

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ :
Καθηγητής Π.Α. ΜΟΥΥΒΔΑΣ

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Σταματίου Ροδόπη
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ (επιβλέπουσα)
Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΥΥΒΔΑΣ
Καθηγητής Φυσιολογίας

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ
Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ
Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΑΔΑΜ ΜΟΥΥΒΔΑΣ
Καθηγητής Φυσιολογίας

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ
Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ
Καθηγητής Πνευμονολογίας

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ
Καθηγητής Καρδιολογίας

ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα 2005-2009. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς όλους όσους συνέβαλλαν στην παραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα,

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ.Αποστολία Χατζηευθυμίου, για όλη τη συμβολή της στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Αποτελεί για μένα κάτι περισσότερο από επιβλέπουσα, καθώς στάθηκε δίπλα μου σε δύσκολες και ευχάριστες στιγμές. Μου έμαθε να μην δέχομαι τίποτα ως δεδομένο και να είμαι ανοιχτή σε προκλήσεις και σε διαφορετικές επιστημονικές προσεγγίσεις. Με την επιστημονική της εγγυρότητα και το ασίγαστο πάθος της για την έρευνα υπήρξε μέντορας και παράδειγμα ζωής. Είναι πολύ λίγα τα ευχαριστώ που μπορώ να εκφράσω για όλες τις ατελείωτες ώρες δουλειάς που μοιραστήκαμε και γι αυτό θα περιοριστώ να την ευχαριστήσω που μου έμαθε πώς να είμαι μαθήτρια στο ερευνητικό πεδίο.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ.Ευφροσύνη Παρασκευά, για τις γνώσεις της που τόσο απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου. Μου έδειξε ότι το κύτταρο είναι κάτι περισσότερο από ένα μυστήριο και αξίζει πραγματικά να κάνει κάποιος το ταξίδι της διερεύνησής του. Την ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε τεχνικά όσο και σε θεωρητικά ζητήματα.

Τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ.Π.Α.Μολυβδά για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική αρωγή του. Καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου ήταν πρόθυμος να με κατευθύνει στα πραγματικά ερωτήματα της έρευνας και να μοιραστεί μαζί μου την πολύτιμη εμπειρία του στο επιστημονικό πεδίο.

Τον Καθηγητή Πνευμονολογίας κ.Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, για την αμέριστη και πολύτιμη βοήθειά του που κατέστησαν δυνατή την παραγματοποίηση της παρούσας έρευνας.

Τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ.Αναστάσιο Γερμενή, τον ερευνητή, υπότροφο M.Curie κ. Βάϊο Καρανίκα και τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας για την εξαιρετικά σημαντική συμβολή και συνεργασία τους, κυρίως στη δημιουργία και τη δημοσίευση των επιστημονικών εργασιών που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που μου διέθεσαν και για τις επικοδομητικές του παρατηρήσεις.

Τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ.Χρυσή Χατζόγλου για την αμέριστη υποστήριξη και τους κ.Σωτήρη Ζαρογιάννη και κ.Ισαάκ Αηδονίδη για την άψογη συνεργασία.

Τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας κ.Γιώργο Σίμο, κ.Παναγιώτη Λιάκο, κ.Ηλία Μυλωνή, κ.Γεωργία Χαχάμη για την σημαντική βοήθειά τους και τις επιστημονικές τους συμβουλές.

Τον τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ.Ιωάννη Μακαντάση για την εξαιρετική τεχνική υποστήριξή του και τη βοήθειά του με τα πειραματόζωα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τον σύζυγο και το παιδί μου για την απεριόριστη υπομονή που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή τους η παρούσα μελέτη δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί. Επίσης, τους γονείς μου στους οποίους χρωστώ τις γνώσεις μου.

*Στον Γιώργο,
που είναι πάντα η έμπνευση της ζωής μου*

*Στον Θάνο,
που με συντοφεύει σε όλα μου τα βήματα*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	16
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	21
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	28
1. Λείες μυικές ίνες	28
1.1. ΛΜΚ αεραγωγών	29
1.2 Αναδιαμόρφωση (remodeling) του τοιχώματος των αεραγωγών	30
2. Πολλαπλασιασμός ΛΜΚ	30
2.1. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αεραγωγών	
2.1.1 Μονοπάτι της PI3 κινάσης	31
2.1.1.1 Αναστολείς του μονοπατιού της PI3K	32
2.1.2. Μονοπάτι των MAP κινασών	33
2.1.2.1 Αναστολείς του μονοπατιού των MAP κινασών	35
3. Γεννητικές ορμόνες	36
3.1 Υποδοχείς ανδρογόνων	37
3.2 Υποδοχείς οιστρογόνων	38
3.3 Υποδοχείς ορμονών στα ΛΜΚ αεραγωγών	39
3.4 Τεστοστερόνη	40
3.5 Οιστρογόνα	40
3.6 Γεννητικές ορμόνες στη φυσιολογία και παθφυσιολογία νόσων του αναπνευστικού	41
4. Μουσκαρινικοί υποδοχείς	42
4.1 Μουσκαρινικοί αγωνιστές	47
4.2 Αναστολείς των μουσκαρινικών υποδοχέων	47
5. Φλεγμονώδεις και αυξητικοί παράγοντες	48
5.1 Κυτταροκίνες και υποδοχείς τους	
5.1.1 Υποδοχείς κυτταροκινών	50
5.1.2 Κυτταροκίνες	52
5.2 Αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους	
5.2.1 Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων	53
5.2.2 Αυξητικοί παράγοντες	53
6. Μακρολίδες	55

6.1 Αζιθρομυκίνη	56
6.2 Κυτταρικές αποκρίσεις που ενεργοποιούνται από την αζιθρομυκίνη	56
6.2.1 Σχέση αυτοφαγίας – απόπτωσης	59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	62
1. Δημιουργία και διατήρηση πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου	62
1.1 Χειρισμός πειραματοζώων	62
1.2 Απομόνωση Λείων Μυθικών Κυττάρων τραχείας κουνελιού	62
1.3 Καθιέρωση πρωτογενούς καλλιέργειας Λείων Μυθικών Κυττάρων τραχείας κουνελιού	64
1.4 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών	64
1.5 Καλλιέργεια Λείων Μυθικών Κυττάρων βρόγχων ανθρώπου	65
2. Κατεργασία των κυττάρων	65
2.1 Κατεργασία των ΛΜΚ με επαγωγείς και ανστολείς του πολλαπλασιασμού τους	65
3. Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό	66
3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	66
4. Εκτίμηση πολλαπλασιασμού σε ΛΜΚ	68
4.1 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήσης αιμοκυτταρόμετρου μετά από χρώση με χρωστική Trypan blue	68
4.2 Μέτρηση ενσωμάτωσης- μεταβολισμού MTS-τετραζολίου από ζωντανά ΛΜΚ	69
4.3 Μέτρηση ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης (³ H-methyl- thymidine) σε νεοσυντιθέμενο DNA των ΛΜΚ	72
5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση	73
5.1 Εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ	73
5.2 Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης	74
5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	75
5.4 Δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου	76
5.5 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων	76
5.6 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής	77
5.7 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	77

5.8	Ανοσοσανίχνευση πρωτεϊνών	78
6.	Εντοπισμός ενδοκυττάρων λυσοσωμάτων	81
6.1	Εντοπισμός λυσοσωμάτων με χρώση με Lysotracker red	81
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
1.	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ	82
1.1	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	82
1.1.1	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με αντίσωμα για την α-ακτίνη του λείου μυός.	82
1.1.2	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με αντίσωμα για την δεσμίνη του λείου μυός	82
1.2	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	83
1.1.1	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με αντίσωμα για την α-ακτίνη του λείου μυός.	83
1.1.2	Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με αντίσωμα για την δεσμίνη του λείου μυός	83
2.	Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων ορού εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ	85
2.1	Επίδραση FBS στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	85
2.2	Επίδραση FBS στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	87
3.	Επίδραση γεννητικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ	88
3.1	Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	88
3.1.1	Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού	88
3.1.1.1	Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού, παρουσία του αναστολέα του υποδοχέα των ανδρογόνων, φλουταμίδη	90
3.1.1.2	Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την τεστοστερόνη σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού	92
3.1.2	Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού	94
3.1.2.1	Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού, παρουσία του αναστολέα του υποδοχέα των ανδρογόνων, φλουταμίδη	96

3.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	97
3.2.1 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού	97
3.2.1.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την οιστραδιόλη σε ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού	98
3.2.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού	100
4. Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών σε ΛΜΚ	101
4.1 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	101
4.1.1.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	101
4.1.1.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	103
4.1.1.3 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	104
4.1.1.4 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, μετά από παρατεταμένη στέρηση ορού	106
4.1.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	106
4.1.2.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	106
4.1.2.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	107
4.1.3 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από μουσκαρινικούς αγωνιστές	108
4.1.3.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από την ακετυλοχολίνη ή την καρβαχόλη σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	108
4.1.3.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK από την ακετυλοχολίνη ή την καρβαχόλη σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	110
4.1.4 Επίδραση μουσκαρινικών ανταγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	112

4.1.4.1 Επίδραση γκαλαμίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επάγεται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές	112
4.1.4.2 Επίδραση τιτροπίου στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επάγεται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές	114
4.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	116
4.2.1.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	116
4.2.1.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	118
4.2.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	120
4.2.2.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	120
4.2.2.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού	121
5. Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων σε ΛΜΚ	122
5.1 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	122
5.1.1 Επίδραση της ιντερλευκίνης 1β στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	122
5.1.2 Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	123
5.1.3 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών	125
5.1.4 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από φλεγμονώδεις παράγοντες σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	126
5.1.4.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από την ιντερλευκίνη 1β ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	126
5.1.4.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK από την ιντερλευκίνη 1β ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	127
5.2 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	130

5.2.1 Επίδραση της ιντερλευκίνης 1β στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	130
5.2.2 Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	130
5.2.3 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών	132
5.2.4 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από φλεγμονώδεις παράγοντες σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	133
5.2.4.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από την ιντερλευκίνη 1β ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	133
5.2.4.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK από την ιντερλευκίνη 1β ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	134
6. Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ	137
6.1 Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	137
6.1.1 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	137
6.1.2 Επίδραση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	139
6.1.3 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	140
6.1.4 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης, του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών και του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών	142
6.1.5 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από αυξητικούς παράγοντες	143
6.1.5.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης, τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	143
6.1.5.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης, τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών	

και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	146
6.2 Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	148
6.2.1 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	148
6.2.2 Επίδραση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	149
6.2.3 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	151
6.2.4 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης, του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών και του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών	152
6.2.5 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από αυξητικούς παράγοντες	153
6.2.5.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης, τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	153
6.2.5.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης, τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	156
7. Επίδραση αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ	157
7.1.1 Επίδραση αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	157
7.1.2 Επίδραση αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	159
7.1.2.1 Εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με χρώση με Trypan blue	159
7.1.3 Επίδραση αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	160
7.1.4 Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3MA	161

7.1.4.1 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3MA	161
7.1.4.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3MA	162
7.1.4.3 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3MA	163
7.1.5 Ενεργοποίηση πρωτεϊνών αυτοφαγίας από την αζιθρομυκίνη	164
7.1.5.1 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στην ενεργοποίηση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης beclin-1 σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	164
7.1.5.1.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης beclin-1 με έμμεσο ανοσοφθορισμό	164
7.1.5.1.2 Εντοπισμός της πρωτεΐνης beclin-1 με ανοσοαποτύπωση κατά Western	165
7.1.5.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στην ενεργοποίηση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης LC3 σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	166
7.1.5.2.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης LC3 με έμμεσο ανοσοφθορισμό	166
7.1.5.2.2 Εντοπισμός της πρωτεΐνης LC3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western	166
7.1.6 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από την αζιθρομυκίνη	168
7.1.6.1 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K, LY294002 και Wortmannin	168
7.1.6.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K, LY294002 και Wortmannin	170
7.1.7 Επίδραση αζιθρομυκίνης στα λυσοσώματα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	171
7.1.8 Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	172
7.1.8.1 Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	172
7.1.8.2 Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	173
7.1.9 Ενεργοποίηση απόπτωσης από την αζιθρομυκίνη σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού	174

7.2 Επίδραση αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	175
7.2.1 Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3ΜΑ	177
7.2.1.1 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3ΜΑ	177
7.2.1. 2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στον αριθμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3ΜΑ	178
7.2.2 Επίδραση της αζιθρομυκίνης στα λυσοσώματα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου	179
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	181
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	197
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	215
ABSTRACT	217

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο: Σταματίου
Όνομα : Ροδόπη
Όνομα πατρός : Χρήστος
Ημερομηνία γέννησης : 10/04/1980
Τόπος γέννησης : Θεσσαλονίκη
Οικογενειακή κατάσταση: έγγαμος με ένα παιδί

Διεύθυνση κατοικίας : Ομορφοχώρι Λάρισας, Δήμος Πλατυκάμπου
Τηλέφωνο κατοικίας : 2410-575341
Κινητό τηλέφωνο: 6974356274
Email: rodopist24@yahoo.com,
rstamatiou@med.uth.gr.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1998:
Αποφοίτηση από το 4^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας .Βαθμός απολυτηρίου 19.2/20
- 1999-2004:
Φοίτηση στο τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
- 2002-2003:
Εκπόνηση πτυχιακής ερευνητικής εργασίας στον τομέα Φυσιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, με θέμα: “Επίδραση ρυπογόνων παραγόντων σε ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος σε κύτταρα γονάδας του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*”, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Μ. Καλογιάννη-Δημητριάδη.
Βαθμός εργασίας 10/10
- 2004:
Αποφοίτηση από το τμήμα Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με βαθμό πτυχίου 7.24 “Λίαν Καλώς”.
- 11/2005:
Έναρξη εκπόνησης διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τομέα Βασικών Επιστημών του τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με θέμα: “Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος”, υπό την επίβλεψη των:
κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά, Καθηγητής
κ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, Επίκουρος Καθηγήτρια
κ. Ευφροσύνη Παρασκευά, Επίκουρος Καθηγήτρια

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2004-σήμερα:

Διδασκαλία Βιολογίας σε φροντιστήρια μέσης εκπαίδευσης, για την προετοιμασία μαθητών της Β και Γ Λυκείου για τις Πανελλήνιες εξετάσεις και για την συμμετοχή τους σε διαγωνισμούς Βιολογίας.

2005-σήμερα:

Συμμετοχή στις εργαστηριακές ασκήσεις Φυσιολογίας Ι και ΙΙ των φοιτητών του τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2006:

Συμμετοχή στα εργαστήρια του μαθήματος “Βιοφυσική Μεμβρανών” του μεταπτυχιακού προγράμματος “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής” του τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2006:

Συμμετοχή στην εκπόνηση πτυχιακής ερευνητικής εργασίας στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από την κ. Χριστίνα Μπουτουρέλη, φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (εαρινό εξάμηνο 2006)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Kaloyanni M., **Stamatiou R.**, Dailianis S.

Zinc and 17β-estradiol induce modifications in Na⁺ /H⁺ exchanger and pyruvate kinase activity through protein kinase C in isolated mantle/gonad cells of *Mytilus galloprovincialis*.

Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicol Pharmacol C, 2005. 141:257-266

Stamatiou R., Paraskeva E., Boukas K., Gourgoulisanis K.I., Molyvdas P.A., Hatziefthimiou A.

Azithromycin has an anti-proliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells

European Respiratory Journal, 2009. 34:721-730

Stamatiou R., Boukas K, Paraskeva E, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A.

Azithromycin reduces the viability of human bronchial smooth muscle cells

Journal of Antibiotics, 2010. *in press*

R. Stamatiou, E. Paraskeva, M. Pieper, K. Gourgoulisanis, P-A Molyvdas and A. Hatziefthimiou The effect of muscarinic receptors agonists, cytokines and growth factors on airway smooth muscle proliferation. Υπό έγκριση.

Η εργασία αυτή έχει γίνει με χρηματοδότηση από την Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riss, Germany και έχει κατατεθεί στην εταιρεία προκειμένου να ληφθεί η τελική έγκριση για να αποσταλεί προς δημοσίευση.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ- ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Απρίλιος 2006:

Διήμερο εργασίας με θέμα “Μεθοδολογία της Έρευνας”, στα πλαίσια του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ<<Αναμόρφωση προγράμματος προπτυχιακών σπουδών>>, σε συνεργασία με την Ελληνική Εταιρεία Κοινωνικής Ιατρικής

Σεπτέμβριος 2006:

Συνέδριο “Ημέρες Πνευμονολογίας”, της Πνευμονολογικής Εταιρείας Ελλάδος σε συνεργασία με την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Παρουσίαση εργασίας με θέμα “Η επίδραση των γεννητικών ορμονών στην επαναδιαμόρφωση των αεραγωγών”.

2006-2007:

Διαλέξεις του μεταπτυχιακού προγράμματος “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής” του τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δεκέμβριος 2007:

16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος,

Παρουσίαση εργασιών με τίτλους:

“Η αζιθρομυκίνη ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων των αεραγωγών”

Σταματίου Ρ., Παρασκευά Ε., Γουργουλιάνης Κ., Μολυβδάς Π.Α., Χατζηευθυμίου Α.

“Η τεστοστερόνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων των αεραγωγών”.

Σταματίου Ρ., Παρασκευά Ε., Παπαγιάννη Μ., Μολυβδάς Π.Α., Χατζηευθυμίου Α.

Δεκέμβριος 2007:

Σεμινάριο “Στατιστική Ανάλυση Ιατρικών Δεδομένων με το SPSS”. Οργάνωση Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Βιομαθηματικών.

Νοέμβριος 2008:

17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

Παρουσίαση εργασίας με τίτλο

“Η αζιθρομυκίνη προκαλεί αυτοφαγία στα λεία μυικά κύτταρα των αεραγωγών”.

Σταματίου Ρ., Παρασκευά Ε., Γουργουλιάνης Κ., Μολυβδάς Π.Α., Χατζηευθυμίου Α.

Απρίλιος 2009:

Θεματική διημερίδα “Κυτταρική επικοινωνία και σηματοδότηση”. Οργάνωση από την Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), υπό την αιγίδα του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Νοέμβριος 2009:

18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

Παρουσίαση αναρτημένης εργασίας με τίτλο

“Η αζιθρομυκίνη ελαττώνει τη βιωσιμότητα λείων μυικών κυττάρων βρόγχων ανθρώπου”

Σταματίου Ρ., Μπούκας Κ., Παρασκευά Ε., Μολυβδάς Π.Α., Χατζηευθυμίου Α.

ΒΡΑΒΕΙΑ

Έπαινος “καλύτερης αναρτημένης εργασίας” από την Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία για την εργασία που παρουσιάστηκε στα πλαίσια του 18ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος με τίτλο

“Η αζιθρομυκίνη ελαττώνει τη βιωσιμότητα λείων μυικών κυττάρων βρόγχων ανθρώπου”

Σταματίου Ρ., Μπούκας Κ., Παρασκευά Ε., Μολυβδάς Π.Α., Χατζηευθυμίου Α.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Άριστη γνώση Αγγλικών :

- Certificate of Proficiency in English, University of Cambridge
- Certificate of Proficiency in English, University of Michigan
- Αναγνωρισμένη επάρκεια γνώσης της Αγγλικής γλώσσας από το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων

Πολύ καλή γνώση Γερμανικών:

- Zertificat Deutsch als Fremdsprache, Goethe Institut

Πολύ καλή γνώση χρήσης Ηλεκτρονικού Υπολογιστή και στατιστικών προγραμμάτων Sigma plot, SPSS, Graph Prism.

Άδεια διδασκαλίας Βιολογίας από το γραφείο δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης Νομαρχίας Λάρισας.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMK: Λεία Μυϊκά κύτταρα

ΧΑΠ: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

PI3K: phosphatidylinositol -3 kinase, κινάση της 3- φωσφατιδυλοϊνσιτόλης

MAPK: mitogen activated protein kinases, κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα

RTK: receptor tyrosine kinase, υποδοχείς κινάσης τυροσίνης

GPCR: G protein coupled receptors, υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες

mTOR: mammalian target of rapamycin, στόχος της ραπαμυκίνης σε θηλαστικά

MLCK: myosin light chain kinase, κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης

PKC: protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

ERK: extracellular signal regulated kinases, κινάσες που ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια ερεθίσματα

JNK: c-Jun N-terminal kinases

AR: androgen receptor, υποδοχέας ανδρογόνων

ER: estrogen receptor, υποδοχέας οιστρογόνων

NR3C4: nuclear receptor subfamily 3 group 4 member C, πυρηνικός υποδοχέας της υποοικογένειας 3 της ομάδας 4 μέλος C

IL-1β: interleukin-1β, ιντερλευκίνη-1β

TNFα: tumor necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TGF: transforming growth factor, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης

bFGF: basic fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

PDGF: platelet derived growth factor, αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από αιμοπετάλια

EGF: elongation growth factor, αυξητικός παράγοντας επιμήκυνσης

TACE: TNFα converting enzyme, ένζυμο μετατροπής του παράγοντα νέκρωσης όγκων α

NF-κB: nuclear factor κB, πυρηνικός παράγοντας κB

LC3: light chain 3, ελαφριά αλυσίδα 3

3MA: 3 methyladenine, 3 μεθυλοαδενίνη

DMEM-F12: Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12, θρεπτικό υλικό για AMK

FBS: fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

PS: penicillin/streptomycin, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

BSA: bovine serum albumine, αλβουμίνη ορού βοός

PBS: phosphate buffered saline, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
EDTA: ethylenediamine, αιθυλενοδιαμίνη
DMSO: dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
TCA: trichloroacetic acid, τριχλωροοξικό οξύ
SDS: sodium dodecyl sulfate, σουλφοξείδιο του νατρίου
cpm: counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό
PMSF: phenylmethylsulfoxide, φαινυλμεθυλσουλφοξείδιο
APS: υπερθειϊκό αμμώνιο
TEMED: τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
ECL: enhanced chemilumminosity, προκαλούμενη χημειοφωταύγεια
ACh: ακετυλοχολίνη
CCh: καρβαχόλη

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στους αεραγωγούς τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) καλύπτουν τα τοιχώματα τους και επιτελούν κύριο ρόλο στη φυσιολογική τους λειτουργία. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της διαμέτρου των αεραγωγών, καθώς μέσω της σύσπασης και της χάλασής τους ελέγχουν την ποσότητα του αέρα που φτάνει στους πνεύμονες. Εκτός όμως από τη λειτουργία τους αυτή είναι σημαντικό η μάζα τους να βρίσκεται σε συγκεκριμένα φυσιολογικά όρια ώστε να μην μεταβάλλεται η φυσιολογική δομή του τοιχώματος των αεραγωγών και η λειτουργία. Το πάχος της στοιβάδας των ΛΜΚ καθορίζεται από τον αριθμό και/η το μέγεθος τους. Διάφοροι παράγοντες τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις μπορούν να επηρεάσουν τον αριθμό των ΛΜΚ στο τοίχωμα των αεραγωγών. Υπάρχουν παράγοντες που ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια στα ΛΜΚ, οδηγούν στην έκφραση γονιδίων και ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης υπάρχουν παράγοντες που οδηγούν σε διαδικασίες που συμμετέχουν στην επιβίωση ή στον κυτταρικό θάνατο. Η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών (remodeling), που εμφανίζεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού, χαρακτηρίζεται από μεταβολή στην δομή των αεραγωγών και μεταξύ άλλων περιλαμβάνει και υπερπλασία-υπερτροφία των ΛΜΚ. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού, όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και η κυστική ίνωση εμφανίζουν διαφορές ως προς τη συχνότητα ή την βαρύτητα της νόσου που σχετίζονται με το φύλο. Σε παθήσεις του αναπνευστικού όπου παρατηρείται αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών, παρατηρείται αυξημένη χολινεργική διαβίβαση στους αεραγωγούς ενώ επίσης μπορεί εκκρίνονται ένα πλήθος φλεγμονωδών παραγόντων, μερικοί από τους οποίους έχουνδειχθεί ότι επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων του αναπνευστικού. Επιπλέον, στην προσπάθεια του αεραγωγού να επιδιορθωθούν οι προκαλούμενες από τη φλεγμονή βλάβες στα τοιχώματά του εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων. Στην θεραπεία των παθήσεων που προαναφέρθηκαν, συχνά χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά και ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες οι μακρολίδες. Μελέτες δείχνουν ότι οι μακρολίδες έχουν επιπρόσθετες δράσεις στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών και μπορούν να επηρεάσουν την βιωσιμότητα των κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των γεννητικών ορμονών (τεστοστερόνη, οιστραδιόλη), των μουσκαρινικών αγωνιστών (ακετυλοχολίνη, καρβαχόλη), των κυτταροκινών (Ιντερλευκίνη-1β, παράγοντας

νέκρωσης όγκων α), των αυξητικών παραγόντων (αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών και αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από αιμοπετάλια) και των μακρολιδών (αζιθρομυκίνη) στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Η δράση των παραπάνω παραγόντων μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές ΛΜΚ, που ανήκουν τόσο σε διαφορετικά είδη οργανισμών, όσο και σε διαφορετικά τμήματα του αναπνευστικού συστήματος. Η επιλογή των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου έγινε προκειμένου να διερευνηθεί αν υπάρχουν διαφορές στην ενεργοποίηση μηχανισμών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών και μεταξύ ανώτερου και κατώτερου τμήματος του αναπνευστικού συστήματος. Επίσης μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολαβούν την επίδραση των παραγόντων που προαναφέρθηκαν στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και των MAP κινασών, τα οποία συμμετέχουν στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ και η πρόκληση αυτοφαγίας και απόπτωσης στα κύτταρα αυτά.

Η διερεύνηση της επίδρασης των παραγόντων αυτών (γεννητικές ορμόνες, χολινεργικοί αγωνιστές, κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και μακρολίδες) στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην επίδραση τους αυτή μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της παθογένειας των νόσων του αναπνευστικού και στην περαιτέρω αποτελεσματική θεραπευτική τους αντιμετώπιση.

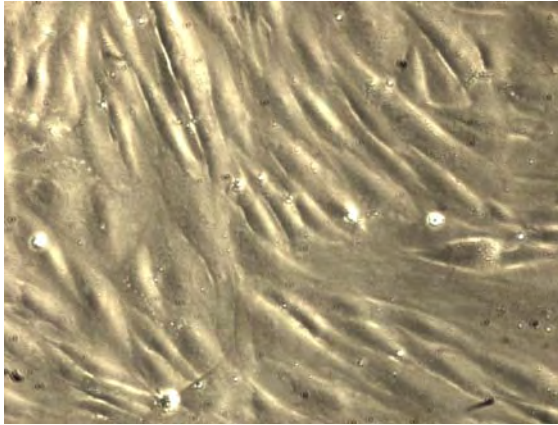
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Λείες μυϊκές ίνες.

Οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκονται στα τοιχώματα των κοίλων οργάνων και στα σπλάχνα. Το όνομά τους προέρχεται από την απουσία σε αυτές γράμμωσης, η οποία παρατηρείται στους σκελετικούς μύες. Εμφανίζουν αυτόματη ηλεκτρική και μηχανική δραστηριότητα, η οποία μπορεί να τροποποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα, όπως ορμόνες αλλά και από τη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Η ταχύτητα της σύσπασης των λείων μυών είναι πολύ μικρό κρη από αυτή των γραμμωτών, μπορούν όμως να διατηρήσουν τη σύσπαση μακροχρόνια με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στους αεραγωγούς και μπορούν να βρίσκονται πάντοτε σε κάποιο βαθμό συστολής(1, 2).

Οι λείοι μυς αποτελούνται από λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μηχανικά με ισχυρούς δεσμούς και χασματικές συνδέσεις με μειωμένη αντίσταση (1). Τα ΛΜΚ έχουν διάμετρο 2 με 5μm, ένα μόνο κεντρικό πυρήνα και τα περισσότερα λεπταίνουν στα άκρα. Όταν παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο εμφανίζουν χαρακτηριστική επιμήκη μορφή και σε μονοστιβάδα σε καλλιέργειες εμφανίζουν μορφή λόφων και κοιλάδων (hills and valleys) (Εικόνα 1), (2). Τα ΛΜΚ εμφανίζουν 2 διακριτούς φαινοτύπους, έναν 'συνθετικό', στον οποίο τα κύτταρα είναι πεπλατυσμένα και μπορούν και διαιρούνται με φυσιολογικό ρυθμό, και έναν 'συσταλτό', στον οποίο τα κύτταρα είναι επιμήκη και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους είναι περιορισμένος (3, 4). Οι διαφορετικοί φαινότυποι αντικατοπτρίζουν και την διαφορετική λειτουργικότητα των κυττάρων, η οποία ελέγχεται από την διαφορά στην έκφραση συγκεκριμένων δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών, αλλά και από την παρουσία υποδοχέων. Επίσης, διαφορά υπάρχει και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμφανίζονται ενεργοποιημένα στους δύο φαινοτύπους, 'συνθετικό' και τον 'συσταλτό', και που οδηγούν στην φαινοτυπική αλλαγή (5, 6, 7, 8). Η μετατροπή του ενός φαινοτύπου στον άλλο εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του κυττάρου, για παράδειγμα η απουσία ορού ή άλλων αυξητικών παραγόντων αυξάνει το ποσοστό των ΛΜΚ που εμφανίζουν τον 'συσταλτό' φαινότυπο (9).

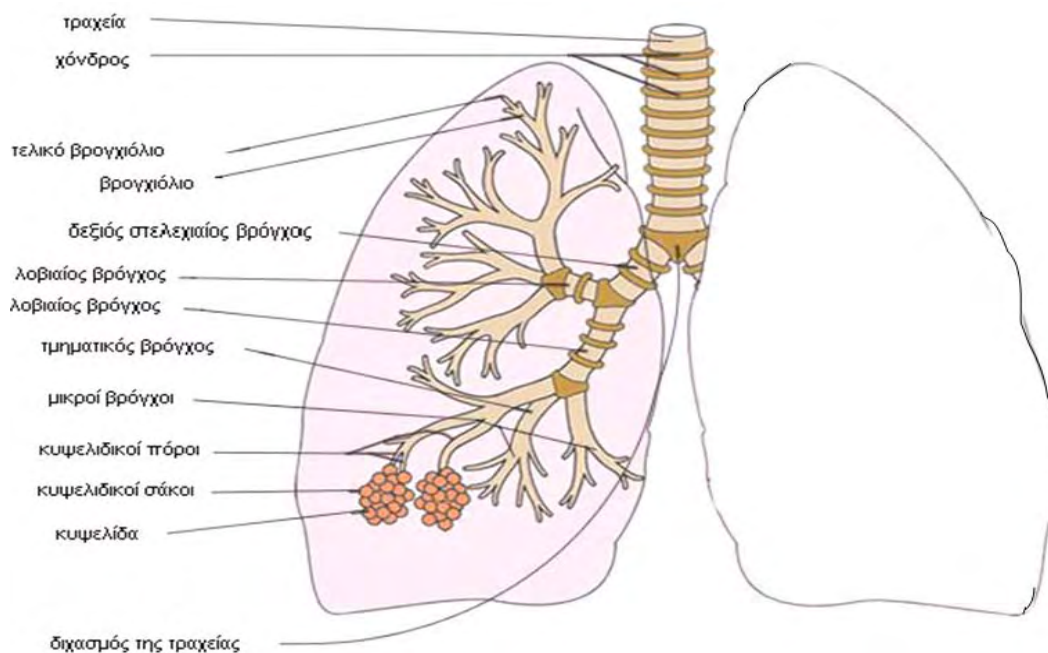


Εικόνα 1.

Καλλιέργεια ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, όπως φαίνεται με οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο

1.1. Λεία μυικά κύτταρα (ΛΜΚ) αεραγωγών

Στο αναπνευστικό σύστημα, λεία μυικά κύτταρα εμφανίζονται στους πνεύμονες αλλά και στο τοίχωμα των αεραγωγών. Οι αεραγωγοί, αρχίζουν από τον λάρυγγα και καταλήγουν στις κυψελίδες των πνευμόνων και επιτελούν τρεις κύριες λειτουργίες: 1) αποτελούν διαύλους για τη διόδο του αέρα, 2) προστατεύουν τους πνεύμονες από ξένα σώματα και 3) υγραίνουν και θερμαίνουν τον αέρα, (Εικόνα 2). Τα ΛΜΚ των αεραγωγών ρυθμίζουν τη διάμετρο των αεραγωγών και επομένως και την ποσότητα του αέρα που φτάνει στους πνεύμονες. Την λειτουργία τους αυτή την επιτελούν κυρίως μέσω της σύσπασης και της χάλασης τους, αλλά δεν πρέπει να παραβλέπεται ο ρόλος του αριθμού των ΛΜΚ στους αεραγωγούς. Αν τα ΛΜΚ των τοιχωμάτων των αεραγωγών αυξηθούν υπερβολικά σε αριθμό, τότε το τοίχωμα θα γίνει πιο παχύ με αποτέλεσμα η διάμετρος του αεραγωγού να μικρύνει και να δυσκολεύει τη ροή του αέρα. Το ισοζύγιο πολλαπλασιασμού/ θανάτου των κυττάρων αυτών ρυθμίζει τον φυσιολογικό αριθμό τους στους αεραγωγούς.



Εικόνα 2.

Ανατομία του πνεύμονα, όπου διακρίνονται οι αεραγωγοί.

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.healthforself.today.com.

