκτυο αποτελεί αποθήκη Ca²⁺. Παρόλο που το ποσό του ελεύθερου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι μικρότερο σε σχέση με το ολικό ενδοκυττάριο ασβέστιο, είναι αυτό που παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου. Έτσι η SERCA2b παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου σε επιθυμητά επίπεδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στη λειτουργία αυτής της αντλίας οφείλεται ο τερματισμός της σύσπασης των ΛΜΙ ^[67]. Εκτός από τη δράση την οποία ασκεί στον μηχανισμό σύσπασης και χάλασης των ΛΜΙ φαίνεται να παίζει ρυθμιστικό ρόλο και σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου ^[68]. Το NO μπορεί να προκαλέσει την ελάττωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου διαμέσου της SERCA ^[69].

4. Το επιθήλιο των αεραγωγών

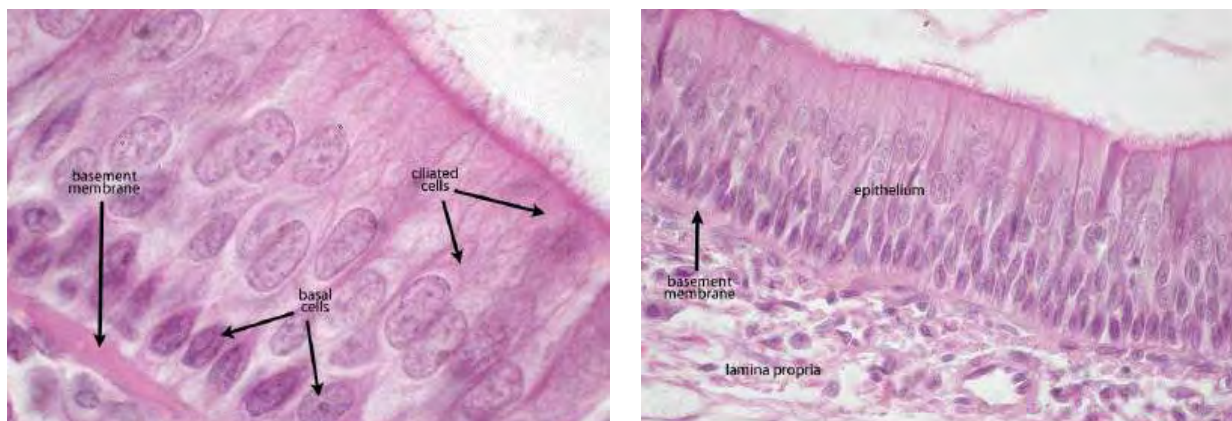
4.1 Δομή του επιθηλίου

Το αναπνευστικό επιθήλιο είναι μια παραλλαγή του κροσσωτού μονόστιβου κυλινδρικού επιθηλίου που ονομάζεται ψευδοπολύστιβο. Εμφανίζεται σαν να περιλαμβάνει περισσότερες από μία στιβάδες. Αυτό οφείλεται στο ότι οι πυρήνες των κυττάρων του βρίσκονται σε διάφορα επίπεδα, ενώ τα κύτταρα είναι υψηλά κυλινδρικά κροσσωτά, τοποθετημένα σε μία μόνο στιβάδα. Επιπλέον στη βάση των κυλινδρικών κυττάρων και μεταξύ τους βρίσκονται άφθονα μικρά στρογγυλά κύτταρα, τα βασικά κύτταρα που αποτελούν μητρικές μορφές των κυττάρων και που σκοπό έχουν με τον πολλαπλασιασμό τους να ανανεώνουν τα κύτταρα του επιθηλίου. Οι κροσσοί οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνειά των κυλινδρικών κυττάρων αποτελούν νηματοειδείς και ευκίνητες προσεκβολές του κυτταροπλάσματος.

Κάθε κύτταρο του κροσσωτού επιθηλίου έχει 200 περίπου κροσσούς οι οποίοι δονούνται με συχνότητα 20 δονήσεων ανά λεπτό με κατεύθυνση προς τον λάρυγγα. Το στρώμα βλέννας που καλύπτει το κροσσωτό επιθήλιο αποτελείται από δύο στιβάδες. Την ιξώδη (gel) που εκκρίνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα και τους υποβλενογόNIους βρογχικούς αδένες και είναι πλούσια σε γλυκοπρωτεΐνες και την υδαρή (sol) που παράγεται από τα βασικά επιθηλιακά κύτταρα και καταλαμβάνει το χώρο που βρίσκεται ανάμεσα στους κροσσούς.

Τα επιθηλιακά κύτταρα δεν αποτελούν απλώς δομικά συστατικά του τοιχώματος των αεραγωγών. Στην ουσία αποτελούν μία εκτεταμένη λειτουργική μονάδα η οποία απαντά με διάφορους τρόπους σε ποικίλα ερεθίσματα παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθογένεια διαφόρων νόσων ^[70]. Η επιθηλιακή μεσεγγυματική τροφική μονάδα (epithelial mesenchymal trophic unit-EMTU) αποτελείται από μία στιβάδα επιθηλιακών και μία στιβάδα μεσεγγυματικών κυττάρων οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με τον βασικό υμένα ή βασική μεμβράνη (Εικόνα 2).

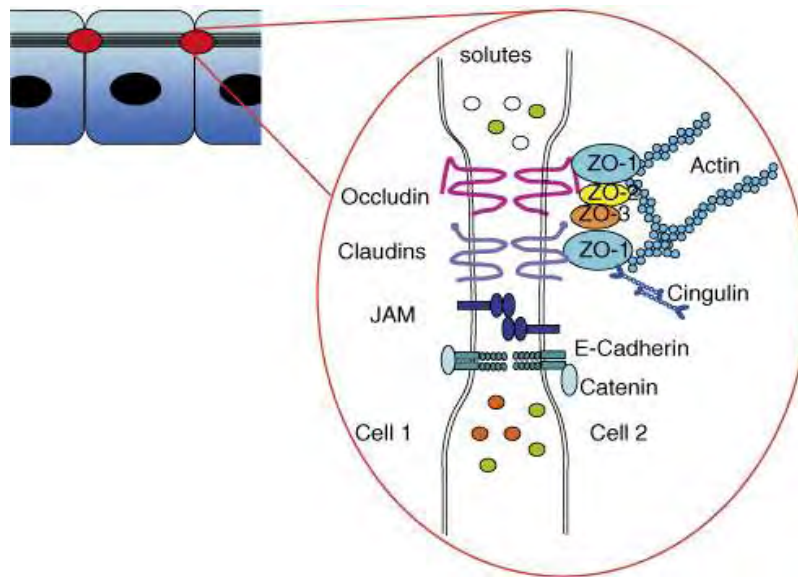
Εικόνα 2: Επιθηλιακή μεσεγγυματική τροφική μονάδα. Απεικονίζεται βιοψία τμήματος του τοιχώματος τραχείας, στο οποίο διακρίνονται το ψευδοπολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο (epithelium), τα βασικά κύτταρα (basal cells) τα οποία αποτελούν πρόδρομες μορφές για τα επιθηλιακά κύτταρα, η λεπτή βασική μεμβράνη (membrane basement) καθώς και η στιβάδα των μεσεγγυματικών κυττάρων (lamina propria) κάτω από τη βασική μεμβράνη. Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (Google.com)



Το επιθήλιο προέρχεται από όλα τα βλαστικά δέρματα. Στερείται αγγείων και τρέφεται από το μεσοκυττάριο υγρό που προέρχεται από τα τριχοειδή γειτονικού συνδετικού ιστού. Αποτελεί στέρεη μεμβράνη καθώς τα κύτταρα που το αποτελούν συνδέονται στενά μεταξύ τους. Η κυτταρική μεμβράνη κάθε κυττάρου παρουσιάζει πυκνώσεις στο σημείο της σύνδεσης και λεπτά μικροϊνίδια εμφανίζονται στο παρακείμενο κυτταρόπλασμα ^[70]. Οι συνδέσεις αυτές (tight junctions) δεν περιορίζονται μόνο σε ορισμένα σημεία του κυττάρου αλλά είναι κυκλικές και έχουν τη μορφή δακτυλίου (Εικόνα 3).

Ο βασικός υμένας βρίσκεται μεταξύ της βασικής επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων και του υποκείμενου συνδετικού ιστού και αποτελείται από εξωκυττάριο δομική ουσία και δίκτυο νευρικών ινών. Ο ρόλος του φαίνεται ότι είναι διπλός. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ουσιών μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των υποκείμενων αγγείων του συνδετικού ιστού και επειδή είναι πάρα πολύ ανθεκτικός και ενωμένος με τα επιθηλιακά κύτταρα παίζει σημαντικό μηχανικό ρόλο στη διατήρηση της συνέχειας της επιθηλιακής κυτταρικής μεμβράνης.

Εικόνα 3: Στερεές συνδέσεις (Tight junctions) των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών. Οι στερεές συνδέσεις αποτελούνται από πρωτεΐνες και υποδοχείς που αλληλεπιδρούν (ZO 1-3, occludin, claudins 1-5) καθώς και από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (β-catenin, E-cadherin, JAM) Τα στοιχεία αυτά τα οποία απαρτίζουν τις στερεές συνδέσεις επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ των παρακείμενων επιθηλιακών κυττάρων (Holgate ST. Allergol Int. 2008 Mar; 57(1): 1-10)



Σημαντικό ρόλο στον υποκείμενο συνδετικό ιστό παίζει η στιβάδα των ινοβλαστών. Η συγκεκριμένη τοποθέτηση των ινοβλαστών, υπό το επιθήλιο, τους καθιστά ικανούς να ανταποκρίνονται σε τοπικό επίπεδο έναντι μεσολαβητών που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, ύστερα από διέγερση των τελευταίων από διάφορους παράγοντες όπως βλάβη του επιθηλίου, κυτταροκίνες και αλλεργιογόνα ^[71-73]. Αποτελούν κύτταρα διαμέτρου περίπου 40 μm και το πάχος τους είναι περίπου 0,55 μm. Παρουσιάζουν αυξημένο πάχος (αντίστοιχα προς τον πυρήνα) και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ δεν παρουσιάζουν εμφανή δεμάτια μικροϊνιδίων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των μυοϊνοβλαστών. Το σχήμα τους είναι αστεροειδές και η μονήρης στιβάδα που σχηματίζουν αντιστοιχεί περίπου στο 70% της επιφάνειας της βασικής μεμβράνης.

Η στιβάδα των ινοβλαστών επεκτείνεται και στο επίπεδο των μικρών αεραγωγών, ενώ συνεχίζει και στην περιοχή ανταλλαγής αερίων με τη μορφή ινοβλαστών του διάμεσου χώρου στο τοίχωμα των κυψελίδων. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, η επιθηλιακή μεσεγχοματική τροφική μονάδα διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην ανάπτυξη των πνευμόνων ^[74]. Συγκεκριμένα αναπτύσσεται μία αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και των υποκείμενων ινοβλαστών. Η επικοινωνία αυτή βασίζεται στην απελευθέρωση διαλυτών μεσολαβητών (transforming growth factor-β ή TGF-β, αγωνιστές του epidermal growth factor receptor-EGFR) και κατευθύνει το σχηματισμό και τη διαίρεση των αεραγωγών ^[75, 76].

4.2 Ο λειτουργικός ρόλος του επιθηλίου

Το αναπνευστικό επιθήλιο ευθύνεται για την μηχανική κάθαρση των αεροφόρων οδών από βλαπτικούς παραγοντες. Ο ανθρώπινος οργανισμός καταναλώνει μόνο 1,5 Kg τροφής και 2 Kg

νερού την ημέρα, ενώ εισπνέει περίπου 10 χιλιάδες λίτρα αέρα. Το γεγονός αυτό τον εκθέτει σε πολλούς κινδύνους επειδή ο ατμοσφαιρικός αέρας περιέχει διάφορα σωματίδια βιολογικής, οργανικής ή ανόργανης χημικής προέλευσης, καθώς και ατμούς, ιόντα και ραδιενεργά στοιχεία. Η απομάκρυνση των σωματιδίων γίνεται με την βοήθεια του συστήματος των κροσσών και της βλέννης, ενώ από τις τελικές αναπνευστικές μονάδες, τα σωματίδια απομακρύνονται με τα μακροφάγα. Οι δονήσεις των κροσσών μετακινούν το στρώμα βλέννας των βρόγχων προς τον οροφάρυγγα. Σωματίδια μεταφέρονται με το σύστημα βλέννας-κροσσών στον οροφάρυγγα και καταπίνονται.

Το επιθήλιο δεν ασκεί μόνο παθητική προστασία αλλά είναι ένας ακόμη παράγοντας που εμπλέκεται και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο πολλών λειτουργιών των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΙ των αεραγωγών. Η παρουσία του επιθηλίου τροποποιεί την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ απελευθερώνοντας παράγοντες οι οποίοι είτε προκαλούν σύσπαση είτε προκαλούν χάλαση^[77]. Τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν βρογχοσυσπαστικές ουσίες και μεσολαβητές της φλεγμονής, ενδοθηλίνη, SP, βαζοπρεσίνη, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες καθώς και μεγάλο αριθμό πεπτιδίων με βρογχοπροστατευτική ή βρογχοσυσπαστική δράση^[78-80].

Ο ρόλος του επιθηλίου στη ρύθμιση της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΙ των αεραγωγών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως για παράδειγμα το φύλο. Μελέτες που έγιναν σε ΛΜΙ τραχείας ενήλικων άρρενων κουνελιών φάνηκε ότι η τεστοστερόνη επιδρά άμεσα στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών με τρόπο εξαρτώμενο από το επιθήλιο και την παραγωγή NO^[81, 82]. Συγκεκριμένα προκαλεί δοσοεξαρτώμενη σύσπαση σε ημικρίκια τραχείας ενήλικων άρρενων κουνελιών και δοσοεξαρτώμενη χάλαση όταν σε αυτά έχουμε προτύτερα επιδράσει με ACh και καρβαχόλη (CCh) ενώ δεν έχει καμία επίδραση σε ιστό θηλυκών κουνελιών. Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου εξουδετερώνει σημαντικά την δράση της χάλασης της ορμόνης. Αντίθετα η δράση χάλασης σε προσυσπασμένα ημικρίκια τραχείας ενήλικων άρρενων κουνελιών της 17β-οιστραδιόλης είναι ανεξάρτητη της παρουσίας επιθηλίου^[82, 83].

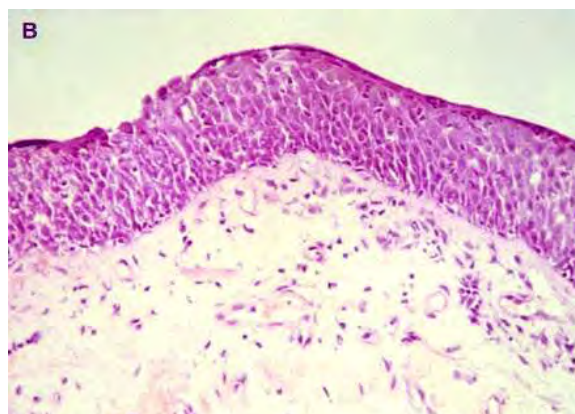
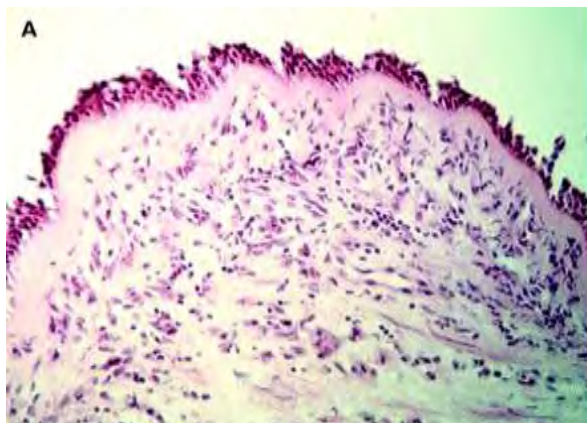
Η μηχανική αφαίρεση του επιθηλίου σε πειράματα *in vitro* έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης των βρογχοσυσπαστικών ουσιών και την ελάττωση της δράσης των ουσιών οι οποίες προκαλούν χάλαση των βρόγχων. Αυτό επιτυγχάνεται διαμέσου ενός συνδυασμού απώλειας των προστανοειδών (prostaglandin E2) και μη-προστανοειδών (epithelium-derived relaxant/inhibitory factor) ανασταλτικών παραγόντων, απώλειας μεταβολικής δραστηριότητας (ουδέτερη ενδοπεπτιδάση) και απώλειας του φραγμού διάχυσης^[84]. Μετά την απώλεια του επιθηλίου η τάση ηρεμίας που ασκείται στις ΛΜΙ φαίνεται πως καθορίζει την ανταποκρισιμότητα τους σε συσπαστικούς παράγοντες όπως η ACh. Συγκεκριμένα η προσθήκη του αναστολέα της συνθετάσης του NO, L-NAME, αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών στην ACh όταν η ασκούμενη

RT είναι 2.5 g, ενώ δεν έχει καμία επίδραση όταν η τάση είναι 0.5 g^[5].

4.3 Ο ρόλος του επιθηλίου στην παθογένεια νόσων του αναπνευστικού

Το επιθήλιο χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ικανότητα αυτοεπιδιόρθωσης μετά τη δράση κάποιου βλαπτικού παράγοντα. Η βλάβη του επιθηλίου παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση νόσων του αναπνευστικού όπως είναι το άσθμα. Η αποκατάσταση του επιθηλίου συνδέεται με μεταβολές του φαινότυπου των κυττάρων, καθώς και με διατάραξη της φυσιολογικής διαδικασίας πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των κυττάρων^[80]. Μέχρι πρόσφατα ήταν αποδεκτό ότι η επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών (remodeling) ήταν το αποτέλεσμα φλεγμονώδους διεργασίας του τοιχώματος, εξαιτίας ανεπιτυχούς αποκατάστασης των επιθηλιακών κυττάρων μετά τη δράση κάποιου βλαπτικού παράγοντα. Με τον όρο επαναδιαμόρφωση χαρακτηρίζεται η αλλαγή στη σύνθεση, στην ποσότητα και στην οργάνωση των κυττάρων και των άλλων ιστών που απαρτίζουν το τοίχωμα των αεραγωγών^[77]. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζουν τις αλλαγές στον πολλαπλασιασμό και στον φαινότυπο των ΛΜΙ δε είναι πλήρως κατανοητοί, ωστόσο πιθανός είναι ο ρυθμιστικός ρόλος μεσολαβητών και αναπτυξιακών παραγόντων, οι οποίοι εκκρίνονται από κύτταρα της φλεγμονής. Μια άλλη υπόθεση είναι πως τα κυτταρικά και δομικά συστατικά του τοιχώματος των αεραγωγών αλληλεπιδρούν με τη στιβάδα των ΛΜΙ προκαλώντας αλλαγές στο φαινότυπο και στη λειτουργία τους, με τελικό αποτέλεσμα την επαναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών κάτω από φλεγμονώδεις συνθήκες (Εικόνα 4). Η πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών είναι πιθανά το σημαντικότερο κομμάτι της επαναδιαμόρφωσής τους δεδομένου ότι η ικανότητα σύσπασης των ΛΜΙ είναι ανάλογη της μάζας τους. Η πάχυνση της στιβάδας των ΛΜΙ οφείλεται σε υπερπλασία και υπερτροφία των κυττάρων και ο βαθμός της πάχυνσης αυτής αντανακλά το βαθμό της σοβαρότητας της νόσου^[85]. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών παρατηρείται νωρίς στην εγκατάσταση της νόσου, με μηχανισμό ανεξάρτητο της φλεγμονής και άρα, η επαναδιαμόρφωση και η φλεγμονή του τοιχώματος των αεραγωγών, είναι δύο οντότητες παράλληλες, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οι οποίες αποτελούν συνέπεια της παθογένεσης του άσθματος^[86].

Εικόνα 4: Μεταβολή του επιθηλίου των αεραγωγών σε νόσους του αναπνευστικού όπως φαίνονται σε βιοψίες βρόγχων από (Α) ασθματικό ασθενή όπου απεικονίζεται η απώλεια του επιθηλίου, η πάχυνση και υαλώδης εμφάνιση της βασικής μεμβράνης και από (Β) βαρύ καπνιστή με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) (FEV1=40% της προβλεπόμενης) όπου απεικονίζεται η λεπιδωτή μεταπλασία του επιθηλίου και η λέπτυνση της βασικής μεμβράνης. Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (Jeffery PK. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Nov; 164(2): S28-38)



5. Μονοξειδιο του αζώτου (NO)

5.1 Σύνθεση του NO

Το 1987 έγινε γνωστό ότι το NO ήταν η ίδια ουσία η οποία ήταν γνωστή ως τότε σαν ενδοθηλιακός παράγοντας χάλασης (EDRF – Endothelium Derived Relaxing Factor) και ο ρόλος του στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένης και της αναπνευστικής άρχισε να γίνεται εμφανής^[87].

Το NO στο αναπνευστικό δέντρο παράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα, στα νεύρα των αεραγωγών, σε κύτταρα της φλεγμονής (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα) και στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα^[1]. Η δραστηριότητα του NO εξετάται από την ποσότητα και την δραστηριότητα του ενζύμου το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του, από το επίπεδο του οξειδωτικού stress και από τον ρυθμό πρόσληψής του από αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι η αιμοσφαιρίνη και η γλουταθειόνη. Το NO παράγεται ενδογενώς από τα επιθηλιακά κύτταρα μετά από διέγερση της NOS φλαβοπρωτεΐνης. Παρόλο που το NO παράγεται σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της NOS, η ακριβής ταυτότητα των βιοδραστικών ενζύμων δεν έχει προσδιοριστεί^[2].