1.2 Αναδιαμόρφωση (remodeling) του τοιχώματος των αεραγωγών

Σε πολλές χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως στο άσθμα και στη χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), παρατηρείται αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών (10, 11). Η αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο το οποίο περιλαμβάνει ένα πλήθος δομικών αλλαγών, όπως πάχυνση της βασικής μεμβράνης, αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των αγγείων και υπερπλασία και υπερτροφία των λείων μυών (12). Οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε περιορισμό της διαμέτρου των αεραγωγών και ελαττωμένη ποσότητα αέρα που εισέρχεται τελικά στους πνεύμονες. Η σημασία επομένως, της ύπαρξης φυσιολογικού αριθμού ΛΜΚ στους αεραγωγούς είναι ιδιαίτερη.

2 Πολλαπλασιασμός λείων μυικών κυττάρων (ΛΜΚ)

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Οι παράγοντες αυτοί μεσολαβούν τη δράση τους ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (3-

phosphatidylinositol kinase, PI3K) ή των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα κινασών (mitogen activated protein kinases, MAPK). Τα μονοπάτια αυτά επάγουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση γονιδίων, που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε αντιγραφή του DNA του και μιτωτικό διπλασιασμό του (13, 14). Στην αντίθετη περίπτωση η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε σταμάτημα της διαίρεσης, μέσω διαδικασιών όπως η αυτοφαγία ή ακόμη και θάνατο κυρίως μέσω απόπτωσης (15, 16). Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό ή τον θάνατο του κυττάρου προϋποθέτει αρχικά την δέσμευση του παράγοντα σε συγκεκριμένους υποδοχείς που βρίσκονται συνήθως στην κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια, πυροδοτείται ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων πρωτεϊνών, οι οποίες με τον τρόπο αυτό ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται. Η τελική απόκριση του κυττάρου στο εκάστοτε ερέθισμα εξαρτάται από τη φύση, τη διάρκεια και την ένταση του ερεθίσματος, αλλά και από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο όταν δέχεται το ερέθισμα (17).

2.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών

2.1.1 Μονοπάτι της PI3 κινάσης

Η οικογένεια των κινασών της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) οργανώνεται σε 3 κατηγορίες, την I, II, και III αντίστοιχα. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν την 3'-ινοσιτόλη σε μια ποικιλία μορίων φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης που συνδέονται με τη μεμβράνη του κυττάρου. Κάθε κλάση έχει διαφορετικά μοναδικά υποστρώματα δράσης και παράγει συγκεκριμένα λιπίδια που αποτελούν δευτέρους μηνύτορες. Επιπλέον, οι κινάσες των διαφορετικών ομάδων ανταποκρίνονται και σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η ενεργοποίηση και η δυνατότητα ρύθμισης συγκεκριμένων PI3 κινασών εξαρτάται από τις ρυθμιστικές και καταλυτικές ισομορφές των κινασών που υπάρχουν στο κύτταρο και οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερή (18).

Οι κινάσες της κλάσης I και II ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση μορίων με υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης (receptor tyrosine kinases (RTK) ή με υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCR) και συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες όπως η επιβίωση και η ανάπτυξη του κυττάρου, η σύνθεση πρωτεϊνών, η μίτωση και η κινητικότητα των κυττάρων. Στα μονοπάτια αυτά εμπλέκεται η φωσφορυλίωση της Akt πρωτεΐνης του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K (19). Οι κινάσες της κλάσης III της PI3K ενεργοποιούνται από την σύνδεση μορίων σε μεμβρανικούς υποδοχείς διαφορετικούς από αυτούς που έχουν ήδη

αναφερθεί. Οι κινάσες της κλάσης III της PI3K συμμετέχουν στην κυκλοφορία κυστιδίων και πρωτεϊνών και εμπλέκονται στην έκκριση των λυσοσωμικών ενζύμων σε μονοπάτια ενδοκύττωσης (20, 21). Σημαντική είναι επίσης η ενεργοποίηση αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς τα γονίδια των κινασών της PI3K θεωρούνται πρωτο-ογκογονίδια και ενεργοποιούνται σε μεγάλο βαθμό σε καρκινικούς όγκους (22) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1.

Κατηγοριοποίηση των κινασών του μονοπατιού της PI3K.

		PI3K		
Κλάση	Δομή	Ενεργοποίηση από	Παραγωγή	Ρόλος
I IA, IB	Ρυθμιστική+καταλυτική υπομονάδα	G-πρωτείνες, RTKs	PI(3)P PI(3, 4)P ₂ PI(3,4,5)P ₃	Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, καρκίνος
II	Μόνο καταλυτική υπομονάδα	Άγνωστοι υποδοχείς	PI(3)P PI(3, 4) P ₂	άγνωστος
III	Ρυθμιστική+καταλυτική υπομονάδα	Άγνωστοι υποδοχείς	PI(3)P	Δημιουργία κυστιδίων, ενδοκύττωση, φαγοκύττωση

2.1.1.1 Αναστολείς του μονοπατιού της PI3K

Η Wortmannin (C₂₃H₂₄O₈), είναι ένας στεροειδής μεταβολίτης των μυκήτων *Penicillium funiculosum* και *Talaromyces (Penicillium) wortmannii* (23) και δρα ως αναστολέας του μονοπατιού της PI3K. Εμφανίζει την ίδια συγγένεια και για τις 3 κλάσεις των κινασών του μονοπατιού και όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη δράση και άλλων ενζύμων που σχετίζονται με την PI3K, όπως του mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), της πρωτεϊνικής κινάσης C, ορισμένων PI4 κινασών και της κινάσης της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (myosin light chain kinase, MLCK) (24, 25). Ακόμη, έχει αναφερθεί η αναστολή από τη Wortmannin των μονοπατιών των polo-like κινασών. Η συγκέντρωση (IC₅₀) στην οποία προκαλεί αναστολή του μονοπατιού της PI3K είναι περίπου 5 nM (26). Από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Φυσιολογίας σε καλλιέργειες ΛΜΚ

αεραγωγών έχει βρεθεί ότι η Wortmannin αναστέλλει πλήρως το μονοπάτι της PI3K σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 500nM.

Ένας άλλος αναστολέας με υψηλή ειδικότητα για το μονοπάτι της PI3K είναι και το LY294002 (C₁₉H₁₇NO₃). Εμποδίζει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της Akt πρωτεΐνης του μονοπατιού, ενώ η συγκέντρωση στην οποία εκμηδενίζει την δραστικότητα των κινασών της PI3K είναι 50 μM. Πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Φυσιολογίας σε καλλιέργειες ΛΜΚ αεραγωγών έδειξαν ότι η συγκέντρωση 20μM, είναι αρκετή για να υπάρχει αναστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K. Το LY294002, παρόλο που έχει δράση παρόμοια με της Wortmannin, προτιμάται σε πειράματα που μελετούν την ενεργοποίηση μόνο του μονοπατιού της PI3K, γιατί σε αντίθεση με τη Wortmannin δεν αναστέλλει άλλα λιπίδια και πρωτεϊνικές κινάσες, όπως την PI4K, την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) ή την c-Src (27).

2.1.2 Μονοπάτι των MAP κινασών

Ένα άλλο βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ είναι το μονοπάτι των MAP κινασών. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται όταν τα κύτταρα αναγνωρίζουν εξωγενή ερεθίσματα και ανταποκρίνονται σε αυτά. Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα [Mitogen-activated protein (MAP) kinases] είναι ειδικές πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης /θρεονίνης, οι οποίες ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, που δρουν ως μιτογόνα. Οι MAPK ρυθμίζουν κυτταρικές δραστηριότητες, όπως την έκφραση γονιδίων, τη μίτωση, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση ή τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων (28, 29, 30). Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί έξι διαφορετικές ομάδες MAP κινασών σε κύτταρα θηλαστικών:

1. Οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια μηνύματα (extracellular signal-regulated kinases, ERK1, ERK2). Οι συγκεκριμένες κινάσες είναι γνωστές και ως κλασικές MAP κινάσες, βασικό μέλος τους είναι η p42/44 και το μονοπάτι τους ενεργοποιείται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και σε εστέρες (που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ογκογένεσης). Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων (31, 32).

2. Οι c-Jun N-terminal κινάσες (JNKs), που αλλιώς χαρακτηρίζονται ως MAPK8, MAPK9, MAPK10 και ανήκουν στο μονοπάτι που ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες του κυττάρου (33).
3. Οι κινάσες p38, που εμφανίζονται σε τέσσερις ισομορφές: α) p38-α ή MAPK14, β) p38-β ή MAPK11, γ) p38-γ ή MAPK12 ή ERK6 και δ) p38-δ ή MAPK13 ή SAPK4 (34). Το σηματοδοτικό μονοπάτι αυτών των κινασών ενεργοποιείται, όπως και το μονοπάτι των JNK, ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως είναι οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η υψηλή θερμοκρασία και το ωσμωτικό σοκ. Και τα δύο μονοπάτια συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον αποπτωτικό θάνατο (35). Η ενεργοποίηση των p38 είναι απαραίτητη για μια φυσιολογική ανοσολογική και φλεγμονώδη απόκριση του κυττάρου, καθώς εμφανίζεται σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα και T λεμφοκύτταρα ως απόκριση σε ένα πλήθος εξωκυττάρων φλεγμονωδών παραγόντων, όπως χυμοκίνες, κυτταροκίνες και βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (36). Το μονοπάτι των p38 MAP κινασών ελέγχει την έκφραση κυτταροκινών, μεταγραφικών παραγόντων και υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας (37).
4. Οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια μηνύματα 5 (extracellular signal-regulated kinases, ERK5 ή MAPK7), αποτελούν μια από τις νεότερες κατηγορίες των MAP κινασών και ενεργοποιούνται τόσο από αυξητικούς παράγοντες όσο και από στρεσογόνα ερεθίσματα. Συμμετέχουν στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.
5. Οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια μηνύματα 3, 4 (extracellular signal-regulated kinases, ERK3 ή MAPK6 και ERK4 ή MAPK4), οι οποίες διαφέρουν ελαφρώς στη δομή από τις κλασικές MAP κινάσες. Οι κινάσες αυτές είναι κυρίως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, που συνδεούνται με άλλα μόρια κινασών μετακινούνται στον πυρήνα και επάγουν την έκφραση γονιδίων (38).
6. Τέλος, οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια μηνύματα 7, 8 (extracellular signal-regulated kinases, ERK7 και ERK8 ή MAPK15). Αυτές αποτελούν το νεότερο μέλος των MAP κινασών και συμπεριφέρονται όπως οι κλασικές MAPK. Δομικά ομοιάζουν με τις ERK3/4 (38).

Από τις παραπάνω κινάσες του ευρύτερου μονοπατιού των MAP κινασών, οι τρεις πρώτες κατηγορίες είναι οι πιο καλά μελετημένες. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών στο σύνολο του, καθώς και η επιμέρους ενεργοποίηση των κινασών p42/44 και p38. Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται ως απόκριση σε μιτογόνα και στρεσογόνα ερεθίσματα αντίστοιχα.

2.1.2.1 Αναστολείς του μονοπατιού των MAP κινασών

Το PD98059 (2'-amino-3'methoxyflavone), είναι ένας γενικός αναστολέας του μονοπατιού των MAP κινασών. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ενεργοποίηση κυρίως των κλασικών MAP κινασών, δηλαδή των ERK1 και 2, οι οποίες ενεργοποιούνται ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες (39, 40). Ο αναστολέας αυτός συνδέεται στην μη φωσφορυλιωμένη ανενεργή μορφή της κινάσης και παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωσή της. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι συγκεντρώσεις του PD98059 στις οποίες εμφανίζεται ενεργότητα κυμαίνονται μεταξύ 2 και 50μΜ, ανάλογα με το ποιες κινάσες του μονοπατιού μας ενδιαφέρει να ανασταλούν. Ωστόσο από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Φυσιολογίας σε καλλιέργειες ΛΜΚ αεραγωγών βρέθηκε ότι πλήρης αναστολή του μονοπατιού των MAP κινασών επιτυγχάνεται από υψηλότερες συγκεντρώσεις του αναστολέα της τάξης των 100μΜ. Το PD98059 εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση, ως προς τα μονοπάτια των ERK1 και 2 MAP κινασών που αναστέλλει. Δεν μπορεί να επηρεάσει το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών που ενεργοποιείται από στρεσογόνα ερεθίσματα ή φλεγμονώδεις παράγοντες, παράγοντες που ενεργοποιούν κυρίως το μονοπάτι των p38 MAP κινασών (41). Επομένως, το PD98059 αποτελεί αναστολέα του μονοπατιού των MAP κινασών που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Τα κύτταρα ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια ως απόκριση σε ερεθίσματα που δέχονται από το εξωτερικό τους περιβάλλον. Η φύση και ο τρόπος δράσης αυτών των ερεθισμάτων ποικίλει, αλλά σχεδόν όλα δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς των κυττάρων προκειμένου να επηρεάσουν τις λειτουργίες τους. Τα ερεθίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες :

- ❖ Ερεθίσματα που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αεραγωγών, και
- ❖ Ερεθίσματα που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι γεννητικές ορμόνες, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές, οι φλεγμονώδεις και οι αυξητικοί παράγοντες, ενώ στη δεύτερη το αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη. Οι παράγοντες αυτοί επιλεχθήκαν λόγω της ιδιαίτερης σχέσης τους με την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών που παρατηρείται σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος.

3. Γεννητικές ορμόνες

Οι γεννητικές ορμόνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του οργανισμού, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Συμμετέχουν στον καθορισμό της σωματικής διάπλασης, της νοητικής ικανότητας και της ψυχολογικής ταυτότητας των δύο φύλων. Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει όργανο, σύστημα ή λειτουργία του ανθρώπου που να μην επηρεάζεται από τις ορμόνες του φύλου, καθώς κάθε σύστημα ή λειτουργία σχετίζεται με το γεννητικό σύστημα (1). Οι γεννητικές ορμόνες εμπλέκονται σε μια πληθώρα φυσιολογικών αποκρίσεων και η δράση τους φαίνεται να μεσολαβείται είτε μέσω ενεργοποίησης γονιδίων-στόχων (γενωμική δράση), είτε μέσω απευθείας ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών (μη γενωμική δράση).

Η κλασσική δράση των γεννητικών ορμονών (γενωμική δράση) περιλαμβάνει την δέσμευση τους σε ενδοκυττάρια υποδοχείς, την μετακίνησή τους στον πυρήνα και τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές αποκρίσεις. Οι δράσεις αυτές χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη ευαισθησία σε ανταγωνιστές της μεταγραφής και μετάφρασης όπως στην ακτινομυκίνη D και κυκλοεξαμίδη. Η δράση των γεννητικών ορμονών μέσω των κλασσικών τους υποδοχέων εμφανίζεται με χρονική υστέρηση καθώς προϋποθέτει την επαγωγή γονιδίων (42).

Τα χαρακτηριστικά των γενωμικών δράσεων είναι:

- Προκαλούνται μέσω σύνδεσης των γεννητικών ορμονών σε κλασσικούς υποδοχείς.
- Πραγματοποιούνται με την μετακίνηση υποδοχέα-ορμόνης στον κυτταρικό πυρήνα
- Παρουσιάζουν χρονική υστέρηση γιατί απαιτούν την σύνθεση RNA και πρωτεϊνών
- Αναστέλλονται παρουσία αναστολέων RNA και/ή πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Εκτός όμως από την κλασσική δράση των γεννητικών ορμονών μέσω υποδοχέων περιγράφεται και η μη γενωμική τους δράση. Ως μη γενωμική ορίζεται κάθε δράση η οποία δεν επηρεάζει άμεσα την έκφραση γονιδίων. Η μη γενωμική δράση προκαλεί άμεσα και γρήγορα αποτελέσματα, όπως την ενεργοποίηση καταρράκτη σημάτων. Καταρράκτες σημάτων περιλαμβάνουν την είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο, την αύξηση του cAMP, την ενεργοποίηση των MAP κινασών και άλλους κλασσικούς δεύτερους αγγελιοφόρους (43, 44). Η ενεργοποίηση αυτών των καταρρακτών μπορεί να επηρεάζει το γονιδίωμα μέσω ρύθμισης της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, όπως η πρωτεϊνικές κινάσες A και C (44).

Τα χαρακτηριστικά των μη γενωμικών δράσεων είναι:

- Είναι πολύ γρήγορες
- Δεν προκαλούν άμεσα τη σύνθεση RNA και πρωτεϊνών
- Συμβαίνουν παρουσία αναστολέων RNA και/ή πρωτεϊνικής σύνθεσης.
- Συμβαίνουν όταν γίνεται χρήση στεροειδών ορμονών συνδεδεμένων με μόρια που αδυνατούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη (όπως τεστοστερόνη συνδεδεμένη με αλβουμίνη).
- Παρατηρούνται σε κύτταρα χωρίς πυρήνα, πχ ερυθροκύτταρα.
- Προκαλούνται από στεροειδείς ορμόνες μέσω σύνδεσης σε υποδοχείς που αδυνατούν να ενεργοποιήσουν μεταγραφικές διαδικασίες. Τέτοιοι είναι υποδοχείς που διαθέτουν μεταλλάξεις, οι οποίες προκαλούν αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία τους.

Οι υποδοχείς με τους οποίους συνδέονται οι γεννητικές ορμόνες προκειμένου να μεσολαβήσουν τη γενωμική τους δράση, διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, στους υποδοχείς ανδρογόνων (androgen receptors, AR) και τους υποδοχείς οιστρογόνων (estrogen receptors, ER).

3.1 Υποδοχείς ανδρογόνων

Ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) αποτελεί τύπο πυρηνικού υποδοχέα (NR3C4, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) (45) και ενεργοποιείται από τη σύνδεση σε αυτόν των ανδρογόνων, τεστοστερόνη ή διϋδροτεστοστερόνη (46). Υπάρχουν δύο τύποι του υποδοχέα ο AR-A και ο AR-B, οι οποίοι είναι εξίσου

λειτουργικοί και παρουσιάζουν μικρές δομικές διαφορές μεταξύ τους (47). Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους η τεστοστερόνη συνδέεται απευθείας στον υποδοχέα των ανδρογόνων, ενώ σε άλλους προκειμένου να συνδεθεί στον υποδοχέα χρειάζεται να μετατραπεί σε διϋδροτεστοστερόνη (48).

Ο κύριος τρόπος δράσης των ανδρογόνων μετά την σύνδεση τους στον υποδοχέα τους είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων (49). Ειδικότερα, η σύνδεση του ανδρογόνου στον υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα, η οποία οδηγεί σε μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και διμερίζεται. Στη συνέχεια, το διμερές του υποδοχέα δεσμεύεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA, η οποία είναι γνωστή ως στοιχείο ορμονικής απόκρισης (hormone response element). Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων των ανδρογόνων με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων (50). Στις μη γενωμικές δράσεις των ανδρογόνων δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του υποδοχέα των ανδρογόνων με το DNA του κυττάρου. Ο μεμβρανικός υποδοχέας αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος στο κυτταρόπλασμα και η σύνδεση του ανδρογόνου σε αυτόν οδηγεί σε γρήγορες αλλαγές της κυτταρικής λειτουργίας ανεξάρτητες της γονιδιακής μεταγραφής, όπως για παράδειγμα αλλαγές στη διακίνηση ιόντων. Η ρύθμιση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε έμμεσες αλλαγές της μεταγραφής γονιδίων, όπως στην φωσφορυλίωση άλλων μεταγραφικών παραγόντων αλλά και στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά των MAP κινασών και της PI3 κινάσης (51, 52, 53).

3.2 Υποδοχείς οιστρογόνων

Ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER) ανήκει σε μια ομάδα υποδοχέων που ενεργοποιούνται από την 17β-οιστραδιόλη. Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων οιστρογόνων: 1) ο υποδοχέας που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών ενδοκυττάρων υποδοχέων που συνδέονται με ορμόνες (estrogen receptor, ER). Ο υποδοχέας αυτός εμφανίζει δύο ισομορφές τον ER-α και τον ER-β οι οποίες εμφανίζονται σε διαφορετικές αναλογίες στους ιστούς (πχ στον πνεύμονα υπάρχει μόνο η ισομορφή ER- β), και 2) ο υποδοχέας οιστρογόνων που συνδέεται με G-πρωτεΐνες (estrogen G protein coupled receptor GPR30 ή GPER) και βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (54). Οι υποδοχείς των οιστρογόνων μπορεί να

αποτελούν μεταγραφικό παράγοντα που συνδέεται στο DNA και ελέγχει την έκφραση γονιδίων (γενωμική δράση), ή μπορεί να μεσολαβούν λειτουργίες ανεξάρτητες της πρόσδεσης τους στο DNA (μη γενωμική δράση) (55).

Όσον αφορά τη γενωμική δράση των οιστρογόνων, ο υποδοχέας τους, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (αν και θραύσματα του έχουν βρεθεί στον πυρήνα των κυττάρων) (56), μετά την σύνδεσή του με την ορμόνη, σχηματίζει διμερή, τα οποία μπορεί να είναι ομο- ή ετερο-διμερή των δύο ισομορφών του (57). Τα διμερή αυτά μετακινούνται στον πυρήνα και συνδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, οι οποίες είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται, ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, ή ακόμα αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα και το ίδιο. Η μη γενωμική δράση μεσολαβείται με τη σύνδεση των οιστρογόνων στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (58, 59). Η σύνδεση αυτή προκαλεί ενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνών, όπως της καλβεολίνης-1, διάφορων G πρωτεϊνών, υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης (RTKs) ή άλλων υποδοχέων (πχ. Src) (55, 58). Η οιστραδιόλη έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί και υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPR30), όπως έχει προαναφερθεί (60), χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ο ρόλος και η θέση αυτού του υποδοχέα (61). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες οδηγεί σε άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} στο κύτταρο και απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου (62). Τόσο η γενωμική όσο και η μη γενωμική δράση των υποδοχέων των οιστρογόνων προκαλεί την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι των MAP κινασών και της PI3K (63).

3.3 Υποδοχείς ορμονών στα ΛΜΚ αεραγωγών

Τα ΛΜΚ αεραγωγών εκφράζουν διάφορους τύπους υποδοχέων των γεννητικών ορμονών. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί τόσο υποδοχείς ανδρογόνων (64) όσο και υποδοχείς οιστρογόνων (54). Παρόλο όμως που οι γεννητικές ορμόνες εμφανίζουν διαφορετική κατανομή στα δύο φύλα, αλλά και διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου (1) δεν έχουν εντοπιστεί διαφορές σε σχέση με το φύλο στην έκφραση των υποδοχέων στα ΛΜΚ του αναπνευστικού. Ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης και η βαρύτητα διάφορων παθήσεων του αναπνευστικού εμφανίζουν διακυμάνσεις σε άτομα διαφορετικού φύλου (65, 66, 67). Ανάμεσα στις παθήσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται και χρόνιες νόσοι του αναπνευστικού, με κυριότερο το άσθμα (68, 69, 70).

3.4 Τεστοστερόνη

Η τεστοστερόνη αποτελεί την κύρια ορμόνη του άνδρα και οι δράσεις της μπορούν να διακριθούν σε δράσεις κατά το στάδιο της εμβρυικής ζωής και μετά τη γέννηση του ατόμου.

Δράση της τεστοστερόνης κατά την εμβρυική ζωή: Η τεστοστερόνη αρχίζει να παράγεται από τους όρχεις του αρσενικού εμβρύου κατά την 7^η εβδομάδα της κύησης και είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη των γενετικών οργάνων του άρρενος.

Δράση της τεστοστερόνης μετά την γέννηση: Η τεστοστερόνη οδηγεί στην ανάπτυξη των πρωτευνόντων και δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου του άρρενος. Ακόμη, προκαλεί αύξηση της μυϊκής μάζας των ανδρών κατά 50% περίπου περισσότερο σε σχέση με τη γυναίκα. Συμμετέχει στην αύξηση οστών, λόγω της γενικής αναβολικής της δράσης στις πρωτεΐνες του σώματος. Με τη δράση της στην κατακράτηση ασβεστίου προκαλεί αύξηση της ολικής οργανικής ουσίας των οστών, αυξάνοντας έτσι το μέγεθος και την αντοχή τους. Επίσης, εξασκεί ειδική δράση στην πύελο όπου προκαλεί στένωση του κάτω στομίου της, επιμήκυνση και διαμόρφωση της πυέλου σε χωνοειδή μορφή σε αντίθεση με την ωοειδή μορφή της γυναικείας πυέλου. Όσον αφορά τη λειτουργία των κυττάρων γενικότερα, η τεστοστερόνη αυξάνει τον βασικό μεταβολισμό, προάγοντας τελικά την αύξηση της δραστηριότητας όλων των κυττάρων του σώματος. Τέλος, προκαλεί αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων, καθώς στον μέσο άνδρα, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων είναι περίπου κατά 700.000 ανά mm³ μεγαλύτερος σε σχέση με τη μέση γυναίκα.

3.5 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα, με κυριότερο αντιπρόσωπο την οιστραδιόλη, εκκρίνονται σε ελάχιστα ποσά κατά την παιδική ηλικία, ενώ κατά την ήβη, το ποσό τους γίνεται 20πλάσιο ή και περισσότερο, καθώς οι γοναδοτροπίνες της υπόφυσης προκαλούν την αυξημένη τους έκκριση. Τα γεννητικά όργανα των θήλεων μεταβάλλονται με την ηλικία, καθώς αυξάνουν σε μέγεθος και αλλάζει η μορφή των επιθηλίων τους. Τα οιστρογόνα προκαλούν αναστολή της αύξησης του σώματος στις γυναίκες, πολύ νωρίτερα από τους άντρες. Ακόμη, αυξάνουν τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών και επιταχύνουν τη σύνδεση των επιφύσεων με τις διαφύσεις των αυλοειδών οστών. Εμφανίζουν ακόμη δράσεις παρόμοιες με την τεστοστερόνη, σε πολύ μικρότερη όμως

ένταση. Δηλαδή, τα οιστρογόνα προκαλούν ελαφρά αύξηση στο ολικό ποσό των πρωτεϊνών του σώματος και του μεταβολισμού, ενώ δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την κατανομή του τριχώματος. Επιπλέον, αποτέλεσμα της δράσης των οιστρογόνων είναι η εναπόθεση αυξημένης ποσότητας λίπους στον υποδόριο ιστό, αλλά και στους μηρούς και γλουτούς, η αυξημένη αγγείωση και η μαλακή υφή του δέρματος και η κατακράτηση νατρίου και νερού από τα ουροφόρα σωληνάρια των νεφρών.

Η ποσότητα των οιστρογόνων μέσα στο σώμα των γυναικών μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου. Ωστόσο, μετά την εμμηνόπαυση η παραγωγή τους σταματά. Η ελάττωση αυτή προκαλεί διάφορα προβλήματα, όπως οστεοπόρωση, λόγω μειωμένης δραστηριότητας των οστεοβλαστών, ελάττωσης του οργανικού υποστρώματος των οστών και ελατωμένης εναπόθεσης ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων στα οστά, αλλά και επιδείνωση παθολογικών καταστάσεων, όπως το άσθμα (71, 72).

3.6 Γεννητικές ορμόνες στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία νόσων του αναπνευστικού.

Οι γεννητικές ορμόνες επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη γιατί αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα με πολύπλοκη δράση στο αναπνευστικό σύστημα. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι γεννητικές ορμόνες επηρεάζουν την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών σε παράγοντες που προκαλούν σύσπαση. Η τεστοστερόνη έχει βρεθεί ότι προκαλεί χάλαση των αεραγωγών που βρίσκονται σε σύσπαση με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη μέσω απελευθέρωσης μονοξειδίου του αζώτου από το επιθήλιο των αεραγωγών (64, 73). Τα οιστρογόνα επηρεάζουν την απόκριση των αεραγωγών σε ερεθίσματα, καθώς μειώνουν την ανταποκρισιμότητα σε αλλεργιογόνα, αλλά και ελαττώνουν την προκαλούμενη από ακετυλοχολίνη σύσπαση (74, 75, 76).

Σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού εμφανίζεται διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο φύλα όσον αφορά στη συχνότητα αλλά και στη βαρύτητα της νόσου. Συγκεκριμένα, μελέτες δείχνουν ότι το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας εμφανίζεται συχνότερα στα νεογέννητα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια (75). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον εντοπισμό με ανοσοϊστοχημεία υψηλότερων επιπέδων υποδοχέων ανδρογόνων σε εμβρυϊκό πνεύμονα αγοριών σε σύγκριση με τον ενήλικο πνεύμονα, αποτελεί μια ένδειξη ότι τα ανδρογόνα μπορεί να καθυστερούν

την ανάπτυξη του εμβρυϊκού πνεύμονα. Επίσης, έρευνες δείχνουν ότι το βρογχικό άσθμα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα αγόρια (76), ενώ η συχνότητα του άσθματος αυξάνει στο γυναικείο φύλο κατά την αναπαραγωγική ηλικία (77). Η συχνότητα και η βαρύτητα των ασθματικών κρίσεων εμφανίζει διαφορές κατά τη διάρκεια των φάσεων του εμμηνου κύκλου στις γυναίκες (78, 79), αλλά και μετά την εμμηνόπαυση (80, 81).

Επιπλέον, σε διάφορες παθήσεις του αναπνευστικού οι ασθενείς παρουσιάζουν τροποποίηση των ορμονικών επιπέδων. Σε αυτές τις περιπτώσεις ανήκουν η αναπνευστική ανεπάρκεια, η πνευμονική ίνωση και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, στις οποίες τα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό των ασθενών έχουν βρεθεί μειωμένα (82, 83, 84, 85). Όσον αφορά τη ΧΑΠ, υπάρχει η πεποίθηση ότι εμφανίζεται πιο συχνά στους άντρες παρά στις γυναίκες, λόγω της υψηλότερης συχνότητας της καπνιστικής συνήθειας σε αυτούς αλλά και λόγω της έκθεσής τους σε προϊόντα του καπνού κατά την εργασία τους. Ωστόσο, οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς στη ΧΑΠ που σχετίζεται με το κάπνισμα σε σχέση με τους άντρες. Στις γυναίκες είναι πιο αυξημένος ο ρυθμός επιδείνωσης της πνευμονικής λειτουργίας που σχετίζεται με την ΧΑΠ, αλλά και τα επίπεδα θνησιμότητας (86, 87, 88, 89, 90, 91). Τέλος, έχει παρατηρηθεί διαφορά στην επιβίωση ατόμων διαφορετικού φύλου που πάσχουν από κυστική ίνωση. Συγκεκριμένα, στις γυναίκες τόσο η πνευμονική λειτουργία όσο και η πιθανότητα επιβίωσης ήταν μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη των ανδρών ασθενών (91, 92, 93, 94).

Είναι επομένως αναγκαίο να γίνει απόλυτη διερεύνηση του ρόλου και του μηχανισμού δράσης των γεννητικών ορμονών στη λειτουργία αλλά και στην παθοφυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος.

4. Μουσκαρινικοί υποδοχείς

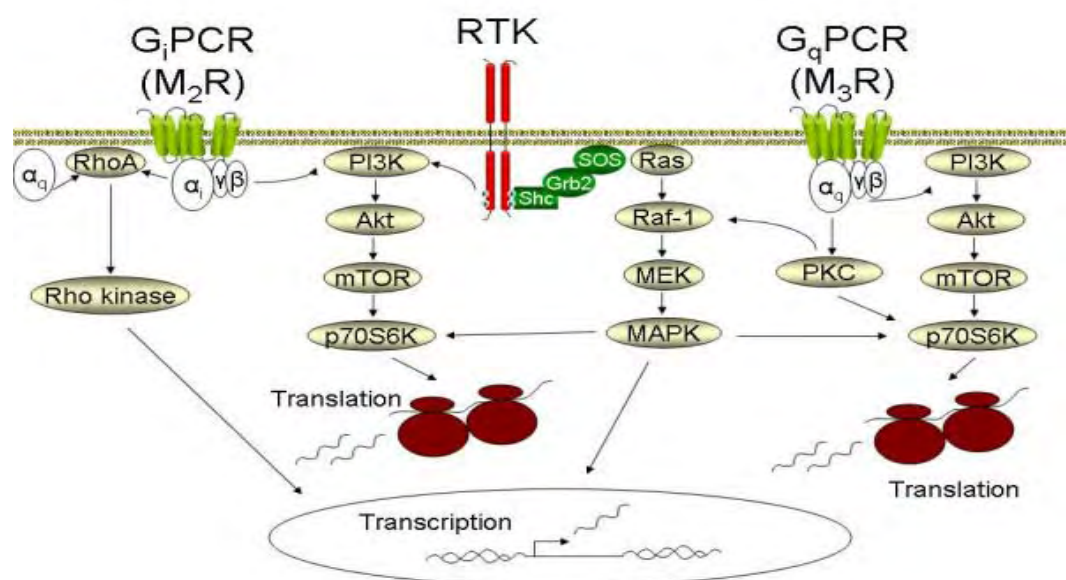
Μια ακόμη κατηγορία υποδοχέων που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών των ΛΜΚ είναι οι μουσκαρινικοί υποδοχείς. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς αποτελούν μια ομάδα υποδοχέων στους οποίους συνδέονται οι μουσκαρινικοί αγωνιστές ακετυλοχολίνη, καρβαχόλη και μεταχολίνη. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G- πρωτεΐνες και έχουν ταυτοποιηθεί 5 διαφορετικοί τύποι υποδοχέων: M1, M2, M3, M4 και M5. Το είδος και η αναλογία των τύπων των υποδοχέων ποικίλει ανάλογα με το είδος του

οργανισμού, τον ιστό και την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Έτσι, οι M2, M3 και M4 υποδοχείς βρίσκονται σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, ενώ ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου εκφράζουν μόνο τους M2 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς (95).