Οι φλαβοπρωτεΐνες ανήκουν σε μια πολύπλευρη ομάδα βιολογικών καταλυτών οι οποίες αποτελούν το 1-3% των γονιδίων των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων^[88, 89]. Οι συνθετάσες του NO ανήκουν σε μια οικογένεια διμερών φλαβινοπρωτεϊνών οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις αναγωγής και οι οποίες μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADPH σε μια ποικιλία αποδεκτών πρωτεϊνών της αίμης. Τα ένζυμα αυτά στον άνθρωπο καθώς και σε άλλα θηλαστικά προέρχονται από διαφορετικά γονίδια το καθένα τα οποία βρίσκονται σε τρία διαφορετικά χρωμοσώματα^[90-94].

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο FAD και στο FMN είναι γραμμική^[95-97]. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης η υπομονάδα FMN διαδραματίζει κεντρικό ρόλο δρώντας

διαμέσου μεταβολών της διαμόρφωσής της ως δέκτης (λαμβάνει ηλεκτρόνια από το $FADH^2$) και ως δότης ηλεκτρονίων (μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το FMNH).

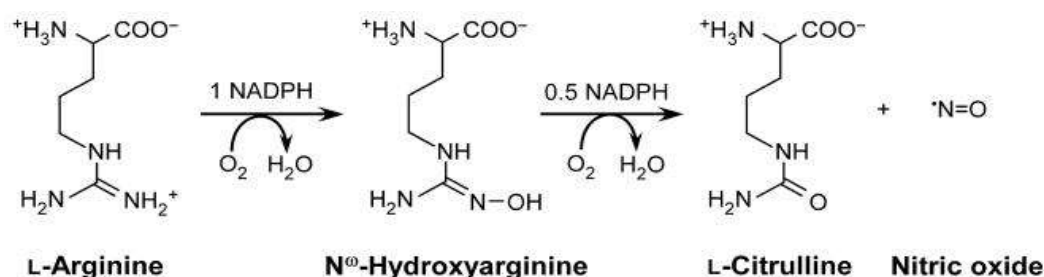
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου συνθετάση του NO (NOS): η νευρωνική (NOS I ή nNOS), η επαγωγίμη (NOS II ή iNOS) και η ενδοθηλιακή (NOS III ή eNOS). Λειτουργικά οι nNOS και eNOS μορφές του ενζύμου αποτελούν δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου. Στις δομικές μορφές της συνθετάσης η μεταφορά των ηλεκτρονίων από την φλαβίνη στην αίμη πυροδοτείται με την σύνδεση της ασβεστιο-καλμοδουλίνης και για τον λόγο αυτό η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών. Η παραγωγή NO από τις δομικές μορφές της NOS πραγματοποιείται άμεσα (σε λίγα δευτερόλεπτα) από τη στιγμή που ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί από αγωνιστές όπως η ACh και η βραδυκινίνη, αλλά σε μικρή ποσότητα (σε συγκεντρώσεις της τάξης των fM ή pM) και διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Η eNOS εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις του κυττάρου (σε μικρές αναδιπλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης καβεολίνης). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι η σύνδεση της eNOS με την καβεολίνη καταστέλλει την δραστηριότητα της eNOS. Μετά τη δράση του αγωνιστή αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} με αποτέλεσμα την σύνδεση της καλμοδουλίνης με την eNOS, την αποσύνδεση της καβεολίνης από την eNOS και την παραγωγή NO. Η πτώση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} έχει σαν αποτέλεσμα την επαναδημιουργία του ανασταλτικού συμπλέγματος eNOS-καβεολίνης. Αντίθετα η iNOS, η οποία ενεργοποιείται από φλεγμονώδη κύτταρα, συνδέεται με την καλμοδουλίνη ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του ασβεστίου και εμφανίζει εντονότερη δραστηριότητα ^[98]. Επίσης το NO παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα (της τάξης των nM) και η παραγωγή του διαρκεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ^[99].

Οι συνθετάσες του NO καταλύουν την αντίδραση της μετατροπής του αμινοξέος L-αργινίνη, σε L-κιτρουλλίνη και NO, χρησιμοποιώντας ως συνυποστρώματα την αναγόμενη μορφή του φωσφορικού νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH) και O_2 , με ενδιάμεσο παράγωγο την N-υδροξυ-αργινίνη η οποία αναστέλλει τη δράση της αργινάσης ^[100] (Εικόνα 5).

Το σύστημα αυτό αργινάσης-συνθετάσης βρίσκεται σε μια λεπτή ισορροπία. Η αυξημένη δραστηριότητα της αργινάσης θα οδηγήσει σε ελαττωμένη παραγωγή NO ενώ από την άλλη η αναστολή της θα οδηγήσει σε υπέρμετρη παραγωγή σε ποσά τέτοια που μπορεί να έχουν τοξική δράση. Το φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), το φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) και η τετραϋδροβιοπτερίνη (H_4B) αποτελούν συνένζυμα όλων των ισομορφών του ενζύμου.

Εικόνα 5: Η βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου από την L-arginine προϋποθέτει την παρουσία νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH) και O_2 και πραγματοποιείται σε δυο βήματα. Στο

πρώτο βήμα η NOS δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH και το μεταφέρει στο σίδηρο της αίμης, με αποτέλεσμα να παράγεται η N-υδροξυ-αργινίνη. Στη συνέχεια ακολουθεί η οξείδωση του ενδιάμεσου προϊόντος και η παραγωγή NO και κιτρουλλίνης (Manukhina EB. *Exp Biol Med.* 2006 Apr; 231(4): 343-365)

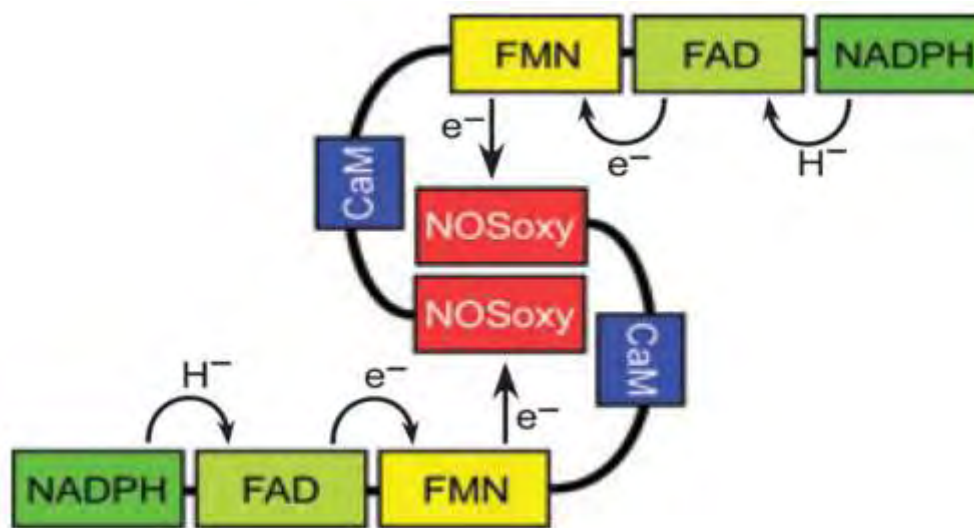


Οι συνθετάσες του NO είναι ομοδιμερή (Εικόνα 6). Αποτελούνται από ένα αμινοτελικό άκρο με την οξυγενάση (NOSoxy) το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του υποστώματος (L-αργινίνη), της αίμης και της τετραϋδροβιοπτερίνης (H₄B), ένα καρβοξυτελικό άκρο με την ρεδουκτάση το οποίο περιέχει τις περιοχές πρόσδεσης για το NADPH, το FAD, και το FMN, το οποίο παρουσιάζει υψηλή ομολογία αλληλουχιών με ένα άλλο γνωστό ένζυμο των θηλαστικών τη ρεδουκτάση του κυττοχρώματος P450, καθώς και μία περιοχή 30 αμινοξέων που αποτελεί την περιοχή σύνδεσης της ασβεστιο-καλμοδουλίνης. Η οξυγενάση βρίσκεται στον πυρήνα του ενζύμου περιέχει ένα μόριο αίμης, που συνδέεται με σίδηρο και αποτελεί την ενεργό θέση του ενζύμου όπου συντίθεται το NO. Κατά την διαδικασία της κατάλυσης μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το NADPH στο FAD και στο FMN σε κάθε υποομάδα της NOS και στη συνέχεια στη σιδηρούχο αίμη της συνοδούς υποομάδας του διμερούς. Η αναγωγή της αίμης καθιστά δυνατή την σύνδεση του O₂ και την οξείδωση του υποστρώματος στην υποομάδα της οξυγενάσης ^[101-103]. Η δραστηριότητα των υποομάδων της NOS μπορεί να εκφραστεί ξεχωριστά η μία από την άλλη.

Παρόλο που οι NOS έχουν βασικά δομικά, θερμοδυναμικά και μηχανικά χαρακτηριστικά από κοινού με την οικογένεια των διμερών φλαβινοπρωτεϊνών, των ρεδουκτασών, υπάρχουν ιδιαιτερότητες σχετικά με την σύνθεση του NO οι οποίες περιορίζουν και καθορίζουν τη λειτουργία τους. Οι NOS εμφανίζουν τουλάχιστον τέσσερα χαρακτηριστικά τα οποία τις διαχωρίζουν από άλλες φλαβοπρωτεΐνες και άλλα σουλφυδρυλικά ένζυμα: (α) το FMN αλληλεπιδρά με τη συνοδό υποομάδα του ίδιου διμερούς ενζύμου (β) η μεταφορά των ηλεκτρονίων επηρεάζεται από την σύνδεση της καλμοδουλίνης (γ) η δέσμευση της H₄B παρέχει το δεύτερο ηλεκτρόνιο για την ενεργοποίηση του O₂ αντί για την φλαβοπρωτεΐνη και στη συνέχεια η οξειδοαναγωγή επαναλαμβάνεται μέσα στην NOS και τέλος (δ) η σύνδεση του NO με την αίμη περιορίζει την

αναγωγή της αίμης από την φλαβοπρωτεΐνη ^[104].

Εικόνα 6: Δομή της NOS. Απεικονίζεται η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το NADPH στο FAD και στο FMN σε κάθε υποομάδα της NOS. NOSoxy: η περιοχή της οξυγενάσης, CaM: ασβέστιο-καλμοδουλίνη, FMN: φλαβινομονονουκλεοτίδιο, FAD: φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο, NADPH: νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (Stuehr DJ. FEBS J. 2009 Aug; 276(15): 3959-74)



Ενώ η cNOS έχει ταξινομηθεί σαν ένα ένζυμο Ca^{2+} και καλμοδουλινοεξαρτώμενο, σε μελέτες οι οποίες έγιναν σε αγγεία, έχει αναφερθεί μια ποικιλία αγωνιστών που ενεργοποιεί την cNOS ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} όπως ο ομοιάζων προς την ινσουλίνη νευροτρόφος παράγων ^[105], τα οιστρογόνα ^[106], και το shear stress ^[107]. Η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της cNOS στην σερίνη/θρεονίνη από μια πρωτεΐνη κινάση η οποία προκαλεί αύξηση της ευαισθησίας του ενζύμου στα ιόντα Ca^{2+} .

5.2 Δράση του NO

Το NO έχει βραχύ χρόνο ημίσειας ζωής (1–5 sec). Έχει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο οποίο οφείλει τη δυνατότητά του να αντιδρά σαν ελεύθερη ρίζα με άλλα μόρια. Η απόσπαση του ηλεκτρονίου θετικοποιεί το μόριο ενώ η προσθήκη ενός άλλου ηλεκτρονίου το καθιστά αρνητικότερο. Στην ηλεκτρική ουδετερότητα του NO οφείλεται η ταχεία διείσδυσή του εντός υδρόφιλων υποστρωμάτων και η ταχεία διαπερατότητά του διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών.

Ανταγωνιστική δράση προς το NO ασκούν όλες οι ενώσεις οι οποίες περιέχουν αίμη, εξαιτίας της υψηλής της δεσμευτικής ικανότητας προς αυτό. Έτσι η αιμοσφαιρίνη αποτελεί έναν

από τους ισχυρότερους ανταγωνιστές του, ικανή να αποτρέψει τοξικές επιπτώσεις από υπέρμετρη σύνθεσή του. Παράλληλα όλες οι μεταλλοπρωτεΐνες είναι δυνατό να σχηματίσουν ενώσεις με το NO, οι οποίες ενδεχομένως ασκούν άμεση επίδραση στη συνολική βιολογική του δράση.

Η τοξική του δράση συνίσταται στην ιδιότητά του να ενεργεί σαν ελεύθερη ρίζα οξυγόνου αλλά και στο γεγονός ότι προκαλεί δυσλειτουργία των NMDA υποδοχέων, εξαιτίας της οξειδωσης που προκαλεί στις σουλφυδριλικές ομάδες του μορίου τους προς τον σχηματισμό S-νιτροζοθειολών. Στον πνεύμονα οι νιτροζοθειόλες φαίνεται να έχουν το ρόλο της αποθήκευσης του NO και της εξασφάλισης της βιοδραστικότητάς του, τόσο μέσω της απελευθέρωσής του όσο και μέσω των αντιδράσεων trans-νιτροζυλίωσης^[108]. Εμφανίζουν στοχευμένη δράση. Η S-νιτροζολο-L-κυστεΐνη συμμετέχει στην S-νιτροζυλίωση ειδικών πρωτεϊνών των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών, στη χάλαση των λείων μυϊκών ινών των πνευμονικών αγγείων καθώς και στην ενίσχυση του σήματος για την αύξηση του αερισμού ανά λεπτό κάτω από συνθήκες υποξίας^[109]. Οι S-νιτροζοθειόλες είναι παρούσες στους αεραγωγούς φυσιολογικών ατόμων σε συγκεντρώσεις ικανές για να ρυθμίσουν τον τόνο των αεραγωγών (περιέχονται σε συγκεντρώσεις mM στη βλέννα που επαλείφει το αναπνευστικό επιθήλιο) και επιπλέον έχουν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το NO^[110]. Η επαγόμενη από τις S-νιτροζοθειόλες χάλαση των λείων μυών διαμεσολαβείται από την αντιστρεπτή οξειδωση των θειολών που βρίσκονται σε πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη συστολή^[111].

Είναι ένα μόριο αγγελιοφόρος το οποίο ρυθμίζει διάφορες βιολογικές λειτουργίες είτε σε μικρές συγκεντρώσεις σαν διαβιβαστής (ρύθμιση αιματικής ροής, αντιδραστικότητα αιμοπεταλίων, νευρομεταφορά και μνήμη στο μη αδρενεργικό μη χολινεργικό σύστημα – NANC) είτε σε μεγάλες συγκεντρώσεις σαν κυτταροτοξικός και κυτταροστατικός παράγοντας του αμυντικού μηχανισμού έναντι όγκων και άλλων παθογόνων. Όλο και περισσότερα στοιχεία επισημαίνουν τον σημαντικό ρόλο του NO στην λειτουργία και στην παθολογία των πνευμόνων. Έχει ανιχνευθεί στον εκπνεόμενο αέρα ανθρώπων και ζώων στον οποίο η συγκέντρωσή του αυξάνει σε διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών όπως στο βρογχικό άσθμα^[112].

5.3 Δράση του NO στους αεραγωγούς

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε ότι το NO περιέχεται σε αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες (όπως η νιτρογλυκερίνη και το νιτροπρωσσικό νάτριο) προάγοντας τη χάλαση σε απομονωμένες ΛΜΙ αεραγωγών ενεργοποιώντας τη γουανυλική κυκλάση και αυξάνοντας το cGMP, μελετήθηκε στον άνθρωπο και στα ζώα η ικανότητα του εισπνεόμενου NO να προκαλεί βρογχοδιαστολή^[113]. Στις μελέτες που έγιναν δεν παρατηρήθηκε επίδραση του NO στην ευενδοτότητα πράγμα που σημαίνει ότι το NO εμποδίζει την σύσπαση των μεγάλων κυρίως

αεραγωγών παρά των μικρών ^[114]. Το εισπνεόμενο NO σε συγκέντρωση 80 ppm δεν έχει καμία επίδραση σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια αλλά έχει μια μικρή βρογχοδιασταλτική δράση σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα ^[115]. Επίσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιπρόσθετα με την ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης, το NO προκαλεί χάλαση των ΛΜΙ των βρόγχων και με την εμπλοκή του στον μεταβολικό δρόμο των θειολών για τον σχηματισμό των νιτροθειολών (RS-NO) οι οποίες έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής απ' ότι το NO, έχουν ισχυρή βρογχοδιασταλτική δράση, είναι ανεξάρτητες του μεταβολικού δρόμου του cGMP και η συγκέντρωσή τους είναι ικανή να επηρεάσει τον τόνο των αεραγωγών ^[116].

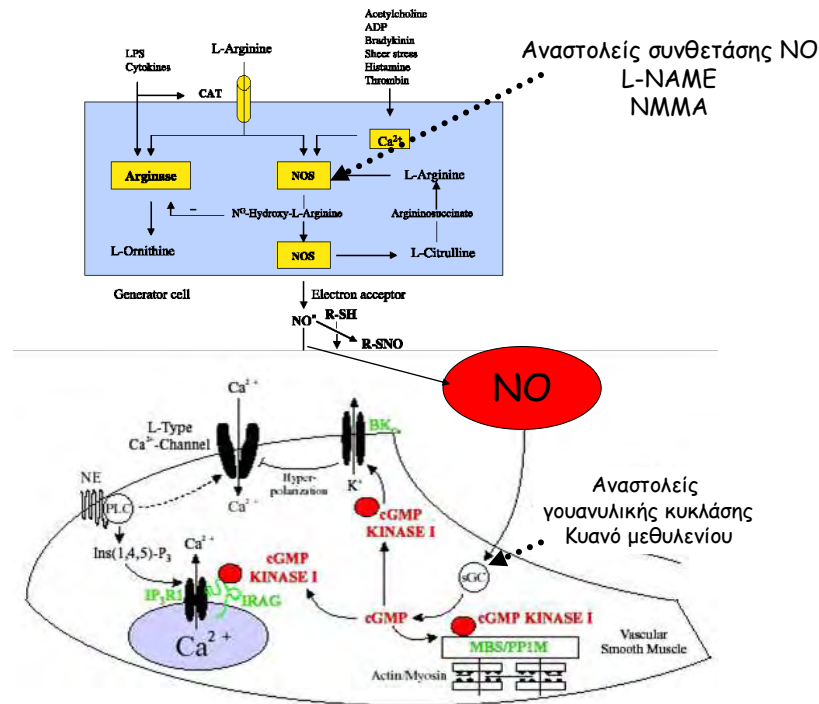
Διάφορες μελέτες σε ζώα έχουν δείξει την δυνατότητα του ενδογενούς NO να επιδρά στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (AHR) που επάγεται από διάφορους μεσολαβητές. Το NO που απελευθερώνεται από το επιθήλιο των αεραγωγών φαίνεται να εξουδετερώνει την σύσπαση των ΛΜΙ των αεραγωγών που επάγεται από διάφορα σπασμογόνα (βραδυκινίνη, ενδοθηλίνη-1, SP, αδενοσίνη, καλσιτονίνη) ^[117-119]. Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα δείχνουν ότι αυτός ο μεταβολικός δρόμος απελευθέρωσης NO είναι ασβεστιοεξαρτώμενος και το cGMP είναι ο τελικός μεσολαβητής για την προστασία των βρόγχων η οποία οφείλεται στο NO που απελευθερώνεται από το επιθήλιο των αεραγωγών ^[120, 121].

Ο πιο γνωστός δρόμος που το NO προκαλεί χάλαση των ΛΜΙ είναι μέσω γουανυλικής κυκλάσης η οποία επάγει στο κύτταρο ένα αριθμό κινάσεων (Εικόνα 7). Οι κινάσεις αυτές προκαλούν χάλαση των ΛΜΙ μέσω πολλαπλών οδών που οδηγούν τελικά σε αποφωσφορυλίωση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης ή σε ελάττωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου είτε επειδή παρεμποδίζεται η είσοδος του από τον εξωκυττάριο χώρο είτε επειδή παρεμποδίζεται η απελευθέρωση του από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης προκαλείται φωσφορυλίωση των διαύλων της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και αναστολή της απελευθέρωσης ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η φωσφορυλίωση και το άνοιγμα διαύλων καλίου (που ενεργοποιούνται από το ασβέστιο-BKca) οδηγεί σε υπερπόλωση της μεμβράνης με συνέπεια το κλείσιμο πολλών διαύλων συμπεριλαμβανομένων και των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου που ευθύνονται για την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο και τελικά την αναστολή εισόδου ασβεστίου στο κύτταρο. Τέλος ενεργοποιείται η φωσφατάση της μυοσίνης που αποφωσφορυλιώνει την ελαφρά άλυσο της μυοσίνης ^[122].