Ο M1 υποδοχέας εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε εξωκρινείς αδένες (96, 97). Συνδέεται με την Gq πρωτεΐνη (98), η οποία συμμετέχει σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και του μονοπατιού της PI3K. Ωστόσο, σε ορισμένους ιστούς, όπως εξωκρινείς αδένες, ο M1 υποδοχέας μπορεί να βρεθεί συνδεδεμένος με την Gi (inhibitory) ή την Gs (stimulatory) πρωτεΐνη, προκαλώντας την τροποποίηση των επιπέδων του cAMP. Οι M2 υποδοχείς συνδέονται με την Gi πρωτεΐνη, η οποία ανταγωνίζεται τη δράση της Gs πρωτεΐνης, ενώ οι M3 υποδοχείς συνδέονται με την Gq πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια παρόμοια με αυτά των M1 υποδοχέων. Οι M3 μουσκαρινικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε διάφορα όργανα του σώματος, αλλά κυρίως σε λείους μυς και αδένες. Στο αναπνευστικό σύστημα, οι M2 υποδοχείς υπάρχουν προσυναπτικά στις παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες, όπου ελέγχουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, ενώ οι M3 εντοπίζονται κυρίως μετασυναπτικά στο ΛΜΚ (99). Οι M4 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συνδέονται με Gi πρωτεΐνη. Οι M5, παρόλο που η ακριβής θέση τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί μοιάζουν λειτουργικά με τους M1 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς. Στο αναπνευστικό σύστημα έχουν βρεθεί M2 και M3 υποδοχείς σε λείους μυς αεραγωγών, αλλά και M4 υποδοχείς στο τοίχωμα κυψελίδων κουνελιού αλλά όχι σε άλλα είδη (95) (Πίνακας 2).

Η σύνδεση μουσκαρινικών αγωνιστών στους M2 ή M3 κυρίως υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών και σε ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP κινασών και της PI3K (100). Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών έχει ως αποτέλεσμα την αντιγραφή του DNA, τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς έχει βρεθεί ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλα είδη υποδοχέων που υπάρχουν στα κύτταρα, όπως τους υποδοχείς της κινάσης τυροσίνης (RTKs) ή με τους υποδοχείς των κυτταροκινών (100). Το γεγονός αυτό καθιστά τον ρόλο αυτών των υποδοχέων ακόμη πιο πολύπλοκο (Εικόνα 3).

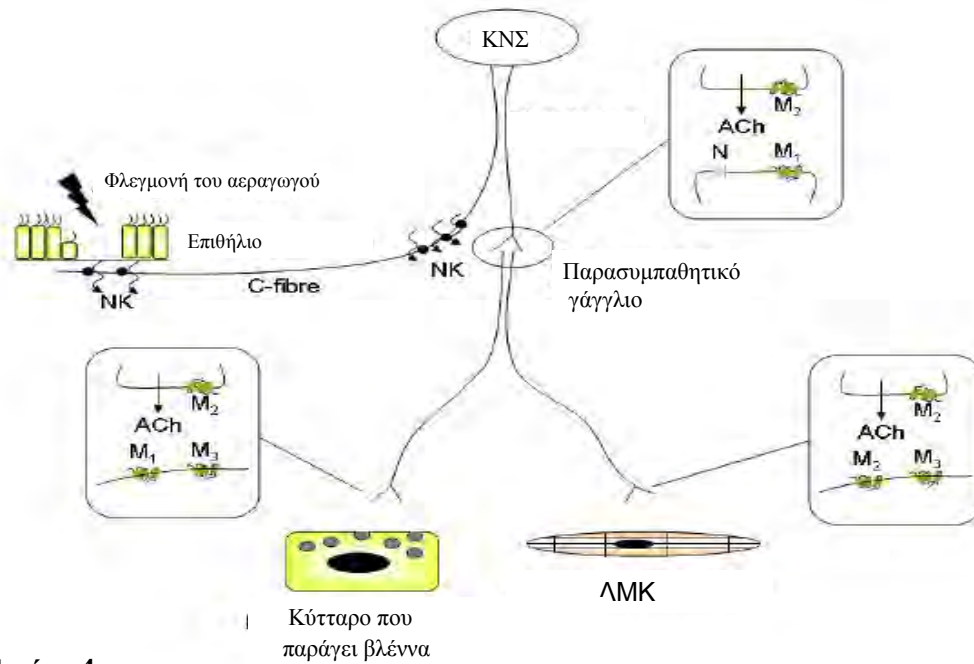
Σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος έχουν βρεθεί διαφοροποιήσεις ως προς την ποσότητα και τη λειτουργία των υποδοχέων αυτών. Έτσι, σε ανθρώπους με ήπιο άσθμα έχουν παρατηρηθεί δυσλειτουργικοί μουσκαρινικοί υποδοχείς (101), ενώ έχει βρεθεί ότι στο άσθμα και τη ΧΑΠ παρατηρείται αυξημένη ποσότητα του μουσκαρινικού αγωνιστή ακετυλοχολίνη (102). Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη απελευθέρωσή της λόγω ενεργοποίησης αντακλαστικών από τη φλεγμονή που υπάρχει στις παθήσεις αυτές (Εικόνα 4). Ένας ακόμα πιθανός λόγος της αυξημένης ποσότητας ακετυλοχολίνης είναι η ελάττωση της έκφρασης και της λειτουργίας των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων που υπάρχουν προσυναπτικά και ρυθμίζουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή (Εικόνα 5).



Εικόνα 3.

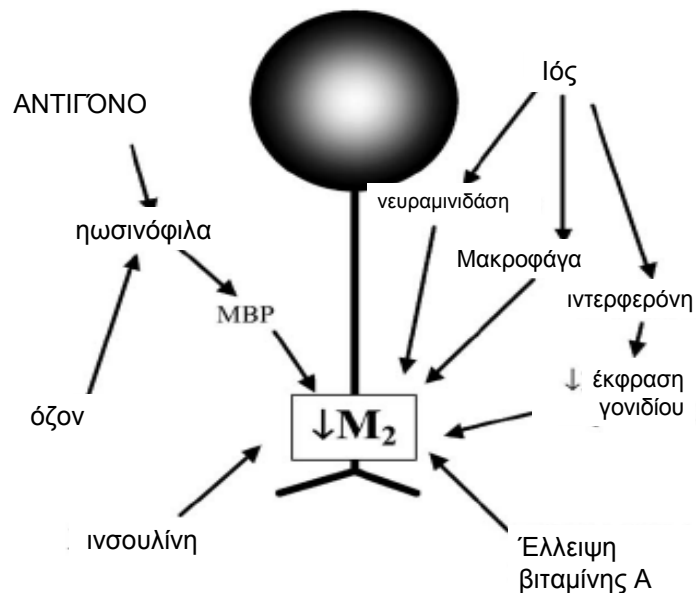
Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους μουσκαρινικούς υποδοχείς και από τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs).

Εικόνα από τους *Gosens et al 2007*, προσαρμοσμένη.



Εικόνα 4.

Δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.
Εικόνα από τους *Gosens et al 2007* προσαρμοσμένη.



Εικόνα 5.

Ρύθμιση της έκφρασης των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων.
Εικόνα από τους *Coulson and Fryer 2003* προσαρμοσμένη.

Πίνακας 2. Τύποι και δράση των μουσκαρινικών υποδοχέων

Τύπος	Λειτουργία	Δράση	Αγωνιστές
M1	-Ρύθμιση μετασυναπτικού δυναμικού διέγερσης (EPSP)σε αυτόνομα γάγγλια -Έκκριση αδένων -Δράση στο ΚΝΣ	-G _q -(G _i) -(G _s) -αργό EPSP. -↓ K ⁺ αγωγιμότητα	ακετυλοχολίνη οξοτρεμορίνη μουσκαρίνη καρβαχόλη
M2	-χαμηλός καρδιακός ρυθμός -ελάττωση δυνάμεων συστολής στους κόλπους της καρδιάς -δράση στο ΚΝΣ	-G _i -↑ K ⁺ αγωγιμότητα -↓ Ca ²⁺ αγωγιμότητα	ακετυλοχολίνη οξοτρεμορίνη μουσκαρίνη καρβαχόλη μεθαχολίνη
M3	- σύσπαση λείων μυών -αύξηση ενδοκυττάριου ασβεστίου στο αγγειακό ενδοθήλιο -αγγειοδιαστολή - αυξημένη έκκριση αδένων -δράση στο ΚΝΣ	-G _q	ακετυλοχολίνη οξοτρεμορίνη πιλοκαρπίνη καρβαχόλη
M4	- ενίσχυση διακίνησης μηνυμάτων - δράση στο ΚΝΣ	-G _i -↑ K ⁺ αγωγιμότητα -↓ Ca ²⁺ αγωγιμότητα	ακετυλοχολίνη οξοτρεμορίνη καρβαχόλη
M5	- δράση στο ΚΝΣ	-G _q	ακετυλοχολίνη καρβαχόλη

4.1 Μουσκαρινικοί αγωνιστές

Στους μουσκαρινικούς υποδοχείς συνδέονται οι μουσκαρινικοί αγωνιστές με κυριότερους την ακετυλοχολίνη και την καρβαχόλη. Η ακετυλοχολίνη αποτελεί νευροδιαβιβαστή τόσο του περιφερικού όσο και του κεντρικού νευρικού συστήματος σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Στο αναπνευστικό σύστημα αποτελεί τον ενδογενή νευροδιαβιβαστή, που απελευθερώνεται από το παρασυμπαθητικό σύστημα και δρα στις λείες μυϊκές ίνες προκαλώντας τη σύσπασή τους. Η καρβαχόλη από την άλλη είναι μια χημική ουσία που ομοιάζει με την ακετυλοχολίνη ως προς τους υποδοχείς στους οποίους δεσμεύεται, αλλά και ως προς τις δράσεις της. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο μουσκαρινικών αγωνιστών είναι η ικανότητα της καρβαχόλης να αντιστέκεται στη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο διασπά την ακετυλοχολίνη, συμμετέχοντας στον μεταβολισμό της και ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό την συγκέντρωσή της. Αυτοί οι δύο μουσκαρινικοί αγωνιστές μπορούν να συνδεθούν σε όλους τους τύπους μουσκαρινικών υποδοχέων με την ίδια ευκολία, αλλά και σε νικοτινικούς υποδοχείς. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες μελέτες που δείχνουν διαφορετική συμπεριφορά ανάμεσα στην ακετυλοχολίνη και την καρβαχόλη, κυρίως ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τη σύνδεσή τους στον υποδοχέα (103).

4.2 Αναστολείς των μουσκαρινικών υποδοχέων

Στους μουσκαρινικούς υποδοχείς μπορούν να συνδεθούν ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν τη δέσμευση των μουσκαρινικών αγωνιστών στους υποδοχείς. Η γκαλαμίνη (2,2',2"-[benzene-1,2,3-triyltris(oxy)]tris(*N,N*-diethylethanamine) αποτελεί αλλοστερικό ανταγωνιστή των μουσκαρινικών υποδοχέων. Συνδέεται στους μουσκαρινικούς υποδοχείς, με σειρά ευαισθησίας $M2 > M1$, $M4 > M3$, $M5$ υποδοχείς. Η σύνδεσή της αυτή παρεμποδίζει την σύνδεση της ακετυλοχολίνης στους υποδοχείς και επομένως αναστέλλει τη δράση της (104). Στη συγκέντρωση των 10mM χρησιμοποιείται ως αναστολέας κυρίως των $M2$ υποδοχέων για τους οποίους εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται ως μυοχαλαρωτικό (105), κυρίως κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων. Επιδρά στο πνευμονογαστρικό νεύρο της καρδιάς, προκαλώντας ταχυκαρδία και περιστασιακά υπέρταση, ενώ ελαττώνει την αρνητική χρονοτροπική δράση της ακετυλοχολίνης στην καρδιά (106).

Ένας άλλος αναστολέας των μουσκαρινικών υποδοχέων είναι το τιοτρόπιο. Το τιοτρόπιο ανταγωνίζεται τη δράση των μουσκαρινικών αγωνιστών καθώς δεσμεύεται εξίσου στους M1, M2 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς. Θεωρείται ανταγωνιστής των M1 και M3 υποδοχέων, καθώς η αποδέσμευσή του από αυτούς είναι 100 φορές πιο αργή από ότι στους M2 υποδοχείς (107, 108). Λόγω της μεγάλης διάρκειας της δράσης του και της αντιχολινεργικής του ικανότητας χρησιμοποιείται κλινικά ως βρογχοδιασταλτικό σε ασθενείς που πάσχουν από ΧΑΠ (107, 109, 110). Επιπλέον, το τιοτρόπιο έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών καθώς εμποδίζει την αύξηση της μάζας του λείου μυ τραχείας και την έκφραση της μυοσίνης σε μοντέλα άσθματος σε ινδικά χοιρίδια (111). Σε ινοβλάστες που λήφθηκαν με βιοψία και απομονώθηκαν από πνεύμονες ασθενών που έπασχαν από πνευμονική ίνωση αλλά και σε μυοϊνοβλάστες το τιοτρόπιο ελάττωσε τον επαγόμενο από ακετυλοχολίνη πολλαπλασιασμό (112).

5. Φλεγμονώδεις και αυξητικοί παράγοντες

Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως το άσθμα και τη ΧΑΠ παρατηρείται συχνά αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών. Έχει βρεθεί ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος των αεραγωγών και της φλεγμονής που αναπτύσσεται στους αεραγωγούς (113). Παρόλο που ο παθογενετικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, ο μηχανισμός που προτείνεται είναι ο εξής: είναι πιθανό η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων να οδηγεί στην έκκριση φλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων, σε μια προσπάθεια αποκατάστασης της ακεραιότητας του επιθηλίου. Οι παράγοντες αυτοί που εκκρίνονται οδηγούν τόσο στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης όσο και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ (12) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3.

Παράγοντες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ του αναπνευστικού.

κατηγορία	μιτογόνα	Αντι-μιτογόνα
RTKs	PDGF, IGF-1, bFGF, EGF, NGF, ινσουλίνη	
Υποδοχείς G-πρωτεϊνών	Ισταμίνη, ενδοθηλίνη1, θρομβοξάνη A2, μουςκαρινικοί αγωνιστές, ATP, βραδυκινίνη	Προσταγλαδίνη, β-αδρενεργικοί αγωνιστές
Υποδοχείς κυτταροκινών	IL-1β, TNFα, TGF-β1, IL-6	IL-4, TNFα, TGF-β1, IFNγ , IFNβ

Ως φλεγμονώδης παράγοντας χαρακτηρίζεται αυτός που εκκρίνεται από δομικά κύτταρα, όπως επιθηλιακά κύτταρα ή ΛΜΚ ή από κύτταρα που εξυπηρετούν την άμυνα του οργανισμού, όπως μακροφάγα και ηωσινόφιλα, κατά τη φλεγμονή. Φλεγμονώδεις παράγοντες είναι κυρίως οι κυτταροκίνες και οι χυμοκίνες (114, 115). Η δράση των ουσιών αυτών εξαρτάται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν. Οι κυτταροκίνες μπορούν να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή να ενεργοποιούν μονοπάτια που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο, με κυριότερο το μονοπάτι που ενεργοποιείται κατά την απόπτωση (116). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δράση δύο βασικών παραγόντων της φλεγμονής, της ιντερλευκίνης- 1β (IL- 1β) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (Tumor necrosis factor α, TNF α), καθώς οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ (Πίνακας 3).

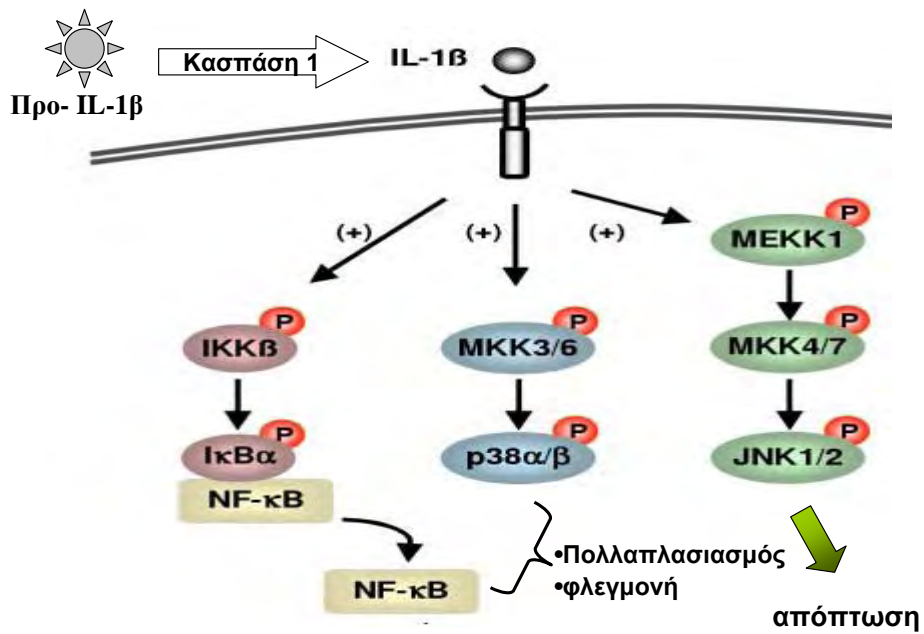
Στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών εμπλέκονται επίσης και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor, PDGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας που ομοιάζει με την ινσουλίνη (insulin-like growth factor-1, IGF-1), ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF) και ο βασικός αυξητικός

παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) (117). Οι παράγοντες αυτοί χαρακτηρίζονται ως αυξητικοί γιατί επάγουν τον πολλαπλασιασμό ή την διαφοροποίηση κυττάρων μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών όπως των MAP κινασών και της PI3K (118, 119, 120, 121). Οι παράγοντες αυτοί, όπως και οι κυτταροκίνες που προαναφέρθηκαν, εκκρίνονται από δομικά κύτταρα ή από κύτταρα της φλεγμονής.

5.1 Κυτταροκίνες και υποδοχείς τους

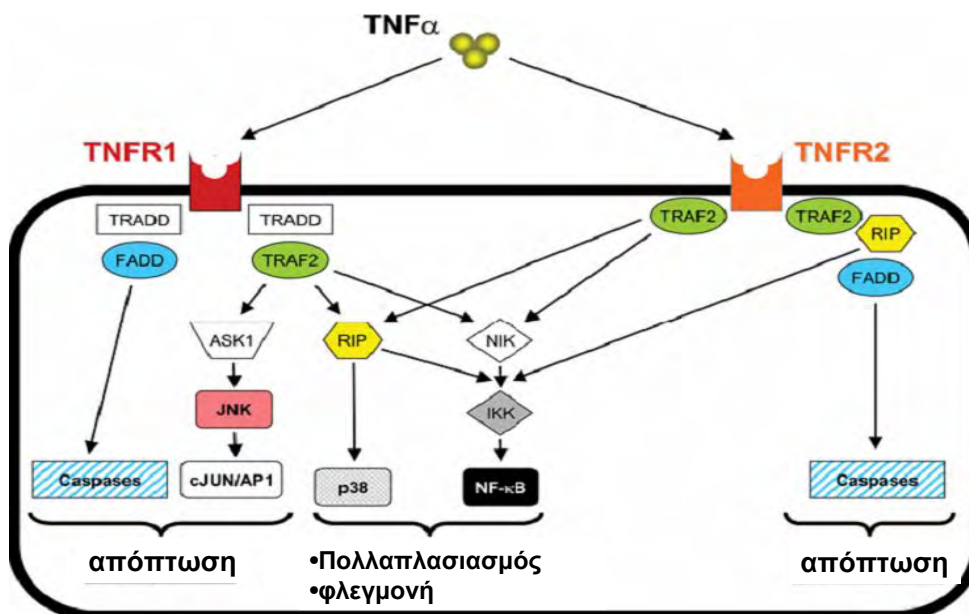
5.1.1 Υποδοχείς κυτταροκινών

Οι κυτταροκίνες δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς αυτοί κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με την στερεοδομή και την κυτταροκίνη που δεσμεύουν. Έτσι υπάρχουν υποδοχείς για ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, χυμοκίνες και για τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων. Οι δύο κυτταροκίνες που μελετήθηκαν, η ιντερλευκίνη-1β και ο TNFα για να επιδράσουν στη λειτουργία των κυττάρων χρειάζεται να συνδεθούν με ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς είναι διαφορετικοί για την καθεμία κυτταροκίνη. Η ιντερλευκίνη-1β συνδέεται σε τους ειδικούς για αυτή υποδοχείς, τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης-1 τύπου I και τύπου II. Ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης-1 τύπου I είναι υπεύθυνος κυρίως για τη μεσολάβηση της φλεγμονώδους δράσης της ιντερλευκίνης, ενώ ο τύπου II μπορεί να δράσει ως καταστολέας της δράσης της ιντερλευκίνης-1 (122, 123) (Εικόνα 6). Ο υποδοχέας του TNFα επίσης εμφανίζεται με δύο μορφές, τον TNF-R1 και τον TNF-R2. Ο TNF-R1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τις δύο μορφές του TNFα, δηλαδή την μορφή του TNFα που συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη ή την τριμερή διαλυτή μορφή. Ο TNF-R2 εντοπίζεται μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά μόνο με την μορφή του TNFα που συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη. Όταν οι υποδοχείς συνδεθούν με την κυτταροκίνη παίρνουν τη μορφή τριμερούς και ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια (124, 125) (Εικόνα 7).



Εικόνα 6.

Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την ιντερλευκίνη 1β (IL-1β)
 Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.biomedcentral.com



Εικόνα 7.

Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον TNFα.
 Εικόνα από τους Russo et al 2005, προσαρμοσμένη.

5.1.2 Κυτταροκίνες

Από τις κυτταροκίνες, η ιντερλευκίνη-1β ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια της ιντερλευκίνης-1, είναι μια από τις πρώτες κυτταροκίνες που ανακαλύφθηκαν και παίζει ρόλο στην εμφάνιση του πυρετού και στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (126). Η κυτταροκίνη αυτή παράγεται από μακροφάγα, μονοκύτταρα, ινοβλάστες και δενδριτικά κύτταρα και αποτελεί σημαντικό τμήμα της φλεγμονώδους απόκρισης σε μολύνσεις. Συγκεκριμένα, αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκειμένου να συμμετέχουν στην κινητοποίηση των λεμφοκυττάρων έναντι των παθογόνων μικροβίων. Επιπλέον, η παραγωγή της ιντερλευκίνης-1β σε περιφερικούς ιστούς έχει συνδεθεί με την υπεραλγησία (αυξημένη ευαισθησία στον πόνο) που σχετίζεται με τον πυρετό (127). Η πρωτεΐνη παράγεται σε μια ανενεργή μορφή (προ-ιντερλευκίνη-1β) η οποία με μεταμεταφραστική τροποποίηση μετατρέπεται στην ενεργή μορφή με τη βοήθεια του ενζύμου κασπάση-1 (Εικόνα 6).

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor necrosis factor α, TNFα), παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα, αλλά και από μια ποικιλία άλλων κυττάρων, όπως τα ενδοθηλιακά, νευρικά, ΛΜΚ και ινοβλάστες. Μεγάλα ποσά TNFα εκκρίνονται ως απόκριση σε λιποπολυσακχαρίτες, ή άλλα βακτηριακά προϊόντα και ως απόκριση στην ιντερλευκίνη-1 (128). Ο TNFα παράγεται κυρίως ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη, οργανωμένη σε σταθερά ομοτριμερή (129, 130), η οποία μετατρέπεται στην διαλυτή μορφή της ομοτριμερούς πρωτεΐνης (sTNF) μέσω δράσης μιας πρωτεολυτικής μεταλλοπρωτεάσης, του ενζύμου που μετατρέπει τον TNFα (TNF alpha converting enzyme, TACE) (131). Η διαλυτή τριμερής μορφή του TNFα σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει την τάση να αποδιοργανώνεται σε μονομερή και να χάνει την δραστηρότητά του. Ο TNFα συνδέεται στον υποδοχέα του και ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επιβίωση του κυττάρου, στον πολλαπλασιασμό του, στην φλεγμονώδη αντίδραση και στην παρεμπόδιση της απόπτωσης. Εναλλακτικά, ο TNFα μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι των MAP κινασών, προκαλώντας μικρή ενεργοποίηση των κλασικών MAP κινασών, μέτρια ενεργοποίηση της p38 MAP κινάσης και ισχυρή ενεργοποίηση του μονοπατιού των JNK κινασών που σχετίζονται με αποκρίσεις σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Τα μονοπάτια αυτά εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό

και είναι γενικά προ-αποπτωτικά. Τέλος, η σύνδεση του TNF α στον υποδοχέα του είναι δυνατόν να προάγει τον κυτταρικό θάνατο, μέσω αποπτωτικών μηχανισμών (124, 125, 132) (Εικόνα 7).

5.2 Αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους

5.2.1 Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων

Οι αυξητικοί παράγοντες δεσμεύονται σε υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης (Receptor tyrosine kinases, RTKs). Έχουν αναγνωριστεί περίπου 20 διαφορετικές κλάσεις RTK, ανάλογα με τον παράγοντα που δεσμεύεται σε αυτούς (133). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν την ικανότητα να αυτοφωσφορυλιώνονται μετά τη σύνδεση του παράγοντα σε αυτούς (134). Η διεργασία αυτή πυρροδοτεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι των MAP κινασών, τόσο τις κλασικές MAP κινάσες, αλλά και την p38 MAP κινάση (135, 136, 137, 138), όπως και το μονοπάτι της PI3K (139, 140, 120, 121). Στην οικογένεια των RTKs δεσμεύονται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, εκ των οποίων μελετήθηκαν οι TGF, bFGF και PDGF, οι οποίοι δεσμεύονται σε διαφορετικούς τύπους υποδοχέων της οικογένειας αυτής. Οι παράγοντες αυτοί επελέγησαν καθώς απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών (Πίνακας 3).

5.2.2 Αυξητικοί παράγοντες

Ο TGF- β είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε τρεις ισομορφές, την TGF- β 1, TGF- β 2 και TGF- β 3. Η ώριμη μορφή του TGF- β προκύπτει μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης μορφής του. Η ώριμη μορφή διμερίζεται προκειμένου να γίνει ενεργή (141). Η δράση του εμφανίζει μεγάλη ποικιλία, καθώς ελέγχει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση, παίζει ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, όπως και στην εκδήλωση διάφορων παθήσεων. Μπορεί όμως να δράσει και ως αναστολέας του πολλαπλασιασμού κυττάρων, αλλά και ως επαγωγέας απόπτωσης. Αυτός ο αυξητικός παράγοντας έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς εμποδίζει τη μετάβαση από την G1 φάση της μίτωσης (142). Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέα για τον TGF, ο υποδοχέας τύπου I και τύπου II. Ο TGF δεσμεύεται στον υποδοχέα τύπου II, ο οποίος

φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I, που με τη σειρά του οδηγεί σε ενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνών σε σηματοδοτικά μονοπάτια (143). Τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στη δράση του TGF εμπλέκονται πολλά μονοπάτια, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθιστώντας την διερεύνηση της επίδρασης του παράγοντα αυτού στα κύτταρα ιδιαίτερα δύσκολη. Για το λόγο αυτό παρατηρούνται αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του TGF στην κυτταρική λειτουργία. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών εξαρτώνται από το είδος των κυττάρων αλλά και από τις συνθήκες της καλλιέργειας.

Ο bFGF ανήκει στη μεγαλύτερη οικογένεια αυξητικών παραγόντων (144). Σε φυσιολογικούς ιστούς εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη και σε συγκεκριμένες περιοχές των αγγείων. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές του υποδοχέα του (fibroblast growth factor receptor, FGFR), οι οποίες μοιάζουν δομικά αλλά διαφέρουν στην ικανότητα πρόσδεσης μορίων (145, 146). Η σύνδεση του bFGF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην αγγειογένεση κατά τη διάρκεια επούλωσης τραυμάτων ή τη δημιουργία όγκων (147, 148). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο bFGF εμποδίζει τη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστοκυττάρων ανθρώπου, παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του παραμένει αδιευκρίνιστος (149).

Τέλος, ο αυξητικός παράγοντας PDGF ανήκει σε μια οικογένεια αυξητικών παραγόντων με 4 διαφορετικά μέλη, PDGF-A, -B, -C και -D. Στις μονομερείς μορφές τους είναι ανενεργοί και ενεργοποιούνται μόνο όταν σχηματίσουν ομο- ή ετεροδιμερή (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Ο PDGF συνδέεται σε RTKs που ονομάζονται PDGF- α και β , και προκειμένου να γίνει η σύνδεση των υποδοχέων με το διμερές του αυξητικού παράγοντα, διμερίζονται και οι υποδοχείς, οδηγώντας στον σχηματισμό 3 πιθανών συνδυασμών υποδοχέων (- $\alpha\alpha$, - $\beta\beta$ και - $\alpha\beta$). Ο α τύπος του υποδοχέα δεσμεύει τις ισομορφές PDGF-AA, PDGF-BB και PDGF-AB, ενώ ο β τύπος τις PDGF-BB και PDGF-AB. Η έκφραση των υποδοχέων και των ισομορφών του αυξητικού παράγοντα είναι ανεξάρτητη μεταξύ τους, οδηγώντας σε ένα πλήθος συνδυασμών και αλληλεπιδράσεων στα κύτταρα στα οποία βρίσκονται και δρουν. Εξάλλου διαφορετικά εξωγενή ερεθίσματα, όπως η φλεγμονή, ή η κυτταρική ανάπτυξη ή η διαφοροποίηση προκαλούν την έκφραση διαφορετικών υποδοχέων PDGF που μεσολαβούν τη δράση διαφορετικών ισομορφών του αυξητικού παράγοντα (150, 151, 152, 153). Η σύνδεση του PDGF στον υποδοχέα και ο διμερισμός του υποδοχέα οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωσή του, που με τη σειρά της

ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι της PI3K. Ο PDGF συμμετέχει με αυτόν τον τρόπο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η ανάπτυξη των κυττάρων. Κυρίως δρα ως μιτογόνο ερέθισμα, καθώς βοηθά το κύτταρο να προχωρήσει πέρα από την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου σε διαίρεση. Ο PDGF έχει συνδεθεί με αγγειογένεση σε παθολογικές καταστάσεις, με κακοήθειες και με ινώσεις (154).

6. Μακρολίδες

Οι μακρολίδες είναι μια οικογένεια αντιβιοτικών που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Οι γνωστότερες και πιο συχνά χορηγούμενες μακρολίδες είναι η ερυθρομυκίνη, η ροξιθρομυκίνη, η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη. Χρησιμοποιούνται ως βακτηριοστατικοί παράγοντες σε διάφορες λοιμώξεις του οργανισμού, καθώς αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση σε βακτήρια (155). Σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού χρησιμοποιούνται λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Έχει βρεθεί ότι οι μακρολίδες αναστέλλουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, καταστέλλοντας κυρίως την απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως ιντερλευκίνη-1β και TNF-α (156, 157). Παράλληλα ελαττώνουν την χρόνια παραγωγή βλέννας στους αεραγωγούς (158, 159). Οι μακρολίδες φαίνεται να παίζουν επιπλέον ρόλο ανεξάρτητα από την βακτηριοστατική ή αντιφλεγμονώδη δράση τους. Συγκεκριμένα η ερυθρομυκίνη επηρεάζει την σύσπαση των λείων μυών του πεπτικού σωλήνα (160, 161, 162), της ουροδόχου κύστης (163) και του μυομητρίου (164, 165, 166). Η επίδραση της ερυθρομυκίνης μεσολαβείται από αλλαγές στην είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο (167, 168). Άλλες μακρολίδες μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία της $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάσης στο σπλαχνικό επιθήλιο (169) και στο συκώτι (170). Η αζιθρομυκίνη προκαλεί χάλαση σε λείες μυικές ίνες τραχείας κουνελιού που βρίσκονται σε σύσπαση με καρβαχόλη ή 80mM KCl (171).

Μελέτες δείχνουν ότι οι μακρολίδες μπορούν να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, όπως τα επιθηλιακά και τα ΛΜΚ. Συγκεκριμένα, η ροξιθρομυκίνη, η ραπαμυκίνη, αλλά και το σταθερό ανάλογό της SAR943 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ στεφανιαίας αρτηρίας ανθρώπου (172), επιθηλιακών και ΛΜΚ αεραγωγών (173), αλλά και σε ηπατοκύτταρα (174). Άλλες

μακρολίδες, όπως η ερυθρομυκίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων goblet στο ρινικό επιθήλιο αρουραίου και σε μονοκύτταρα ανθρώπου (175, 176), ενώ η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη επάγουν την απόπτωση σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (177) και σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (178). Λαμβάνοντας υπόψη τις μελέτες αυτές, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η δράση της μακρολίδης αζιθρομυκίνη στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αεραγωγών.

6.1 Αζιθρομυκίνη

Η αζιθρομυκίνη ανήκει στις αζαλίδες, μια υποκατηγορία των μακρολιδών. Ομοιάζει δομικά με την ερυθρομυκίνη, από την οποία και παράγεται, με τη διαφορά ότι ο δακτύλιος της λακτόνης της αζιθρομυκίνης αποτελείται από 15 άτομα. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων, κυρίως σε άτομα με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς δεσμεύεται στην 50S υπομονάδα των βακτηριακών ριβοσωμάτων και παρεμποδίζει τη μετάφραση και επομένως την πρωτεϊνοσύνθεση, χωρίς να επιδρά στα νουκλεϊκά οξέα. Το αντιμικροβιακό της φάσμα είναι παρόμοιο με αυτό της ερυθρομυκίνης, περιλαμβάνοντας διάφορα μέλη της οικογένειας των στρεπτόκοκκων, σταφυλόκοκκων, μυκοπλασμάτων και χλαμυδίων, είναι όμως πιο δραστική έναντι σε Gram αρνητικά βακτήρια, όπως η *Haemophilus influenzae*. Η αζιθρομυκίνη είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό κυρίως λόγω της έλλειψης παρενεργειών, καθώς απορροφάται ταχύτητα και αποθηκεύεται στα φαγοκύτταρα που την μεταφέρουν στις θέσεις της λοίμωξης, επιτυγχάνοντας έτσι πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις της μακρολίδης σε συγκεκριμένους ιστούς, σε σχέση με τη συγκέντρωσή της στο πλάσμα. Έτσι χρησιμοποιείται σε χαμηλές δόσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, στις οποίες εμφανίζεται φλεγμονή (179, 180, 181, 182, 183). Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν βελτίωση της κλινικής τους εικόνας, η οποία όμως δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην βακτηριοστατική και αντιφλεγμονώδη δράση της αζιθρομυκίνης.

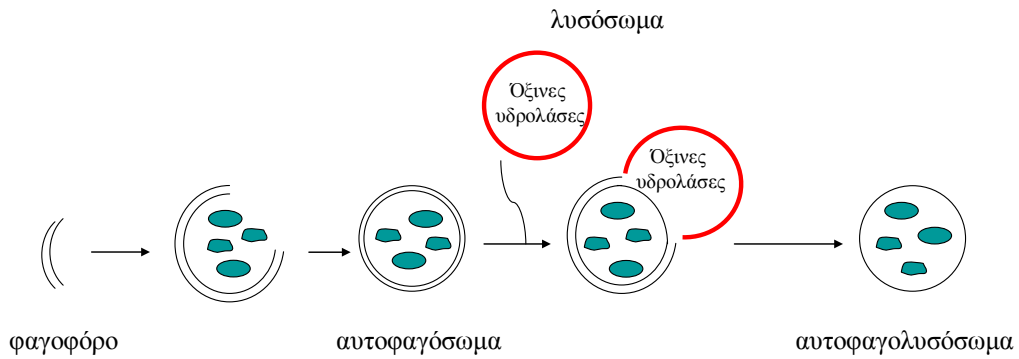
6.2 Κυτταρικές αποκρίσεις που ενεργοποιούνται από την αζιθρομυκίνη

Η αζιθρομυκίνη αποτελεί ερεθίσμα για το ΛΜΚ το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση μονοπατιών, τα οποία με τη σειρά τους θα βοηθήσουν το κύτταρο να επιβιώσει παρουσία του ερεθίσματος ή στην αντίθετη περίπτωση θα το οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Τα κύτταρα που δέχονται στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως

χημικές ουσίες ή στέρηση θρεπτικών συστατικών, έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν κυτταρικά συστατικά με τη βοήθεια λυσοσωμικών ενζύμων, προκειμένου να εξασφαλίσουν ενέργεια ή υλικά. Η καταβολική αυτή διαδικασία ονομάζεται αυτοφαγία, καθώς το κύτταρο φαίνεται να τρέφεται με τον εαυτό του. Η αυτοφαγία εμφανίζεται ως φυσιολογική λειτουργία στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, καθώς συμμετέχει στην ανακύκλωση πρωτεϊνών και οργανιδίων, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κυττάρου, της κυτταρικής διαφοροποίησης και των ομοιοστατικών διεργασιών του, βοηθώντας τη διατήρηση ισορροπίας ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμηση κυτταρικών προϊόντων. Η αυτοφαγία βοηθά το κύτταρο να ανταπεξέλθει σε αντίξοες συνθήκες, όπως τα στρεσογόνα ερεθίσματα. Ξεκινά με τη δημιουργία κυστιδίων που περικλείονται από απλή ή διπλή μεμβράνη και σχηματίζουν τα αρχικά φαγοφόρα. Στη συνέχεια, στα κυστίδια αυτά εγκοιλώνονται οι πρωτεΐνες ή τα οργανίδια τα οποία θα αποδιοργανωθούν και το αυτοφαγόσωμα πλέον, ενώνεται με ένα λυσόσωμα, σχηματίζοντας έτσι ένα αυτοφαγολυσόσωμα, του οποίου οι όξινες λυσοσωμικές υδρολάσες θα καταστρέψουν το περιεχόμενο του (184, 185, 186, 187) (Εικόνα 8).

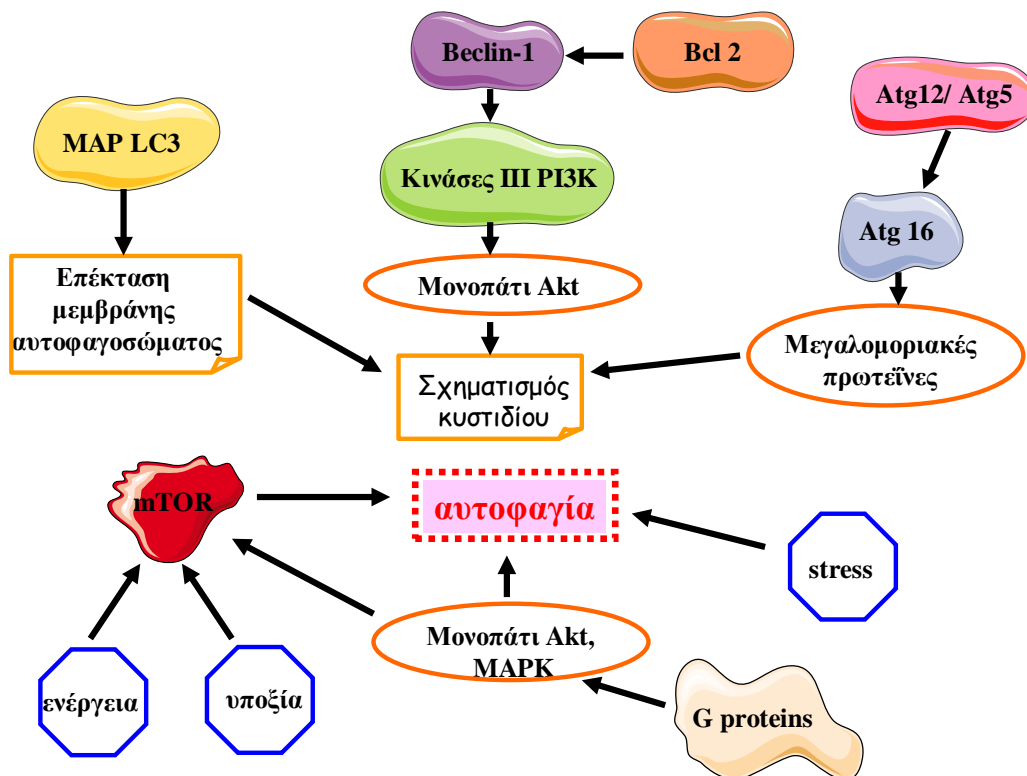
Η διαδικασία της αυτοφαγίας, αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκειά της παραμένουν αδιευκρίνιστα. (Εικόνα 9). Έχει ωστόσο βρεθεί η συμμετοχή κάποιων συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οι οποίες και χαρακτηρίζονται ως αυτοφαγικές πρωτεΐνες, καθώς ενεργοποιούνται κατά την αυτοφαγία. Συγκεκριμένα, προκειμένου να δημιουργηθούν τα αυτοφαγοσώματα πρέπει να δημιουργηθούν πλασματικές μεμβράνες και η διαδικασία αυτή απαιτεί την ενεργοποίηση των κλάσης III κινασών του μονοπατιού της PI3K, με σημαντικότερη από αυτές την πρωτεΐνη beclin-1 ή Atg 6 (autophagy-related gene-6). Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιεί με τη σειρά της την Bcl-2, η οποία φωσφορυλιώνεται και προκαλεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων με τελικό σκοπό τη δημιουργία του αυτοφαγικού κυστιδίου (188, 189, 190). Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης αυτής παρεμποδίζεται από τον αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μεθυλοαδενίνη (3-MA) (191), ενώ γενικοί αναστολείς του μονοπατιού της PI3K θα μπορούσαν να αναστείλουν και αυτό το αυτοφαγικό μονοπάτι (192). Επιπλέον, προκειμένου να προχωρήσει η αυτοφαγία είναι απαραίτητη η λειτουργία και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι της πρωτεΐνης LC3 (light chain 3) ή Atg 8, καθώς και η ενεργοποίηση πρωτεασών (193). Η LC 3 είναι μια πρωτεΐνη που εμφανίζει δράση ανάλογη της

ουμπικουιτίνης, βοηθώντας στην αποδιοργάνωση των διαφόρων μορίων και σχετίζεται με τη δημιουργία μικροσωληνίσκων στο κύτταρο.



Εικόνα 8.

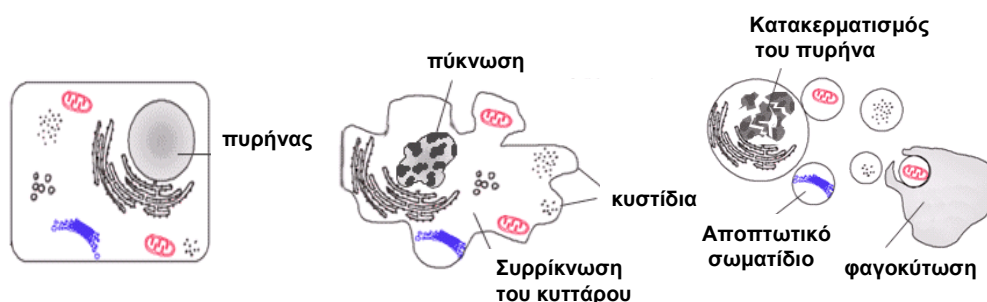
Δημιουργία και λειτουργία αυτοφαγικών κυστιδίων. Η αρχική μεμβράνη (φαγοφόρο) επεκτείνεται και εγκολπώνει πρωτεΐνες και οργανίδια, δημιουργώντας το αυτοφαγόσωμα. Αυτό στη συνέχεια ενώνεται με το λυσόσωμα και το περιεχόμενό του διαλύεται μέσα στο αυτοφαγολυσόσωμα.



Εικόνα 9. Σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αυτοφαγία.

6.2.1 Σχέση αυτοφαγίας - απόπτωσης

Παρόλο που οι μηχανισμοί και ο ρόλος της αυτοφαγίας δεν έχουν γίνει ακόμη πλήρως κατανοητά, φαίνεται πως η αυτοφαγία θα μπορούσε να αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης του κυττάρου σε αντίξοες συνθήκες. Ωστόσο, η αυτοφαγία συχνά οδηγεί τα κύτταρα σε θάνατο, ενεργοποιώντας κυρίως αποπτωτικούς μηχανισμούς. Έτσι θα μπορούσε ίσως να συμπεριληφθεί στους τύπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και να χαρακτηριστεί ως αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος, ή κυτταροπλασματικός κυτταρικός θάνατος ή κυτταρικός θάνατος τύπου II (185, 194). Η αυτοφαγία ωστόσο εμφανίζει διακριτές διαφορές με την απόπτωση, κατά την οποία εμφανίζεται διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, κατακερματισμός του πυρήνα, συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστροφή του χρωμοσωμικού DNA (195) (Εικόνα 10). Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε αποπτωτικό θάνατο (196, 197, 198), ενώ το αν το ερέθισμα που δέχεται το κύτταρο θα το οδηγήσει σε αυτοφαγία, μέσω της οποίας θα επιβιώσει, ή σε απόπτωση και θάνατο εξαρτάται από τη φύση, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος, καθώς και από την ενεργειακή κατάσταση στην οποία βρισκόταν το κύτταρο όταν δέχτηκε το ερέθισμα (199).



Εικόνα 10.

Κυτταρικός θάνατος με απόπτωση.

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.wikipedia.org

Η παρούσα μελέτη επιχειρεί να απαντήσει σε ερωτήματα που αφορούν την λειτουργία των ΛΜΚ των αεραγωγών και συγκεκριμένα.

- ❖ Κατά πόσο οι γεννητικές ορμόνες, τεστοστερόνη και οιστραδιόλη επηρεάζουν τον αριθμό των ΛΜΚ των αεραγωγών και αν η δράση τους αυτή εξαρτάται από το φύλο.
- ❖ Ποιος είναι ο ρόλος των μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, μέσω ποιων υποδοχέων και σηματοδοτικών μονοπατιών μεσολαβείται η δράση τους.
- ❖ Πώς οι φλεγμονώδεις και οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται στους αεραγωγούς σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού επηρεάζουν τη μάζα των ΛΜΚ.
- ❖ Με ποιο τρόπο, πέραν της βακτηριοστατικής και αντιφλεγμονώδους δράσης του, το αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη επηρεάζει τα ΛΜΚ των αεραγωγών και κατ' επέκταση και την φυσιολογική δομή και λειτουργία του αεραγωγού.
- ❖ Σε ποιο βαθμό όλα τα ανωτέρω συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της στοιβάδας των ΛΜΚ των αεραγωγών.

Στόχος της μελέτης αυτής είναι να διερευνήσει τη δράση των προαναφερθέντων παραγόντων στα ΛΜΚ των αεραγωγών και να προτείνει μηχανισμούς μέσω των οποίων μεσολαβείται η δράση αυτή.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1 Δημιουργία και διατήρηση πρωτογενών καλλιέργειών ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου.

1.1 Χειρισμός πειραματόζωων

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

1.2 Απομόνωση Λείων Μυικών Κυττάρων τραχείας κουνελιού

Μετά την θανάτωση των ζώων, απομακρύνθηκαν οι ιστοί που βρίσκονται στην περιοχή της τραχείας, η τραχεία αφαιρέθηκε κάτω από κατά το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου (Πίνακας 4), σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις του ιστού, ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατόν περισσότερο αίμα. Σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής, αφαιρέθηκε το λίπος και υπολείμματα ιστών που περιέβαλαν την τραχεία και στη συνέχεια κόπηκε ο χόνδρος απέναντι από τις λείες μυικές ίνες, έτσι ώστε να ανοίξει η τραχεία κατά μήκος. Το επιθήλιο απομακρύνθηκε με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό (Εικόνα 11).

Οι λείες μυικές ίνες απομακρύνθηκαν από τον χόνδρο και αφού ακολούθησαν πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου, μεταφέρθηκαν σε 2ml του πρώτου διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού (Πίνακας 4) και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C. Ανάμεσα στις δύο φυγοκεντρήσεις το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε νέο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου. Μετά την δεύτερη φυγοκέντρωση, το εναιώρημα μεταφέρθηκε στο δεύτερο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού (Πίνακας 4) και επώαστηκε για 60 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Έπειτα, το εναιώρημα των λείων μυικών ινών φυγοκεντρήθηκε εκ νέου 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταξύ των φυγοκεντρήσεων, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12 (DMEM-

F12, GIBCO), το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη (διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, PS). Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε με ελαφριά ανάδευση προκειμένου να αποκολληθούν τα χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα των λείων μυικών ινών.

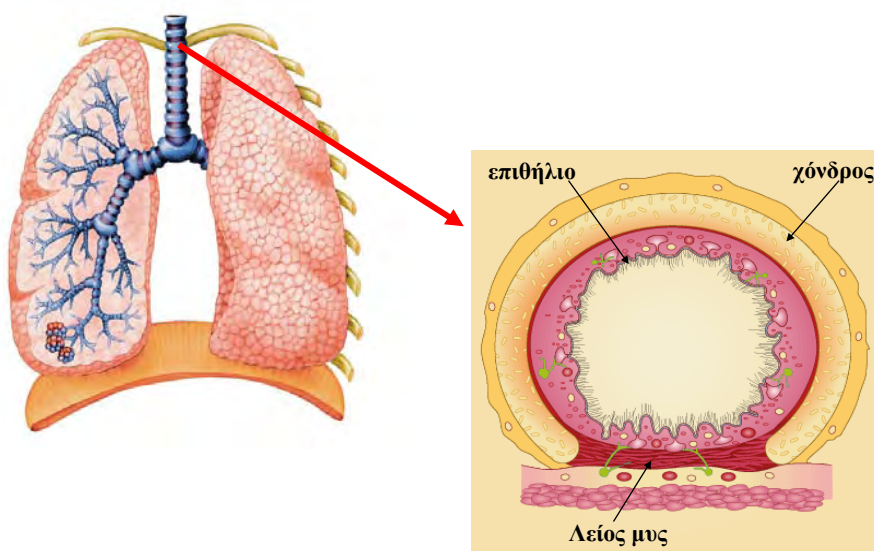
Πίνακας 4. Διαλύματα απομόνωσης

A. Διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου

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

B. Διαλύματα ενζυμικού διαχωρισμού

2ml διάλυμα Krebs χαμηλού ασβεστίου	Αλβουμίνη ορού βοός (BSA)	Κολλαγενάση I	Ελαστάση IV
Πρώτο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού	0.25%	2mg/ml	10U/ml
Δεύτερο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού	0.25%	1mg/ml	20U/ml



Εικόνα 11.

Ανατομία τραχείας

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.admit-online.info

1.3 Καθιέρωση πρωτογενούς καλλιέργειας Λείων Μυικών Κυττάρων τραχείας κουνελιού

Μετά την απομόνωση, τα ζωντανά κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon YS2T, (Nikon Inc., Melville New York, USA), με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) έπειτα από χρώση με Trypan blue. Η χρωστική Trypan blue (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα, καθώς εισέρχεται από τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες. Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε φλάσκα των 75 cm² (περίπου 5x10⁴ κύτταρα ανά 2 ml θρεπτικού υλικού), μαζί με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% CO₂. 24 με 48 ώρες μετά την απομόνωση, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας, οπότε το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από νέο και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες, με περιοδική αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανα 2 ημέρες. Όταν τα κύτταρα δημιούργησαν μονοστιβάδα η οποία κάλυπτε την επιφάνεια της φλάσκας αποκολλήθηκαν με 0.2 % θρυψίνη. Ακολούθησαν επανακαλλιέργειες των κυττάρων σε φλάσκες ή σε τρυβλία καλλιέργειών. Τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην 3^η με 6^η ανακαλλιέργεια.

1.4 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών

Κύτταρα της πρωτογενούς καλλιέργειας διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C. Τα κύτταρα προς αποθήκευση, τα οποία ήταν προσκολλημένα ως μονοστιβάδα στην επιφάνεια φλάσκας, ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1*PBS (Phosphate buffered saline). Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.2% θρυψίνης-0.05% EDTA σε PBS και η φλάσκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 5ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 με 10% FBS και φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 rpm, για 3 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12, με 10% FBS, που περιείχε επιπλέον 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο, Sigma-Aldrich) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιέργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα σε υδατόλουτρο στους 37°C, και στη συνέχεια προστέθηκαν 6ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1000rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το

ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO₂.

1.5 Καλλιέργεια Λείων Μυικών Κυττάρων βρόγχων ανθρώπου

Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (cc-2576, Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα 75cm², μαζί με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό είχαν υποστεί 3-6 ανακαλλιέργειες.

2 Κατεργασία των κυττάρων

2.1 Κατεργασία των ΛΜΚ με επαγωγείς και αναστολείς του πολλαπλασιασμού τους.

Τα κύτταρα που βρισκόταν σε καλλιέργεια πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1*PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν για 24, 72 ώρες ή 7 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη) στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Η στέρηση του ορού είχε ως στόχο τον κατά το δυνατό συγχρονισμό των κυττάρων, καθώς απουσία ορού τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται, παραμένουν όμως ζωντανά και διατηρούν τη δυναμική να αρχίσουν ξανά να διαιρούνται όταν δεχτούν το κατάλληλο ερέθισμα. Η στέρηση ορού για 7 ημέρες έγινε μόνο στην περίπτωση που μελετήθηκε η επίδραση ουσιών στον φαινότυπο των ΛΜΚ και ήταν αναγκαίος ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας σε ΛΜΚ που δεν διαιρούνται. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 4, 24, 48, 72 ώρες με ουσίες οι οποίες επάγουν ή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 5.

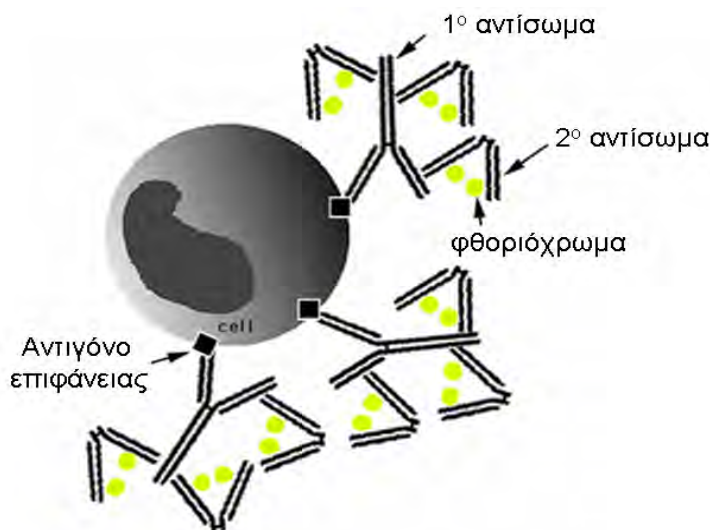
Πίνακας 5. Ουσίες που επάγουν ή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων

Ουσία	Συγκέντρωση	Δράση
Τεστοστερόνη	$10^{-8}M$	Γεννητική ορμόνη
Οιστραδιόλη	$10^{-8}M$	Γεννητική ορμόνη
Φλουταμίδη	$10^{-8}M$	Αναστολέας υποδοχέων ανδρογόνων
Αζιθρομυκίνη	$10^{-7}M$ - $10^{-5}M$	Αντιβιοτικό
Ακετυλοχολίνη	$10^{-7}M$, $10^{-5}M$, $10^{-3}M$	Μουσκαρινικός αγωνιστής
Καρβαχόλη	$10^{-9}M$, $3*10^{-7}M$, $10^{-5}M$	Μουσκαρινικός αγωνιστής
Tiotropium bromide	$30*10^{-9}M$, $100*10^{-9}M$	M2-M3 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
Gallamine	$10^{-5}M$	M2 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
LY294002	$10*10^{-6}M$, $20*10^{-6}M$	Αναστολέας του μονοπατιού της PI3K
PD98059	$10*10^{-6}M$, $100*10^{-6}M$	Αναστολέας του μονοπατιού των MAPK
Wortmannin	$500*10^{-9}M$	Αναστολέας του μονοπατιού της PI3K
3-methyl-adenine	$10^{-5}M$	Αναστολέας της αυτοφαγίας

3 Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Σε διάφορες περιοχές των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στην πλασματική, στην πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου ή ενδοκυττάρια. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες των κυττάρων, δρουν ως αντιγόνα για συγκεκριμένα ειδικά αντισώματα. Επομένως, τα κύτταρα επώαστηκαν με ειδικά αντισώματα τα οποία αλληλεπίδρασαν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με δεύτερα αντισώματα, τα οποία έφεραν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες, και συνδέθηκαν ειδικά με τα πρώτα, επιτρέποντας τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα (Εικόνα 12). Όταν στα κύτταρα επέδρασε φως με κατάλληλο μήκος κύματος, επιτεύχθηκε φθορισμός. Στη συνέχεια έγινε παρατήρηση σε μικροσκόπιο, το οποίο έφερε κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA) και φωτογράφιση του παρασκευάσματος με ειδική ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany).



Εικόνα 12.

Εντοπισμός πρωτεϊνών επιφανείας με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.genscript.com.

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

Inc, New York, USA). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Πρώτο αντίσωμα	αραίωση	Δεύτερο αντίσωμα	Πρωτεΐνη που ανιχνεύεται
a-actin	1: 400	Anti-mouse IgG	α-ακτίνη λείου μυός
Desmin	1: 400	Anti-mouse IgG	Δεσμίνη λείου μυός
Beclin 1	1: 1000	Anti-rabbit IgG	Πρωτεΐνη αυτοφαγίας
LC 3	1: 1000	Anti-rabbit IgG	Πρωτεΐνη αυτοφαγίας

4 Εκτίμηση πολλαπλασιασμού σε ΛΜΚ

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επαγωγή ή αναστολή πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές.

4.1 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου μετά από χρώση με χρωστική Trypan blue.

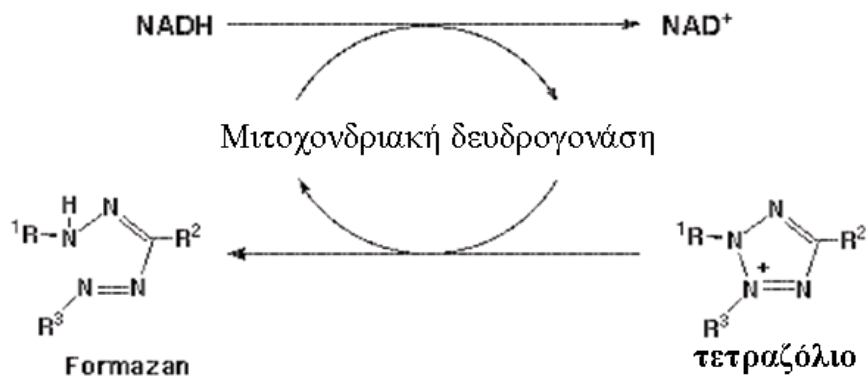
Σε αυτή την τεχνική μετρήθηκαν τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα (τα νεκρά απορροφούν τη χρωστική καθώς αυτή μπορεί και διαπερνά τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες και χρωματίζει τα κύτταρα κυανά) και έγινε αναγωγή σε αριθμό κυττάρων ανά ml κυτταρικού αιωρήματος, χρησιμοποιώντας τον τύπο: $(a/8) * 5 * 10^4$ όπου α ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε 8 τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer, Εικόνα 13)



Εικόνα 13.
Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer).
Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα
www.commonswikimedia.com

4.2 Μέτρηση ενσωμάτωσης –μεταβολισμού MTS –τετραζολίου από ζωντανά ΑΜΚ.

Η τεχνική Cell Titer AQueus One Solution assay, χρησιμοποιεί την χρωστική MTS–τετραζόλιο [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium], η οποία απορροφάται από τα κύτταρα. Η δεϋδρογονάση των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων μετατρέπει το MTS-τετραζόλιο σε έγχρωμο προϊόν του (RNH-N==CR'-N==NR', formazan) (Εικόνα 14). Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος με τη χρωστική καταμετράται σε φωτόμετρο ELISA plate reader, κατάλληλο για πιάτα 96 θέσεων, στα 490 nm με αναφορά στα 630 nm. Η μετρούμενη οπτική πυκνότητα, που υποδηλώνει την ύπαρξη της μεταβολισμένης χρωστικής, είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν σε κάθε θέση του πιάτου. Έχει γίνει κατασκευή πρότυπης καμπύλης οπτικής πυκνότητας–αριθμού κυττάρων, η οποία σε αριθμούς κυττάρων 1000 έως 20000 είναι γραμμική (Εικόνα 15). Στα πειράματα που έγιναν, μια ομάδα κυττάρων αποτελούσε την ομάδα ελέγχου (control), τα οποία ήταν κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και επομένως δεν πολλαπλασιαζόταν, μια άλλη ομάδα κυττάρων επώαστηκαν με 10% FBS και επομένως εμφάνιζαν το μέγιστο πολλαπλασιασμό και η τρίτη ομάδα κυττάρων ήταν αυτά που επώαστηκαν με την εκάστοτε ουσία της οποίας η επίδραση μελετήθηκε. Άρα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, εκτιμάται ο σχετικός αριθμός των κυττάρων και επομένως η ύπαρξη ή μη πολλαπλασιασμού, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που είχαν επιλεγεί.



Εικόνα 14.

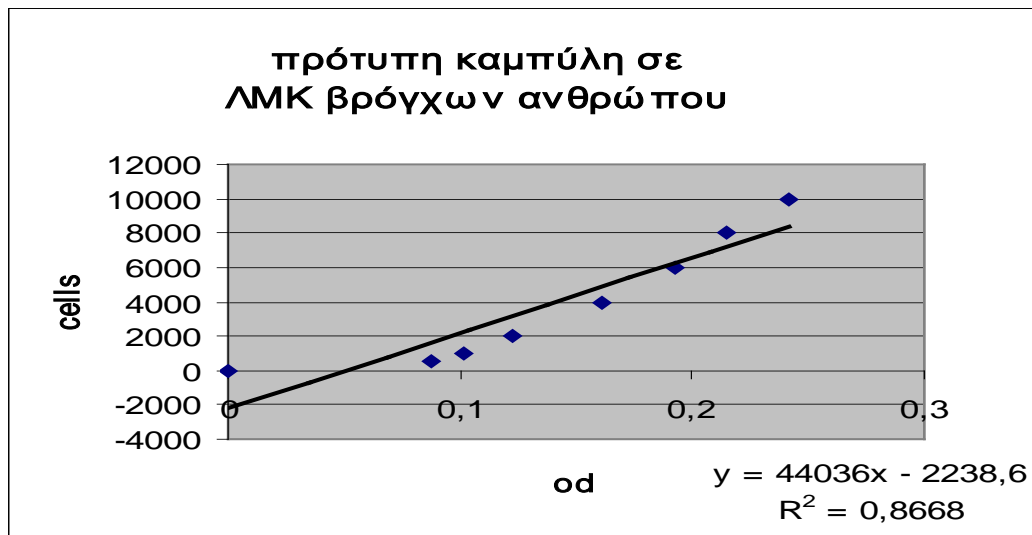
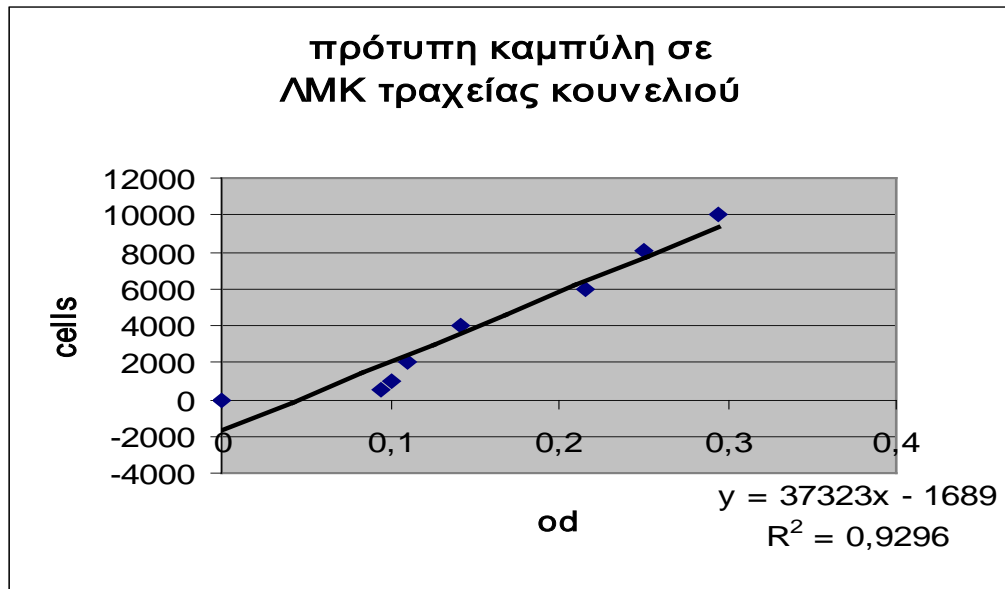
Μεταβολισμός MTS-τετραζολίου

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.promega.com

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν με πυκνότητα 2000 κύτταρα ανά θέση σε πιάτα ELISA 96 θέσεων και επώαστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη, στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Μετά το πέρας των 24 ωρών το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (> 95%) βρισκόταν προσκολλημένα στην επιφάνεια του πιάτου. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των κυττάρων με διάλυμα 1*PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και ακολούθησε επώαση για 24 ή 72 ώρες με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη, χωρίς ορό, στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Με την αφαίρεση ορού εξασφαλίστηκε ο κατά το δυνατό συγχρονισμός των κυττάρων με σταμάτημα του πολλαπλασιασμού τους. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με τους επαγωγείς ή τους αναστολείς του πολλαπλασιασμού για 24, 48, 72 ώρες.

Μετά το τέλος της κατεργασίας τους προστέθηκε απευθείας σε κάθε θέση 20% διάλυμα MTS –τετραζολίου και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C, παρουσία 5% CO₂. Τα πιάτα Elisa τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε μετατροπή της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων σε ποσοστό % της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων του control (δηλαδή η οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού θεωρήθηκε 100%) και σύγκριση των ποσοστών. Στις πειραματικές συνθήκες υπήρχαν και κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί

με θρεπτικό που περιείχε ορό, τα οποία αποτελούσαν την θετική ομάδα ελέγχου, δηλαδή ήταν τα κύτταρα που εμφάνιζαν το μέγιστο της πολλαπλασιαστικής ικανότητάς τους.