Η ενδογενής απελευθέρωση NO φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο στο ήπιο άσθμα ενώ το σοβαρό άσθμα πιθανά να οφείλεται στην μείωση ή στην απουσία της eNOS ^[123]. Μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών ανανεώνουν την δραστηριότητα της eNOS καταστέλλοντας την έκφραση iNOS ^[124]. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της eNOS μπορεί

να συνδέεται με την ανάπτυξη του άσθματος αλλά δεν φαίνεται να επιδρά στην βαρύτητά του ^[125].

Εικόνα 7: Δράση του NO στις AMI (Hofmann F. J Cell Sci. 2000 May; 113 (10): 1671-6)



Η ενδογενής απελευθέρωση NO έχει διεγερτική επίδραση στους βλεννοπαραγωγούς αδένες των αεραγωγών ^[126]. Επίσης έχει βρεθεί ένας μηχανισμός ο οποίος αυξάνει την κινητικότητα των κροσσών του αναπνευστικού επιθηλίου και ο οποίος εξαρτάται από το NO ^[127]. Εμπλοκή του NO αναφέρεται και στην λειτουργία των διαύλων ιόντων του επιθηλίου των αεραγωγών ^[128, 129].

Η αυξημένη ενδογενής παραγωγή NO έχει σαν αποτέλεσμα μια απώτερη επιβλαβή επίδραση και μπορεί να εμπλέκεται στην ηωσινοφιλική φλεγμονή η οποία χαρακτηρίζει το άσθμα. Το NO φαίνεται να παίζει ρόλο και στην μη ειδική άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων και μπορεί να εμπλέκεται στην σήμανση μεταξύ μακροφάγων και T κυττάρων ^[130]. Τα βοηθητικά T1 κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα να παράγουν NO και να σκοτώσουν τα παθογόνα ^[131]. Η ισορροπία μεταξύ των βοηθητικών T1 και T2 κυττάρων καθορίζει την έκβαση πολλών σοβαρών ασθενειών. Τα T1 (αλλά όχι και τα T2) μπορούν να ενεργοποιηθούν από ειδικά αντιγόνα και να παράγουν μεγάλες ποσότητες NO. Το NO φαίνεται να ασκεί αυτορυθμιστική δράση στα T1 κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην ανοσοπαθολογία ^[132].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξωγενής χορήγηση NO έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της σύνθεσης του DNA και του πολλαπλασιασμού των ΛΜΙ των αεραγωγών είτε πρόκειται για τον μεταβολικό δρόμο στον οποίο εμπλέκεται το cGMP είτε για τον μεταβολικό δρόμο ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το cGMP ^[133, 134]. Αυτή η πρόσφατη ανακάλυψη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του NO μπορεί να αποβεί σημαντική στην πρόληψη της επαναδιαμόρφωσης (remodeling) των αεραγωγών στο χρόνια άσθμα ή στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ^[2].

Συμπερασματικά, το NO διαδραματίζει διάφορους ρόλους στους αεραγωγούς που ποικίλουν από ενδογενής τροποποιητής της λειτουργίας των αεραγωγών έως μεσολαβητής της τροποποίησης της ανοσολογικής απάντησης σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Η δραστηριότητά του καθορίζεται από τη συγκέντρωσή του, από την περιοχή και από τον χρόνο της σύνθεσής του. Πολλές μελέτες αναφέρονται στην παθοβιολογική σημασία του NO σε ειδικές νόσους των αεραγωγών όπως το βρογχικό άσθμα. Η βρογχοπροστατευτική επίδραση του NO στο άσθμα περιλαμβάνει χάλαση και αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΙ. Η αυξημένη υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών μπορεί να οφείλεται σε ελλιπή παραγωγή NO, το οποίο προέρχεται από ενεργοποίηση της cNOS, σε τοπικό επίπεδο ^[135]. Από την άλλη το άσθμα συνδέεται με τοπική αύξηση της παραγωγής του NO το οποίο προέρχεται από ενεργοποίηση της iNOS, και η οποία μακροπρόθεσμα έχει βλαπτική επίδραση στους αεραγωγούς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Προετοιμασία ιστού και πειράματα συστολών.

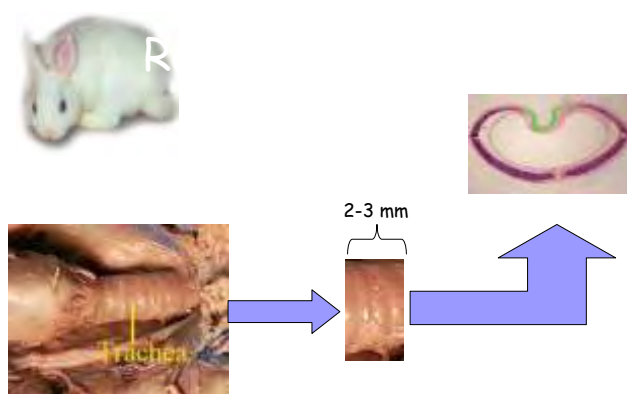
Η μελέτη έγινε σε εξωθωρακικά τμήματα τραχείας ενήλικων κουνελιών (ηλικίας 6 εβδομάδων, με βάρος σώματος περίπου 2 Kg) και των δύο φύλων. Τα ζώα θανατώθηκαν με ενδοφλέβια χορήγηση νατριούχου πεντοβαρβιτάλης (Vétoquinol, Γαλλία) σε δόση 20 mg/kg βάρους σώματος.

Την ευθανασία του κουνελιού ακολουθούσε χειρουργική διάνοιξη του τραχήλου και ανεύρεση της τραχείας. Η χειρουργική αφαίρεση της τραχείας γινόταν στο πάνω μέρος της, στο ύψος του κρικοειδούς χόνδρου και στο κάτω μέρος της, στο ύψος όπου αυτή εισέρχεται στο θώρακα.

Στη συνέχεια η τραχεία καθαριζόταν από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό στο συντομότερο χρονικό διάστημα και εμβαπτιζόταν αμέσως σε διάλυμα Krebs με την ακόλουθη σύσταση: Na^+ 137 mM, Mg^{2+} 1.1 mM, K^+ 5.9 mM, Cl^- 123 mM, Ca^{2+} 2 mM, H_2PO_4^- 1.2 mM, HCO_3^- 24.9 mM, Glucose 9.6 mM. Στο διάλυμα υπήρχε συνεχής παροχή O_2 95% και CO_2 5% και η θερμοκρασία του διατηρούνταν διαρκώς σταθερή στους 37°C. Το pH του διαλύματος ήταν 7.4.

Ακολούθως, το μέσο τμήμα της τραχείας τεμαχιζόταν σε κρίκους, πλάτους 2 mm, 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 κόβονταν κατά μήκος του χόνδρου απέναντι ακριβώς από την περιοχή των λείων μυϊκών ινών ώστε αυτές να διατηρούνται ανέπαφες (Εικόνα 1).

ΕΙΚΟΝΑ 1: Παρασκεύασμα ημικρικών τραχείας κουνελιού



Κάθε ημικρίκιο τοποθετούνταν σε λουτρό διαπότισης, με την ενδοαυλική πλευρά προς τα πάνω και βρισκόταν υπό συνεχή διαπότιση με διάλυμα Krebs (pH 7.4 στους 37°C). Το πάχος των

ιστοτεμαχίων μετριόταν, μετά το τέλος του πειράματος, με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (DIAPHOT 300 Nikon), μιας βιντεοκάμερας (TK-1281, JVC) και μιας οθόνης (TM-290 ZE, JVC) καθώς επίσης και με τη βοήθεια ενός μέτρου διαμέτρου 0.025 mm (πλάκα Neubauer).

Κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετείτο στο λουτρό διαπότισης, του οποίου η χωρητικότητα ήταν 5 ml, με την επιφάνεια του αυλού προς τα πάνω. Το ένα άκρο του ιστοτεμαχίου στερεωνόταν στη βάση του λουτρού διαπότισης και το άλλο σε άγκιστρο στο ελεύθερο άκρο ενός μηχανομετατροπέα (Grass FT 03C force displacement transducer). Συγχρόνως υπήρχε συνεχής ένδειξη σήματος σε οθόνη παλμογράφου (Harvard Universal). Στα υδατόλουτρα υπήρχε συνεχής ροή οξυγονωμένου διαλύματος Krebs και η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 37°C με τη βοήθεια ενός θερμαντήρα νερού. Η παροχή του διαλύματος καθώς και η απομάκρυνσή του γινόταν μέσω μιας περισταλτικής αντλίας με ταχύτητα διάχυσης 5ml/min (Εικόνα 2). Στα ιστοτεμάχια εφαρμόζοταν, με τη βοήθεια μικρομετρικού κοχλίου, χειροκίνητα, τάση ηρεμίας 0.5 g, 2.5 g ή 4 g και αφήνονταν να ισορροπήσουν για τουλάχιστον μία ώρα πριν αρχίσει η πειραματική διαδικασία. Οι αλλαγές στην τάση ανιχνεύονταν μέσω του μηχανομετατροπέα και καταγράφονταν από ένα καταγραφικό μηχάνημα τεσσάρων καναλιών (Grass 7400 Physiological Recorder).

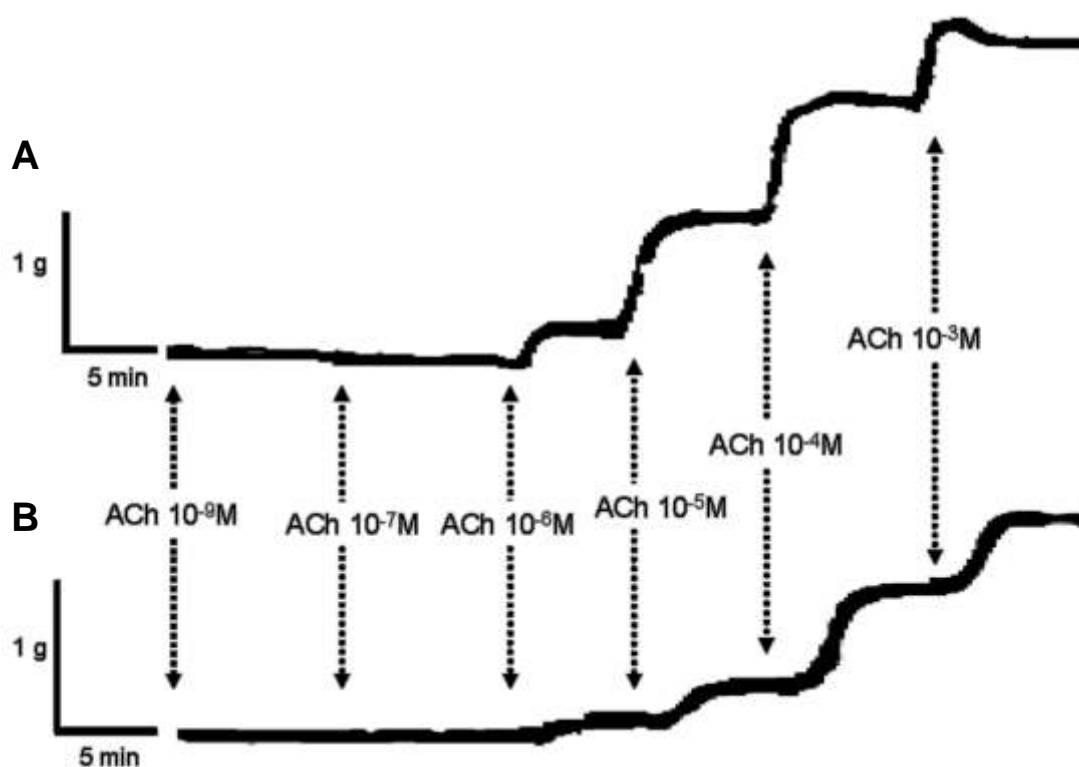
ΕΙΚΟΝΑ 2: Πειραματική διάταξη (Α) για τη μελέτη των συστολών των λείων μυϊκών ινών τραχείας κουνελιού. (Β): καταγραφικό μηχάνημα τεσσάρων καναλιών (Grass 7400 Physiological Recorder). (Γ): Λουτρά διαπότισης και μηχανομετατροπείς (Grass FT 03C force displacement transducer). (Δ): θερμαντήρας νερού



Τα πειράματα της ομάδα ελέγχου και αυτά της μελέτης της επίδρασης της φαρμακευτικής ουσίας γίνονταν παράλληλα σε διαφορετικά λουτρά διαπότισης. Η ACh προστίθετο στο διάλυμα

διαπότισης αθροιστικά (Εικόνα 3).

ΕΙΚΟΝΑ 3: Αντιπροσωπευτική καμπύλη καταγραφής, που δείχνει τη σύσπαση των ΛΜΙ που προκαλεί η ACh (ACh $10^{-9}M$ - $10^{-3}M$) παρουσία (A) ή απουσία (B) του μη ειδικού αναστολέα της NOS, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) σε συγκέντρωση $10^{-4}M$.

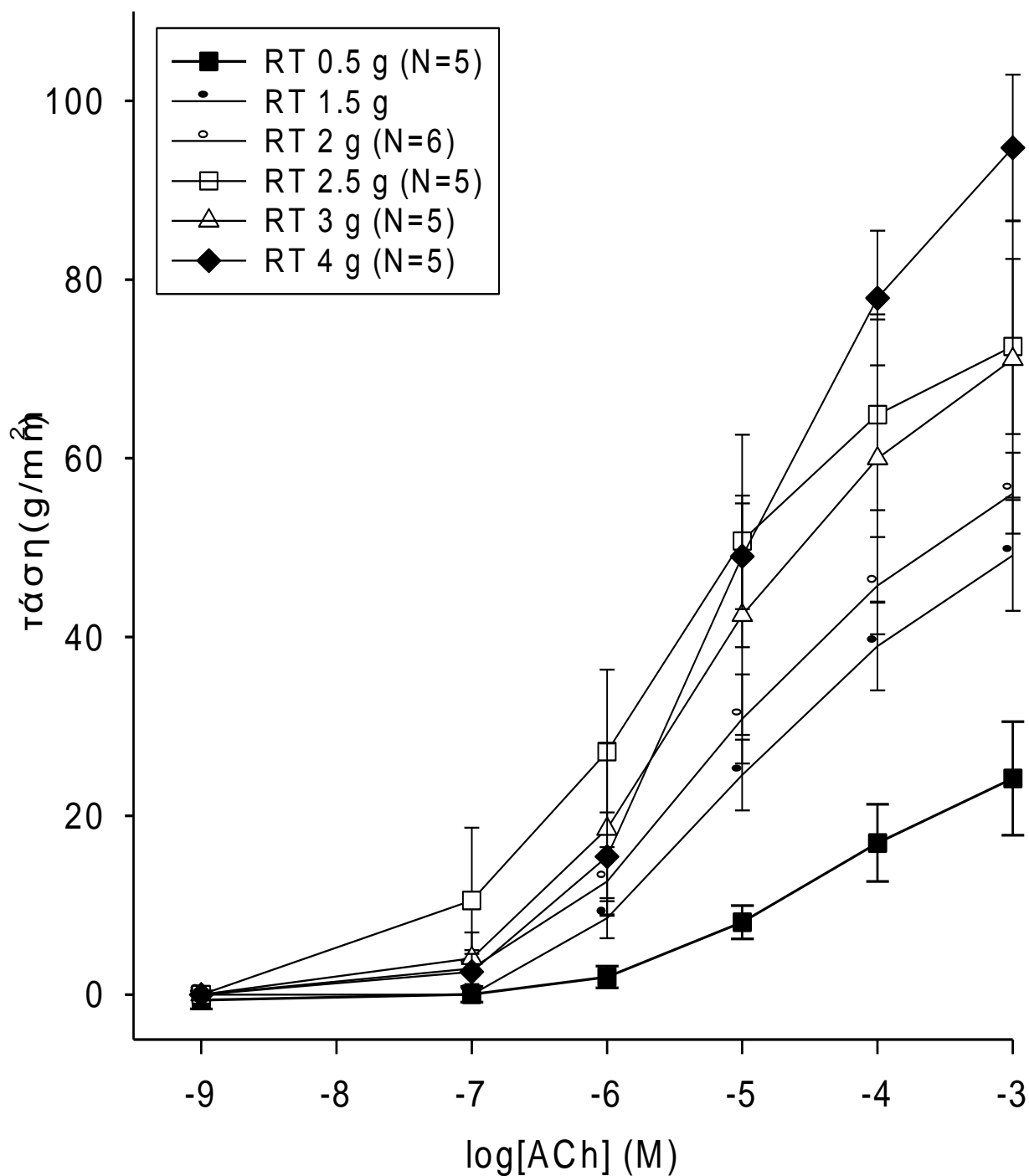


Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι όταν μεταβάλλεται η τάση ηρεμίας που εφαρμόζεται στον ιστό από 0.5 έως 4 γραμμάρια μεταβάλλεται και η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη (Σχήμα 1). Υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η τάση η οποία αναπτύσσεται στις ΛΜΙ σαν απάντηση στην επίδραση της ACh βρίσκεται στην περιοχή της καμπύλης όπου η σχέση, εφαρμοζόμενης τάσης ηρεμίας/τάσης η οποία αναπτύσσεται στους ιστούς, έχει γραμμική συσχέτιση (Σχήμα 2). Επίσης υπό τάση ηρεμίας 2.5 g το μήκος των ΛΜΙ είναι αυξημένο κατά 110% του αρχικού, ενώ υπό τάση 0.5 g οι ΛΜΙ διατηρούν το μήκος τους χωρίς διπλώσεις ή διάταση ^[5].

ΣΧΗΜΑ 1:

Καμπύλη δόσης απάντησης της ACh, υπό τάση ηρεμίας (RT) 0.5 g έως 4 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM.

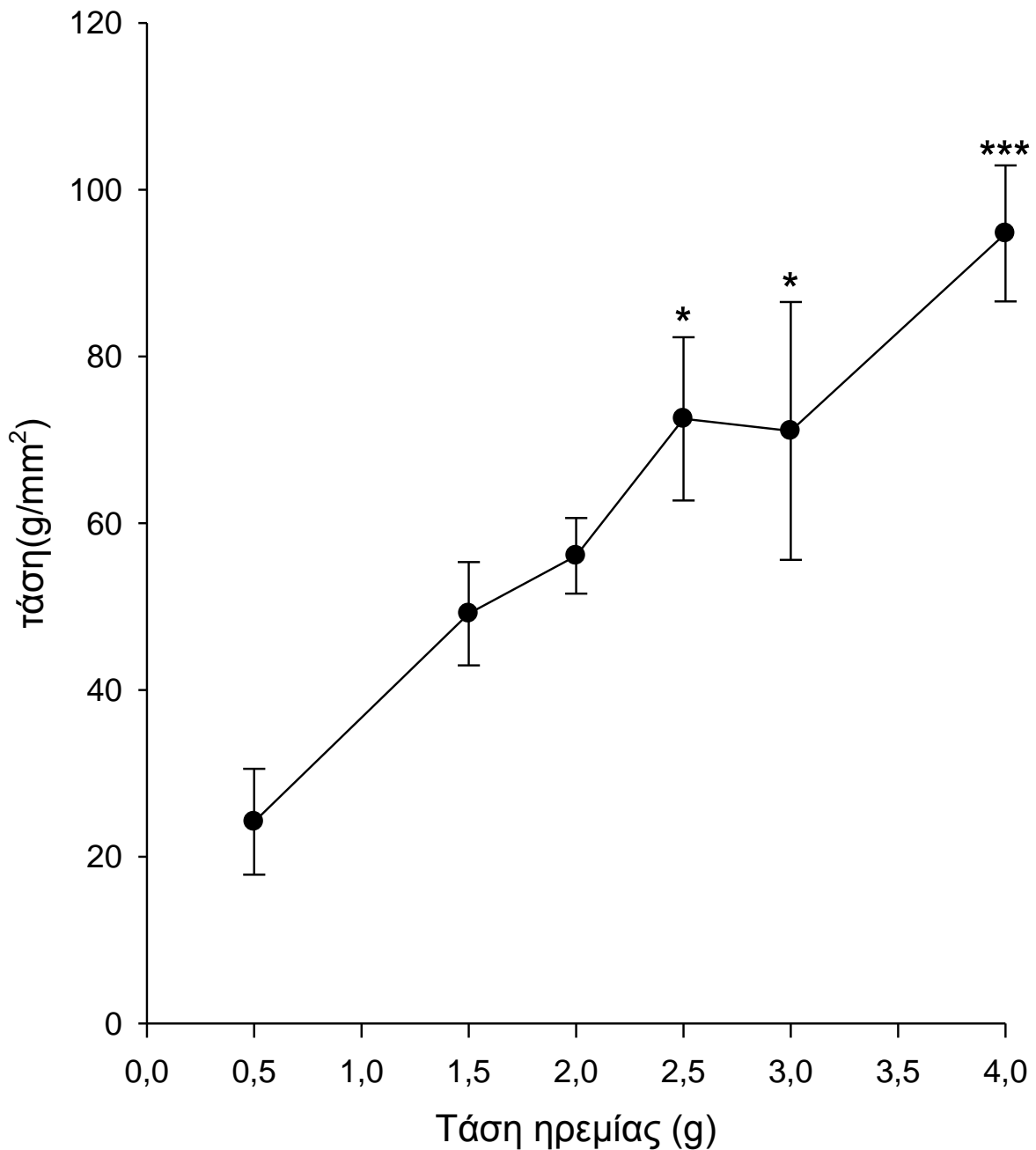
Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 5 έως 7 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



ΣΧΗΜΑ 2:

Μέγιστη τάση που αναπτύσσουν οι ιστοί σε $ACh 10^{-3}M$, υπό τάση ηρεμίας (RT) 0.5 g έως 4 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 5 έως 7 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. * $p < 0.05$ και *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με την τάση που αναπτύσσεται υπό τάση ηρεμίας 0.5 g (unpaired t-test)



2. Μελέτη της επίδρασης της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου

Για να μελετηθεί ο ρόλος της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου τα πειράματα διεξήχθησαν σε δύο συγκεντρώσεις Ca^{2+} στο υγρό διαπότισης:

A) Σε συγκέντρωση Ca^{2+} 2 mM που ισοδυναμεί με την συγκέντρωση ασβεστίου που υπάρχει φυσιολογικά στο εξωκυττάριο υγρό του πειραματόζωου.