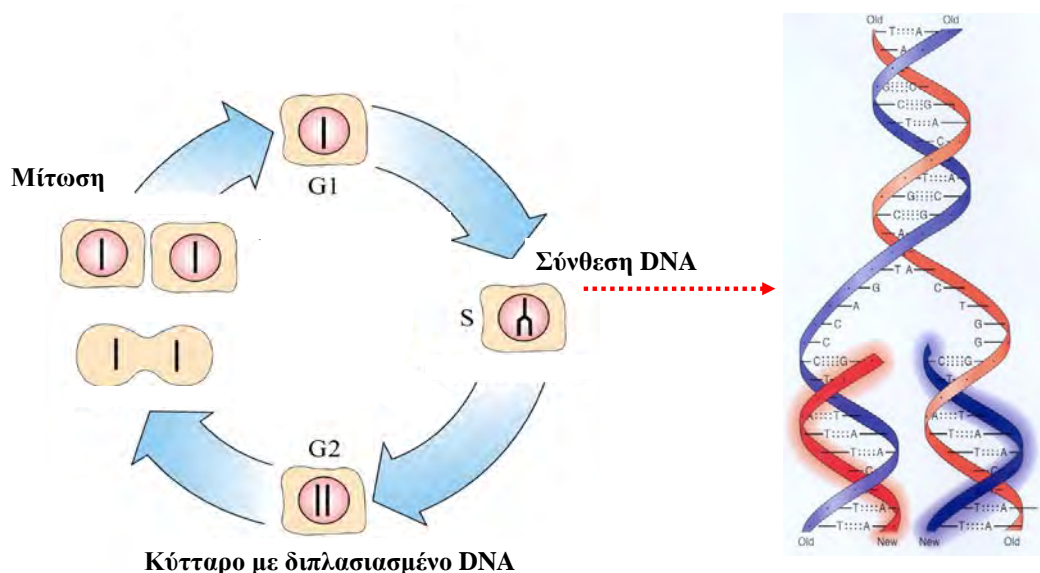


Εικόνα 15.

Πρότυπες καμπύλες οπτικής πυκνότητας- αριθμού κυττάρων σε ΛΜΚ.

4.3 Μέτρηση ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης (^3H -methyl-thymidine) σε νεοσυντιθέμενο DNA των ΛΜΚ.

Όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, πριν αρχίσει η διαίρεση του κυττάρου, κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, τα κύτταρα αντιγράφουν το DNA τους, δημιουργώντας δύο πανομοιότυπα μόρια DNA, τα οποία αποτελούνται από μία παλιά και μία νέα αλυσίδα DNA, λόγω του τρόπου αντιγραφής του μορίου (Εικόνα 16). Επομένως, όταν στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας προστίθεται τριτιομένη ραδιενεργός θυμιδίνη (^3H -methyl-thymidine), θα ενσωματωθεί στα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA και θα είναι δυνατό, μέσω της μέτρησης της ραδιενέργειας που έχει ενσωματωθεί στα κύτταρα να μετρήσουμε τα νέα μόρια DNA που συντέθηκαν κατά τον κυτταρικό κύκλο του κυττάρου, άρα να εκτιμήσουμε τον αριθμό των κυττάρων που πρόκειται να διαιρεθούν ή έχουν ήδη διαιρεθεί.



Εικόνα 16.

Σύνθεση DNA κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Εικόνες προσαρμοσμένες από τις ιστοσελίδες www.nobelprize.org και

www.dnareplication.info

Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 12 θέσεων με πυκνότητα 63000 κύτταρα ανά θέση και επώαστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη, στους 37 °C παρουσία 5% CO₂. Μετά το πέρας των 24 ωρών ακολούθησε στέρηση ορού για 72 ώρες, με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με τους επαγωγείς ή τους αναστολείς του πολλαπλασιασμού για 24, 48, 72 ώρες. Τις τελευταίες 18 ώρες της επώασης των κυττάρων με τις διάφορες ουσίες, στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας προστέθηκαν απευθείας 2.5

mCi/ml ραδιενεργής θυμιδίνης και η επώαση συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες. Μετά το τέλος της επώασης των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε στα κύτταρα διάλυμα 10% τριχλωροοξικού οξέος (TCA), που βρισκόταν στους 4°C, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια το διάλυμα μονιμοποίησης απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν διαδοχικά 3 φορές με νερό βρύσης. Αφού απομακρύνθηκε το νερό, προστέθηκε διάλυμα 20% NaOH-1% SDS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καταστραφούν οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και να ληφθεί το κυτταρικό εκχύλισμα. Το εκχύλισμα των κυττάρων αναδεύτηκε ελαφρώς και προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρίου 12N για να εξουδετερωθεί η δράση του διαλύματος εκχύλισης.

Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια μέτρησης ραδιενέργειας (mini scintillation vials, Antisel) και προστέθηκε υγρό σπινθηρισμού σε αναλογία 1:4 (Ultima gold XR scintillation fluid, Perkin-Elmer). Ακολούθησε μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενεργής θυμιδίνης στο κάθε δείγμα σε μετρητή Wallac (β- counter). Η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας εκφράστηκε από τον μετρητή ως κρούσεις ραδιενεργού υλικού ανά λεπτό μέτρησης (cpm, counts per minute). Ο αριθμός των κρούσεων ανά λεπτό είναι ανάλογος της ποσότητας της ραδιενεργής θυμιδίνης που έχει ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο DNA, άρα ανάλογος των νέων μορίων DNA των κυττάρων που διαιρούνται. Η εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων έγινε σε σύγκριση με τις κρούσεις που μετρήθηκαν στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, όπως και στην προηγούμενη τεχνική, ενώ υπήρχαν και κύτταρα τα οποία έδιναν το μέγιστο του πολλαπλασιασμού τους καθώς είχαν επωαστεί σε θρεπτικό υλικό με 10% ορό.

5 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση

5.1 Εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ

Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm με τις υπό μελέτη ουσίες για 4 ή 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε πλύση του τρυβλίου με διάλυμα 1*PBS, που περιείχε 100μg/ml PMSF, το οποίο είναι αναστολέας των πρωτεασών. Ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου με πίεση με ειδική σπάτουλα, με τη χρήση 50μl διαλύματος λύσης (Πίνακας 7). Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου eppendorf, και αφού επώαστηκε για 10 λεπτά σε πάγο, φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, 5μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, ενώ 150 μl του υπερκείμενου χρησιμοποιήθηκαν

για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση.

5.2 Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

Η μέτρηση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Αυτή η δημιουργία συμπλόκων μεταβάλλει το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Τα 5 μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του πρωτεϊνικού λύματος αναμίχθηκαν με 795 μl νερό και 200μl από το αντιδραστήριο και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 595 nm. Οι τιμές της απορρόφησης από το φωτόμετρο μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA). Η ολική πρωτεΐνη που υπάρχει σε κάθε δείγμα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την ηλεκτροφόρηση προκειμένου να υπάρχει αρκετή πρωτεΐνη.

Πίνακας 7 : Διάλυμα λύσης ευκαρυωτικών κυττάρων και εκχύλισης κυτταρικών πρωτεϊνών

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

5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες ενός δείγματος, που υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση, διαχωρίζονται καθώς κινούνται διαμέσω των πόρων μιας πηκτής. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται γιατί οι πρωτεΐνες ως φορτισμένα μόρια κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών (v) μέσα στην πηκτή, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται (E) και από το ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης (q). Τα μεγέθη αυτά συσχετίζονται με την εξίσωση :

$$v = E * q / f$$

όπου f : ο παράγοντας που εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα στο χώρο της πρωτεΐνης, καθώς και το ιξώδες της πηκτής μέσα στην οποία κινείται η πρωτεΐνη.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Οι πηκτές αυτές σχηματίζονται καθώς το ακρυλαμίδιο ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και το N,N μεθυλενοδισακρυλαμίδιο ή αλλιώς bis-ακρυλαμίδιο ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) συνπολυμερίζονται, καθώς το bis-ακρυλαμίδιο συνδέει τις σχηματιζόμενες αλυσίδες του ακρυλαμιδίου. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι ο σχηματισμός ενός πολυμερούς πλέγματος, του οποίου οι πόροι ποικίλουν σε μέγεθος, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Το πλέγμα δημιουργείται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, με την προσθήκη υπερθειϊκού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10% APS), το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη του μηχανισμού, και της τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED), η οποία είναι ένας φωτοχημικός καταλύτης που χρειάζεται για τη διάδοση του μηχανισμού.

Στην ασυνεχή ηλεκτροφόρηση, η οποία χρησιμοποιήθηκε, δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικές πηκτές. Η πηκτή επιστοιβάξης δημιουργήθηκε, έτσι ώστε να συμπυκνωθούν οι πρωτεΐνες του κάθε δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, πριν αρχίσουν να διαχωρίζονται, ενώ η πηκτή διαχωρισμού ήταν η πηκτή στην οποία διαχωρίστηκαν τελικά οι πρωτεΐνες. Οι δύο πηκτές παρασκευάστηκαν από δύο διαφορετικά ως προς τη σύσταση και το pH τους διαλύματα, ενώ και το ρυθμιστικό διάλυμα των δοχείων ηλεκτροφόρησης ήταν διαφορετικό από αυτά των πηκτών.

Οι αποδιατακτικές συνθήκες της ηλεκτροφόρησης εξασφαλίστηκαν με τη χρήση του απορρυπαντικού sodium dodecyl sulfate (SDS), το οποίο αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα συνδέεται με αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης).

Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το SDS φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο και είναι επιμήκη. Επειδή όμως το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό, η κίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεϊνών εξαρτάται αποκλειστικά μόνο από το μοριακό τους βάρος.

5.4 Δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Η πηκτή στην οποία έγινε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων, αποτελούνταν από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία είχε ύψος 7.5 cm και πάχος 1 mm και την πηκτή επιστοβαξής με ύψος 2.5 cm. Στην πηκτή επιστοίβαξης δημιουργήθηκαν θέσεις, στις οποίες προστέθηκε το κάθε δείγμα, καθώς τοποθετήθηκε στην πηκτή πλαστική οδοντωτή μήτρα, η οποία και αφαιρέθηκε μόλις ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός των μονομερών της πηκτής.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση παρουσιάζεται στον Πίνακα 8

Πίνακας 8:

Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης, pH 8.9

ΟΥΣΙΑ	TRIS	ΓΛΥΚΙΝΗ	EDTA	SDS
Συγκέντρωση	50 mM	0.38 M	2 mM	0.1%

Πηκτή επιστοίβαξης, pH 6.8

ΟΥΣΙΑ	ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ: BIS ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ	SDS	TRIS-HCL	EDTA	APS	TEMED
Συγκέντρωση	4.5%	0.1%	0.125 M	2 mM	0.08%	0.04%

Πηκτή διαχωρισμού, pH 8.8

ΟΥΣΙΑ	ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ: BIS ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ	SDS	TRIS-HCL	EDTA	APS	TEMED
Συγκέντρωση	8-12%	0.1%	0.375 M	2 mM	0.04%	0.04%

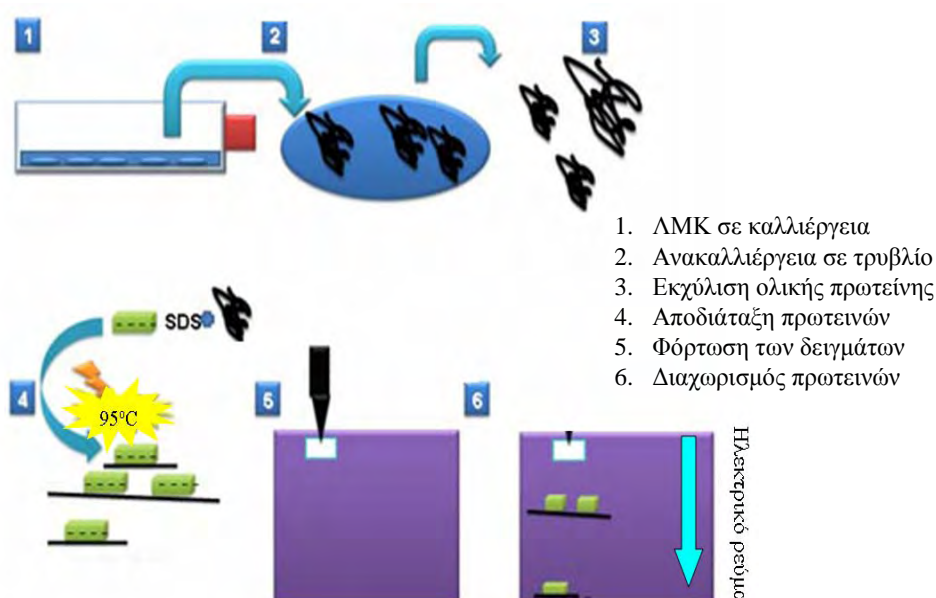
5.5 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων

Τα 150 μl δείγματος που είχαν ληφθεί από τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναμιχθηκαν με ένα διάλυμα επιφόρτωσης (Tris-HCl pH6.8 62.5mM, SDS 2.3%, γλυκερόλη 10%, μπλε-

βρωμοφαινόλης 0.05% w/v, DTT 25mM) σε αναλογία 1:3 και ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 95° C. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν με σύριγγα τύπου Hamilton, στις ειδικές θέσεις της πηκτής επιστοιβάξης που είχαν δημιουργηθεί με τη χρήση της ειδικής μήτρας κατά την κατασκευή της πηκτής. Σε κάθε θέση τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος που περιείχε 30 ή 40 μg πρωτεΐνης. Στην πρώτη θέση επιφορτώθηκε μίγμα πρωτεϊνών-μαρτύρων με συγκεκριμένα μοριακά βάρη.

5.6 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

Η ηλεκτροφορητική συσκευή συνδέθηκε με τροφοδοτικό μηχάνημα και η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε σε 200Volt, 400mA, για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ηλεκτροφόρηση θεωρήθηκε ολοκληρωμένη όταν το «μέτωπο» (μπλε γραμμή της χρωστικής) έφτασε στο χαμηλότερο άκρο της πηκτής (Εικόνα 17).



Εικόνα 17.

Ανάλυση κατά Western.

Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.westernblotinfo.com

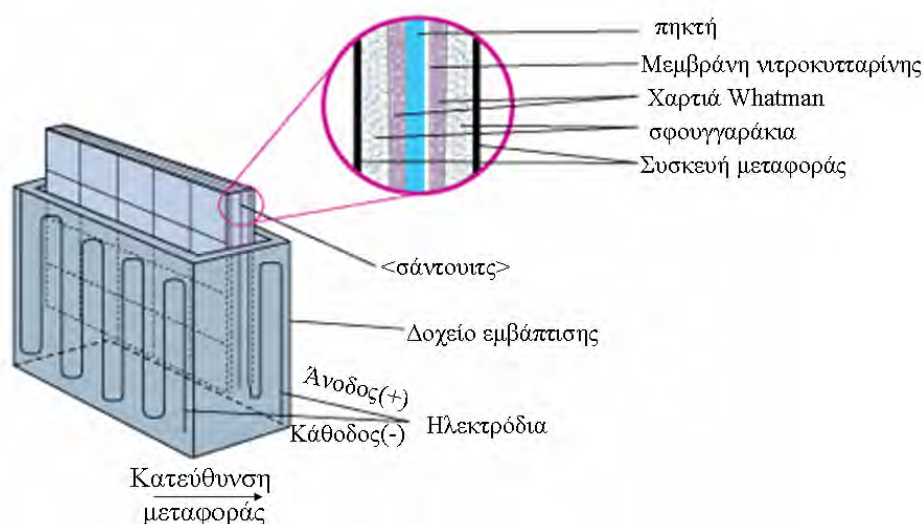
5.7 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες που υπήρχαν πάνω στην πηκτή και είχαν διαχωριστεί με την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε καθώς το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόστηκε μετακίνησε τις πρωτεΐνες που είναι μόρια αρνητικά φορτισμένα από την πηκτή πάνω στη μεμβράνη. Η μεταφορά αυτή έγινε σε υγρή φάση (Wet transfer), ως εξής :

Η πηκτή διαχωρισμού, έξι διηθητικά χαρτιά 3mm Whatman στο μέγεθος της πηκτής και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα μεταφοράς προκειμένου να

εξισορροπηθούν. Έπειτα, δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» στη συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών, το οποίο περιείχε διαδοχικά 3 χαρτιά Whatman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, την πηκτή και άλλα 3 χαρτιά Whatman. Η διάταξη αυτή τοποθετήθηκε στη συσκευή και η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα μεταφοράς (Tris 48mM, glycine 39mM, SDS 1.3mM, methanol 20%) (Εικόνα 18).

Στη συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 100Volt, 350mA για 55 λεπτά, με συνεχή ανάδευση του διαλύματος, παρουσία πάγου για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του διαλύματος. Όταν η μεταφορά ολοκληρώθηκε, η μεμβράνη χρωματίστηκε προσωρινά με χρωστική Ponceau S 0,2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μεταφορά ήταν επιτυχής καθώς η συγκεκριμένη χρωστική χρωματίζει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη και επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών πάνω σε αυτή. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό και κατόπιν αποχρωματίστηκε με πλύση με διάλυμα 1*PBS-0.1% Tween 20



Εικόνα 18.
Μεταφορά πρωτεϊνών
Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα www.westernblotinfo.com

5.8 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρουν ως αντιγόνα και μπορούν να συνδεθούν ειδικά με κατάλληλα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η σύνδεση αντιγόνου- αντισώματος μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με της ανοσοσφαιρίνης IgG του πρώτου και παράλληλα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη

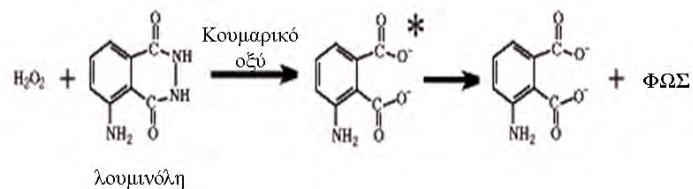
(συνήθως το HRP). Το ένζυμο αυτό αντιδρά με υπόστρωμα που προστίθεται εξωγενώς και εκλύει φωταύγεια ή δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χρώματος.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες, επώαστηκε για 20 λεπτά σε διάλυμα 1*PBS-0.1% Tween 20, που περιείχε 5% γάλα σε σκόνη, προκειμένου να κορεσθούν οι θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Με την δέσμηση αυτή αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, έγινε 1 πλύση της μεμβράνης με διάλυμα 1*PBS-0.1% Tween 20, που διήρκησε 10 λεπτά, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος κορεσμού.

Η μεμβράνη επώαστηκε για 16 ώρες στους 4° C με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση (Πίνακας 9) και κατόπιν ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμία με διάλυμα 1*PBS-0.1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου, με συνεχή ανάδευση της μεμβράνης. Οι πλύσεις έγιναν προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα συνδέεται ειδικά με το πρώτο, όπως προαναφέρθηκε. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος ακολούθησε η διαδικασία των πλύσεων που περιγράφηκε παραπάνω.

Το τελικό στάδιο της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών είναι ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη με χημειοφωταύγεια. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 10ml λουμινόλης (1.25 mM σε 0.1M Tris-Cl pH 8.5), που περιείχε 10μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM σε DMSO), για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 19).

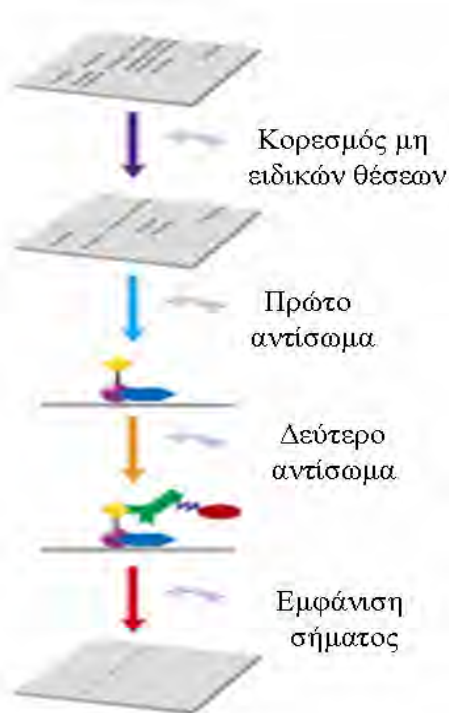
Ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ (ECL Hyperfilm, Amersham). Προκειμένου να εμφανιστεί η εικόνα της πρωτεΐνης στο φιλμ ακολούθησε εμφάνιση του φιλμ σε αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά εμφάνιση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak film developer), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak film fixer) και 3 λεπτά σε νερό). Με την τεχνική αυτή πάνω στο φιλμ αποτυπώθηκε το φως που εκλύθηκε από την αντίδραση φωταύγειας που πραγματοποιήθηκε, άρα κατ' επέκταση και η θέση της μεμβράνης όπου υπήρχε σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος. Δηλαδή στο σημείο όπου βρισκόταν καθηλωμένη η πρωτεΐνη (Εικόνα 20).



Εικόνα 19.
Αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Πίνακας 9 : Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

Πρώτο αντίσωμα	αραίωση	Δεύτερο αντίσωμα	αραίωση	Πρωτεΐνη που ανιχνεύεται
Phospho-Akt	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Φωσφορυλιωμένη Akt (PI3K)
Phospho-p42-44	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Φωσφορυλιωμένη p42/44 (MAPK)
Phospho- p38	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Φωσφορυλιωμένη p38 (MAPK)
LC3	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Light Chain 3 αυτοφαγική πρωτεΐνη
Beclin 1	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Beclin 1 αυτοφαγική πρωτεΐνη
Caspase 1	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000	Κασπάση 1 αποπτωτική πρωτεΐνη
β-actin	1:3000	Anti mouse IgG	1:3000	β-ακτίνη λείου μυός



Εικόνα 20.
Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών
Εικόνα προσαρμοσμένη από την ιστοσελίδα
www.genscript.com.

6 Εντοπισμός ενδοκυττάρων λυσοσωμάτων

6.1. Εντοπισμός λυσοσωμάτων με χρώση με LysoTracker red.

Η χρωστική LysoTracker red (Molecular Probes, Invitrogen) είναι μια όξινη φθορίζουσα χρωστική, η οποία απορροφάται από ζωντανά κύτταρα και ενσωματώνεται στα λυσοσώματα των κυττάρων αυτών. Ο αριθμός των λυσοσωμάτων που βρίσκονται σε ένα κύτταρο ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης του κυττάρου και τα ερεθίσματα που δέχεται σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Συγκεκριμένα, τα ΛΜΚ επώαστηκαν με τις κατάλληλες ουσίες για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα πάνω σε καλυπτρίδες και στη συνέχεια ακολούθησε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας και πλύση των κυττάρων με διάλυμα 1*PBS. Στη συνέχεια, στην καλλιέργεια προστέθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε την χρωστική LysoTracker red σε συγκέντρωση 75nM και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C, παρουσία 5% CO₂. Μετά το τέλος της επώασης οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από το πιάτο της καλλιέργειας και τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα στην οποία υπήρχε μία σταγόνα 1*PBS, έτσι ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται μεταξύ των επιφανειών της καλυπτρίδας και της αντικειμενοφόρου πλάκας. Οι καλυπτρίδες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με ειδικό φίλτρο απορρόφησης (Zeiss Axioskop 40) και λήφθηκαν φωτογραφίες με ειδική ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480).

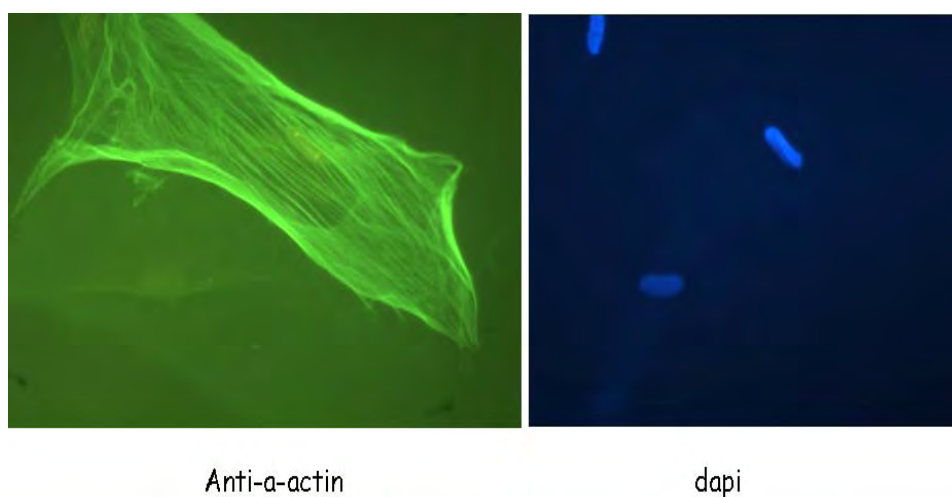
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Χαρακτηρισμός ΛΜΚ

1.1 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

1.1.1 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με αντίσωμα για την α- ακτίνη του λείου μυός.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως ΛΜΚ ελέγχοντας την έκφραση της α-ακτίνης του κυτταροσκελετού με κατάλληλο αντίσωμα, με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Στα κύτταρα εντοπίστηκε α-ακτίνη λείου μυός, με την χαρακτηριστική για ΛΜΚ κατανομή της στον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίστηκαν με χρωστική DAPI ειδική για πυρηνική χρώση, ώστε να διευκολυνθεί ο εντοπισμός των κυττάρων (Εικόνα 1).

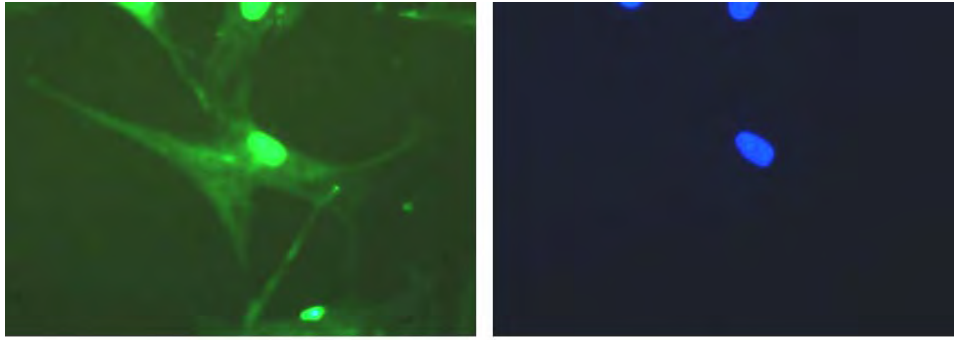


Εικόνα 1.

Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με έμμεσο ανοσοφθορισμό, με αντίσωμα κατά της α-ακτίνης του λείου μυός, και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI.

1.1.2 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με αντίσωμα για την δεσμίνη του λείου μυός.

Τα ΛΜΚ εκφράζουν την πρωτεΐνη δεσμίνη στον κυτταροσκελετό τους και η εμφάνιση της πρωτεΐνης αυτής είναι χαρακτηριστική του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνιζαν χαρακτηριστικό για ΛΜΚ πρότυπο δεσμίνης (Εικόνα 2).



Anti-desmin

dapi

Εικόνα 2.

Χαρακτηρισμός ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με έμμεσο ανοσοφθορισμό, με αντίσωμα κατά της δεσμίνης του λείου μυός, και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI.

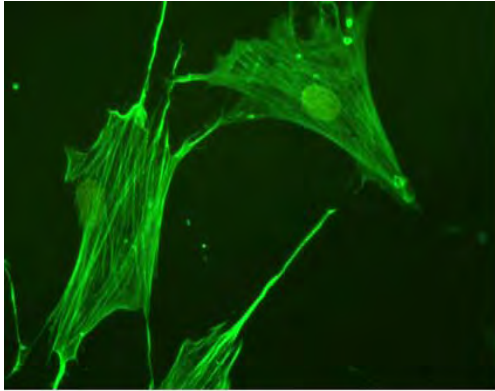
1.2 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

1.2.1 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με αντίσωμα για την α-ακτίνη του λείου μυός.

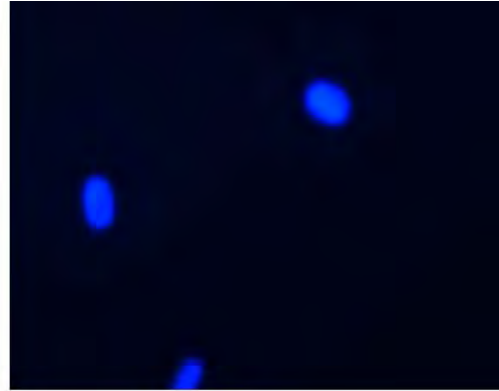
Τα ανθρώπινα ΛΜΚ που χρησιμοποιήθηκαν, παρόλο που είχαν ήδη ελέγξει από την εταιρεία που τα απομόνωσε από βρόγχους ανθρώπου, ελέγχθηκαν για να επιβεβαιωθεί ότι όντως ανήκαν στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Για τον χαρακτηρισμό τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την α-ακτίνη του λείου μυός και τα κύτταρα εμφάνιζαν χαρακτηριστικό για ΛΜΚ πρότυπο α-ακτίνης (Εικόνα 3)

1.2.2 Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με αντίσωμα για την δεσμίνη του λείου μυός.

Τα ανθρώπινα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν εξέφραζαν δεσμίνη λείου μυός, όπως φαίνεται με χρήση αντισώματος για τη δεσμίνη και έμμεσο ανοσοφθορισμό (Εικόνα 4).



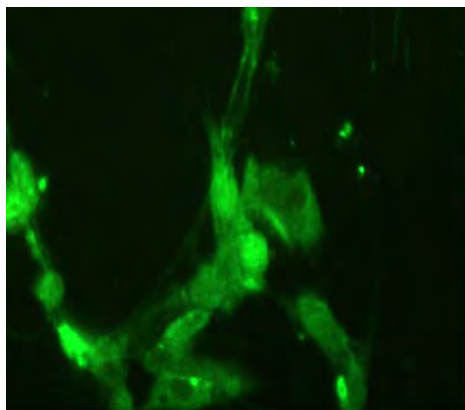
Anti- α -actin



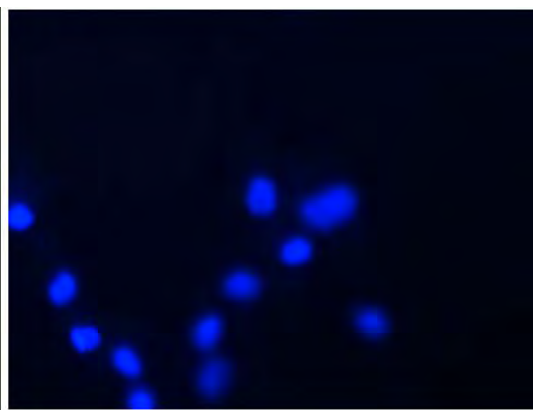
dapi

Εικόνα 3.

Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά της α -ακτίνης του λείου μυός, και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI.



Anti-desmin



dapi

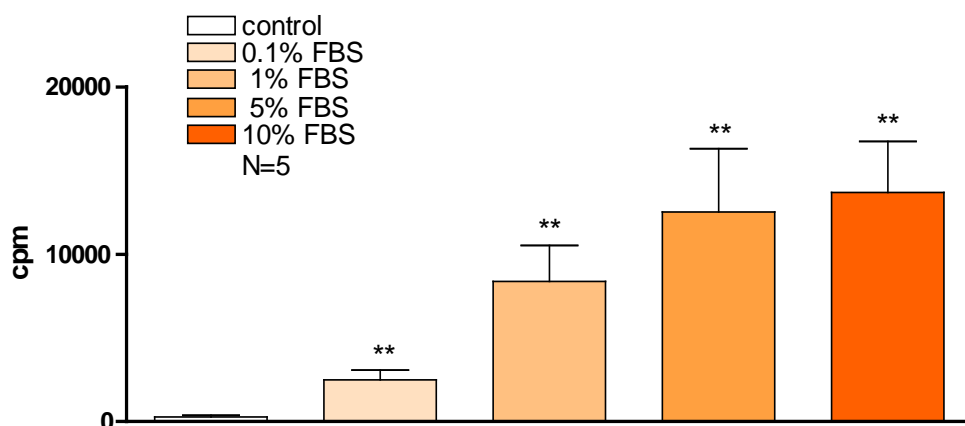
Εικόνα 4.

Χαρακτηρισμός ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά της δεσμίνης του λείου μυός, και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI.

2 Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων ορού εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ

2.1 Επίδραση FBS στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ορού (0.1%, 1%, 5%, 10%) για 48h. Η επιλογή του χρόνου επώασης προκειμένου να γίνουν οι μετρήσεις έγινε με βάση τον χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων που κυμαίνεται από 46 ως 52 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης (methyl- ^3H] thymidine incorporation method), με την οποία μετρήθηκαν οι κρούσεις (cpm, counts per minute) ραδιενεργού υλικού στα δείγματα. Ο αριθμός των κρούσεων αντικατοπτρίζει την σύνθεση DNA κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Με τη μέθοδο αυτή προκύπτει ότι η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας αυξάνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ακόμη και από την συγκέντρωση 0.1% ορού, μετά από επώαση των κυττάρων με ορό για 48 ώρες (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα η μετρούμενη ενσωμάτωση ραδιενέργειας ήταν: 2495 ± 583 cpm, 8370 ± 2149 cpm, 12524 ± 3780 cpm και 13694 ± 3051 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.1%, 1%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα.

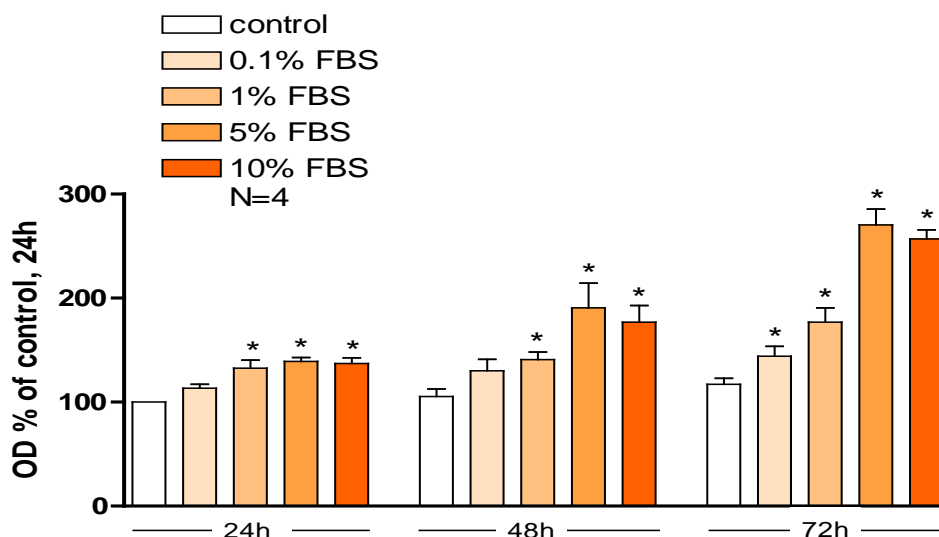


Εικόνα 5.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl- ^3H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία FBS (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Επόμενο βήμα ήταν να διερευνηθεί αν τα κύτταρα που αντέγραψαν το DNA τους προχώρησαν και σε κυτταροδιαίρεση. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Cell

Titer 96® AQueous One Solution Assay, με την οποία έγινε εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια. Όταν τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επωάστηκαν με τις ίδιες συγκεντρώσεις ορού (0.1%, 1%, 5%, 10%) για 24, 48, 72 ώρες ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, από την συγκέντρωση 1%FBS και πάνω. Η αύξηση αυτή του αριθμού των κυττάρων ήταν μεγαλύτερη καθώς αυξανόταν ο χρόνος επώασης των κυττάρων παρουσία FBS, ενώ η μέγιστη δράση παρατηρήθηκε από την συγκέντρωση 5% FBS (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα, η οπτική πυκνότητα σε σύγκριση με την οπτική πυκνότητα το πρώτο 24ωρο των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού ήταν σε ποσοστά $113.3\pm 3.71\%$, $132.7\pm 7.81\%$, $139\pm 3.88\%$ και $137.2\pm 5.31\%$, σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24h παρουσία 0.1%, 1%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα. Παρόμοια, τα ποσοστά μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων παρουσία ορού ήταν $130.1\pm 11.04\%$, $140.9\pm 7.35\%$, $190.6\pm 23.81\%$ και $177\pm 15.97\%$ για κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία 0.1%, 1%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα. Τα ποσοστά μετά από 72 ώρες επώασης των κυττάρων παρουσία ορού ήταν $144.1\pm 9.43\%$, $176.9\pm 13.85\%$, $270.4\pm 15.36\%$ και $257\pm 8.47\%$ για κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία 0.1%, 1%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα.

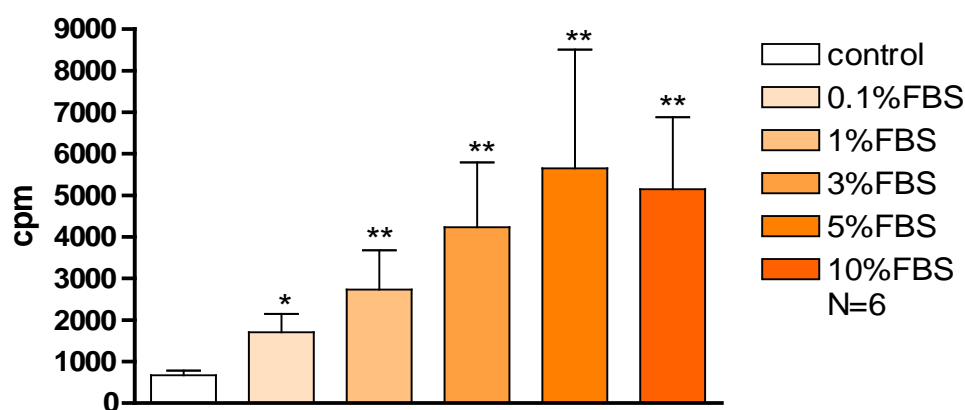


Εικόνα 6.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επωάστηκαν απουσία FBS. (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

2.2 Επίδραση FBS στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Επώαση ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με 0.1, 1, 5, 10% ορού για 48h, είχε ως αποτέλεσμα δόσοεξαρτώμενη αύξηση της ενσωμάτωσης methyl-[³H] thymidine από τα κύτταρα, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική από τη συγκέντρωση 3%FBS (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα η μετρούμενη ενσωματωμένη ραδιενέργεια ήταν 1709±443cpm, 2734±943cpm, 4234±1561cpm, 5651±2854cpm και 5150±1727 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.1%, 1%, 3%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα.

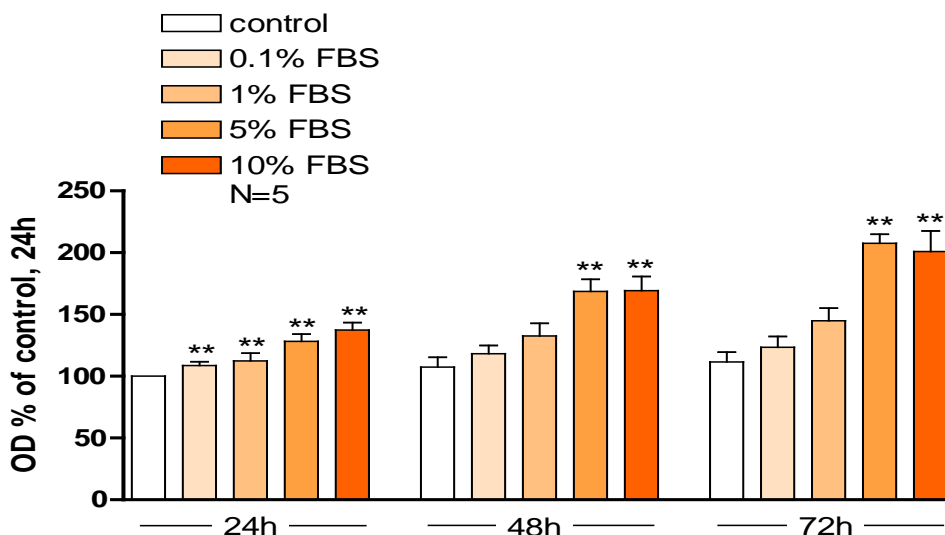


Εικόνα 7.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία FBS (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Η επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με τις ίδιες συγκεντρώσεις ορού είχε ως αποτέλεσμα και δόσοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, στατιστικά σημαντική από τη συγκέντρωση 0.1% ορού, ενώ η μέγιστη δράση παρατηρήθηκε από τη συγκέντρωση 5% ορού (Εικόνα 8). Συγκεκριμένα, η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό 108.6±3.04%, 112.5±6.08 %, 128.2±5.92 % και 137.3±6.11 %, σε κύτταρα που επώαστηκαν για 24h με 0.1%, 1%, 5% και 10% FBS αντίστοιχα. Οι τιμές για το δεύτερο και το τρίτο 24ώρο ήταν αντίστοιχα 118.2±6.78% και 123.4±8.78% για κύτταρα που επώαστηκαν με 0.1% ορό, 132.5±10.4% και 145±10.09% για κύτταρα που επώαστηκαν με 1% ορό, 168.7±9.74% και 207.6±7.29% για κύτταρα που επώαστηκαν με 5% ορό και τέλος 169.3±11.35% και

200.9±16.68 % για κύτταρα που επώαστηκαν με 10% ορό. Όπως και στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer96® AQueous One Solution Assay.



Εικόνα 8.

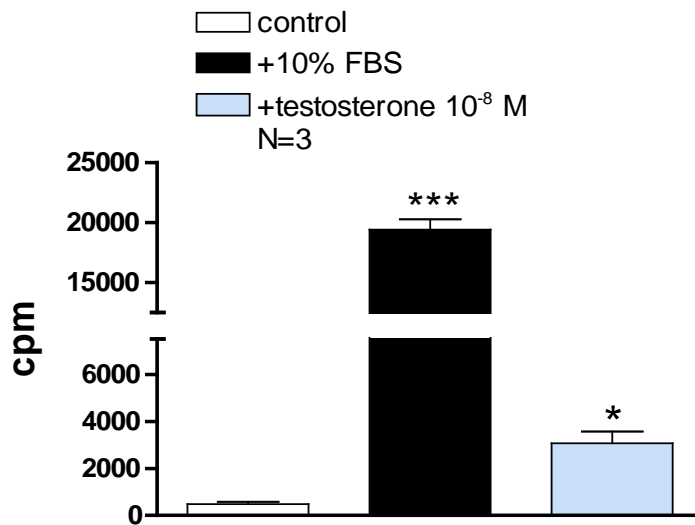
Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία FBS. (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3 Επίδραση γεννητικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ

3.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

3.1.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού

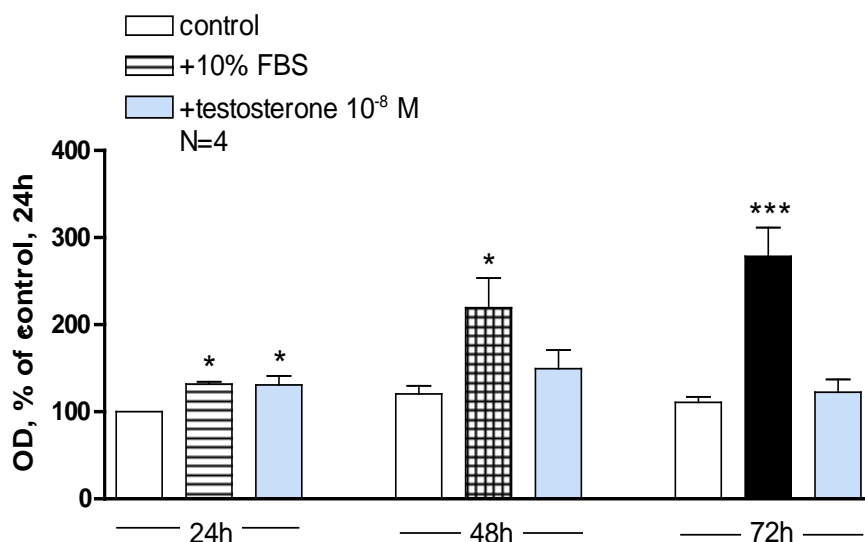
Μελετήθηκε η επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ που απομονώθηκαν από τραχεία ενήλικου αρσενικού κουνελιού. Τα κύτταρα αφού επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν, επώαστηκαν με τεστοστερόνη για 24 ώρες. Τα ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού παρουσίασαν αυξημένη ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, από 486.02±99.39cpm στην ομάδα ελέγχου, δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, σε 3074.55±97.45cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10⁻⁸M τεστοστερόνης, (Εικόνα 9).



Εικόνα 9.

Επίδραση τεστοστερόνης (10^{-8} M) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3\text{H}]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Όταν τα ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού επώαστηκαν για 24, 48, 72 ώρες με 10^{-8} M τεστοστερόνη ο αριθμός τους αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά μετά από 24h επώασης σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Η ομάδα ελέγχου (control) θεωρείται ότι περιέχει κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται, καθώς αυτά βρίσκονται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Συγκεκριμένα, η οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία τεστοστερόνης ήταν 130.9 ± 10.3 % στατιστικώς σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ο ορός προκάλεσε αύξηση της τάξης του 131.79 ± 2.59 %, δηλαδή η τεστοστερόνη οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων ανάλογη με εκείνη που παρατηρήθηκε παρουσία 10% FBS. Παρόλο που η τεστοστερόνη φαίνεται να προκάλεσε αύξηση του αριθμού των κυττάρων μετά από 24 ώρες επώασης (Εικόνα 10), η δράση της αυτή περιορίστηκε στο πρώτο 24ώρο της επώασης, καθώς μετά από 48 ή 72h επώασης δεν εμφανίστηκε περαιτέρω αύξηση του αριθμού των κυττάρων.

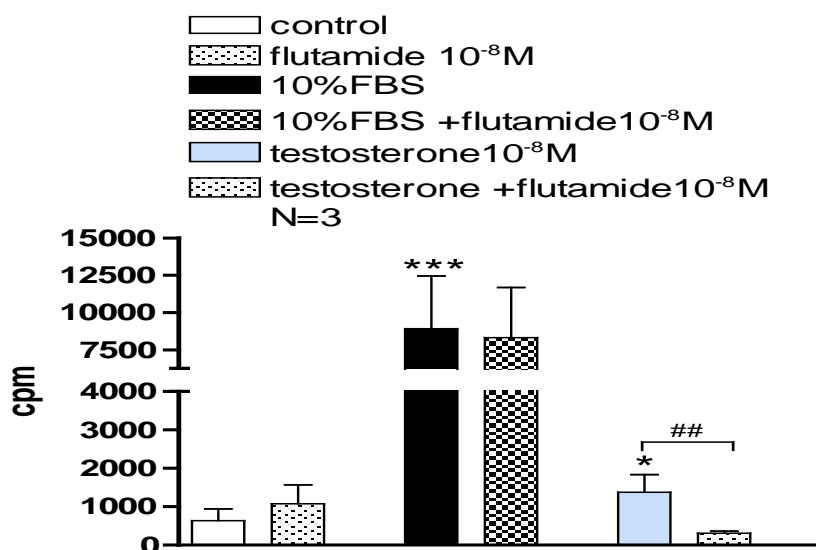


Εικόνα 10.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και *** $P<0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επωάστηκαν απουσία ορού (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.1.1.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού, παρουσία του αναστολέα των υποδοχέων ανδρογόνων, φλουταμίδη.

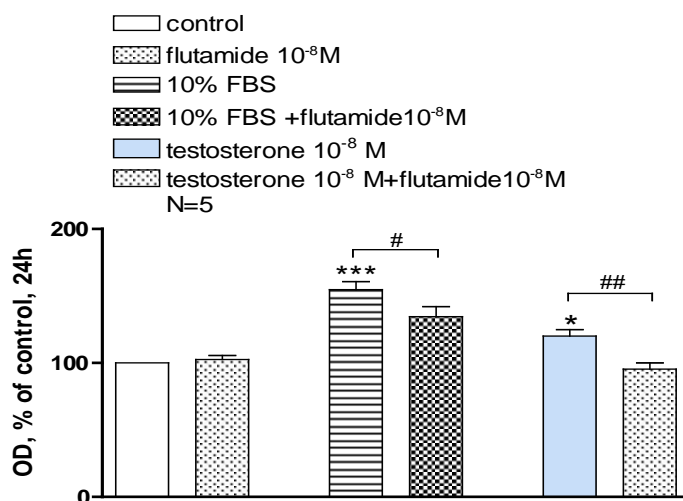
Τα ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού πριν επωαστούν για 24 ώρες με τεστοστερόνη σε συγκέντρωση $10^{-8}M$, προεπωάστηκαν με φλουταμίδη $10^{-8}M$ για 2 ώρες. Η φλουταμίδη δεσμεύεται στους υποδοχείς ανδρογόνων των ΛΜΚ και εμποδίζει την σύνδεση της τεστοστερόνης στους υποδοχείς αυτούς, για τους οποίους εμφανίζει ειδικότητα. Παρατηρήθηκε, ότι η φλουταμίδη ελάττωσε στατιστικώς σημαντικά την επαγόμενη από τεστοστερόνη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα, από $1374.29\pm 460.85\text{cpm}$ σε $308.93\pm 52.82\text{cpm}$ σε κύτταρα που επωάστηκαν με τεστοστερόνη σε σύγκριση με κύτταρα που επωάστηκαν με τεστοστερόνη και φλουταμίδη αντίστοιχα (Εικόνα 11). Ωστόσο, η φλουταμίδη δεν επηρέασε την ενσωμάτωση ραδιενέργειας στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με ή χωρίς 10%FBS.



Εικόνα 11.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$), παρουσία του αναστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων φλουταμίδη ($10^{-8}M$) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3H]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και *** $P<0.001$ σε σύγκριση με το control και ## $P<0.01$ σε σύγκριση με την επίδραση της τεστοστερόνης μόνης της στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Παρατηρήθηκε επιπλέον, ότι η φλουταμίδη ελάττωσε στατιστικώς σημαντικά την επαγόμενη από τεστοστερόνη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, από $120\pm 4.99\%$ σε $95.45\pm 4.67\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με τεστοστερόνη σε σύγκριση με κύτταρα που επώαστηκαν με τεστοστερόνη και φλουταμίδη, μετά από 24 ώρες επώασης (Εικόνα 12). Ενώ ο ίδιος αναστολέας δεν επηρέασε τον αριθμό των κυττάρων που είχαν επωαστεί με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, ελάττωσε τον επαγόμενο από 10% FBS πολλαπλασιασμό των κυττάρων, από $154.72\pm 5.96\%$ σε $134.63\pm 7.4\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό σε σύγκριση με κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και φλουταμίδη.



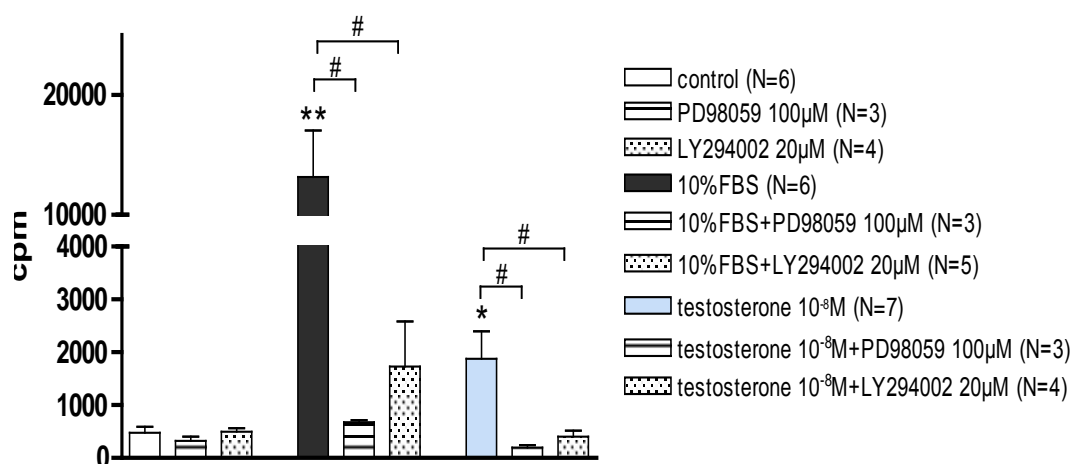
Εικόνα 12.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$), παρουσία του αναστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων φλουταμίδη ($10^{-8}M$) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και *** $P<0.001$ σε σύγκριση με το control και # $P<0.05$, ## $P<0.01$ σε σύγκριση με την επίδραση του ορού ή της τεστοστερόνης μόνης στη οπτική πυκνότητα (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.1.1.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την τεστοστερόνη σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων μεσολαβείται η δράση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς δύο κύριων μεταβολικών μονοπατιών, τα οποία είναι ενεργοποιημένα σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, του μονοπατιού της κίνησης της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI3K) και του μονοπατιού των MAP κινάσων. Συγκεκριμένα, τα ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού προεπώστηκαν για 1 ώρα με PD98059 (100 μ M), που είναι αναστολέας του μονοπατιού των MAP κινάσων και για 15 λεπτά με LY294002 (20 μ M), που είναι αναστολέας του μονοπατιού της PI3K, αντίστοιχα, πριν την προσθήκη του ορού και της τεστοστερόνης για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο αναστολείς προκάλεσαν ελάττωση της ενσωμάτωσης της ραδιενεργής θυμιδίνης στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10%FBS (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα η ενσωμάτωση της ραδιενεργής θυμιδίνης ήταν 13174.85 \pm 3856.9541cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, 674.53 \pm 39.41cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό παρουσία PD98059 και 1728.4 \pm 852.01cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό παρουσία LY294002

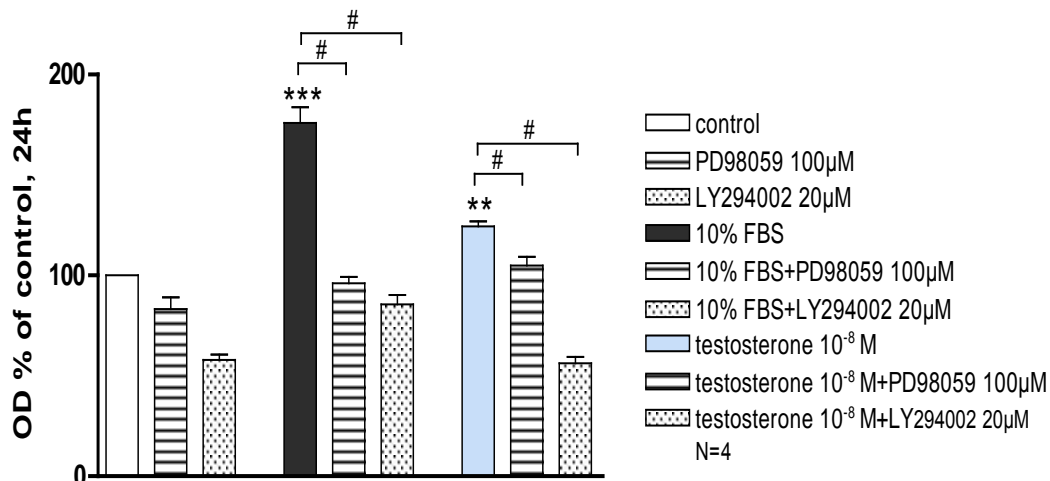
αντίστοιχα. Παρόμοια επίδραση είχαν οι αναστολείς PD 98059 και LY 294002 στον αριθμό των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10%FBS για 24 ώρες (Εικόνα 14). Αντιθέτως, οι αναστολείς PD98059 και LY294002 δεν είχαν καμία επίδραση στον αριθμό των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού (Εικόνες 13 και 14).



Εικόνα 13.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$), παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού των MAPK PD98059 ($100\mu M$) και του μονοπατιού της PI3K LY294002 ($20\mu M$) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3H]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το control και # $P < 0.05$, σε σύγκριση με την επίδραση του ορού ή της τεστοστερόνης μόνης στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Επιπλέον, τόσο το PD98059 ($100\mu M$), όσο και το LY294002 ($20\mu M$), ελάττωσαν τον επαγόμενο από τεστοστερόνη πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Συγκεκριμένα η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 2115 ± 548.17 cpm στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία τεστοστερόνης, 198.93 ± 46.28 cpm στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία τεστοστερόνης και PD98059 και 404.21 ± 113.8 cpm στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία τεστοστερόνης και LY294002 (Εικόνα 13). Παρόμοια η οπτική πυκνότητα (εκφραζόμενη ως ποσοστό της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων της ομάδας ελέγχου) ήταν 124.4 ± 2.52 % σε κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με τεστοστερόνη, 105 ± 4.22 % σε κύτταρα που επωάστηκαν με τεστοστερόνη και PD98059 και σε 56.32 ± 3.15 % σε κύτταρα που επωάστηκαν με τεστοστερόνη και LY294002 (Εικόνα 14).

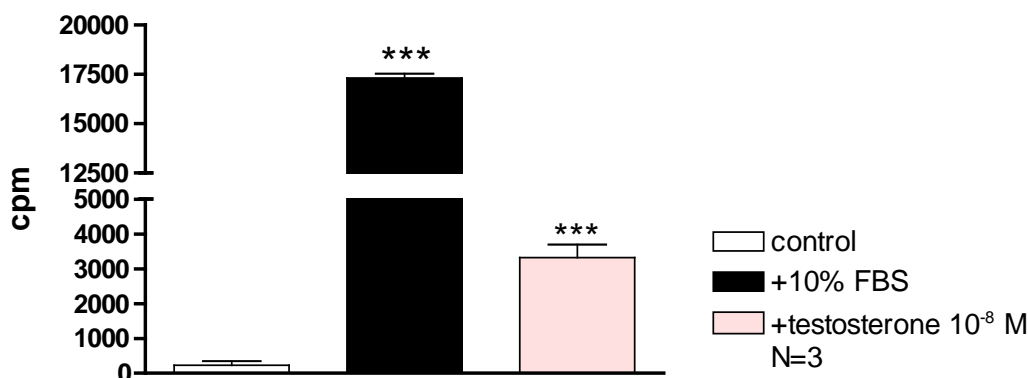


Εικόνα 14.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$), παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού των MAPK PD98059 (100µM) και του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20µM) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P<0.01$ και *** $P<0.001$ σε σύγκριση με το control και # $P<0.05$ σε σύγκριση με την επίδραση του ορού ή της τεστοστερόνης μόνης στη οπτική πυκνότητα (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.1.2 Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού

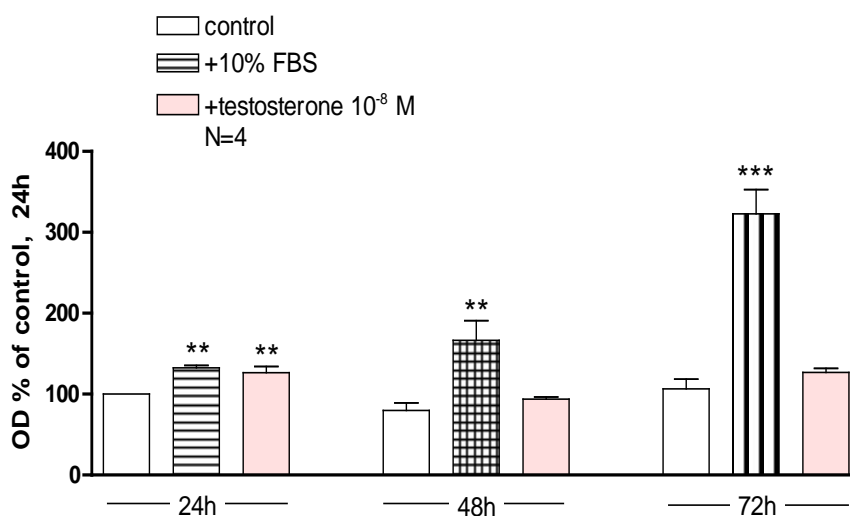
Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της τεστοστερόνης σε ΛΜΚ τραχείας που απομονώθηκαν από ενήλικο θηλυκό κουνέλι, προκειμένου να διεκρινιστεί αν η επίδραση της ορμόνης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ εξαρτάται από το φύλο. Έτσι, κύτταρα τα οποία ήταν συγχρονισμένα και δεν πολλαπλασιαζόταν, επώαστηκαν με τεστοστερόνη ($10^{-8}M$) για 24 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενέργειας. Η τεστοστερόνη ($10^{-8}M$) προκάλεσε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης σε ΛΜΚ από τραχεία θηλυκών κουνελιών (Εικόνα 15). Συγκεκριμένα, στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου η ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν $227.8\pm 114.5\text{cpm}$, στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS για 24 ώρες $17316.96\pm 222.33\text{cpm}$ και στα κύτταρα που επώαστηκαν με τεστοστερόνη για 24 ώρες $3323.16\pm 375.72\text{cpm}$.



Εικόνα 15.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$) στην ενσωμάτωση methyl-[3H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Όταν τα ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού επώαστηκαν για 24, 48, 72 ώρες με τεστοστερόνη και στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων που αναλογεί στον αριθμό των κυττάρων στην καλλιέργεια, παρατηρήθηκε ανάλογη αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 10% FBS παρατηρήθηκε αύξηση της οπτικής πυκνότητας κατά $132.5 \pm 3.03\%$ της οπτικής πυκνότητας της ομάδας ελέγχου, δηλαδή των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες. Η τεστοστερόνη προκάλεσε επαγωγή του πολλαπλασιασμού των θηλυκών κυττάρων της τάξης του $126.53 \pm 7.53\%$ σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Η δράση της αυτή ήταν παρόμοια με στα κύτταρα του αρσενικού κουνελιού και περιορίζεται στις πρώτες 24 ώρες, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση τις επόμενες ώρες της επώασης (Εικόνα 16).

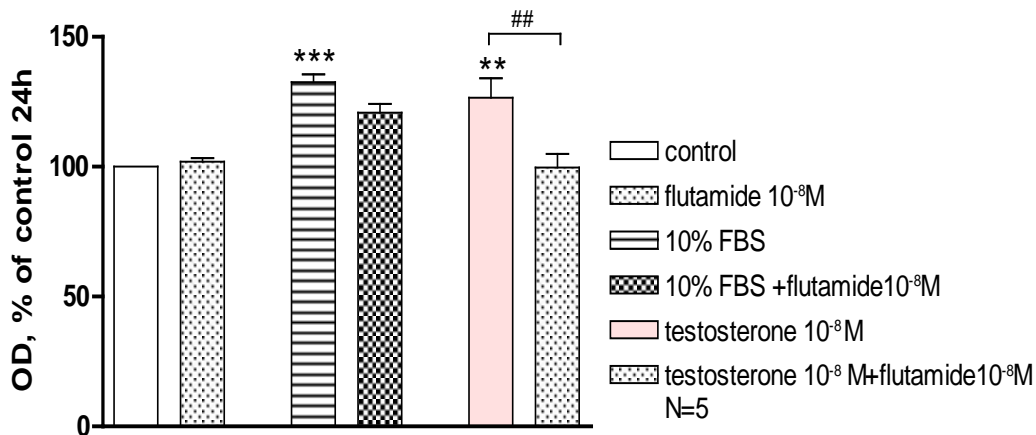


Εικόνα 16.

Επίδραση τεστοστερόνης ($10^{-8}M$) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επωάστηκαν απουσία ορού (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.1.2.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού, παρουσία του αναστολέα των υποδοχέων ανδρογόνων, φλουταμίδα

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν η δράση της τεστοστερόνης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ θηλυκού κουνελιού αναστέλλεται από την φλουταμίδα. Όταν τα κύτταρα προεπώστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα των υποδοχέων ανδρογόνων, φλουταμίδα ($10^{-8}M$) και στη συνέχεια με τεστοστερόνη ($10^{-8}M$) παρατηρήθηκε ελάττωση του επαγομένου από την τεστοστερόνη πολλαπλασιασμού των κυττάρων από $126.53 \pm 7.5\%$ σε $99.71 \pm 5.25\%$ (ποσοστό της οπτικής πυκνότητας της ομάδας ελέγχου το πρώτο 24ώρο). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ΛΜΚ αρσενικού κουνελιού η φλουταμίδα δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επωάστηκαν παρουσία 10%FBS ($132.5 \pm 3.05\%$ σε κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με ορό και $120.86 \pm 3.37\%$ παρουσία ορού και φλουταμίδης) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17.

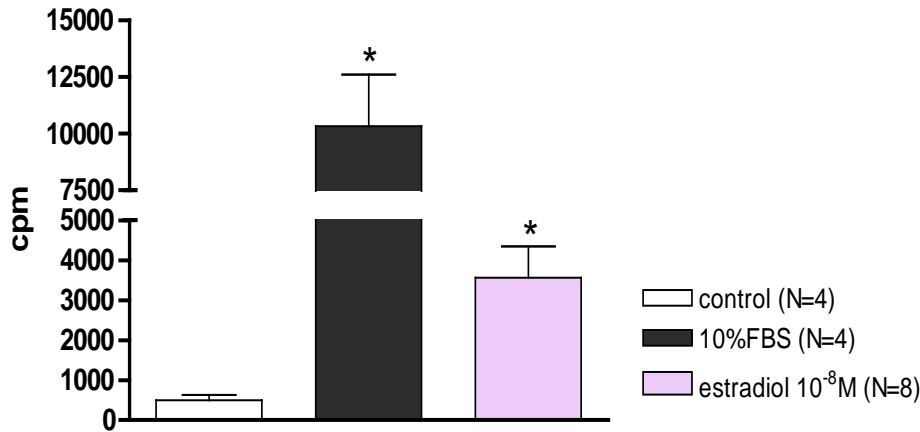
Επίδραση τεστοστερόνης (10^{-8} M), παρουσία του αναστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων φλουταμίδη (10^{-8} M) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το control # $P < 0.05$ σε σύγκριση με την επίδραση του ορού ή της τεστοστερόνης μόνης στη οπτική πυκνότητα (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

3.2.1 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού

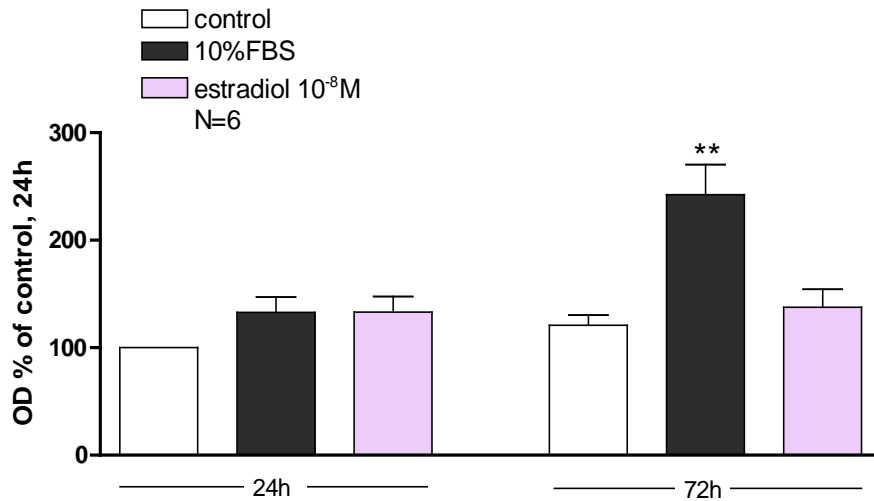
Η κύρια γεννητική ορμόνη των θηλυκών ατόμων στα θηλαστικά είναι η οιστραδιόλη. Μετά τη μελέτη της επίδρασης της τεστοστερόνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, διερευνήθηκε η επίδραση της οιστραδιόλης στον ίδιο κυτταρικό τύπο. Η οιστραδιόλη 10^{-8} M αύξησε σημαντικά την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα από 496.86 ± 131.35 cpm της ομάδας ελέγχου σε 3885.54 ± 1075.87 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 10^{-8} M οιστραδιόλη (Εικόνα 18).