B) Σε χαμηλή συγκέντρωση Ca^{2+} 0.2 mM, δηλαδή σε συγκέντρωση 10% της φυσιολογικής. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε γιατί είναι χαμηλότερη από την συγκέντρωση ασβεστίου, η οποία απαιτείται ώστε να ασκήσει το επιθηλίο την τροποποιητική του δράση, στην σύσπαση που επάγεται από την ACh, και δεν επηρεάζει την παθητική τάση ^[136].

3. Μελέτη της επίδρασης φαρμακευτικών ουσιών

Οι συγκεντρώσεις των φαρμακευτικών ουσιών επιλέχθηκαν με κριτήριο τις υψηλότερες ανασταλτικές ή διεγερτικές επιδράσεις τους. Τα τμήματα τραχείας επώαστηκαν με τον ανασταλτικό παράγοντα ή την πρόδρομη ουσία τουλάχιστον για 30 λεπτά προτού επιδράσουμε με διαδοχικά διαλύματα ACh σε συγκεντρώσεις από 10^{-9} έως 10^{-3} M.

3.1. Αναστολείς συνθετάσης NO

Τα πειράματα έγιναν παρουσία του μη ειδικού αναστολέα της NOS, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) σε συγκέντρωση 10^{-4} M, του ειδικού αναστολέα της iNOS, S-Methylsothioureia (SMT) σε συγκέντρωση 10^{-4} M και του ειδικού αναστολέα της nNOS, 7-Nitroindazole (7-NI) σε συγκέντρωση 10^{-4} M.

Ο σχετικός αναστολέας της eNOS, L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10^{-4} M. Μελετήθηκε η επίδραση του στην μέγιστη σύσπαση των ΔΜΙ που προκαλεί η ακετυλοχολίνη σε συγκέντρωση 10^{-3} M.

3.2. Αναστολείς φωσφορυλίωσης

Τα πειράματα έγιναν παρουσία του αναστολέα της πρωτεΐνης κινάσης, Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) σε συγκέντρωση 3×10^{-6} M και του αναστολέα Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) σε συγκέντρωση 3×10^{-6} M

3.3. Ανταγωνιστές τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου

Τα πειράματα έγιναν παρουσία του αναστολέα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου βεραπαμίλη σε συγκέντρωση 2×10^{-6} M

3.4. Εξωγενής χορήγηση πρόδρομης ουσίας σχηματισμού NO

Τα πειράματα έγιναν παρουσία της πρόδρομης ουσίας σχηματισμού του NO, L-αργινίνης σε συγκέντρωση 10^{-3} M.

Όλες οι χημικές ουσίες αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich Chemical (Γερμανία), εκτός από την Erbstatin A που αγοράστηκε από την Calbiochem (Calif, USA).

Η βεραπαμίλη διαλύθηκε 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.

Ο ειδικός αναστολέας της nNOS, 7-Nitroindazole (7-NI) και ο αναστολέας της πρωτεΐνης τυροσίνης κινάσης Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) διαλύθηκαν σε dimethyl sulfoxide (DMSO).

Όλες οι υπόλοιπες ουσίες διαλύθηκαν σε διάλυμα Krebs

Η παρασκευή των διαλυμάτων γινόταν κάθε φορά πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Υπολογίστηκε η μέγιστη τάση που προκλήθηκε σαν απάντηση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ACh και οι τιμές εκφράστηκαν ως τάση σε γραμμάρια ανά διατομή ιστού (g/mm^2). Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν μέσος όρος \pm σφάλμα μέσου όρου (standard error). Το N αναφέρεται στον αριθμό των πειραμάτων.

Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων πειραμάτων έγινε με τη χρήση unpaired t-test. Θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική κάθε διαφορά με $p < 0.05$. Τα γραφικά έγιναν με τα γραφιστικά πακέτα Sigma Plot 2001 και Graph Prism.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ

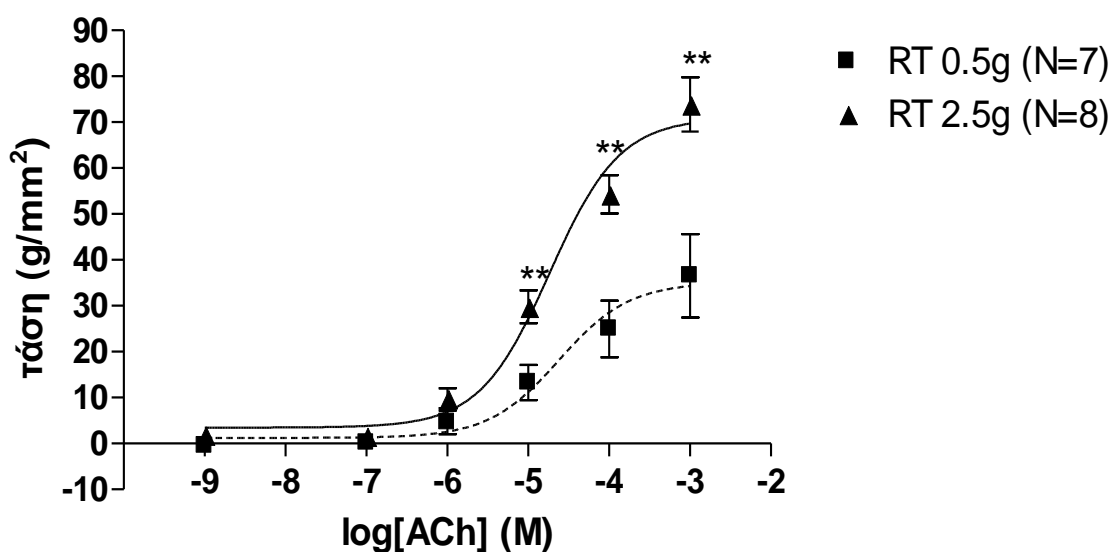
1.1 Μελέτη της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Μελετήθηκε η επίδραση της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη. Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g και σε εξωκυτάρια συγκέντρωση ασβεστίου 2 mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η αύξηση της τάσης ηρεμίας από 0.5 g σε 2.5 g έχει σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά η σύσπαση του ιστού σαν απάντηση στην επίδραση της ακετυλοχολίνης σε συγκεντρώσεις από 10^{-5} M έως 10^{-3} M ($p < 0.05$). Η ισομετρική τάση που αναπτύχθηκε με την επίδραση της ακετυλοχολίνης σε συγκέντρωση 10^{-3} M ήταν 24.18 ± 6.34 g/mm² και 72.41 ± 4.15 g/mm² υπό τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g αντίστοιχα ($p < 0.01$) (Σχήμα 1).

ΣΧΗΜΑ 1:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, υπό RT 0.5 g και 2.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 7 ή 8 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις τιμές υπό τάση ηρεμίας 0.5 g (unpaired t-test).



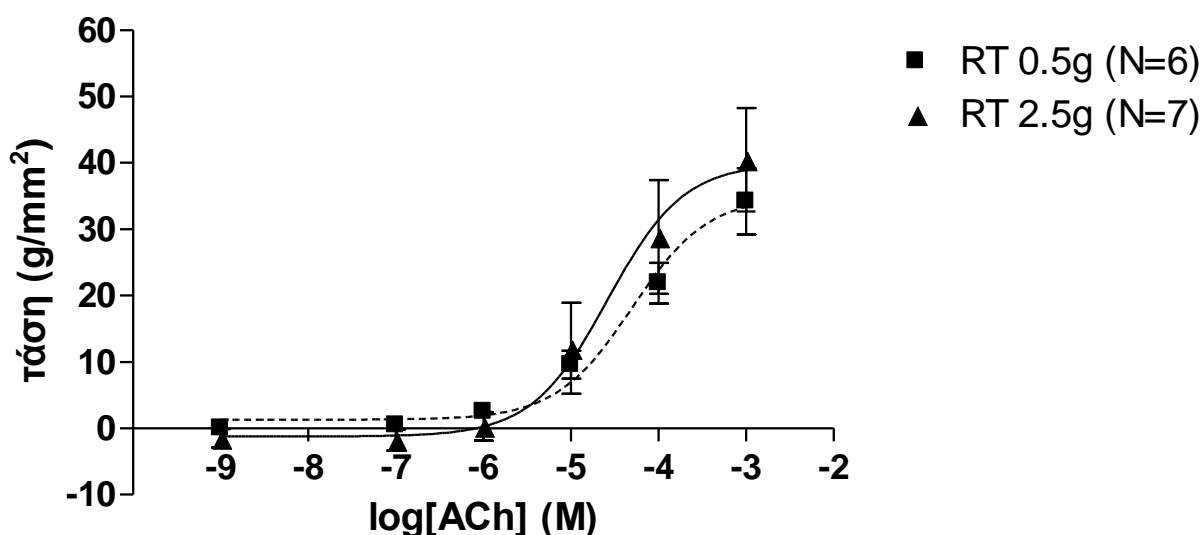
1.2 Μελέτη της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 0.2 mM

Μελετήθηκε η επίδραση της τάσης ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη σε εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου 0.2 mM. Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η αύξηση της τάσης ηρεμίας από 0.5 g σε 2.5 g δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα του ιστού στην ακετυλοχολίνη σε συγκεντρώσεις από 10^{-9} M έως 10^{-3} M όταν η συγκέντρωση του εξωκυττάριου ασβεστίου είναι χαμηλή (0.2mM). Η ισομετρική τάση που αναπτύχθηκε με την επίδραση της ακετυλοχολίνης σε συγκέντρωση 10^{-3} M ήταν 37.97 ± 4.07 g/mm² και 48.26 ± 8.95 g/mm² υπό εφαρμοζόμενη τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g αντίστοιχα (Σχήμα 2).

ΣΧΗΜΑ 2:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, υπό RT 2.5 g και 0.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 0.2 mM.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 6 ή 7 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



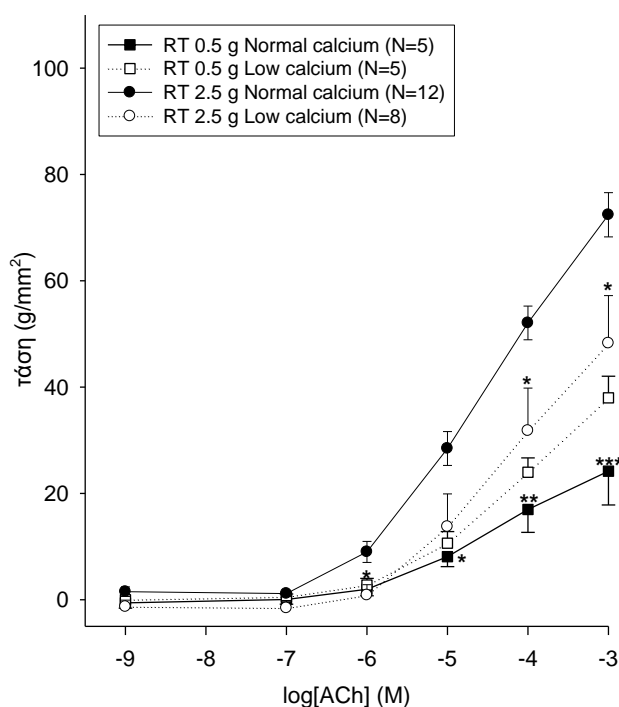
1.3 Σύγκριση της επίδρασης της RT στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh σε συγκέντρωση εξωκυττάρια ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM υπό RT 2.5 g και 0.5 g

Η επίδραση της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ακετυλοχολίνη εξαρτάται από την εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Έτσι σε χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου (0.2 mM), η σύσπαση του ιστού με την επίδραση της ακετυλοχολίνης δεν αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της τάσης ηρεμίας από 0.5 g σε 2.5 g όπως παρατηρείται σε συγκέντρωση ασβεστίου 2 mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η μείωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της σύσπασης η οποία επάγεται από την ακετυλοχολίνη σε συγκεντρώσεις από 10^{-6} M έως 10^{-3} M ($p < 0.05$) ενώ υπό τάση ηρεμίας 0.5 g δεν υπήρξε διαφορά (Σχήμα 3).

ΣΧΗΜΑ 3:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ακετυλοχολίνης, σε κανονική (2 mM) και μειωμένη (0.2 mM) εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, υπό RT 2.5 g, και 0.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 5 έως 12 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$: σύγκριση μεταξύ των τιμών της τάσης των 2.5 g και 0.5 g σε κανονική εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου (unpaired t-test).



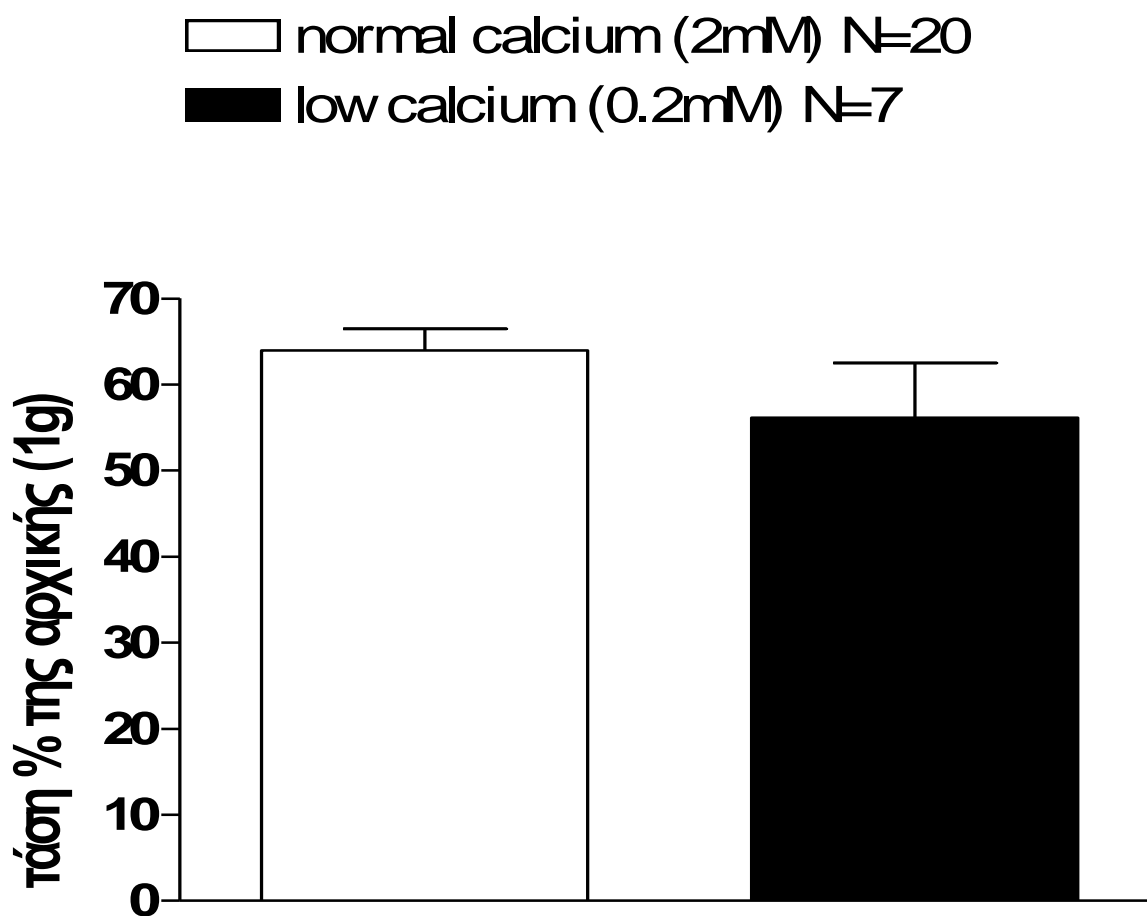
1.4 Μελέτη της επίδρασης της RT στην παθητική τάση των ΛΜΙ σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g σε συκεντρώσεις ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM. Στον ιστό εφαρμόστηκε χειροκίνητα αρχική τάση 0.5 g ή 2.5 g. Ο ιστός αφέθηκε να ισορροπήσει για 60 περίπου λεπτά και υπολογίστηκε η παθητική τάση του ιστού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η μεταβολή της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην παθητική τάση (Σχήμα 4).

ΣΧΗΜΑ 4:

Παθητική τάση που αναπτύσσει ο ιστός σε κανονική (2 mM) και μειωμένη (0.2 mM) εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου υπό 2.5 g τάση ηρεμίας.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 7 έως 22 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



2. Μελέτη της επίδρασης της RT στην παραγωγή NO

2.1 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

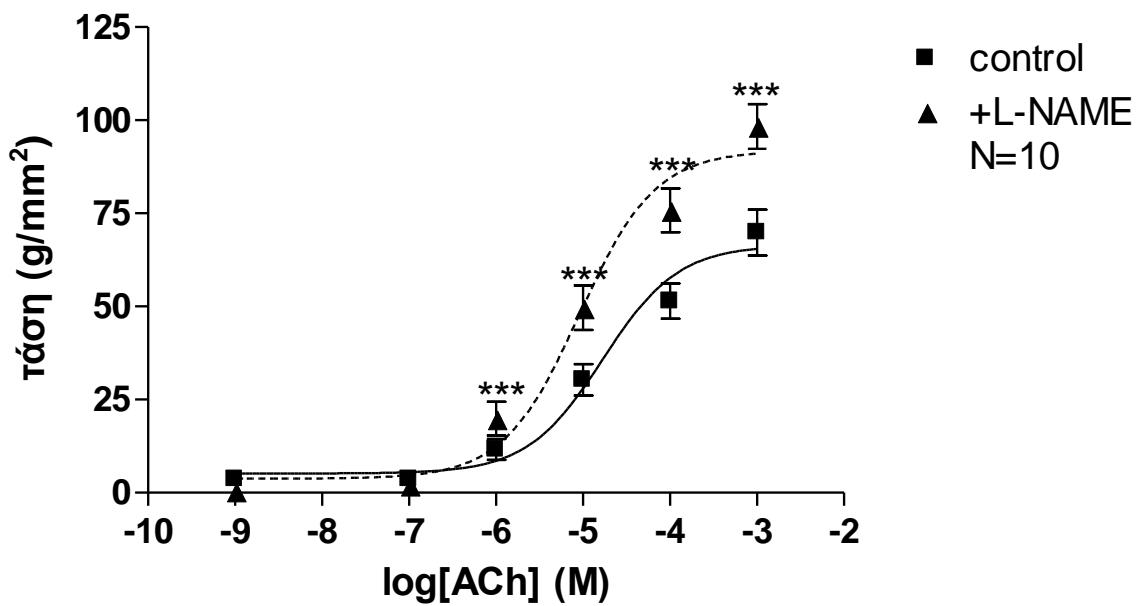
Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 0.5 g και 2.5 g παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η παρουσία του L-NAME στο υγρό διαπότισης αυξάνει σε σημαντικό βαθμό τη σύσπαση που επάγεται από την ακετυλοχολίνη σε συγκεντρώσεις από 10^{-6} M έως και 10^{-3} M ($p < 0.05$) (Σχήμα 5A). Αντίθετα υπό τάση ηρεμίας 0.5 g η παρουσία του L-NAME δεν φαίνεται να επηρεάζει το βαθμό της σύσπασης που επάγεται από την επίδραση της ακετυλοχολίνης (Σχήμα 5B). Υπό τάση ηρεμίας 2.5 g παρουσία του L-NAME, η ισομετρική τάση που αναπτύχθηκε με την επίδραση της ακετυλοχολίνης σε συγκέντρωση 10^{-3} M ήταν 101.08 ± 5.95 g/mm².

ΣΧΗΜΑ 5:

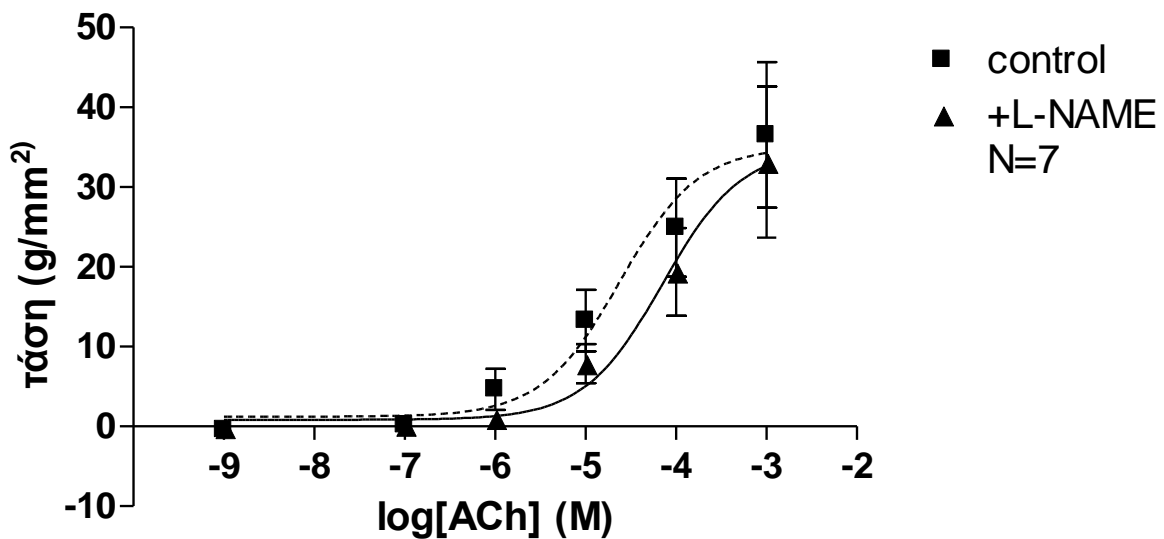
Καμπύλη δόσης απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO Nω-Nitro-L-Arginine Methyl ester (L-NAME) υπό 2.5 g (A) και 0.5 g (B) τάση ηρεμίας.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 7 ή 10 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (unpaired *t*-test).

A



B



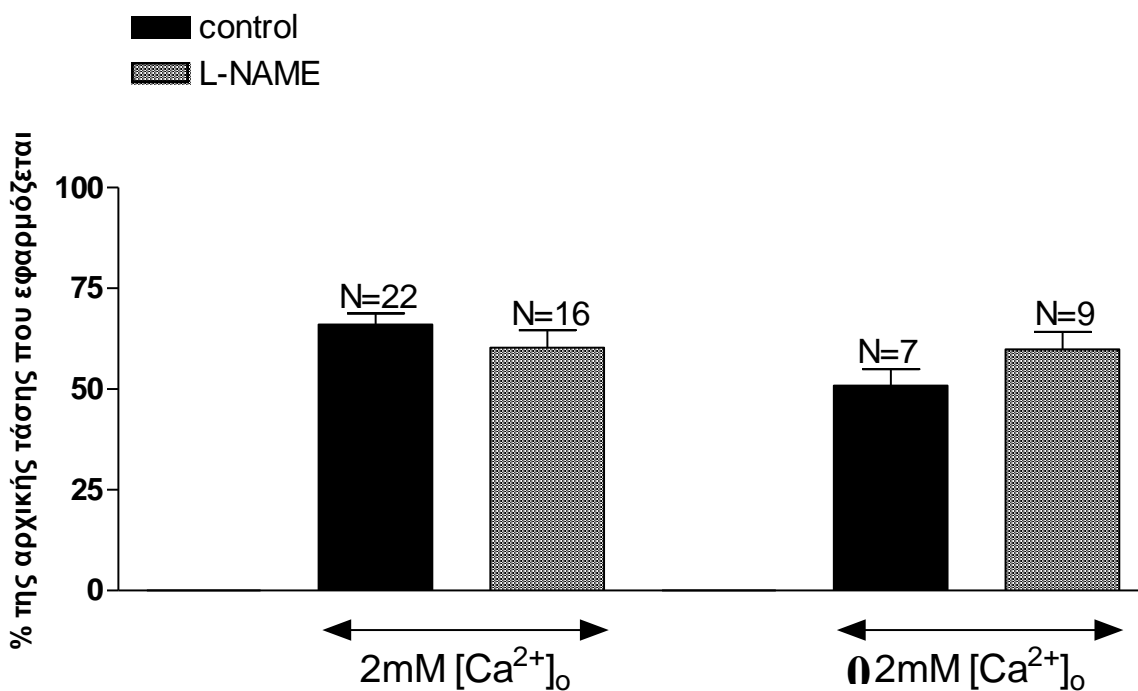
2.2 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) στην παθητική τάση του ιστού που αναπτύσσεται όταν εφαρμόζεται στον ιστό τάση ηρεμίας 2.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g σε συγκεντρώσεις ασβεστίου 2 mM και 0.2 mM παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME). Στον ιστό εφαρμόστηκε χειροκίνητα αρχική τάση 2.5 g. Ο ιστός αφέθηκε να ισορροπήσει για 60 περίπου λεπτά και υπολογίστηκε η παθητική τάση του ιστού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η μεταβολή της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου καθώς και η προεπεξεργασία των παρασκευασμάτων με L-NAME δεν επηρεάζει την παθητική τάση (Σχήμα 6).

ΣΧΗΜΑ 6:

Παθητική τάση που αναπτύσσει ο ιστός σε κανονική (2 mM) και μειωμένη (0.2 mM) εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου στο διάλυμα υπό τάση ηρεμίας 2.5 g παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME).

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 7 έως 22 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



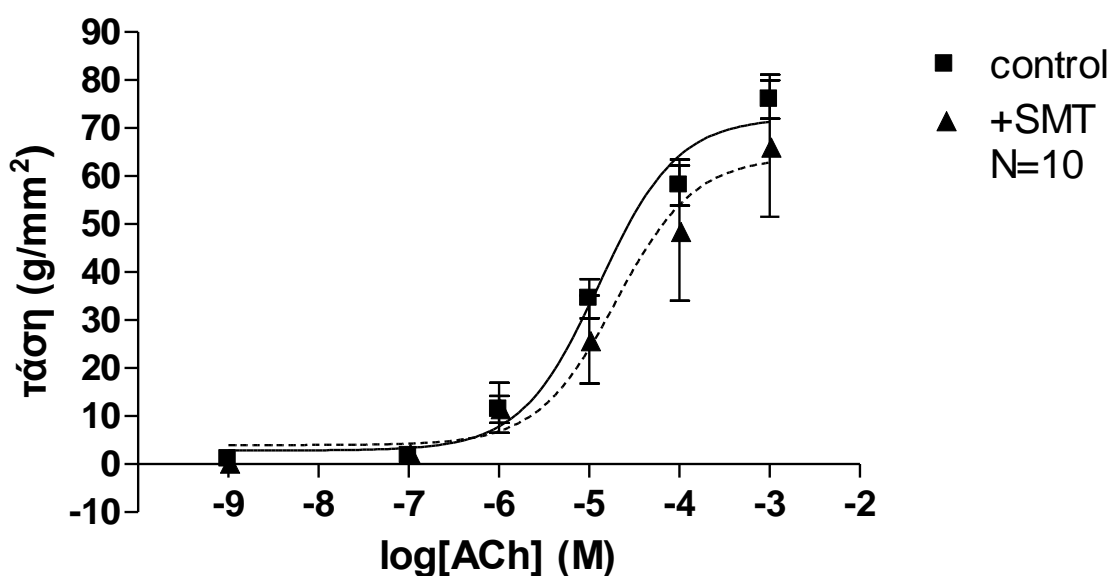
2.3 Μελέτη της επίδρασης του ειδικού ανταγωνιστή της iNOS, Acetylcholine Chloride, S-Methylsithiourea (SMT) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, παρουσία και απουσία του ειδικού ανταγωνιστή της iNOS, Acetylcholine Chloride, S-Methylsithiourea (SMT). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η επώαση των ημικρικών με τον αναστολέα της επαγωγίμης μορφής της συνθετάσης του NO (inducible NOS), SMT δεν επηρεάζει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ακετυλοχολίνη (Σχήμα 7). Η προεπεξεργασία των παρασκευασμάτων με SMT δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην παθητική τάση.

ΣΧΗΜΑ 7:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του ειδικού ανταγωνιστή της iNOS, Acetylcholine Chloride, S-Methylsithiourea (SMT) υπό τάση ηρεμίας 2.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 10 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



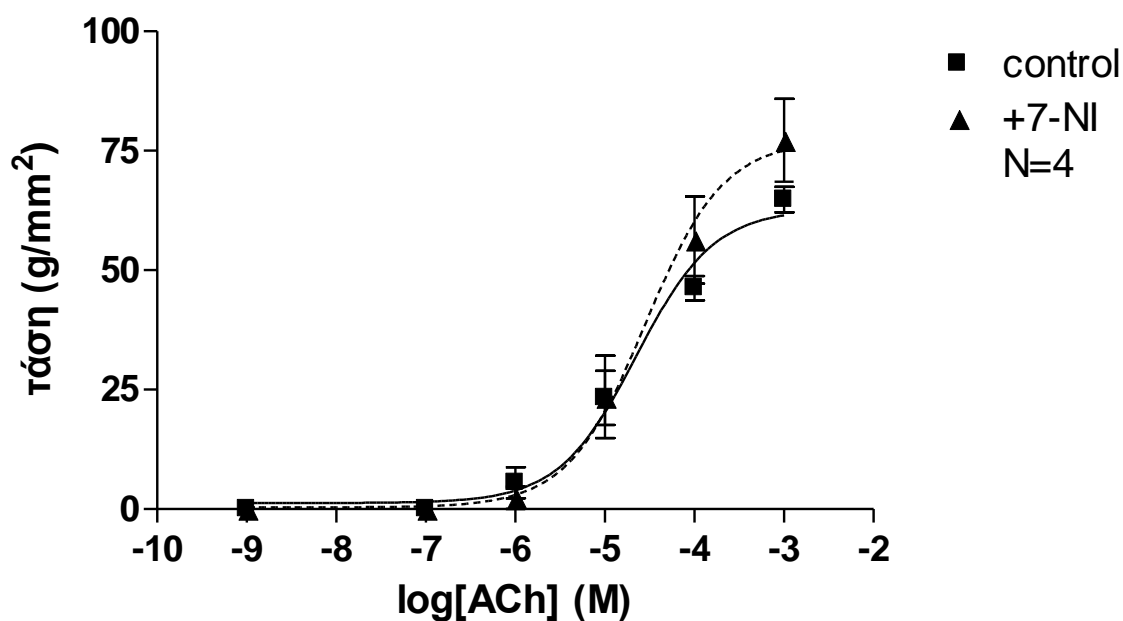
2.4 Μελέτη της επίδρασης του ειδικού ανταγωνιστή της nNOS, 7-Nitroindazole (7-NI) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, παρουσία και απουσία του ειδικού ανταγωνιστή της nNOS, 7-Nitroindazole (7-NI). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η επώαση των ημικρικών με αναστολείς της νευρωνικής ισομορφής (neuronal NOS) της συνθετάσης του NO, 7-Nitroindazole δεν επηρεάζει στην ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ακετυλοχολίνη (Σχήμα 8). Η προεπεξεργασία των παρασκευασμάτων με 7-NI δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην παθητική τάση.

ΣΧΗΜΑ 8:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του ειδικού ανταγωνιστή της nNOS, 7-Nitroindazole (7-NI) υπό RT 2.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 4 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



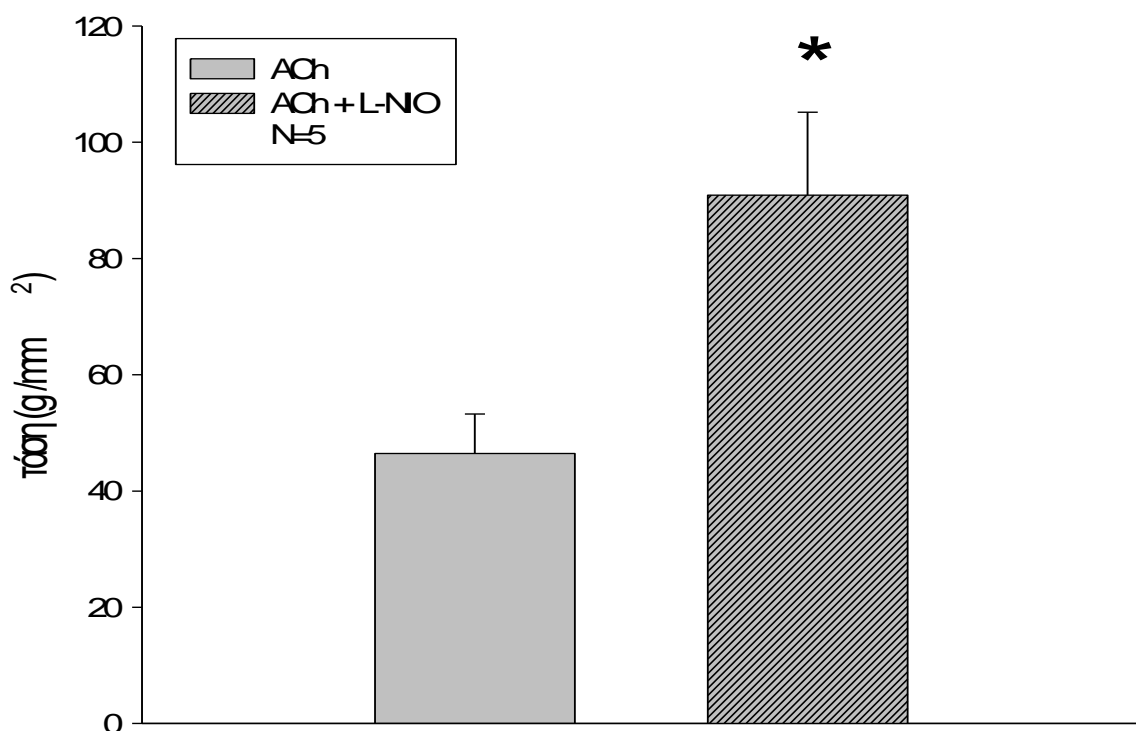
2.5 Μελέτη της επίδρασης του σχετικού ανταγωνιστή της eNOS, L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO) σε συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, παρουσία και απουσία του σχετικού ανταγωνιστή της eNOS, L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO). Μελετήθηκε η επίδραση του L-NIO στην μέγιστη τάση που προκαλεί η ακετυλοχολίνη σε συγκέντρωση 10⁻³ M. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η παρουσία του σχετικού αναστολέα της eNOS, L-NIO αυξάνει σημαντικά την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ακετυλοχολίνη. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η eNOS εμπλέκεται στην αύξηση της παραγωγής του NO υπό τάση ηρεμίας 2.5 g (Σχήμα 9).

ΣΧΗΜΑ 9:

Επίδραση του ειδικού ανταγωνιστή της eNOS, L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO) στην μέγιστη τάση που προκαλεί η ACh σε συγκέντρωση 10⁻³ M υπό 2.5 g RT.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 5 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (unpaired t-test).



3. Μελέτη της επίδρασης της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου στην παραγωγή NO

3.1 Μελέτη της επίδρασης του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME) υπό RT 0.5 g και 2.5 g σε συγκέντρωση εξωκυττάριασ ασβεστίου 0.2 mM

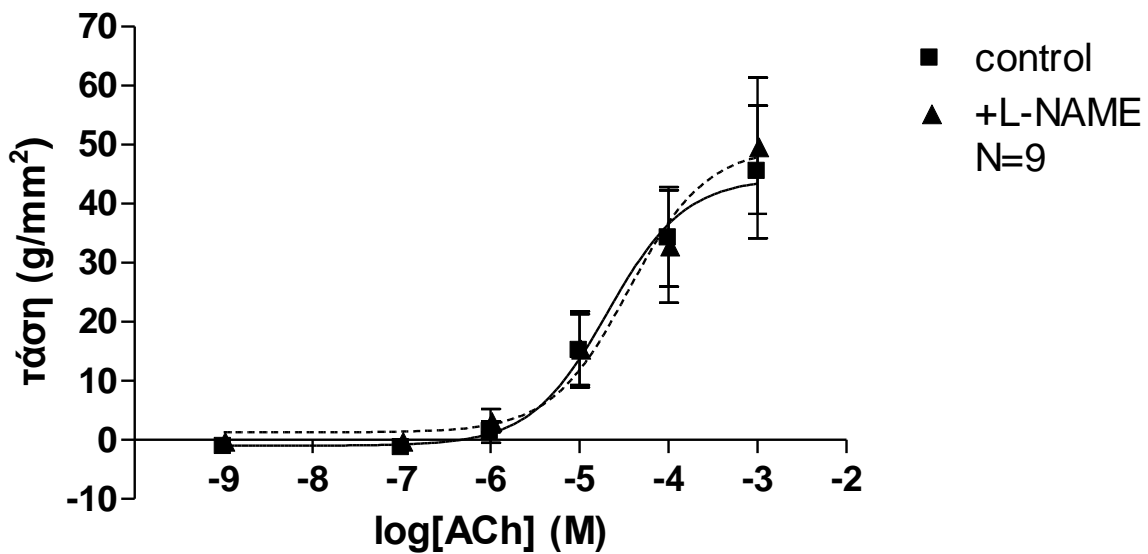
Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο και συγκέντρωση εξωκυττάριασ ασβεστίου 0.2 mM, υπό τάση ηρεμίας 0.5 και 2.5 g, παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η μείωση της εξωκυττάριασ συγκέντρωσης ασβεστίου καταργεί την επίδραση του L-NAME στη σύσπαση που επάγεται από την επίδραση της ακετυλοχολίνης υπό τάση ηρεμίας 2.5 g. Έτσι σε χαμηλή εξωκυττάριασ συγκέντρωση ασβεστίου η παρουσία του L-NAME δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη σύσπαση που επάγεται από την επίδραση της ακετυλοχολίνης ούτε υπό 2.5 g (Σχήμα 10 A) ούτε υπό 0.5 g τάση ηρεμίας (Σχήμα 10 B).

ΣΧΗΜΑ 10:

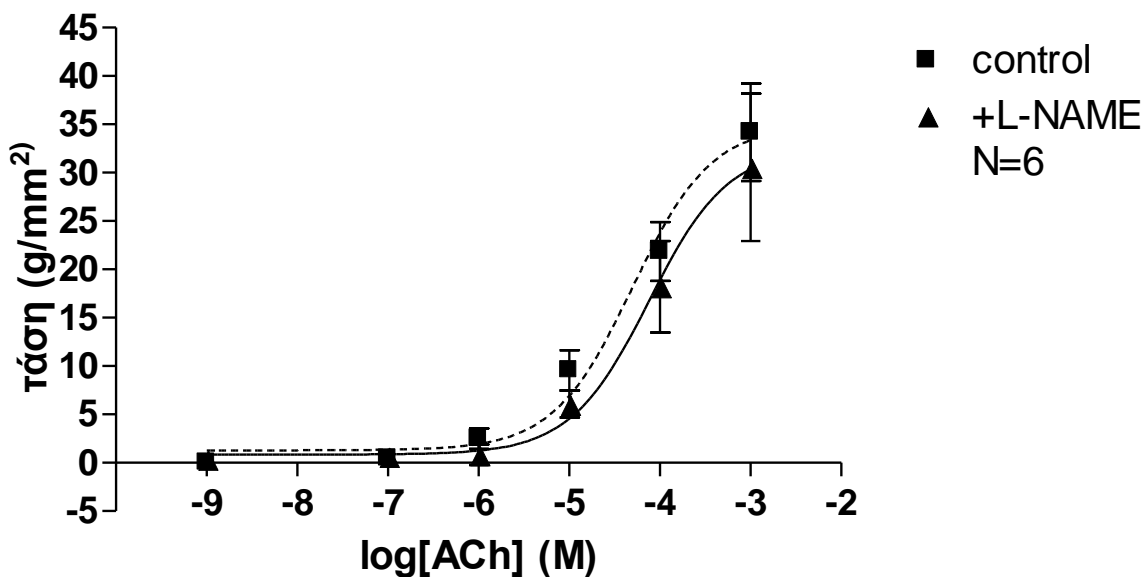
Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO Nω-Nitro-L-Arginine Methyl ester (L-NAME) υπό 2.5 g (A) και 0.5 g (B) RT.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 6 ή 9 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (unpaired *t*-test).

A



B



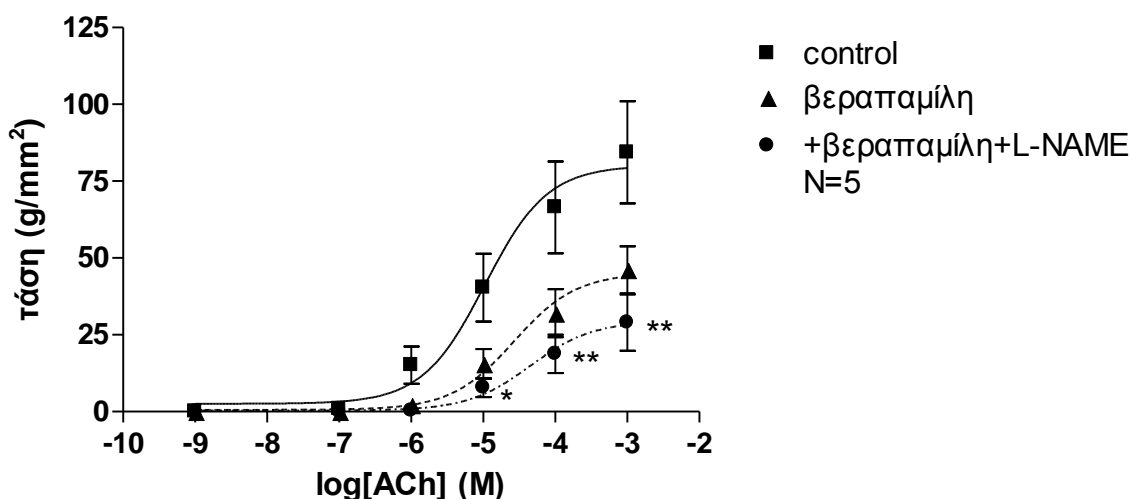
3.2 Μελέτη της επίδρασης του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh, υπό RT 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η παρουσία της βεραπαμίλης στο διάλυμα ελαττώνει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη αλλά όχι με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Το L-NAME δεν έχει καμία επίδραση στη σύσπαση η οποία οφείλεται στη δράση της ACh και η οποία παρατηρείται υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, όταν προηγουμένως οι ιστοί επωασθούν με βεραπαμίλη. Όταν στο υγρό διαπότισης υπάρχει τόσο βεραπαμίλη όσο και ο μη ειδικός ανταγωνιστής της συνθάσης του NO, Nω-Nitro-L-Arginine Methyl ester (L-NAME) η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη ελαττώνεται αλλά όχι με στατιστικά σημαντικό τρόπο (Σχήμα 11).

ΣΧΗΜΑ 11:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη και του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθέσεως του NO Nω-Nitro-L-Arginine Methyl ester (L-NAME) υπό RT 2.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 5 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. * $p < 0.05$ και ** $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (unpaired *t*-test).



4. Μελέτη της επίδρασης των αναστολέων φωσφορυλίωσης της τυροσίνης Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) και Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) στην παραγωγή NO

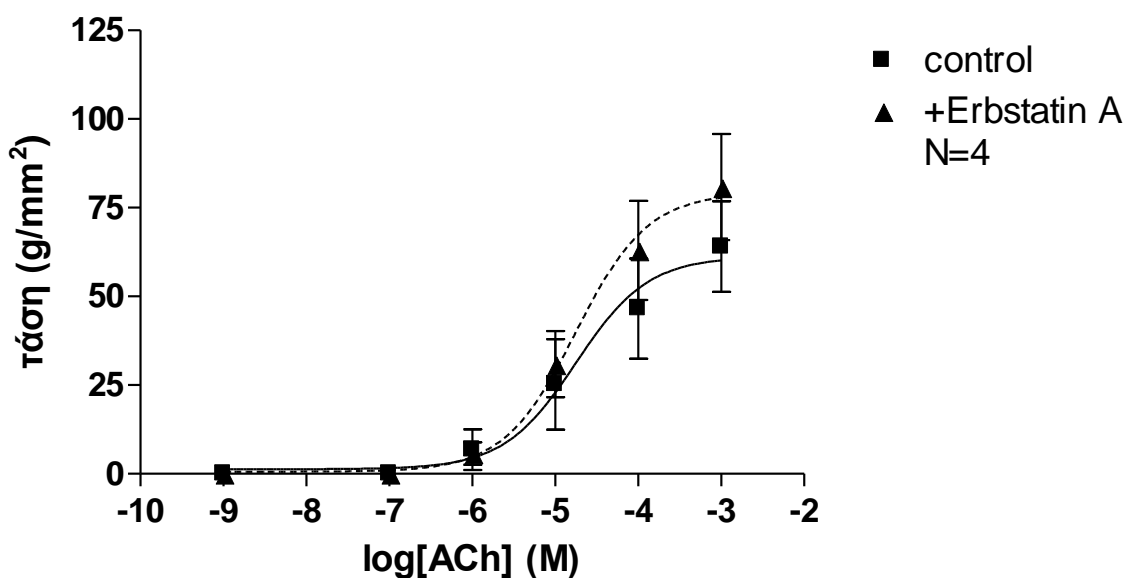
4.1 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh, υπό RT 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, παρουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, η παρουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη (Σχήμα 12).

ΣΧΗΜΑ 12:

Καμπύλη δόσης απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) υπό RT 2.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 4 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



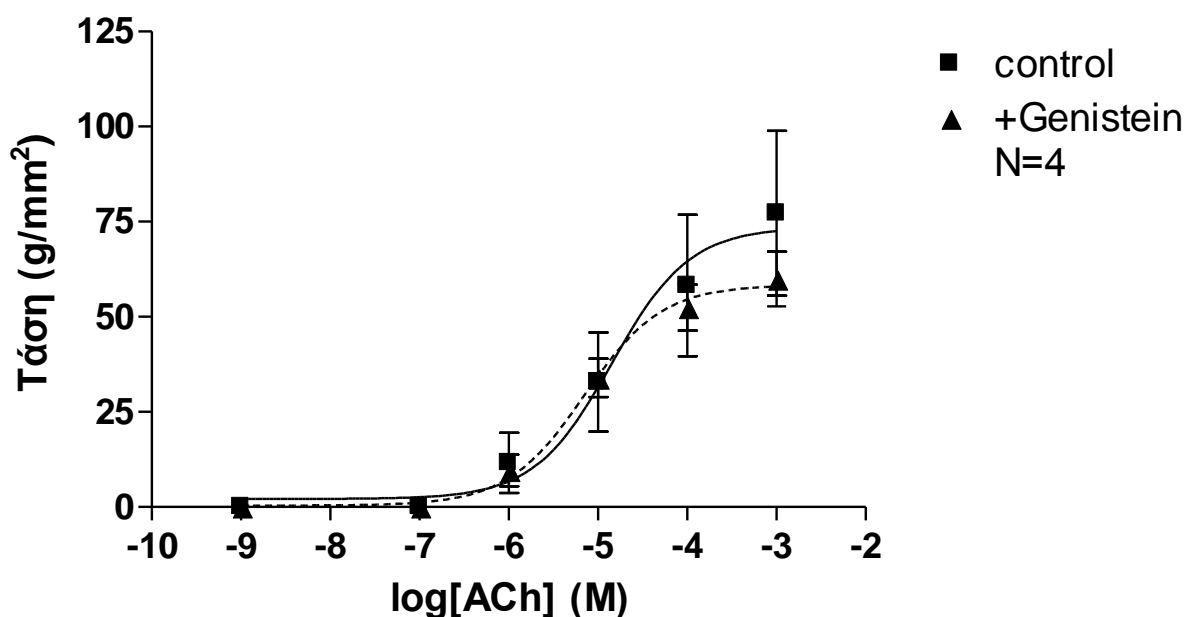
4.2 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη, υπό RT 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, παρουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, η παρουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη (Σχήμα 13).

ΣΧΗΜΑ 13:

Καμπύλη δόσης απάντησης της ACh, παρουσία και απουσία του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) υπό RT 2.5 g.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 4 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου.



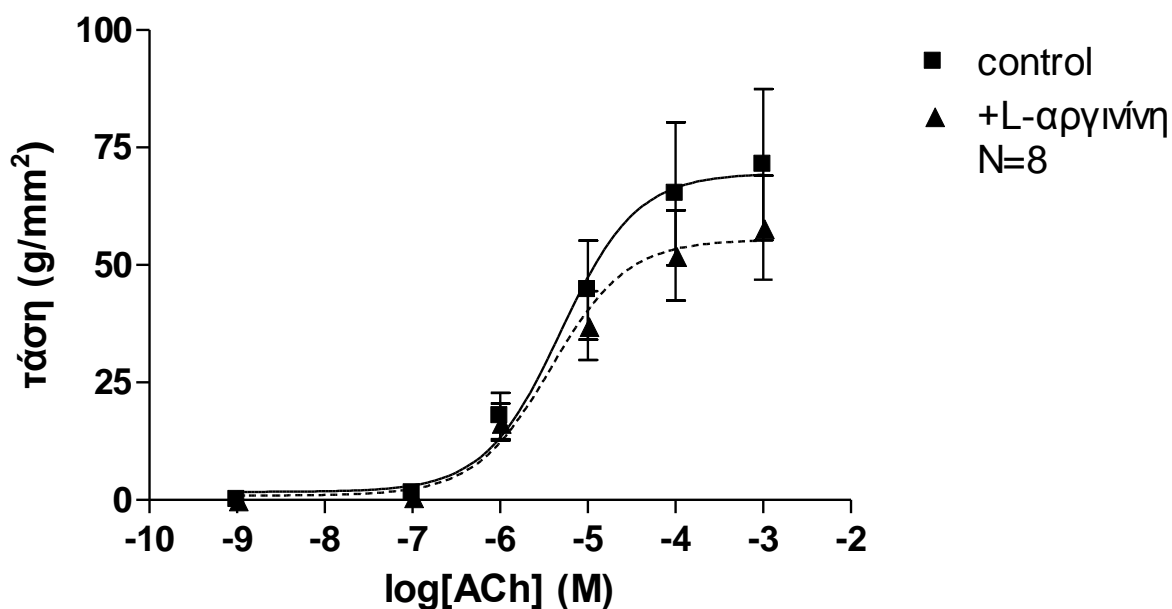
5. Μελέτη της επίδρασης της L-αργινίνης στην παραγωγή NO

Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, παρουσία της πρόδρομης ουσίας του NO, L-αργινίνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η παρουσία της πρόδρομης ουσίας του NO L-αργινίνης, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη σύσπαση που επάγεται από την ακετυλοχολίνη υπό 2.5 g τάση ηρεμίας (Σχήμα 14). Η προεπεξεργασία των παρασκευασμάτων με L-αργινίνη δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην παθητική τάση.

ΣΧΗΜΑ 14:

Καμπύλη δόσης-απάντησης της ACh, υπό RT 2.5 g σε παρουσία L-αργινίνης.

Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών 8 πειραμάτων και οι κάθετες γραμμές δείχνουν το σφάλμα του μέσου όρου. Το N αναφέρεται στον αριθμό των πειραμάτων.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την αναπνευστική λειτουργία οι περιοδικές μεταβολές του όγκου των πνευμόνων οδηγούν σε μεταβολές του μήκους των ΛΜΙ του τοιχώματος των αεραγωγών. Η τάση που εφαρμόζεται στις ΛΜΙ αποτελεί το μηχανικό ερέθισμα το οποίο εμπλέκεται στον μηχανοευαίσθητο μηχανισμό τροποποίησης της οργάνωσης των συσταλών στοιχείων των ΛΜΙ. Πειραματικές μελέτες υποδηλώνουν ότι η μείωση της διατασιμότητας και η αύξηση της ανταποκρισιμότητας των ΛΜΙ των αεραγωγών, σε χαμηλούς πνευμονικούς όγκους οφείλεται στην δομική πλαστικότητα των ΛΜΙ. Ο μηχανισμός συνδέεται-σχετίζεται με την ακαμψία και την εκτασιμότητα των ΛΜΙ ^[137], με μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} ^[6, 138] και με ρύθμιση των μορίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των συσταλών πρωτεϊνών ^[139, 140]. Η τάση ηρεμίας είναι ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος καθορίζει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην δράση συσπαστικών παραγόντων αφού η τάση επηρεάζει το μήκος του ιστού στον οποίο εφαρμόζεται. Μελέτες σε τραχεία βοοειδών φανερώνουν την διαφορετική ευαισθησία των ΛΜΙ των αεραγωγών και των ΛΜΙ των αγγείων στις μεταβολές της τάσης. Στις ΛΜΙ των αεραγωγών, η διάταση (strain) και όχι η τάση (stress), ευθύνεται για τις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Έτσι μια αύξηση της διατοιχωματικής πίεσης, οδηγεί σε έκπτυξη των πνευμόνων αλλά σε σύσπαση των πνευμονικών αγγείων (μυογενής μηχανισμός). Η διάταση των ΛΜΙ των αεραγωγών οδηγεί σε μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου μέσω ρύθμισης G-πρωτεϊνών και/ή της φωσφολιπάσης C. Σε αυτό το μεταβολικό δρόμο η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου εξαρτάται από την ενεργοποίηση μηχανοευαίσθητων ιοντικών διαύλων ασβεστίου στις ΛΜΙ ενώ η συμμετοχή του σαρκοπλασματικού δικτύου δεν φαίνεται να είναι σημαντική ^[6].

Μελέτες έχουν δείξει ότι επίδραση της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ εξαρτάται από τον συσπαστικό παράγοντα και από τον μεταβολικό δρόμο ο οποίος εμπλέκεται ^[5, 6, 7, 8]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η αύξηση της τάσης ηρεμίας από 0.5 σε 2.5 γραμμάρια αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών στην ACh και η επίδραση αυτή της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών εξαρτάται από την εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Συγκεκριμένα η ελάττωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου ή η παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου βεραπαμίλη έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώνεται σημαντικά η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που δείχνουν ότι η ακετυλοχολίνη ασκεί τη δράση της στις λείες μυϊκές ίνες κινητοποιώντας τόσο το ασβέστιο από τις ενδοκυττάριας αποθήκες όσο και προάγοντας την είσοδο του ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο ^[141]. Ειδικότερα η ακετυλοχολίνη στις ΛΜΙ των αεραγωγών συνδέεται σε μουσκαρινικούς υποδοχείς κυρίως M3 και M2 τύπου που εντοπίζονται

στη μεμβράνη των ΛΜΙ. Οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με G πρωτεΐνη. Η διέγερση των M3 υποδοχέων, οδηγεί σε απόσπαση της υποομάδας α της G-πρωτεΐνης και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C η οποία καταλύει τη διάσπαση της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP₂). Αυτό οδηγεί στην δημιουργία δύο ενδοκυττάρων δευτερογενών μηνυματοφόρων ενώσεων: της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) και της διακυκλυκερόλης (DAG). Η IP₃ οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, κινητοποιώντας ασβέστιο από τις ενδοκυττάρια αποθήκες, μέσω IP₃ υποδοχέων. Η DAG ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση C η οποία μεταβάλλει την ευαισθησία του συσπαστικού μηχανισμού στα ιόντα ασβεστίου. Το αποτέλεσμα της αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου είναι η σύσπαση των ΛΜΙ. Επί πλέον η αύξηση του ασβεστίου οδηγεί σε εκπόλωση των ΛΜΙ, διάνοιξη τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου και την είσοδο ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο. Η διέγερση των M2 υποδοχέων οδηγεί μέσω ανασταλτικής G πρωτεΐνης σε απενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, που καταλύει τη διάσπαση του ATP σε AMP και cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A που φωσφορυλιώνει ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και προκαλεί χάλαση των ΛΜΙ ^[141]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας φαίνεται ότι η είσοδος ασβεστίου στις ΛΜΙ επηρεάζεται από την τάση ηρεμίας καθώς η ελάττωση του εξωκυττάριας ασβεστίου επηρεάζει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη κυρίως σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων και όχι στο 0.5 γραμμάρια (Σχήμα 3).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν, με την θεωρία της μηχανοευαίσθητης ρύθμισης της εισροής του ασβεστίου στις λείες μυϊκές ίνες μέσω διαύλων ιόντων ^[56, 142-144] περιλαμβανομένων των ΛΜΙ των αεραγωγών ^[6, 145]. Η λειτουργία των διαύλων αυτών μεταβάλλεται όταν στην κυτταρική μεμβράνη επιδράσει ένα μηχανικό ερέθισμα με αποτέλεσμα την είσοδο θετικών ιόντων στο κύτταρο. Η είσοδος θετικού φορτίου στο κύτταρο οδηγεί την μεμβράνη σε εκπόλωση και το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαύλων ιόντων ασβεστίου οι οποίοι εξαρτώνται από το δυναμικό της μεμβράνης και είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η μεταβολή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca²⁺ μετά από την εφαρμογή μηχανικού ερεθίσματος επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση G-πρωτεϊνών και/ή της φωσφολιπάσης C. Η μεταβολή αυτή φαίνεται να αποτελεί ένα μηχανισμό αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης, ο οποίος περιορίζει τη βράχυνση των ΛΜΙ κατά τον βρογχόσπασμο. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχει καταδειχτεί ένας μηχανοευαίσθητος τρόπος ρύθμισης L-τύπου διαύλων ιόντων οι οποίοι εξαρτώνται από την τάση και οι οποίοι ρυθμίζουν την ροή του ασβεστίου ^[146, 147]. Στον καρδιακό μυ η ενεργοποίηση τασεοεξαρτώμενων διαύλων Na⁺ και κατά συνέπεια η είσοδος θετικών φορτίων στο κύτταρο οδηγεί σε διάνοιξη L-τύπου διαύλων ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου δεν οδηγεί από μόνη της σε σύσπαση αλλά

απαιτείται και η ενεργοποίηση των υποδοχέων ρυανοδίνης (ενεργοποιούνται από την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου διαμέσου των L-τύπου διαύλων) στο σαρκοπλασματικό δίκτυο ώστε να κινητοποιηθεί ασβέστιο και από τις ενδοκυττάριας αποθήκες. Στις ΛΜΙ των αγγείων και του γαστρεντερικού συστήματος η ενεργοποίηση τασεοεξαρτώμενων διαύλων Cl^- , μη ειδικών διαύλων κατιόντων και διαύλων ασβεστίου οδηγεί στην διάνοιξη διαύλων ασβεστίου τύπου L και εισροή ασβεστίου στο κύτταρο η οποία επαρκεί για την πρόκληση σύσπασης. Στις ΛΜΙ των αεραγωγών η είσοδος ασβεστίου μέσω L-τύπου διαύλων ασβεστίου επαρκεί επίσης για την πρόκληση σύσπασης. Έτσι οι διάυλοι Ca^{2+} , K^+ και Cl^- παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό διέγερσης-σύσπασης των ΛΜΙ των αεραγωγών. Η σύσπαση των ΛΜΙ είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (MLC), η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (MLCK) και την φωσφατάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (MLCP). Η MLCK ενεργοποιείται από την ασβέστιοκαλμοδουλίνη. Παράγοντες με βρογχοσυσπαστική δράση αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και την δραστηριότητα MLCK και/ή μειώνουν την δραστηριότητα της MLCP (η οποία αυξάνει την ευαισθησία του μηχανισμού σύσπασης στα ιόντα ασβεστίου). Παράγοντες με βρογχοδιασταλτική δράση έχουν τα αντίθετα αποτελέσματα.

Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών, το επιθήλιο μπορεί επίσης να τροποποιήσει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ σε συσπαστικούς παράγοντες. Το επιθήλιο δεν αποτελεί απλά την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι εισπνεόμενων βλαπτικών παραγόντων αλλά έχει επίσης ενεργό ρόλο στη διατήρηση του τόνου των ΛΜΙ των αεραγωγών και σε φλεγμονώδεις διεργασίες των αεραγωγών. Συνθέτει και απελευθερώνει βιολογικά δραστικές ουσίες που επηρεάζουν τον τόνο των ΛΜΙ των αεραγωγών καθώς και κυτταροκίνες. Ευθύνεται για την έκφραση μορίων τα οποία συμμετέχουν στην οργάνωση και διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών και μπορεί να τροποποιήσει την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού διαμέσου της έκφρασης αντιγόνων της ομάδας HLA. Οι βιολογικά δραστικές ουσίες οι οποίες παράγονται ενδογενώς από το επιθήλιο περιλαμβάνουν το NO ^[9], τα προϊόντα της κυκλοοξυγενάσης (COX) ^[148, 149] και την ενδοθηλίνη-1 (ET-1) ^[150]. Τα προϊόντα της COX μεταβάλλουν άμεσα την απάντηση των αεραγωγών στην τάση που ασκείται σε αυτούς ^[151] ή έμμεσα επιδρώντας στον ενδογενή τόνο των αεραγωγών ^[152, 153]. Πειράματα σε ενήλικα κουνέλια έχουν δείξει ότι ο ρυθμιστικός ρόλος του επιθηλίου στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ακετυλοχολίνη μεταβάλλεται όταν μεταβάλλεται η τάση ηρεμίας που ασκείται στον ιστό [5, 10]. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι η μεταβολή στη τάση ηρεμίας από 0.5 γραμμάρια σε 2.5 γραμμάρια μεταβάλλει την ενδογενή παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου

στους αεραγωγούς (Σχήμα 5). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, σύμφωνα με τα οποία η τάση μπορεί να διεγείρει την παραγωγή του NO στους αεραγωγούς ^[9, 149, 154, 155].

Έχει δειχτεί με ανοσοϊστοχημεία ^[156, 157] ότι στους αεραγωγούς των κουνελιών εκφράζονται τόσο η νευρωνική όσο και η ενδοθηλιακή ισομορφή της συνθετάσης του NO (με την ενδοθηλιακή μορφή να είναι πιο έντονα χρωματισμένη), ενώ η επαγωγίμη μορφή του ενζύμου ήταν ουσιαστικά απύση.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη ελέγξαμε την επίδραση αναστολέων της επαγωγίμης καθώς και της νευρωνικής συνθετάσης του NO, SMT και 7-NI αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, υπό τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων ούτε η παρουσία του SMT (Σχήμα 7) ούτε του 7-NI (Σχήμα 8) στο υγρό διαπύση μετέβαλε τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που επάγεται από την επίδραση της ακετυλοχολίνης, υποδηλώνοντας ότι τόσο η νευρωνική όσο και η επαγωγίμη μορφή της συνθετάσης του NO δεν εμπλέκονται στην αύξηση της παραγωγής του NO που παρατηρείται με την αύξηση της τάσης ηρεμίας που εφαρμόζεται στον ιστό από το 0.5 στα 2.5 γραμμάρια.

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή επίδραση της τάσης ηρεμίας στη μεταβολή της δραστηριότητας της επιθηλιακής συνθετάσης του NO. Καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμος ειδικός αναστολέας για την eNOS, έγινε μια σειρά πειραμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο σχετικός αναστολέας της eNOS, L-NIO ^[158-161]. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η παρουσία του L-NIO στο υγρό διαπύση αυξάνει σημαντικά την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh (Σχήμα 9) καταδεικνύοντας ότι η eNOS εμπλέκεται στην αύξηση της παραγωγής του NO σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων.

Μελέτες που έγιναν σε αγγεία δείχνουν ότι η eNOS είναι δυνατό να διεγερθεί μέσω δύο τουλάχιστον οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός αγωνιστή στον αντίστοιχο υποδοχέα και την επακόλουθη αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ασβεστίου η οποία προάγει την σύνδεση της καλμοδουλίνης στην eNOS και την αποσύνδεση της καβεολίνης από την eNOS, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου ^[4]. Έτσι μπορεί να ενεργοποιηθεί από παράγοντες οι οποίοι προκαλούν αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου όπως είναι η βραδυκίνη, η οιστραδιόλη, η ισταμίνη κλπ. Η πτώση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} έχει σαν αποτέλεσμα την επαναδημιουργία του ανασταλτικού συμπλέγματος eNOS-καβεολίνης. Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει μια ποικιλία αγωνιστών που ενεργοποιεί την eNOS ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} όπως ο ομοιάζων προς την ινσουλίνη νευροτρόφος παράγων ^[105], τα οιστρογόνα ^[106], καθώς και η επίδραση μηχανικού ερεθίσματος, όπως αυτό που προκαλεί η ροή του αίματος στο τοίχωμα των αγγείων (shear stress) ^[107]. Η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από

τη φωσφορυλίωση της eNOS στην σερίνη/θρεονίνη από μια πρωτεΐνη κινάση η οποία προκαλεί αύξηση της ευαισθησίας του ενζύμου στα ιόντα Ca^{2+} .

In vitro η eNOS είναι δυνατό να φωσφορυλιωθεί από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA φωσφορυλιώνει την ανθρώπινη eNOS στην θρεονίνη 495 και στην σερίνη 1177 ανεξάρτητα από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και καλμοδουλίνης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η PKA είναι δυνατό να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της eNOS και in vivo. Επίσης έχει δειχθεί ότι η πρωτεϊνική κινάση B ή κινάση Akt φωσφορυλιώνει την eNOS in vivo και in vitro και εμπλέκεται σε μεταβολικούς δρόμους ασβεστιοεξαρτούμενους και μη. Η Akt φωσφορυλιώνει την ανθρώπινη eNOS στην σερίνη 1177. Η φωσφορυλίωση της eNOS από την Akt μειώνει την αποσύνδεση της καλμοδουλίνης από την ενεργοποιημένη eNOS. Η βραδυκινίνη είναι δυνατόν να προκαλέσει φωσφορυλίωση στην σερίνη, αυτός ο μεταβολικός δρόμος όμως εξαρτάται από το ασβέστιο διότι αναστέλλεται από ανταγωνιστές της καλμοδουλίνης και από ελάττωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου. Επίσης το NO το οποίο παράγεται μέσω αυτής της μεταβολικής οδού, παράγεται με βραδύτερο ρυθμό. Η επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με δότες NO επάγει την φωσφορυλίωση στη σερίνη, αυτή η φωσφορυλίωση όμως αναστέλλει την δραστηριότητα του ενζύμου και αυτό πιθανά αποτελεί έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Σε αυτό τον μεταβολικό δρόμο φαίνεται πως το ένζυμο που εμπλέκεται και αναστέλλει την δραστηριότητα της eNOS είναι η PKC. Άλλες κινάσες είναι επίσης πιθανό να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της eNOS και μπορούν φωσφορυλιώνοντάς την είτε να αυξήσουν είτε να ελαττώσουν την δραστηριότητά της ^[162].

Αρχικά λοιπόν μελετήσαμε τη πιθανή επίδραση του εξωκυττάριας ασβεστίου στην παραγωγή NO. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε τόσο η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh υπό τάση ηρεμίας 0.5 και 2.5 γραμμαρίων σε διάλυμα Krebs με φυσιολογική (2 mM) και χαμηλή (0.2 mM) συγκέντρωση ασβεστίου όπως και η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh υπό τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων παρουσία του ανταγωνιστή διαύλων ιόντων εξαρτούμενων από την τάση, βεραπαμίλη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι σε χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου (Σχήμα 10) ή σε παρουσία βεραπαμίλης (Σχήμα 11) στο διάλυμα, η παρουσία του L-NAME δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh υποδηλώνοντας ότι σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων η παραγωγή του NO προάγεται από την είσοδο ασβεστίου από τον εξωκυττάρια χώρο κυρίως μέσω τασεοεξαρτούμενων διαύλων ασβεστίου. Κατά συνέπεια, η παραγωγή του NO, απαιτεί φυσιολογική εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και εξαρτάται από την είσοδο στο κύτταρο ιόντων ασβεστίου μέσω διαύλων ιόντων εξαρτούμενων από την τάση τύπου L ^[163] και άρα οι αποκλειστές διαύλων ιόντων ασβεστίου τύπου L ^[164, 165] μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και/ή την δραστηριότητα της NOS.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η επίδραση της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh είναι ασβεστιοεξαρτώμενη. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με μελέτες που δείχνουν ότι στους αεραγωγούς, διάλυτοι ιόντων εξαρτώμενοι από την τάση μπορεί να ρυθμίζουν την τροποποιητική επίδραση του επιθηλίου μέσω διαφόρων ερεθισμάτων ^[166-169]. Σε πειράματα που έγιναν σε βρόγχους κουνελιών και ανθρώπινη τραχεία ^[170] αποδείχτηκε ότι η βεραπαμίλη επηρεάζει την τροποποιητική δράση του επιθηλίου στους αεραγωγούς. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα μηχανικά ερεθίσματα μπορούν να αυξήσουν την δραστηριότητα της eNOS ^[171].

Στη συνέχεια μελετήσαμε τη πιθανή εμπλοκή της φωσφορυλίωσης της σερίνης στην μεταβολή της δραστηριότητας της eNOS συναρτήσει της τάσης ηρεμίας. Μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) και Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) στην παραγωγή NO. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, Erbstatin A (2,5-Dihydroxymethylcinnamate) στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh. Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh. Τα πειράματα έγιναν επίσης σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι, σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM, οι αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης, erbstatin A (Σχήμα 12) και genistein (Σχήμα 13) δεν μεταβάλλουν την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι στην τραχεία των κουνελιών η φωσφορυλίωση της τυροσίνης δεν εμπλέκεται στην παραγωγή του NO η οποία παρατηρείται σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων.

Πειράματα που έγιναν σε αγγεία έδειξαν ότι η πρόσληψη της L-αργινίνης εμπλέκεται στην παραγωγή, από το ενδοθήλιο, του NO η οποία προκαλείται από μηχανικό ερέθισμα. Η L-αργινίνη δεν απαιτείται όμως για την παραγωγή του NO που επάγεται από την επίδραση της ακετυλοχολίνης ^[172, 173] καθώς και από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης ^[174-176]. Σε μια σειρά πειραμάτων διερευνήσαμε κατά πόσο η πρόσληψη της L-αργινίνης μπορεί να εμπλέκεται στην παραγωγή του NO που παρατηρείται σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης L-αργινίνης στην παραγωγή NO. Τα πειράματα έγιναν σε ιστούς με άθικτο επιθήλιο υπό τάση ηρεμίας 2.5 g και συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου 2 mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι η

παρουσία της πρόδρομης ουσίας του NO, L-αργινίνης στο διάλυμα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη σύσπαση που επάγεται από την ACh ούτε υπό 2.5 g τάση ηρεμίας (Σχήμα 14).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η τάση ηρεμίας επηρεάζει την απελευθέρωση του NO στην τραχεία του κουνελιού επηρεάζοντας κυρίως τη δραστηριότητα της επιθηλιακής συνθετάσης του NO. Η δραστηριότητα της επιθηλιακής συνθετάσης του NO μεταβάλλεται με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο και όχι μέσω φωσφορυλίωσης της τυροσίνης ή μέσω αυξημένης πρόσληψης L-αργινίνης από τα επιθηλιακά κύτταρα. Ειδικότερα, σε τάση ηρεμίας 0.5 γραμμαρίου η βασική στάθμη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου δεν επαρκεί να ενεργοποιήσει την eNOS ώστε να παραχθεί NO από τα επιθηλιακά κύτταρα. Σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων η ACh προκαλεί μια αύξηση της ροής του ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση της eNOS και παραγωγή NO, η οποία είναι ανεξάρτητη από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης και την εξωκυττάρια συγκέντρωση της L-αργινίνης.

Έχει αποδειχθεί με κλινικές μελέτες ότι η βαθεία εισπνοή έχει δράση βρογχοδιασταλτική και βρογχοπροστατευτική. Η προστατευτική δράση είναι απύσχα σε ασθενείς με άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ^[177]. Δεν είναι σαφές το που οφείλεται η απουσία της βρογχοπροστατευτικής δράσης της βαθείας εισπνοής στους ασθματικούς. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγηθεί, όπως αναστολή του χολινεργικού τόνου ^[178], ενεργοποίηση του iNANC συστήματος ^[179], καθώς και τροποποίηση της οργάνωσης των συσταλών στοιχείων των ΛΜΙ ^[180, 181]. Δεδομένα τα οποία προκύπτουν από την παρούσα μελέτη καθώς και από προηγούμενες ^[5, 10], υποδεικνύουν ότι το επιθήλιο διαδραματίζει έναν επιπρόσθετο ρυθμιστικό ρόλο σε αυτήν την διαδικασία. Καθώς το επιθήλιο απαντά στην τάση με την τροποποίηση της δραστηριότητας της eNOS και την παραγωγή του NO, η οποία οδηγεί σε ελάττωση της ανταποκρισιμότητας των αεραγωγών, είναι πιθανό σε νόσους του αναπνευστικού, και ιδιαίτερα στο άσθμα όπου υπάρχει καταστροφή του επιθηλίου, να επηρεάζεται αυτή η προστατευτική δράση του ^[80].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- 1.** Η αύξηση της τάσης ηρεμίας από 0.5 σε 2.5 γραμμάρια αυξάνει την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών στην ACh.
- 2.** Η επίδραση αυτή της τάσης ηρεμίας στην ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ των αεραγωγών εξαρτάται από την εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου καθώς η ελάττωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου ή η παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου βεραπαμίλη έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώνεται σημαντικά η ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh.
- 3.** Η ενδογενής παραγωγή NO επηρεάζεται από την τάση ηρεμίας που ασκείται στον ιστό καθώς η παρουσία του μη ειδικού αναστολέα της NOS, L-NAME, αυξάνει τη σύσπαση η οποία επάγεται από την ACh υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, ενώ υπό τάση ηρεμίας 0.5 g η επίδραση του αναστολέα δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- 4.** Τόσο η νευρωνική όσο και η επαγωγίμη μορφή της συνθετάσης του NO δεν εμπλέκονται στην αύξηση της παραγωγής του NO που παρατηρείται με την αύξηση της τάσης ηρεμίας που εφαρμόζεται στον ιστό από το 0.5 στα 2.5 γραμμάρια, καθώς σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων, ούτε η παρουσία του ειδικού αναστολέα της επαγωγίμης μορφής της NOS, SMT ούτε του ειδικού αναστολέα της νευρωνικής μορφής της NOS, 7-NI μετέβαλε τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών που επάγεται από την επίδραση της ACh.
- 5.** Η επιθηλιακή μορφή της συνθετάσης του NO εμπλέκεται στην αύξηση της παραγωγής του NO σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων καθώς η παρουσία του σχετικού αναστολέα της επιθηλιακής μορφής της NOS, L-NIO, στο υγρό διαπότισης αυξάνει σημαντικά την ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στην ACh.
- 6.** Σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων η παραγωγή του NO προάγεται από την είσοδο ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο κυρίως μέσω τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου καθώς σε χαμηλή συγκέντρωση εξωκυττάριας ασβεστίου (0.2 mM) ή σε παρουσία του ανταγωνιστή τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλης στο διάλυμα, η παρουσία του L-NAME δεν μεταβάλλει την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh.
- 7.** Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης δεν εμπλέκεται στην παραγωγή του NO η οποία παρατηρείται σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων καθώς σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων και συγκέντρωση εξωκυττάριας ασβεστίου 2 mM, οι αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης, erbstatin A και Genistein δεν μεταβάλλουν την ανταποκρισιμότητα των ΛΜΙ στην ACh.
- 8.** Η πρόσληψη L-αργινίνης δεν εμπλέκεται στην παραγωγή του NO η οποία παρατηρείται σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων καθώς σε τάση ηρεμίας 2.5 γραμμαρίων η παρουσία της πρόδρομης

ουσίας του NO, L-αργινίνης στο διάλυμα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη σύσπαση που επάγεται από την ACh.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Κατά τη διάρκεια της εισπνοής-εκπνοής μεταβάλλεται τόσο το μήκος των λείων μυϊκών ινών (ΛΜΙ) των αεραγωγών, όσο και το φορτίο που ασκείται σ' αυτές. Οι μεταβολές του μήκους των ΛΜΙ αποτελούν σήματα που μπορούν να ρυθμίσουν την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών. Εκτός από τους μηχανισμούς που αφορούν τις ΛΜΙ αυτές κάθε αυτές, το επιθήλιο φαίνεται να αποτελεί και αυτό σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσει με ποιο μηχανισμό οι μεταβολές του φορτίου που ασκείται στους αεραγωγούς μπορούν να μεταβάλλουν την δραστηριότητα της συνθετάσης του NO (NOS) και την παραγωγή του NO από τους αεραγωγούς.

Μέθοδος: Σε πειράματα συστολών, σε ημικρίκια τραχείας κουνελιού, μελετήθηκαν η επίδραση της τάσης ηρεμίας (0.5 ή 2.5 γραμμαρίων) στην παραγωγή του NO, η εμπλοκή της νευρωνικής (nNOS), της επαγωγίμης (iNOS) και της επιθηλιακής (eNOS) συνθετάσης του NO, καθώς και ο τρόπος μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου.

Αποτελέσματα: Η μεταβολή της τάσης ηρεμίας από 0.5 g σε 2.5 g αυξάνει σημαντικά τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών (ΛΜΙ) τραχείας κουνελιών η οποία επάγεται από την ακετυλοχολίνη (ACh). Η μείωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου ή η παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου βεραπαμίλης, ελαττώνει τη σύσπαση η οποία επάγεται από την ACh, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g. Η μεταβολή της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου δεν μεταβάλλει την παθητική τάση. Η προσθήκη του μη ειδικού ανταγωνιστή της συνθετάσης του NO, N^o-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), αυξάνει τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh, υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, ενώ υπό τάση ηρεμίας 0.5 g δεν έχει κανένα αποτέλεσμα. Υπό τάση ηρεμίας 2.5 g, η προσθήκη του ειδικού ανταγωνιστή της επαγωγίμης μορφής της συνθετάσης του NO, S-methylsithiourea (SMT) καθώς και του ειδικού ανταγωνιστή της νευρωνικής μορφής της συνθετάσης του NO, 7-Nitroindazole (7-NI), δεν μεταβάλλουν τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh. Υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η παρουσία του σχετικού αναστολέα της συνθετάσης του NO, L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO), αυξάνει σημαντικά την σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh. Υπό τάση ηρεμίας 0.5 g κανένας αναστολέας καμιάς συνθέσεως του NO δεν μεταβάλλει τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh. Σε χαμηλή συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου (0.2 mM) και υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η παρουσία L-NAME στο υγρό διαπότησης δεν μεταβάλλει τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh. Σε φυσιολογική συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου (2 mM) και υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η σύγχρονη παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλης και του L-NAME στο υγρό διαπότησης δεν μεταβάλλει τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh. Σε φυσιολογική συγκέντρωση εξωκυττάριου ασβεστίου (2 mM) και υπό τάση ηρεμίας 2.5 g η παρουσία των αναστολέων φωσφορυλίωσης erbstatin A ή genistein καθώς και της πρόδρομης ουσίας του NO L-αργινίνης δεν μεταβάλλουν τη σύσπαση των ΛΜΙ η οποία επάγεται από την ACh.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η τάση ηρεμίας επηρεάζει την απελευθέρωση του NO στην τραχεία του κουνελιού επηρεάζοντας κυρίως την δραστικότητα της επιθηλιακής συνθετάσης του NO. Η δραστικότητα της επιθηλιακής συνθετάσης του NO μεταβάλλεται με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο και όχι μέσω φωσφορυλίωσης της τυροσίνης ή μέσω αυξημένης πρόσληψης L-αργινίνης από τα επιθηλιακά κύτταρα.

ABSTRACT

Objective: During lung ventilation, length of airways smooth muscle (ASM) as well as the load that exert to them is altered. These changes of ASMs length, constitute signals which could modulate airway responsiveness. Despite the above mechanisms concerned ASM, the epithelium could also play an important modulatory role. Aim of this study was to research whether these load fluctuations of ASM could modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production.

Methods: Resting tension (RT) effect (0.5 g or 2.5 g) on NO production, the involvement of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), of inducible nitric oxide synthase (iNOS), of epithelial nitric oxide synthase (eNOS) as well as the way of enzyme activity alteration was studied, on contraction experiments on tracheal rings of rabbits.

Results: The alteration of resting tension (RT) from 0.5 g to 2.5 g increased significantly airway smooth muscle contractions induced by acetylcholine (ACh), in rabbit trachea. The decrease in extracellular calcium concentration or the presence of the voltage-dependent channel antagonist verapamil had no effect on contractions induced by ACh at 2.5 RT. The alteration of extracellular calcium concentration had no effect on passive tension. The presence of non-selective NOS inhibitor, N ω -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) increases ACh-induced contractions at 2.5 g RT while had no effect at 0.5 g RT. At 2.5 g RT, specific inhibitors of inducible and neuronal NOS, S-methylsothiurea (SMT) and 7-Nitroindazole (7-NI) had no effect on contractions induced by ACh. At 2.5 g RT, the presence of relative NOS inhibitor L-N⁵-(1-Iminoethyl)ornithine hydrochloride (L-NIO), increases significantly ACh induced contractions. At 0.5 g RT, no inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) had any effect on ACh-induced contractions. At low extracellular calcium concentration (0.2 mM) and at 2.5 g RT, the presence of non-selective NOS inhibitor, N ω -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) had no effect on contractions induced by ACh. At normal extracellular calcium concentration (2 mM) and at 2.5 g RT the presence of both, non-selective NOS inhibitor, N ω -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) and voltage-dependent channel antagonist verapamil had no effect on contractions induced by ACh. At normal extracellular calcium concentration (2 mM) and at 2.5 g RT the presence of the tyrosine kinase inhibitors, erbstatin A or genistein, as well as the presence of precursor of NO L-arginine had no effect on ACh-induced contractions.

Conclusions: Results of this study suggest that, RT affects NO release on rabbit trachea by modulating the activity of eNOS. eNOS activity is modulated in a calcium-dependent way and it is independent of tyrosine phosphorylation or increased extracellular L-arginine uptake by epithelial cells.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric-oxide and lung disease. *Thorax*. 1993 Oct; 48(10): 1034-43
2. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003 Feb; 58(2): 175 – 82
3. Michel T, Feron O. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J Clin Invest*. 1997 Nov; 100(9): 2146 – 52
4. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Feb; 280(2): F193 – 206
5. Hatziefthimiou AA, Karetsi E, Pratzoudis E, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Resting tension effect on airway smooth muscle: the involvement of epithelium. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005 Feb; 145(2-3): 201-8
6. An SS, Hai CM. Mechanical signals and mechanosensitive modulation of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Nov; 279(5): C1375-84
7. Mehta D, Wu MF, Gunst SJ. Role of contractile protein activation in the length-dependent modulation of tracheal smooth muscle force. *Am J Physiol*. 1996 Jan; 270(1): C243-52
8. Gilbert EK, Weaver BA, Rembold CM. Depolarisation decreases the $[Ca^{2+}]_i$ sensitivity of myocin light-chain kinase in arterial smooth muscle: comparison of aequorin and fura 2 $[Ca^{2+}]_i$ estimates. *FASEB J*. 1991 Aug; 5(11): 2593-9
9. Gourgoulianis KI, Iliodromitis Z, Hatziefthimiou AA, Molyvdas PA. Epithelium-dependent regulation of airways smooth muscle function. A histamine-nitric oxide pathway. *Mediators Inflamm*. 1998 Sep; 7(6): 409–11
10. Gourgoulianis KI, Domali A, Molyvdas PA. Airway responsiveness: role of inflammation, epithelium damage and smooth muscle tension. *Mediators Inflamm*. 1999 Aug; 8(4-5): 261-3
11. Jeffery PK, Reid L. New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat*. 1975 Nov; 120(2): 295–320
12. Breeze RG, Wheeldom EB. The cells of pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis*. 1977 Oct; 116(4): 705-77
13. Williams MH. Why do the aiways contain smooth muscle? *Lung*. 1981; 159: 291-3
14. Pfitzer G. Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 497-503
15. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 2009 Jan; 89: 73-120
16. Wess J. Muscarinic ACh receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical

- Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 423-50
17. Sathish V, Leblebici F, Kip SN, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ reuptake in porcine airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Apr; 294(4): L787-96
 18. Janssen LJ, Tazzeo T, Zuo J, Pertens E, Keshavjee S. KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Oct; 287(4): L852-8
 19. Stretton D. Nonadrenergic, noncholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Pathol.* 1991; 18: 675-84
 20. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990; 347: 768-70
 21. Canning BJ. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol.* 2006 Sep; 101(3): 971-85
 22. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol.* 1992 Jan; 210(2): 221-2
 23. Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146: 1543-7
 24. Fischer J, Jackowski M. The significance of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in diagnosis of sleep apnea syndrome. *Pneumologie.* 1989 Nov; 43 (1): 584-6
 25. Rhoden KJ, Barnes PJ. Potentiation of nonadrenergic neural relaxation in guinea pig airways by a cyclic cAMP phosphodiesterase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Jan; 252(1): 396-402
 26. Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH et al. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest.* 1993 Aug; 92(2): 736-42
 27. Kanazawa H, Kawaguchi T, Shoji S, Fujii T, Kudoh S, Hirata K et al. Synergistic effect of nitric oxide and vasoactive intestinal peptide on bronchoprotection against histamine in anesthetized guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Feb; 155(2): 747-50
 28. Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Nov; 158(5): S171-5
 29. Boot JD, de Haas S, Tarasevych S, Roy C, Wang L, Amin D et al. Effect of an NK1/NK2 receptor antagonist on airway responses and inflammation to allergen in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Mar; 175(5): 450-7

30. Ramalho R, Soares R, Couto N, Moreira A. Tachykinin receptors antagonism for asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med.* 2011 Aug; 11: 41
31. Barnes PJ. Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986 Apr; 280(2): 208-28
32. Marek W. Chronobiology of the bronchial system. *Pneumologie.* 1997 Apr; 51(2): 430-9
33. Mackay TW, HulksG, Douglas NJ. Non-adrenergic, non-cholinergic function in the human airway. *Respir Med.* 1998 Mar; 92(3): 461-6
34. Syyong HT, Raqeeb A, Paré PD, Seow CY. Time course of isotonic shortening and the underlying contraction mechanism in airway smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2011 Sep; 111(3): 642-56
35. Hai CM, Watson C, Wallach SJ, Reyes V, Kim E, Xu J. Effects of substrate and inhibition of oxidative metabolism on contraction and myosin phosphorylation in ASM. *Am J Physiol.* 1993 Jun; 264(1): L553-9
36. Baek EB, Kim SJ. Mechanisms of myogenic response: Ca²⁺-dependent and -independent signaling. *J Smooth Muscle Res.* 2011; 47(2): 55-65
37. Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K et al. Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of ASM. *Eur J Pharmacol.* 2006 Dec; 552(1-3): 135-42
38. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003 Oct; 83(4): 1325-58
39. Fredberg JJ, Jones KA, Nathan M, Raboudi S, Prakash YS, Shore SA et al. Friction in airway smooth muscle: mechanism latch, and implications in asthma. *J Appl Physiol.* 1996 Dec; 81(6): 2703-12
40. James A, Loughheed D, Pearce-Pinto G, Ryan G, Musk B. Maximal airway narrowing in a general population. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Oct; 146(4): 895-9
41. Moreno RH, Hogg JC, Paré PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Jun; 133(6): 1171-80
42. Matsuba K, Thurlbeck WM. A morphometric study of bronchial and bronchiolar walls in children. *Am Rev Respir Dis.* 1972 Jun; 105(6): 908-13
43. Sobonya RE. Quantitative structural alterations in long-standing allergic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Aug; 130(2): 289-92

44. Hislop AA, Haworth SG. Airway size and structure in the normal fetal and infant lung and the effect of premature delivery and artificial ventilation. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Dec; 140(6): 1717-26
45. James AL, Paré PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Jan; 139(1): 242-6
46. Hayashi S, Toda N. Age-related alterations in the response of rabbit tracheal smooth muscle to agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980 Sep; 214(3): 675-81
47. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Jun; 16(6): 629-39
48. Smith PG, Tokui T, Ikebe M. Mechanical strain increases contractile enzyme activity in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1995; 268: L999-1005
49. Smith PG, Moreno R, Ikebe M. Strain increases airway smooth muscle contractile and cytoskeletal proteins in vitro. *Am J Physiol.* 1997; 272: L20-7
50. Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Jan; 5(1): 80-8
51. Pratushevich VR, Seow CY, Ford LE. Plasticity in canine airway smooth muscle. *J Gen Physiol.* 1995 Jan; 105(1): 73-94
52. Kuo KH, Herrera AM, Wang L, Paré PD, Ford LE, Stephens NL et al. Structure-function correlation in airway smooth muscle adapted to different lengths. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Aug; 285(2): C384-90
53. Zhang J, Herrere AM, Pare PD, Seow CY. Dense-body aggregates as plastic structures supporting tension in smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 Nov; 299(5): L631-8
54. Smith PG, Garcia R, Kogerman L. Mechanical strain increases protein tyrosine phosphorylation in airway smooth muscle cells. *Exp Cell Res.* 1998; 239: 353-60
55. Smith PG, Roy C, Zhang YN, Chaudhuri S. Mechanical stress increases RhoA Activation in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 28: 436-42
56. Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2000; 12: 435-45
57. Scichilione N, Permutt S, Togiaw A. The lack of the bronchoprotective and not the bronchodilatory ability of deep inspiration is associated with airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 413-9

58. Brown RH, Mitzner W. Airway response to deep inspiration: role of nitric oxide. *Eur Respir J*. 2003; 22: 57-61
59. Wang L, Paré PD. Deep inspiration and airway smooth muscle adaptation to length change. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Sep; 137(2-3): 169-78
60. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol*. 2011 Oct; 2011: 174306
61. Nilius B, Watanabe H, Vriens J. The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflugers Arch*. 2003 Jun; 446(3): 298-303
62. Chapman ID, Kristersson G, Mathelin E, Schaeublin L, Mazzoni L, Boubekour K et al. Effects of potassium channel opener (SDZ PCO 400) on guinea pig and human pulmonary airways. *Br J Pharmacol*. 1992; 106: 423-9
63. Isaac L, Mc Ardle S, Miller NM, Foster RW, Small RC. Effects of some K⁺-channel inhibitors on the electrical behaviour of guinea-pig isolated trachealis and on its responses to spasmogenic drugs. *Br J Pharmacol*. 1996; 117: 1653-62
64. Wu BN, Lin RJ, Lo YC, Shen KP, Wang CC, Lin YT et al. KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: the role of the epithelium, cyclic nucleotides and K⁺ channels. *Br J Pharmacol*. 2004 Aug; 142(7): 1105-14
65. Toczyłowska-Mamińska R, Dołowy K. Ion transporting proteins of human bronchial epithelium. *J Cell Biochem*. 2012 Feb; 113(2): 426-32
66. Apell HJ. Structure-function relationship in P-type ATPases: a biophysical approach. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003; 150: 1-35
67. Thorneloe KS, Nelson MT. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Mar; 83(3): 215-42
68. Tong XY, Evangelista A, Cohen PA. Targeting the Redox Regulation of SERCA in Vascular Physiology and Disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 April; 10(2): 133-8
69. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004; 10: 1200-7
70. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2008 Mar; 57(1): 1-10
71. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. The attenuated fibroblast sheath of the respiratory tract. Epithelial-Mesenchymal trophic unit. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 21: 655-7
72. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*

- Biol. 1990; 3: 507–11
73. Evans MJ, Guha SC, Cox RA, Moller PC. Attenuated fibroblast sheath around the basement membrane zone in the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 8: 188-92
 74. Jeffrey PK. The development of large and small airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 May; 157(2): S174-80
 75. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb; 111(2): 215-25
 76. Davies DE, Holgate ST. Asthma: the importance of epithelial mesenchymal communication in pathogenesis. Inflammation and the airway epithelium in asthma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec; 34(12): 1520-6
 77. An SS, Fredberg JJ. Biophysical basis for airway hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Jul; 85(7): 700-14
 78. Holgate ST. Epithelial damage and response. *Clin Exp Allergy.* 2000 Jun; 30(1): 37-41
 79. Knight DA, Stewart GA, Thompson PJ. Histamine tachyphylaxis in human airway smooth muscle. The role of H₂-receptors and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Jul; 146(1): 137-40
 80. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* 2003 Dec; 8(4): 432-46
 81. Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulianis K, Molyvdas PA. Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2006 Dec; 149(8): 1083-91
 82. Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulianis K, Molyvdas PA. Sexual dimorphism in airway responsiveness to sex hormones in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Aug; 293(2): L516
 83. Pang JJ, Xu XB, Li HF, Zhang XY, Zheng TZ, Qu SY. Inhibition of beta-estradiol on trachea smooth muscle contraction in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 Mar; 23(3): 273-7
 84. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1994; 7: 2226-33
 85. Baart GJ, Langenhof M, van de Waterbeemd B, Hamstra HJ, Zomer B, van der Pol LA et al. Expression of phosphofructokinase in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 2010 Feb; 156(2): 530-42
 86. Sumi Y and Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007; 56: 341-8
 87. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-6

88. De Colibus L, Mattevi A. New frontiers in structural flavoenzymology. *Curr Opin Struct Biol.* 2006 Dec; 16(6): 722-8
89. Joosten V, van Berkel WJ. Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Apr; 11(2): 195-202
90. Charles IG, Chubb A, Gill R, Clare J, Lowe PN, Holmes LS et al. Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Nov; 196(3): 1481-9
91. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992 Jul; 267(21): 14519-22
92. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992 Aug; 307(3): 287-93
93. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993 Jan; 316(2): 175-80
94. Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry.* 1993 Nov; 32(43): 11600-5
95. Gutiérrez A, González-Gross M, Ruiz JR, Mesa JL, Castillo MJ. Acute exposure to moderate high altitude decreases growth hormone response to physical exercise in untrained subjects. *J Sports Med Phys Fitness.* 2003 Dec; 43(4): 554-8
96. Girvan HM, Waltham TN, Neeli R, Collins HF, McLean KJ, Scrutton NS et al. Flavocytochrome P450 BM3 and the origin of CYP102 fusion species. *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec; 34(6): 1173-7
97. Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA. Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Apr; 1698(1): 1-26
98. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1999 May; 1411(2-3): 217-30
99. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42: 1849-57
100. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Adaptation to Intermittent Hypoxia. *Exp Biol Med.* April 2006; 231(4): 343-65
101. Masters BS, Mc Millan K, Sheta EA, Nishimura JS, Roman LJ, Martasek P. Neuronal

- nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal. *FASEB J.* 1996 Apr; 10(5): 552-8
102. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994 Sep; 78(6): 927-30.
103. Wei CC, Wang ZQ, Arvai AS, Hemann C, Hille R, Getzoff ED et al. Structure of tetrahydrobiopterin tunes its electron transfer to the heme-dioxy intermediate in nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 2003 Feb; 42(7): 1969-77
104. Stuehr DJ, Tejero J, Haque MM. Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain. *FEBS J.* 2009 Aug; 276(15): 3959-74
105. Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric-oxide production by endothelial cells. *Kidney Int.* 1994; 45:598-604
106. Russell K, Haynes M, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa W, Bender J. Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric-oxide synthase in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5026-30
107. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation endothelial nitric-oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996 Nov; 79(5): 984-91
108. Ricciardolo FLM, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533: 240-52
109. Lipton A, Johnson M, McDonald T, Lieberman M, Gozal D, Gaston B. S-Nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature.* 2001; 413: 171-4
110. Gaston B, Sears S, Woods J, Hunt J, Ponaman M, Mc Mahon T et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet.* 1998; 351: 1317-9
111. Perkins WJ, Pabelick C, Warner DO, Jones KA. cGMP-independent mechanism of airway smooth muscle relaxation induced by S-nitrosoglutathione. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1998; 275: 468-74
112. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J.* 1993; 6: 1368-70
113. Gruetter CA, Childers CC, Bosserman MK, Lemke SM, Ball JG, Valentovic MA. Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate and sodium nitroprusside in bovine airways. *Am Rev Respir Dis.* 1989 May; 139(5): 1192-7
114. Högman M, Frostell C, Hedenström H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide

- modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Dec; 148(1): 1474–8
115. Högman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *Eur Respir J.* 1993; 6: 177–80
116. Jansen A, Drazen J, Osborne JA, Brown R, Loscalzo J, Stamler JS. The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrothiols. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Apr; 261(1): 154–60
117. Ricciardolo FLM, Nadel JA, Yoshihara S, Geppetti P. Evidence for reduction of bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea pigs by release of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1994; 113: 1147–52
118. Ricciardolo FLM, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Gerretti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation: role of tachykinins, bradykinin and nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 557–62
119. Ricciardolo FLM, Trevisani M, Geppetti P, Nadel A, Amadesi S, Bertrand C. NKA-induced bronchoconstriction in vivo is reduced by nitric oxide release via septide-insensitive NK1 receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 915–20
120. Figini M, Ricciardolo FLM, Javdan P, Nijkamp FP, Emanuelli C, Pradelles P et al. Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in guinea-pig trachea is nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Mar; 153(3): 918–23
121. Ricciardolo FLM, Steinhoff A, Amadesi S, Guerrini R, Tognetto M, Trevisani M et al. Presence and bronchomotor activity of protease activated receptor-2 (PAR-2) in guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1672–80
122. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000 May; 113(10): 1671–6
123. Ricciardolo FLM, Di Maria GU, Mistretta A, Sapienza MA, Geppetti P. Impairment of bronchoprotection by nitric oxide in severe asthma. *Lancet.* 1997; 350: 1297–8
124. Black PN, Brodie SM. Nitric oxide and response to inhaled bradykinin in severe asthma. *Lancet.* 1998; 351: 449–50
125. Lee YC, Cheon KT, Lee HB, Park SK, Rhee YK, Lee YC. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with asthma. *Allergy.* 2000; 55: 959–63
126. Nagaki M, Shimura MN, Irokawa T, Sasaki T, Shirato K. Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir Physiol.* 1995; 102: 89–95
127. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191:

128. Duszyk M, Radomski MW. The role of nitric oxide in the regulation of ion channels in airway epithelium: implications for diseases of the lung. *Free Radic Res.* 2000; 33: 449–59
129. Duszyk M. Regulation of anion secretion by nitric oxide in human airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 2001; 281: L450–7
130. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today.* 1995; 16: 28–30
131. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000 Jun; 164(12): 6166–73
132. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 980–4
133. Hamad AM, Johnson SR, Knox AJ. Antiproliferative effects of NO and ANP in cultured human airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 277: L910–8
134. Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA. Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J.* 1999 Oct; 13(13): 1810–6
135. Ricciardolo FLM, Timmers MC, Geppeti P. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 198-204
136. Lev A, Christensen GC, Ryan JP, Wang M, Kelsen SG. Epithelial modulation of trachealis muscle tension is calcium and temperature dependent. *J Appl Physiol.* 1989; 67: 713-9
137. Gunst SJ, Wu MF. Selected contribution: plasticity of airway smooth muscle stiffness and extensibility: role of length adaptive mechanisms. *J Appl Physiol.* 2001 Feb; 90(2): 741-9
138. Gunst SJ. Effects of muscle length and load on intracellular Ca^{2+} in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1989 Apr; 256(1): C807-12
139. Yoo J, Ellis R, Morgan KG, Hai CM. Mechanosensitive modulation of myosin phosphorylation and phosphatidylinositol turnover in smooth muscle. *Am J Physiol.* 1994 Dec; 267(1): C1657-65
140. Tang D, Mehta D, Gunst SJ. Mechanosensitive tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1999 Jan; 276(1): C250-8

141. Hall IP. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2000; 15: 1120-7
142. Kirber MT, Guerrero-Hernández A, Bowman DS, Fogarty KE, Tuft RA, Singer JJ et al. Multiple pathways responsible for the stretch-induced increase in Ca^{2+} concentration in toad stomach smooth muscle cells. *J Physiol.* 2000 Apr; 524(1): 3-17
143. Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE, Singer JJ. Visualization of Ca^{2+} entry through single stretch-activated cation channels. *PNAS.* 2002 Apr; 99(9): 6404-9
144. Wu X., Davis MJ. Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Apr; 280(4): H1751-61
145. Hai CM, Szeto B. Agonist-induced myosin phosphorylation during isometric contraction and unloaded shortening in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 1992 Jan; 262(1): L53-62
146. Lyford GL, Strege PR, Shepard A, Ou Y, Ermilov L, Miller SM et al. Alpha (1C) (Ca(V)1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep; 283(3): C1001 – 8
147. Laitko U, Morris CE. Membrane tension accelerates rate-limiting voltage-dependent activation and slow inactivation steps in a shaker channel. *J Gen Physiol.* 2004 Feb; 123(2): 135-54
148. Savla U, Sporn PH, Waters CM. Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis. *Am J Physiol.* 1997 Nov; 273(1): L1013–9
149. Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Epithelium-dependent effect of l-glutamate on airways: involvement of prostaglandins. *Mediators Inflamm.* 2002;11: 33–38
150. Henry PJ. Endothelin receptor distribution and function in the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26: 162–7
151. Gao Y, Vanhoutte PM. Responsiveness of the guinea pig trachea to stretch: role of the epithelium and cyclooxygenase products. *J Appl Physiol.* 1993; 75: 2112–6
152. Bard M, Salmeron S, Coirault C, Blanc FX, Lecarpentier Y. Effects of initial length on intrinsic tone in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1998; 275: L1026–30
153. Charette L, Misquitta C, Guay J, Reindeau D, Jones TR. Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig trachea. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995; 73: 1561–7
154. Bannenberg GL, Gustafsson LE. Stretch-induced stimulation of lower airway nitric oxide formation in the guinea-pig: inhibition by gadolinium chloride. *Pharmacol Toxicol* 1997; 81: 13-8

155. Artlich A, Adding C, Agvald P, Persson MG, Lonnqvist PA, Gustafsson LE. Exhaled nitric oxide increases during high frequency oscillatory ventilation in rabbits. *Exp Physiol*. 1999; 84: 959-69
156. Vaughan DJ, Brogan TV, Kerr ME, Deem S, Luchtel DL, Swenson ER. Contributions of nitric oxide synthase isozymes to exhaled nitric oxide and hypoxic pulmonary vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284: 834-43
157. Muto E, Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Sagai M, Iguchi A. Endothelial-constitutive nitric oxide synthase exists in airways and diesel exhaust particles inhibit the effect of nitric oxide. *Life Sci*. 1996; 59(18): 1563-70
158. Ijuin R, Umezawa N, Nagai S, Higuchi T. Evaluation of 3-substituted arginine analogs as selective inhibitors of human nitric oxide synthase isozymes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005; 15: 2881-5
159. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2002; 946: 139-47
160. Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol*. 2005; 510: 31-8
161. Muzaffar S, Jeremy JY, Angelini GD, Stuart-Smith K, Shukla N. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax*. 2003; 58: 598-604
162. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2001 Jun; 88(11): E68-75
163. Hucks D, Ward JP. Critical dependence of the NO-mediated component of cyclic AMP-induced vasorelaxation on extracellular L-arginine in pulmonary arteries of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000; 130(5): 997-1004
164. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-Independent Activation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Tyrosine Phosphatase Inhibitors and Fluid Shear Stress. *Circ Res*. 1998 Apr; 82(6): 686-95
165. Oka M, Wada M, Yamamoto A, Itoh Y, Fujita T. Functional expression of constitutive nitric oxide synthases regulated by voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels in cultured human astrocytes. *Glia*. 2004 April; 46(1): 53-62
166. Ding Y, Vaziri ND. Nifedipine and Diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Feb; 292(2): 606-9
167. Smith RP, Shellard R, Di Benedetto G, Magnus CJ, Mehta A. Interaction between

- calcium, neutral endopeptidase and the substance P mediated ciliary response in human respiratory epithelium. *Eur Respir J*. 1996 Jan; 9(1): 86-92
168. Hucks D, Khan NM, Ward JP. Essential role of L-arginine uptake and protein tyrosine kinase activity for NO-dependent vasorelaxation induced by stretch, isometric tension and cyclic AMP in rat pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2000; 131(7): 1475-81
169. Sanderson MJ, Dirksen ER. Mechanosensitivity of cultured ciliated cells from the mammalian respiratory tract: Implications for the regulation of mucociliary transport. *PNAS*. 1986 Oct; 83(19): 7302-6
170. Rosales OR, Isales CM, Barrett PQ, Brophy C, Sumpio BE. Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca^{2+} concentration through mobilization of intracellular and extracellular pools. *Biochem J*. 1997 Sep; 326(2): 385-92
171. Boitano S, Sanderson MJ, Dirksen ER. A role for Ca^{2+} -conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. *J Cell Sci*. 1994 Nov; 107(11): 3037-44
172. Fleming I, Bauersachs J, Schäfer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca^{2+} -independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *PNAS*. 1999 Feb; 96(3): 1123-8
173. Raeburn D, Hay DW, Robinson VA, Farmer SG, Fleming WW, Fedan JS. The effect of verapamil is reduced in isolated airway smooth muscle preparations lacking the epithelium. *Life Sci*. 1986 Mar; 38(9): 809-16
174. Ding Y, Vaziri ND. Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells. *Hypertension*. 1998 Oct; 32(4): 718-23
175. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jan; 284(1): R1-12
176. Luo S, Pan SL, Wu WB, Wang CC, Chiu CT, Tsai YJ et al. Bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilization in canine cultured tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol*. 1999 Mar; 126(6): 1341-50
177. Scichilone N, Marchese R, Catalano F, Vignola A, Toghias A, Bellia V. Bronchodilatory effect of deep inspiration is absent in subjects with mild COPD. *Chest*. 2004 Jun; 125(6): 2029-35
178. Kesler BS, Canning BJ. Regulation of baseline cholinergic tone in guinea-pig airway smooth muscle. *J Physiol*. 1999 Aug; 518(3): 843-55
179. Rand MJ, Li C. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 659-82

180. Gunst SJ, Stropp JQ, Service J. Mechanical modulation of pressure-volume characteristics of contracted canine airways in vitro. *J Appl Physiol.* 1990 May; 68(5): 2223–9
181. Shen X, Wu MF, Tepper RS, Gunst SJ. Mechanisms for the mechanical response of airway smoothmuscle to length oscillation. *J Appl Physiol.* 1997 Sep; 83(3): 731–8