Παρόλη την αύξηση που προκάλεσε η οιστραδιόλη στην ενσωμάτωση ραδιενέργειας, δεν φάνηκε να επηρεάζει τον αριθμό των ΛΜΚ που απομονώθηκαν από τραχεία ενήλικου θηλυκού κουνελιού μετά από 24 ή 72 ώρες επώασης καθώς η οπτική πυκνότητα των κυττάρων αυξήθηκε κατά $133.21 \pm 14.37\%$ μετά από 24h και κατά $137.66 \pm 16.61\%$ μετά από 72h (στατιστικά μη σημαντική διαφορά) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 19).



Εικόνα 18.

Επίδραση οιστραδιόλης (10⁻⁸M) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

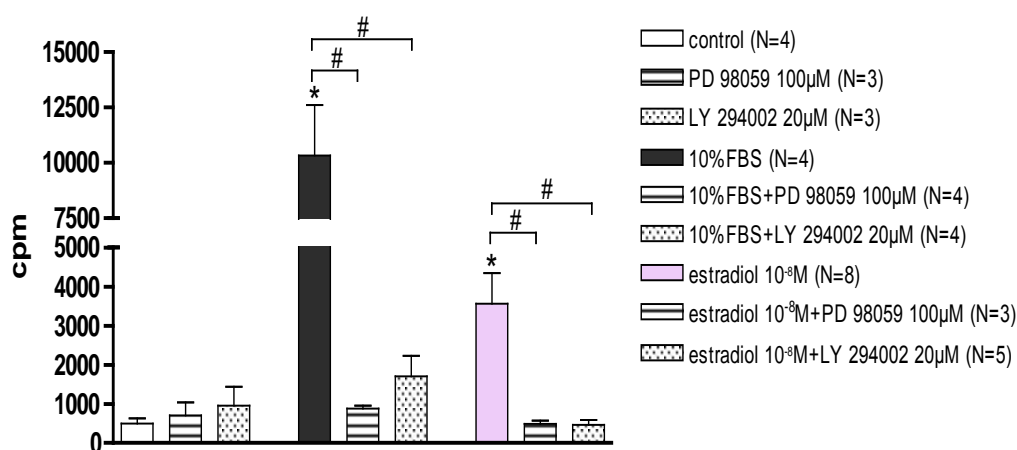


Εικόνα 19.

Επίδραση οιστραδιόλης (10⁻⁸M) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

3.2.1.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την οιστραδιόλη σε ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων μεσολαβείται η δράση της οιστραδιόλης στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης. Τόσο ο αναστολέας του μονοπατιού των MAP κινασών PD98059 (100μM), όσο και ο αναστολέας του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM), ανέστειλαν την επαγομένη από την οιστραδιόλη ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας θηλυκού κουνελιού (Εικόνα 20). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 3885.54 ± 1075.87 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με οιστραδιόλη. 486.27 ± 85.85 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη παρουσία PD98059 και 832.07 ± 389.02 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη παρουσία LY294002.

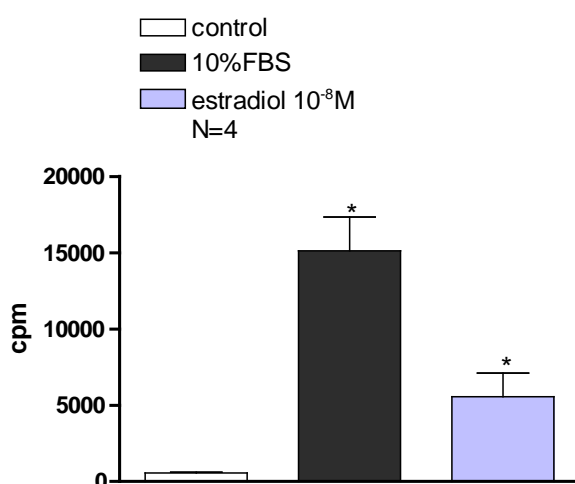


Εικόνα 20.

Επίδραση οιστραδιόλης (10^{-8} M), παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού των MAPK PD98059 (100μM) και του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20μM) στην ενσωμάτωση methyl-[3 H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control και # $P < 0.05$, σε σύγκριση με την επίδραση της οιστραδιόλης στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

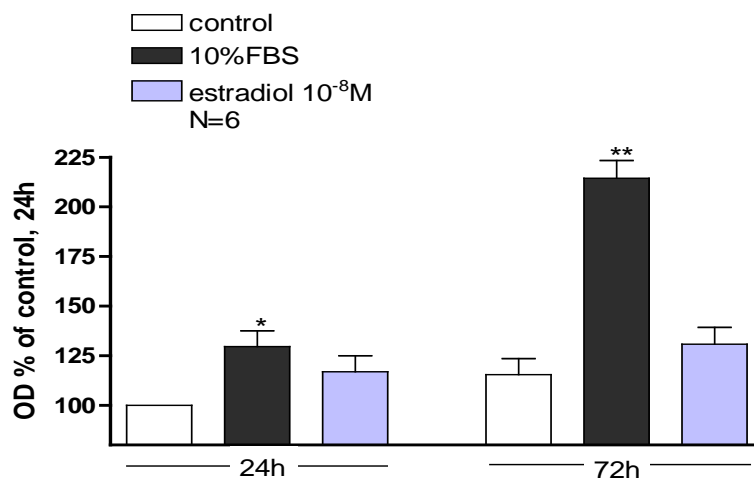
3.2.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού

Μελετήθηκε η επίδραση της οιστραδιόλης σε κύτταρα που απομονώθηκαν και από τραχεία αρσενικού κουνελιού. Σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού η οιστραδιόλη εμφάνισε παρόμοια δράση με αυτή που εμφανιζόταν στα κύτταρα του θηλυκού κουνελιού. Δηλαδή, παρόλο που παρατηρήθηκε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενέργειας από τα κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με οιστραδιόλη $10^{-8}M$ από 553.36 ± 49.68 cpm στην ομάδα ελέγχου σε 5551.68 ± 1556.15 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη (Εικόνα 21), δεν παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των κυττάρων που επώαστηκαν για 24 ή 72 ώρες με την ορμόνη ($113.04 \pm 7.64\%$ στις 24h και $130.81 \pm 8.45\%$ στις 72h, στατιστικά μη σημαντική διαφορά), (Εικόνα 22).



Εικόνα 21.

Επίδραση οιστραδιόλης ($10^{-8}M$) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3H]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 22.

Επίδραση οιστραδιόλης (10⁻⁸M) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

4 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών σε ΛΜΚ.

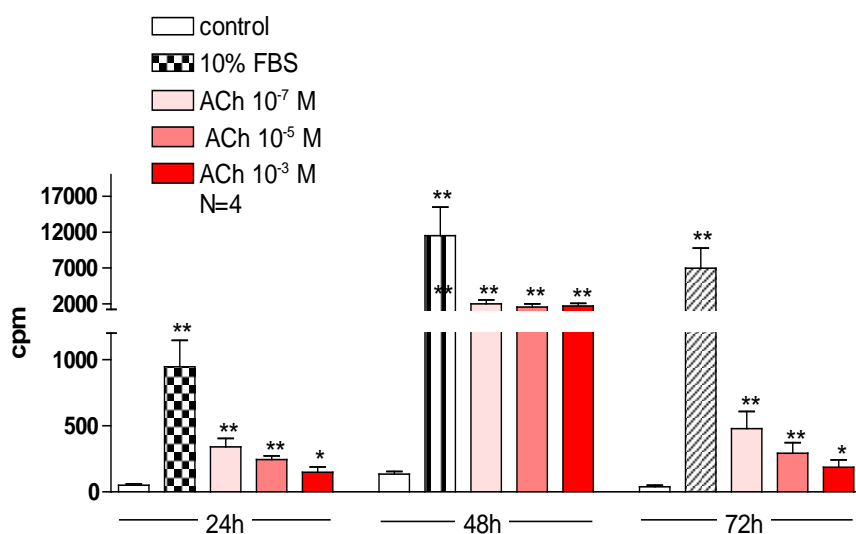
4.1 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

4.1.1.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Ο μουσκαρινικός αγωνιστής ακετυλοχολίνη, ο οποίος συνδέεται με μουσκαρινικούς υποδοχείς σε ΛΜΚ αεραγωγών, χρησιμοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις 10⁻⁷, 10⁻⁵, και 10⁻³M. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλεχθήκαν καθώς η 10⁻⁷M είναι η συγκέντρωση ακετυλοχολίνης που δεν έχει καμία επίδραση στη σύσπαση λείων μυικών ινών, σε πειράματα σύζευξης διέγερσης-συστολής, η 10⁻⁵M είναι η συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται το μισό της μέγιστης επίδρασης της ακετυλοχολίνης σε σύσπαση ΛΜΙ (IC₅₀) και η 10⁻³M είναι η συγκέντρωση που εμφανίζει τη μέγιστη επίδραση στη σύσπαση, όπως έχει δειχθεί από πειράματα που έχουν γίνει στο εργαστήριο Φυσιολογίας στο παρελθόν.

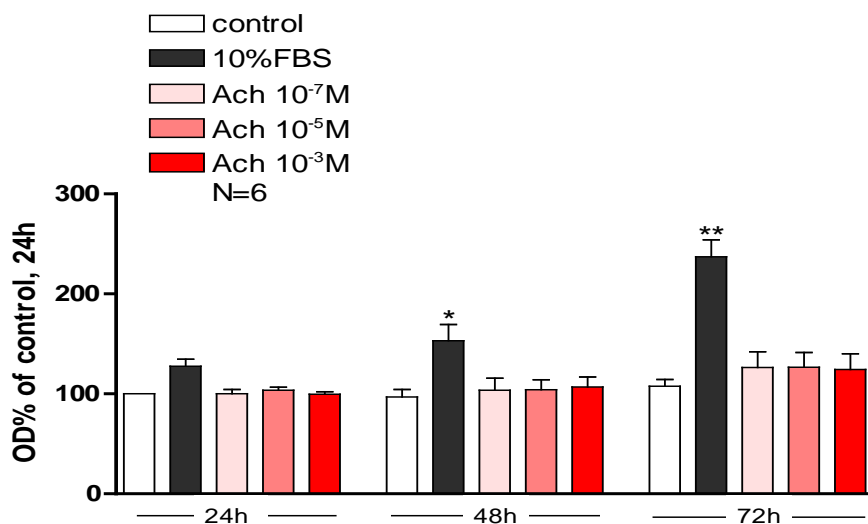
Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις 3 συγκεντρώσεις της ακετυλοχολίνης για 24, 48 και 72 ώρες και μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των νεοσυντιθέμενων μορίων DNA σε κύτταρα που επώαστηκαν και με τις 3 συγκεντρώσεις ακετυλοχολίνης για 24, 48 και 72 ώρες (Εικόνα 23). Συγκεκριμένα η μετρούμενη ενσωματωμένη ραδιενέργεια ήταν 136 ± 20 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, 11508 ± 3960 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και 1690 ± 374 cpm, 1549 ± 441 cpm ή 1978 ± 550 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη 10^{-7} M, 10^{-5} M ή 10^{-3} M αντίστοιχα.

Αντίθετα, όταν ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 24), παρόλο που τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν διατηρούσαν ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, όπως φαίνεται από τη στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων όταν αυτά επώαστηκαν με 10% ορό (αύξηση της τάξης του $153.2\pm 16.23\%$ μετά από 48 ώρες και $237.2\pm 17\%$ μετά από 72 ώρες επώασης).



Εικόνα 23.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης (ACh) στην ενσωμάτωση methyl- 3 H thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και ** $P<0.01$, σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 24.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης (ACh) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

4.1.1.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

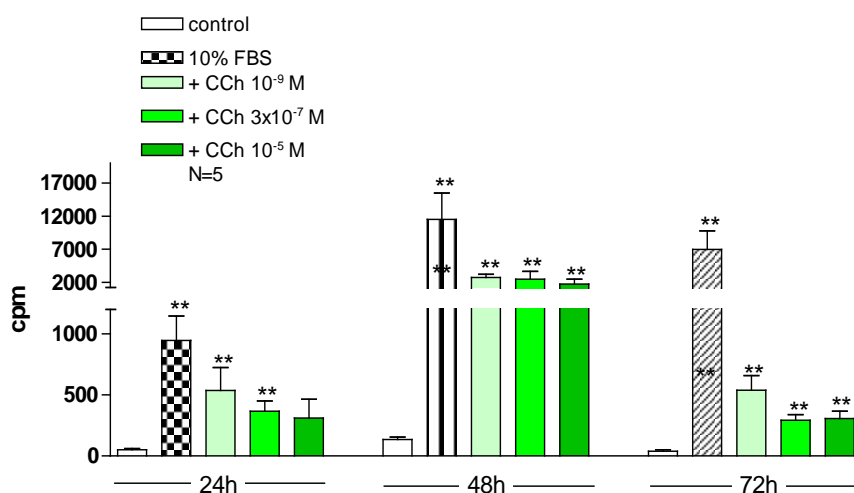
Η καρβαχόλη είναι αγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων αλλά διαφέρει από την ακετυλοχολίνη στο ότι δεν διασπάται από την ακετυλοχολινεστεράση. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις καρβαχόλης 10^{-9} , $3 \cdot 10^{-7}$ και 10^{-5} M, οι οποίες επελέγησαν για τους ίδιους λόγους με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις της ακετυλοχολίνης. Δηλαδή, από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Φυσιολογία στο παρελθόν και αφορούσαν τη σύζευξη διέγερσης-συστολής σε λείες μυικές ίνες τραχείας κουνελιού, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση 10^{-9} M καρβαχόλης δεν έχει καμία επίδραση στη σύσπαση λείων μυικών ινών, η $3 \cdot 10^{-7}$ M είναι η συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται το μισό της μέγιστης επίδρασης της καρβαχόλης σε σύσπαση λείων μυικών ινών (IC_{50}) και η 10^{-5} M είναι η συγκέντρωση που εμφανίζει τη μέγιστη επίδραση στη σύσπαση.

Μετά από επώαση 24, 48 και 72 ωρών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης σε κύτταρα που επώαστηκαν ακόμα και με τη μικρότερη συγκέντρωση καρβαχόλης (Εικόνα 25). Συγκεκριμένα, η μετρούμενη ενσωματωμένη ραδιενέργεια ήταν 302 ± 101 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, 13743 ± 4383 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10%

FBS και 1479 ± 662 cpm, 2094 ± 1029 cpm ή 2468 ± 472 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με καρβαχόλη 10^{-9} M, 3×10^{-7} M ή 10^{-5} M αντίστοιχα. Ωστόσο οι ίδιες συνθήκες καλλιέργειας δεν οδήγησαν σε καμία μεταβολή στον αριθμό των κυττάρων, όπως αυτός μετρήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® Aqueous One Solution Assay (Εικόνα 26).

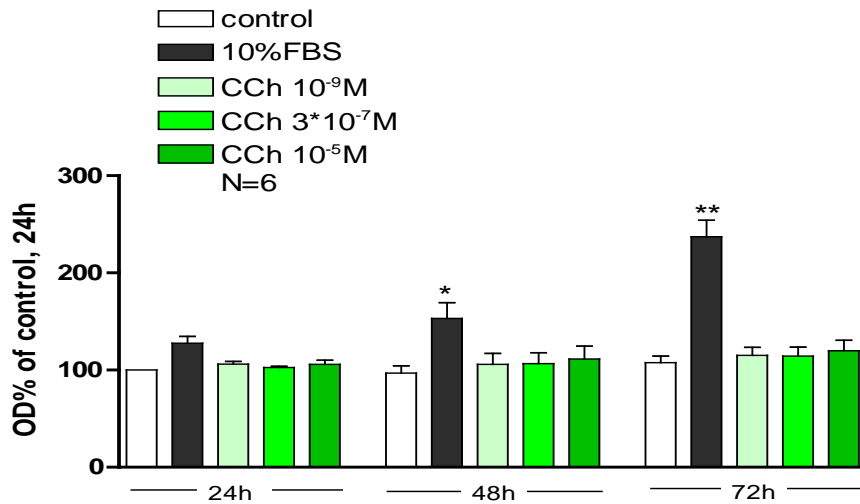
4.1.1.3 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον φαινότυπο ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Παρόλο που η επώαση των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με τους μουσκαρινικούς αγωνιστές ακετυλοχολίνη και καρβαχόλη δεν επηρέασε τον αριθμό των κυττάρων, παρατηρήθηκε επίδρασή τους στη μορφολογία των κυττάρων (Εικόνα 27). Συγκεκριμένα, παρουσία ακετυλοχολίνης 10^{-7} M ή καρβαχόλης 10^{-9} M τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού απέκτησαν τον ‘συνθετικό’ φαινότυπο, που εμφάνιζαν κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS, μετά από 30 ημέρες επώασης. Οι παρατηρούμενες μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων ήταν ορατές από τις πρώτες 48 ώρες της επώασης και γινόταν πιο εμφανείς σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, καθώς εξαρτώνται από τον χρόνο της επώασης.



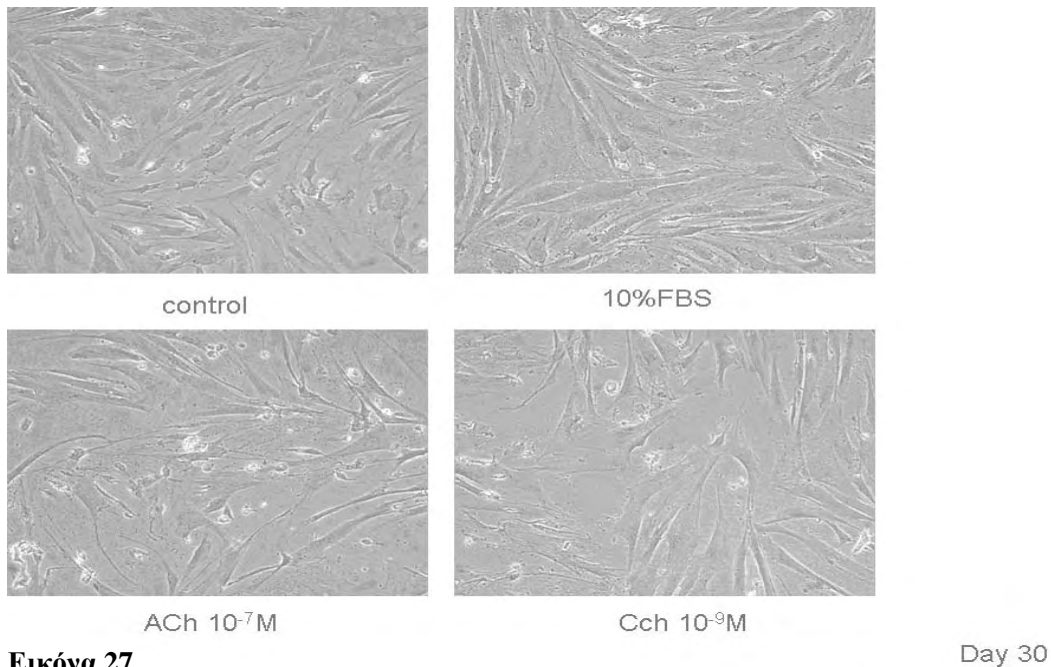
Εικόνα 25.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καρβαχόλης (CCh) στην ενσωμάτωση methyl-[3 H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01. σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 26.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καρβαχόλης (CCh) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

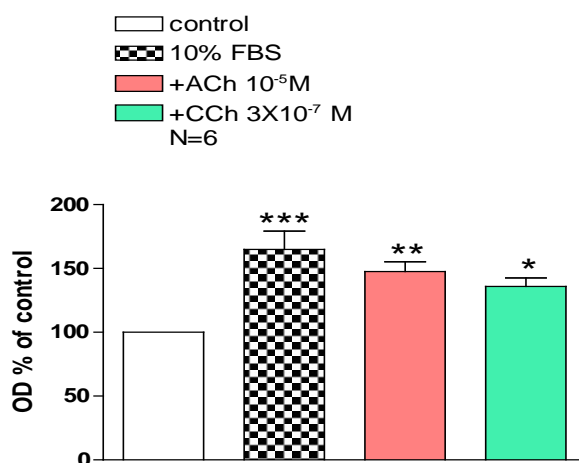


Εικόνα 27.

Επίδραση ακετυλοχολίνης ή καρβαχόλης, μετά από 30 ημέρες επώασης, στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τα οποία έχουν υποστεί στέρηση ορού για 7 ημέρες.

4.1.1.4 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, μετά από παρατεταμένη στέρηση ορού.

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η στέρηση ορού προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τον 'συσταλτό' φαινότυπο (3, 4), αλλά και της έκφρασης M3 μουσκαρινικών υποδοχέων (5), σε καλλιέργειες ΛΜΚ αεραγωγών. Έτσι, ελέγχθηκε η επίδραση της ακετυλοχολίνης και της καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 7 ημέρες. Πράγματι, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές είχαν διαφορετική επίδραση στα κύτταρα αυτά, καθώς αύξησαν στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό τους (Εικόνα 28).



Εικόνα 28.

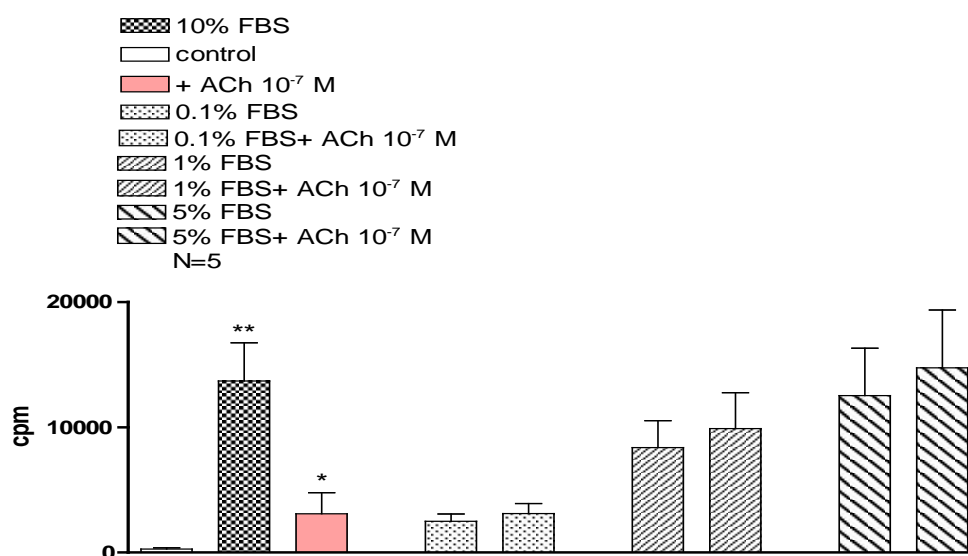
Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) ή καρβαχόλης (CCh), μετά από 72h επώασης, στον αριθμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τα οποία έχουν υποστεί στέρηση ορού για 7 ημέρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

4.1.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

4.1.2.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη 10^{-7} M, παρουσία 0.1, 1, 5% ορού για 48 ώρες και μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης, δεν

ανιχνεύθηκε συνεργική επίδραση της ακετυλοχολίνης και του ορού στην ενσωμάτωση ραδιενέργειας (Εικόνα 29). Επιπλέον, επώαση των κυττάρων με τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετυλοχολίνης, παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων ορού για 24, 48, 72 ώρες, δεν προκάλεσε καμία συνεργική δράση των δύο παραγόντων, όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

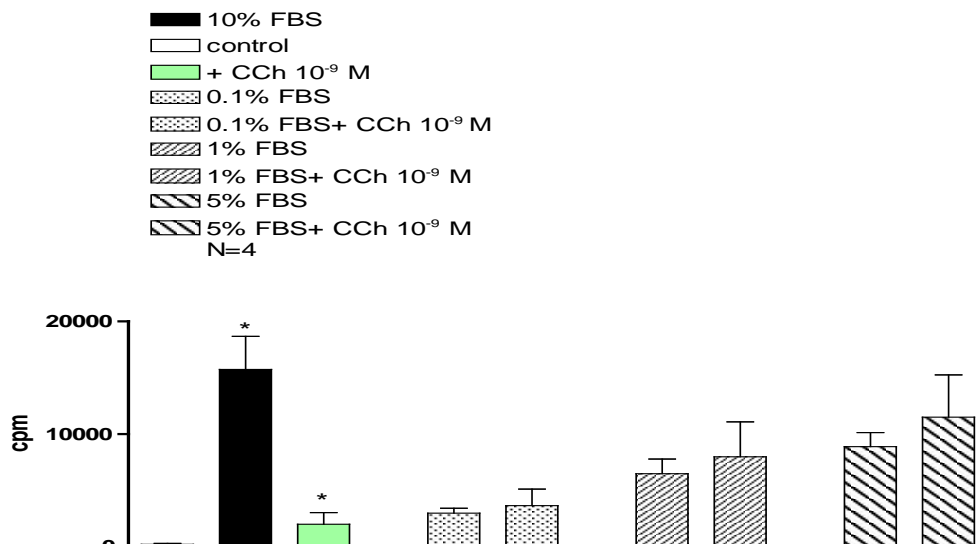


Εικόνα 29.

Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) (10^{-7} M), παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl- 3 H thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$. σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.1.2.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

Επώαση ΛΜΚ με καρβαχόλη 10^{-9} M, παρουσία ορού 0.1, 1 και 5% για 48 ώρες δεν εμφάνισε καμία συνεργική δράση ως προς την ενσωμάτωση της ραδιενέργειας, σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία της μικρότερης συγκέντρωσης καρβαχόλης και των διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού (Εικόνα 30). Παρόμοια, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με καρβαχόλη 10^{-9} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-5} M, παρουσία ορού (0.1, 1, 5%) για 24, 48, 72 ώρες, δεν παρατηρήθηκε καμία συνεργική δράση ως προς την αύξηση του αριθμού των κυττάρων, όπως αυτά μετρήθηκαν με την μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).



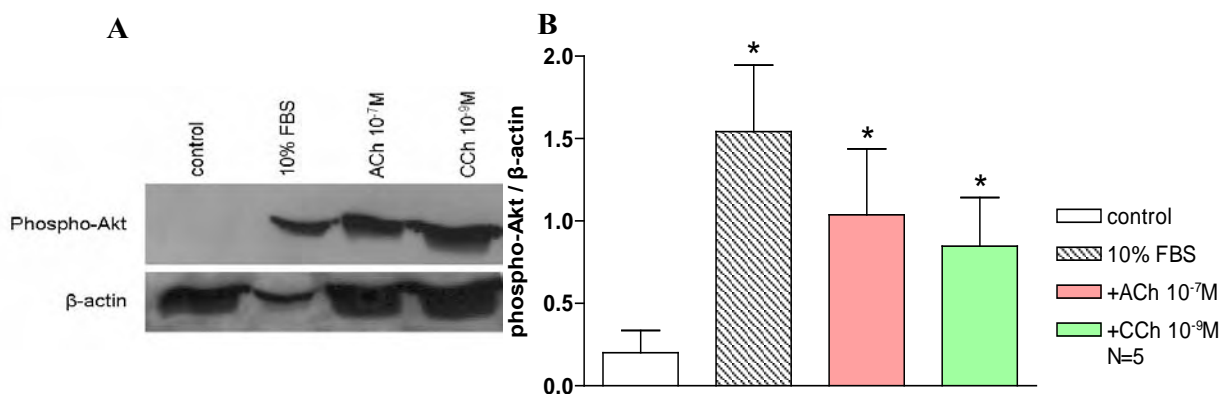
Εικόνα 30.

Επίδραση καρβαχόλης (CCh) (10^{-9} M), παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl- $[\text{^3H}]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.1.3 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από μουςκαρινικούς αγωνιστές.

4.1.3.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) από την ακετυλοχολίνη ή την καρβαχόλη σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Καθώς οι μουςκαρινικοί αγωνιστές (ακετυλοχολίνη, καρβαχόλη) οδήγησαν σε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενέργειας στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, διερευνήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη δράση τους αυτή. Αρχικά ελέγχθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K από την ακετυλοχολίνη και την καρβαχόλη με χρήση της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt πρωτεΐνης σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν για 4 ώρες με 10^{-7} M ακετυλοχολίνη ή 10^{-9} M καρβαχόλη. Η ακετυλοχολίνη και η καρβαχόλη ενεργοποίησαν το μονοπάτι της PI3K, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt. Ο λόγος phosho-Akt/ β -actin, που είναι ενδεικτικός της ποσότητας της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται, ήταν 0.2 ± 0.13 σε κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς ορό, 1.54 ± 0.4 σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS και 1.03 ± 0.39 , 0.84 ± 0.29 σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10^{-7} M ακετυλοχολίνη ή 10^{-9} M καρβαχόλη αντίστοιχα (Εικόνα 31).

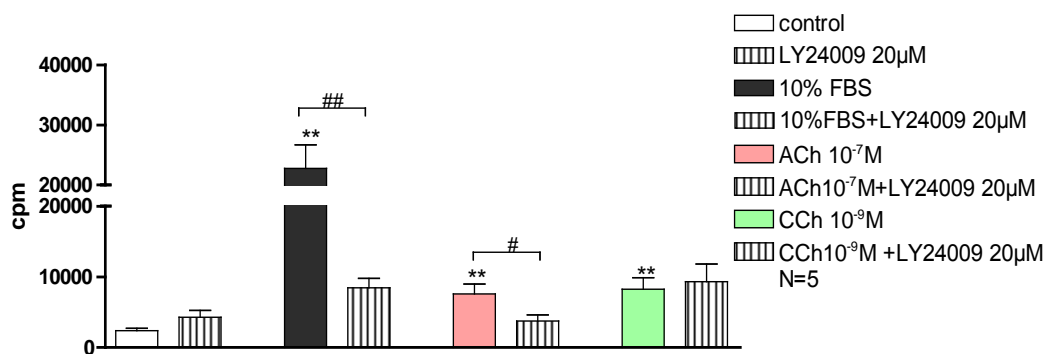


Εικόνα 31.

A. Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ακετυλοχολίνη (ACh) (10^{-7} M) ή καρβαχόλη (CCh) (10^{-9} M)

B. Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ακετυλοχολίνη (10^{-7} M) ή καρβαχόλη (10^{-9} M). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM) και μελετήθηκε η επίδραση της ακετυλοχολίνης και της καρβαχόλης, παρουσία του αναστολέα στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Το LY294002 (20μM) δεν είχε καμία επίδραση στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού για 48 ώρες. Αντιθέτως ελάττωσε σημαντικά την επαγομένη από 10%FBS ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης από 22764 ± 3927 σε 8434 ± 1364 cpm (η σύγκριση έγινε ανάμεσα σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό παρουσία του αναστολέα και σε κύτταρα που επώαστηκαν με σκέτο ορό). Η παρουσία του LY294002 (20μM) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ελάττωσε σημαντικά την ενσωμάτωση ραδιενέργειας που είχε επαχθεί από την ακετυλοχολίνη σε συγκέντρωση 10^{-7} M (Εικόνα 32). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ήταν 7597 ± 1376 και 3745 ± 873 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με 10^{-7} M ακετυλοχολίνη και 10^{-7} M ακετυλοχολίνη παρουσία 20μM LY294002 αντίστοιχα. Η παρουσία του αναστολέα της PI3K, LY294002, δεν είχε καμία επίδραση στην επαγομένη από 10^{-9} M καρβαχόλη ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης.

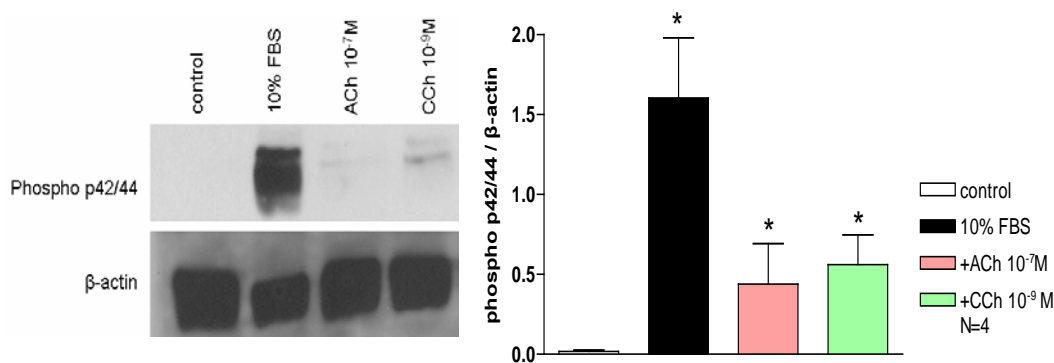


Εικόνα 32.

Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) (10^{-7} M) ή καρβαχόλης (CCh) (10^{-9} M), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20µM) στην ενσωμάτωση methyl-[3 H] thymidine σε ΑΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control, #P<0.05 και ##P<0.01 σε σύγκριση με την ακετυλοχολίνη ή το FBS μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.1.3.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών από την ακετυλοχολίνη ή την καρβαχόλη σε ΑΜΚ τραχείας κουνελιού.

Στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων εκτός από το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K εμπλέκεται και το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών. Η πιθανή ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού μελετήθηκε με την ανίχνευση της βασικής του πρωτεΐνης p42/44 στην φωσφορυλιωμένη-ενεργή μορφή της, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης από κύτταρα που είχαν επωαστεί για 4 ώρες με 10^{-7} M ακετυλοχολίνη ή 10^{-9} M καρβαχόλη. Και οι δύο μουσκαρινικοί αγωνιστές ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών καθώς ανιχνεύτηκε ποσότητα φωσφορυλιωμένης p42/44 πρωτεΐνης σε κύτταρα που επώαστηκαν με τους αγωνιστές αυτούς. Ο λόγος phosho-p42-44/ β -actin ήταν 0.017 ± 0.008 σε κύτταρα της ομάδας ελέγχου, 1.604 ± 0.37 σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και 0.438 ± 0.25 ή 0.561 ± 0.18 σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10^{-7} M ακετυλοχολίνη ή 10^{-9} M καρβαχόλη αντίστοιχα (Εικόνα 33).

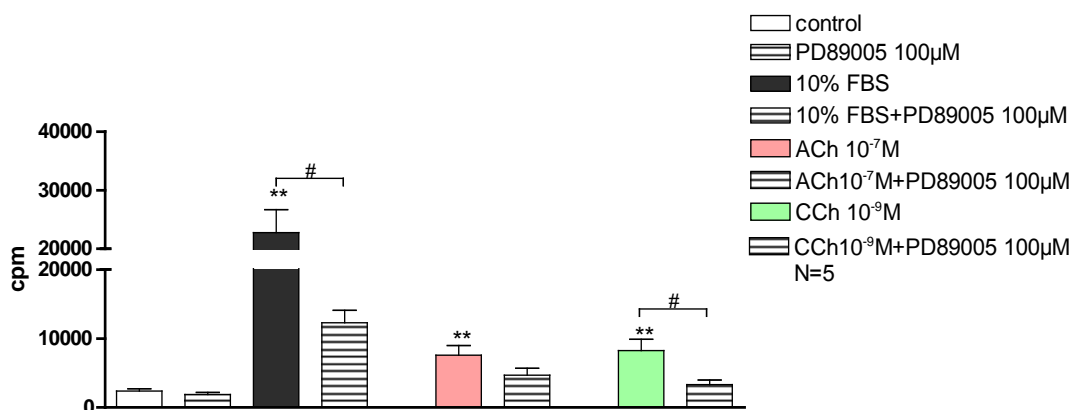


Εικόνα 33.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p42/44, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ακετυλοχολίνη (ACh) (10^{-7} M) ή καρβαχόλη (CCh) (10^{-9} M)

Ο λόγος phosho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ακετυλοχολίνη (10^{-7} M) ή καρβαχόλη (10^{-9} M). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της ακετυλοχολίνης και της καρβαχόλης παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAP κινασών, PD89005 (100μM). Ο αναστολέας δεν επηρέασε την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, αλλά ελάττωσε σημαντικά την επαγόμενη από 10% FBS ενσωμάτωση, από 22764 ± 3927 σε 12300 ± 1769 cpm. Παρουσία του PD89005 (100μM) ελαττώθηκε, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη (10^{-7} M) για 48 ώρες. Ωστόσο, παρουσία του PD89005, ελαττώθηκε σημαντικά η επαγόμενη από την καρβαχόλη (10^{-9} M) ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης (Εικόνα 34). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 8254 ± 1642 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με καρβαχόλη και 3325 ± 650 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με καρβαχόλη παρουσία του PD89005.



Εικόνα 34.

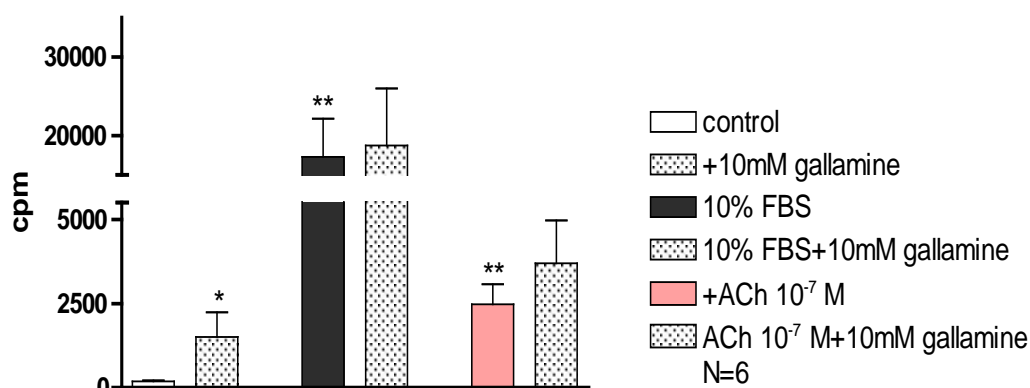
Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) ($10^{-7}M$) ή καρβαχόλης (CCh) ($10^{-9}M$), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100µM) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3H]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και ** $P<0.01$ σε σύγκριση με το control και # $P<0.05$ σε σύγκριση με την ακετυλοχολίνη ή το FBS μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.1.4 Επίδραση μουσκαρινικών ανταγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

4.1.4.1 Επίδραση γκαλαμίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επάγεται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές.

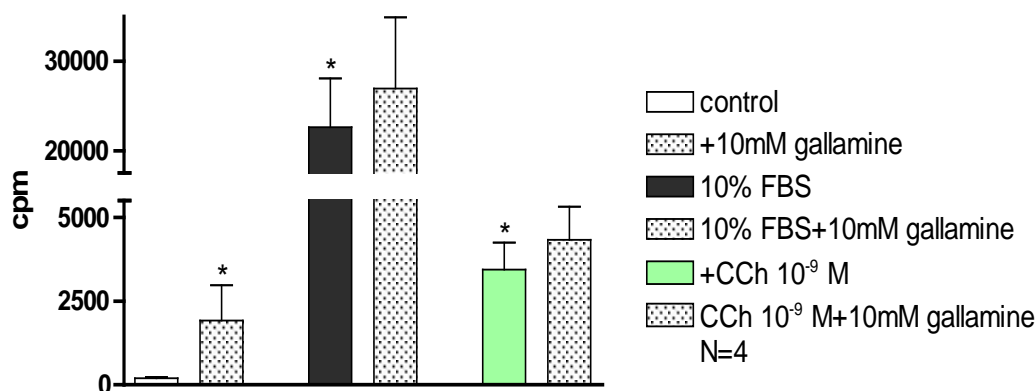
Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή εμπλοκή των M_2 υποδοχέων στην δράση των μουσκαρινικών αγωνιστών στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλλοστερικός ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων, γκαλαμίνη, σε συγκέντρωση $10^{-5}M$. Στη συγκέντρωση αυτή η γκαλαμίνη έχει δείχθει ότι παρεμποδίζει κυρίως τους M_2 μουσκαρινικούς υποδοχείς (3). Παρατηρήθηκε, ότι κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί για 48 ώρες μόνο με γκαλαμίνη εμφάνισαν αυξημένη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης από $188.6\pm 30.4cpm$ σε $1510\pm 730.7cpm$ (Εικόνα 35). Αντίθετα, η γκαλαμίνη δεν επηρέασε την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS (Εικόνα 35, Εικόνα 36).

Η γκαλαμίνη δεν επηρέασε την επαγόμενη από την ακετυλοχολίνη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης. Η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 2475 ± 601.3 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη και 3698 ± 1272 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη παρουσία γκαλαμίνης (Εικόνα 35). Παρόμοια, η γκαλαμίνη δεν ελάττωσε την επαγόμενη από την καρβαχόλη ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης (Εικόνα 36). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 3440 ± 809.9 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με καρβαχόλη και 4334 ± 983.7 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με καρβαχόλη παρουσία γκαλαμίνης.



Εικόνα 35.

Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) (10^{-7} M), παρουσία του ανταγωνιστή των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων, γκαλαμίνη (10mM) στην ενσωμάτωση methyl- 3 H thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



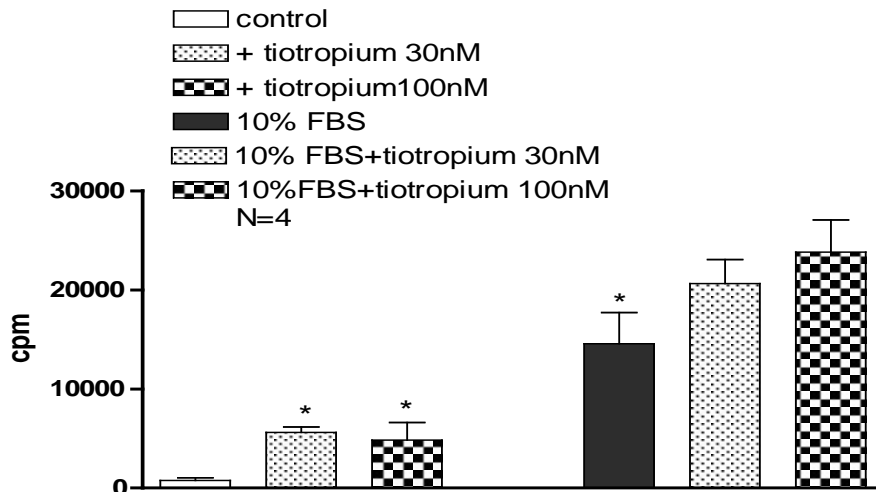
Εικόνα 36.

Επίδραση καρβαχόλης (CCh) (10^{-9} M), παρουσία του ανταγωνιστή των M₂ μουσκαρινικών υποδοχέων, γκαλαμίνη (10mM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.1.4.2 Επίδραση τιτροπίου στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επάγεται από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές

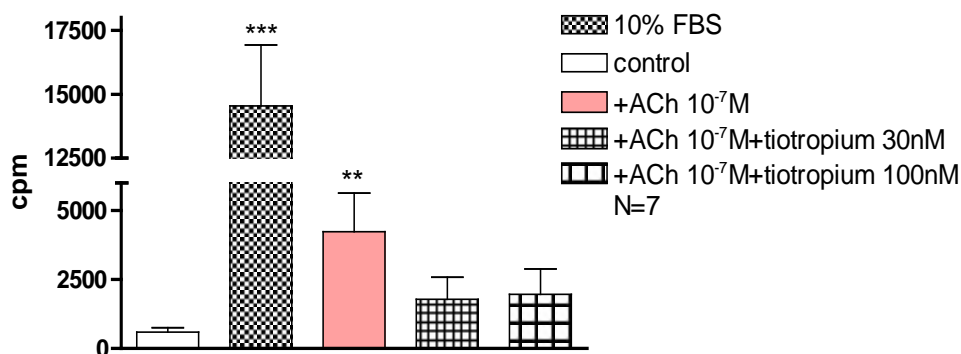
Το τιτροπίο είναι ανταγωνιστής των M₂ και M₃ μουσκαρινικών υποδοχέων. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με 30 nM ή 100nM τιτροπίο αυξήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης, από 672 ± 223 cpm, στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, σε 4449 ± 1427 cpm ή 4566 ± 1137 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν με τιτροπίο 30 nM ή 100nM αντίστοιχα. Η επίδραση αυτή του τιτροπίου φτάνει στο μέγιστο επίπεδο από τη συγκέντρωση 30nM. Σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10% ορό παρουσία τιτροπίου δεν εμφανίστηκε καμία διαφορά ως προς την ενσωμάτωση ραδιενεργού υλικού (Εικόνα 37).

Ωστόσο, η παρουσία του τιτροπίου (30 nM και 100nM) ελάττωσε, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, την ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που προκλήθηκε από την ακετυλοχολίνη (Εικόνα 38) ή καρβαχόλη (Εικόνα 39).



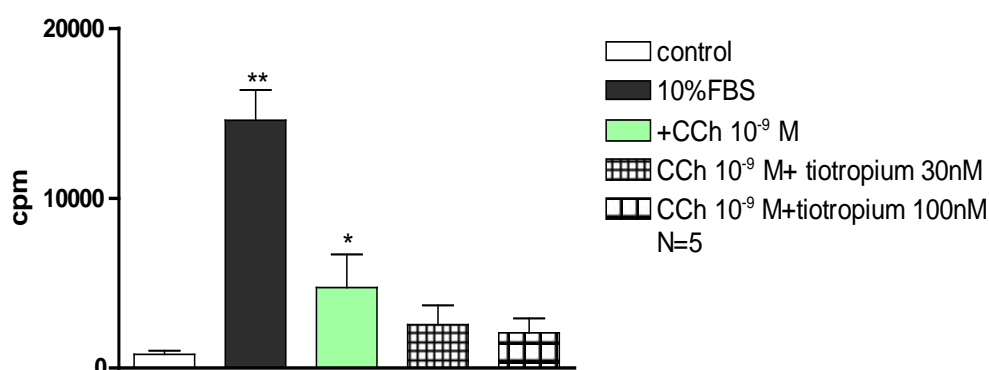
Εικόνα 37.

Επίδραση του ανταγωνιστή των M2-M3 μουσκαρινικών υποδοχέων, τιτροπίου (30nM, 100nM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 38.

Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) (10⁻⁷M) παρουσία του ανταγωνιστή των M2-M3 μουσκαρινικών υποδοχέων, τιτροπίου (30nM, 100nM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 39

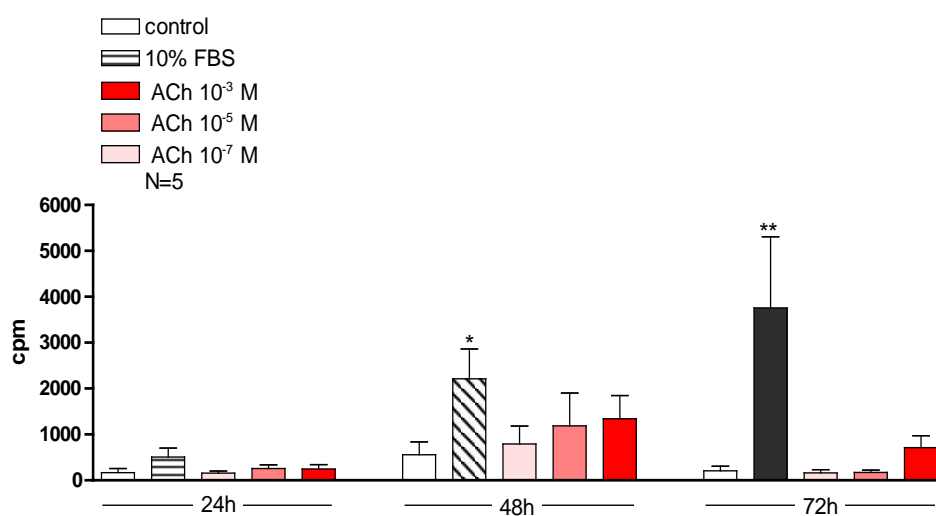
Επίδραση καρβαχόλης (CCh) (10^{-9}M) παρουσία του ανταγωνιστή των M2-M3 μουσκαρινικών υποδοχέων, τιοτρόπιο (30nM, 100nM) στην ενσωμάτωση methyl- $[\text{^3H}]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P<0.05$ και ** $P<0.01$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

4.2.1.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

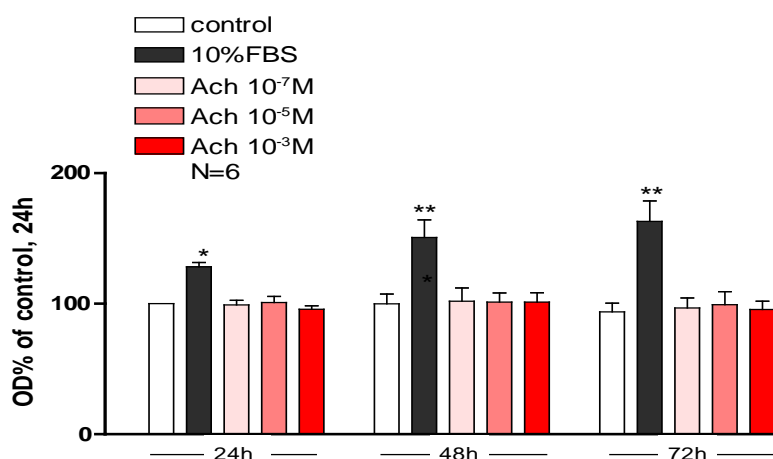
Μελετήθηκε η επίδραση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης (10^{-7}M , 10^{-5}M , 10^{-3}M) ή καρβαχόλης (10^{-9}M , $3*10^{-7}\text{M}$, 10^{-5}M) στην οπτική πυκνότητα των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν, όπως και στην περίπτωση των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, με βάση πειράματα συσπάσεων λείων μυικών ινών. Έχει βρεθεί λοιπόν, ότι οι συγκεντρώσεις 10^{-7}M ακετυλοχολίνης και 10^{-9}M καρβαχόλης είναι συγκεντρώσεις στις οποίες δεν παρατηρείται επίδραση στις συσπάσεις, οι συγκεντρώσεις 10^{-5}M ακετυλοχολίνης και $3*10^{-7}\text{M}$ καρβαχόλης αποτελούν συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται το μισό της μέγιστης επίδρασης των αγωνιστών αυτών στη σύσπαση (IC_{50}) και τέλος οι συγκεντρώσεις 10^{-3}M ακετυλοχολίνης και 10^{-5}M καρβαχόλης αποτελούν τις μέγιστες χρησιμοποιούμενες έτσι ώστε να παρατηρείται σύσπαση σε λείες μυικές ίνες ανθρώπινων αεραγωγών. Όταν μελετήθηκε η επίδραση των τριών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης στην

ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης, μετά από 24, 48 ή 72ώρες επώασης δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση της ενσωμάτωσης προκαλούμενη από την ακετυλοχολίνη (Εικόνα 40). Συγκεκριμένα, μετά από 48h επώασης η ενσωμάτωση ήταν 556 ± 282 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, 2210 ± 650 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και 1344 ± 504 cpm, 1185 ± 717 cpm ή 794 ± 389 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία ακετυλοχολίνης 10^{-7} M, 10^{-5} M ή 10^{-3} M αντίστοιχα. Επιπλέον, ο αριθμός των κυττάρων παρέμεινε αμετάβλητος στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας (Εικόνα 41).



Εικόνα 40.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης (ACh) στην ενσωμάτωση methyl-[3 H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$. σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

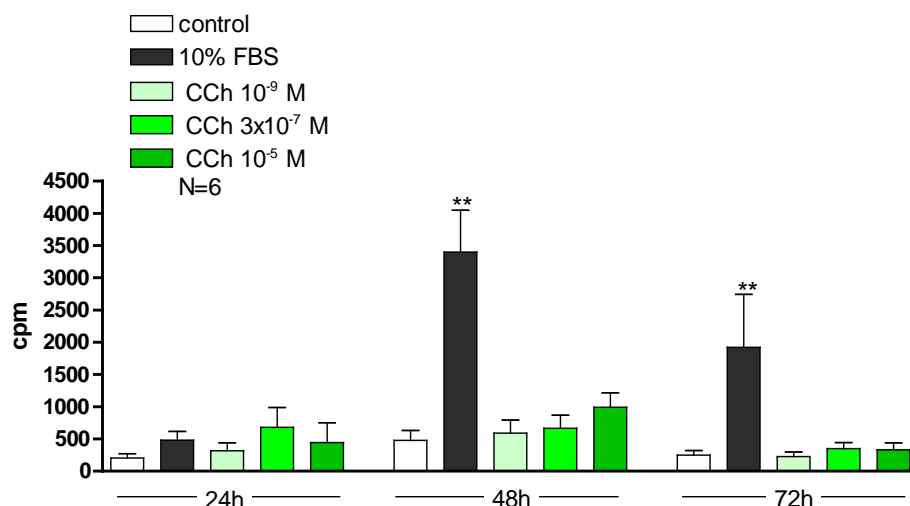


Εικόνα 41.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ακετυλοχολίνης (ACh) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

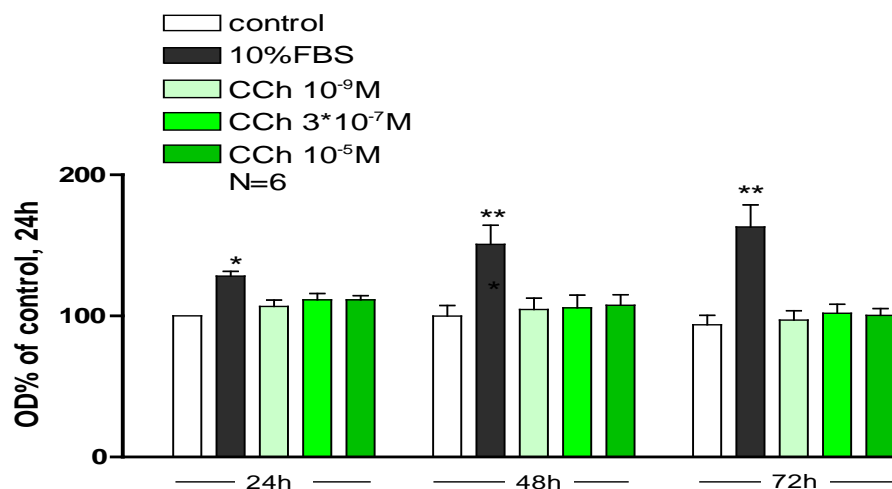
4.2.1.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις καρβαχόλης (10^{-9} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-5} M) για 24, 48, 72 ώρες. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν ανάλογα με αυτά που παρουσίασε η ακετυλοχολίνη. Δηλαδή δεν εμφανίστηκε καμία αύξηση της ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης ή του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 42, 43). Ενδεικτικά μετά από 48h επώασης με τις τρεις συγκεντρώσεις της καρβαχόλης, η ενσωμάτωση ραδιενέργειας ήταν 365 ± 71 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, 3716 ± 802 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και 795 ± 247 cpm, 625 ± 248 cpm ή 885 ± 343 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία καρβαχόλης σε συγκεντρώσεις 10^{-9} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M ή 10^{-5} M αντίστοιχα.



Εικόνα 42.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καρβαχόλης (CCh) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01. σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



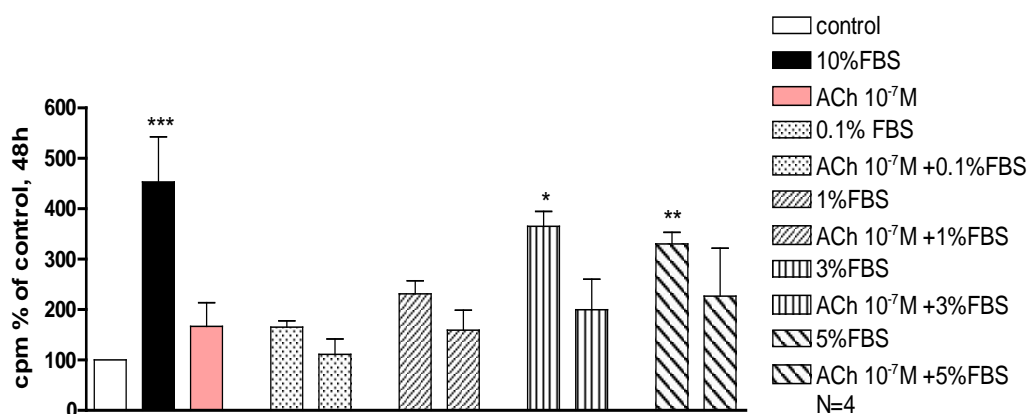
Εικόνα 43.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καρβαχόλης (CCh) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

4.2.2 Επίδραση μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

4.2.2.1 Επίδραση ακετυλοχολίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

Η επώαση των κυττάρων με ακετυλοχολίνη ($10^{-7}M$) παρουσία 0.1%, 1% ή 5% ορού για 48ώρες, δεν οδήγησε σε καμία συνεργική δράση των δύο παραγόντων, δηλαδή της ακετυλοχολίνης και του ορού, καθώς η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης παρουσία ακετυλοχολίνης και ορού δεν άλλαξε σε σχέση με την επαγόμενη από τον ορό ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης (Εικόνα 44). Επιπλέον, η επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με ακετυλοχολίνη $10^{-7}M$, $10^{-5}M$ ή $10^{-3}M$, παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού για 24, 48, 72 ώρες δεν προκάλεσε κάποια αθροιστική δράση όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

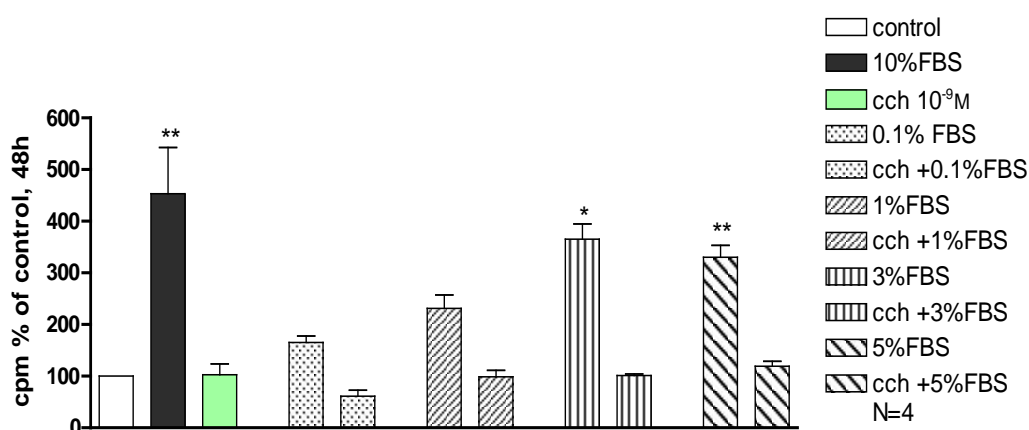


Εικόνα 44.

Επίδραση ακετυλοχολίνης (ACh) ($10^{-7}M$), παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl- $[^3H]$ thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

4.2.2.2 Επίδραση καρβαχόλης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού.

Επώαση ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με καρβαχόλη (10^{-9} M), παρουσία ορού (0,1, 1, 5%) για 48 ώρες, δεν προκάλεσε συνεργική δράση ως προς την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης, όπως και στην περίπτωση της ακετυλοχολίνης (Εικόνα 45). Η επώαση των κυττάρων με καρβαχόλη 10^{-9} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-5} M, παρουσία ορού για 24, 48, 72 ώρες δεν προκάλεσε αύξηση της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων, όπως αυτή μετρήθηκε με την μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay. Η οπτική πυκνότητα κυττάρων που επώαστηκαν με τον μουσκαρινικό αγωνιστή παρουσία ορού, φάνηκαν να ακολουθούν την επαγόμενη από τον ορό αύξηση (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).



Εικόνα 45.

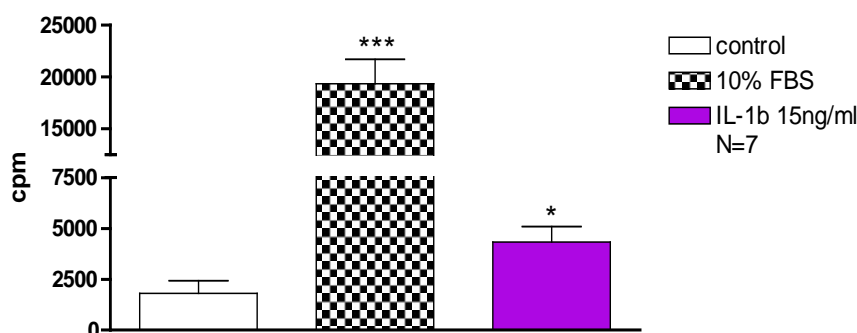
Επίδραση καρβαχόλης (CCh) (10^{-9} M), παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS στην ενσωμάτωση methyl- 3 H thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

5. Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων σε ΛΜΚ

5.1 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

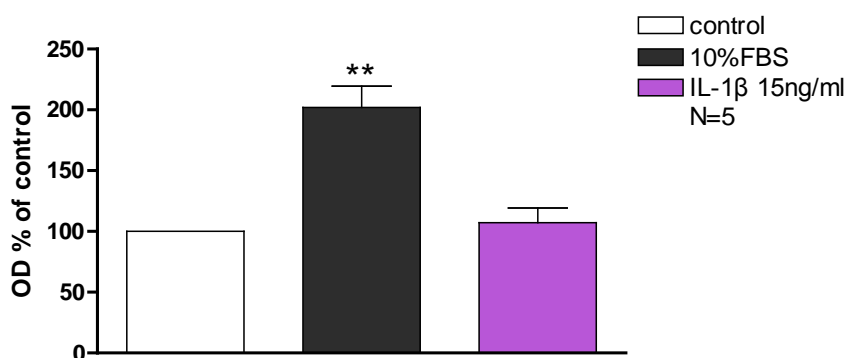
5.1.1 Επίδραση της ιντερλευκίνης 1β (interleukin 1β, IL-1β) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) για 48h αυξήθηκε σημαντικά η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης (Εικόνα 46). Συγκεκριμένα η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 1801 ± 634 cpm, 19361 ± 2342 cpm, και 4332 ± 758 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό χωρίς ορό, παρουσία 10% FBS ή παρουσία 15ng/ml ιντερλευκίνης-1β αντίστοιχα. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) για 7 h δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κυττάρων, όπως αυτός εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay (Εικόνα 47).



Εικόνα 46.

Επίδραση ιντερλευκίνης 1β (IL-1b) (15ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

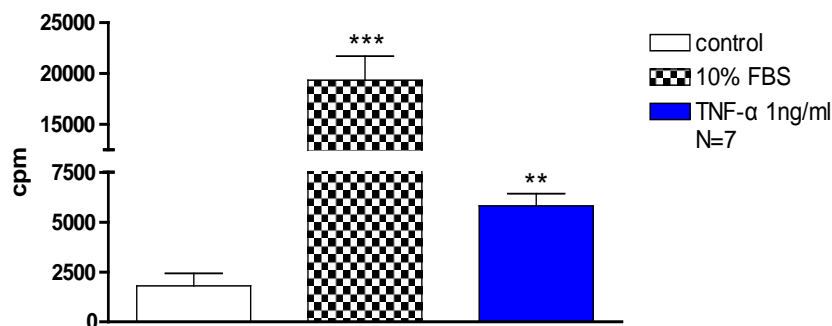


Εικόνα 47.

Επίδραση ιντερλευκίνης 1β (IL-1b) (15ng/ml), στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

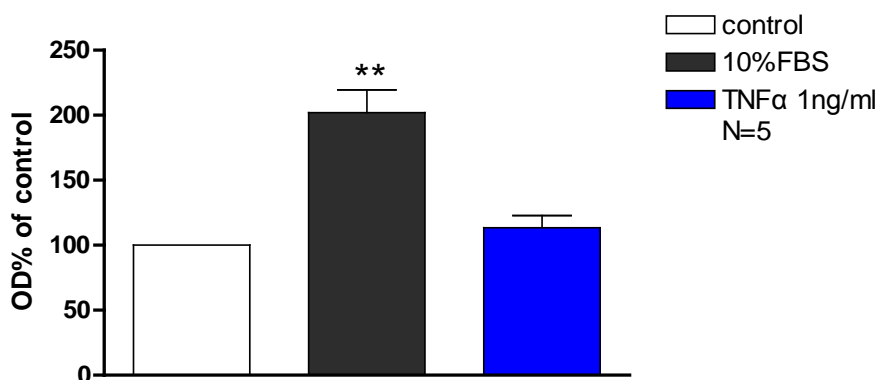
5.1.2 Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία TNF-α (1ng/ml) για 4 h παρατηρήθηκε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης από τα κύτταρα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 1801±634cpm, 19361±2342cpm, και 5824±604cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, παρουσία 10% FBS ή 1ng/ml TNF-α αντίστοιχα (Εικόνα 48). Η επώαση των κυττάρων παρουσία TNF-α (1ng/ml) για 7 h δεν επηρέασε τον αριθμό των κυττάρων όπως αυτός εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay (Εικόνα 49).



Εικόνα 48.

Επίδραση TNFα (1ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 49.

Επίδραση TNFα (1ng/ml), στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

5.1.3 Επίδραση των φλεγμονωδών παραγόντων ιντερλευκίνη 1β (interleukin 1β, IL-1β) και παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών.

Παρόλο που τόσο η ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) και ο TNF-α (1ng/ml), όσο και η ακετυλοχολίνη (10^{-7} M) ή η καρβαχόλη (10^{-9} M) από μόνες τους αύξησαν σημαντικά την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε καμία συνεργική επίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων (Πίνακας 1). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην μετρούμενη οπτική πυκνότητα κυττάρων που είχαν επωαστεί ταυτόχρονα με τους μουσκαρινικούς αγωνιστές και την ιντερλευκίνη 1β ή τον TNF-α αντίστοιχα (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).

παράγοντας	ΛΜΚ τραχείας κουνελιού
control	1050±291 cpm (N=4)
10% FBS	22579±3375 cpm (N=4)*
+ACh 10^{-7} M	6465±1405 cpm (N=4)*
+CCh 10^{-9} M	4588±1327 cpm (N=4)*
+IL-1β 15ng/ml	4534±760 cpm (N=4)*
+IL-1β 15ng/ml+ ACh 10^{-7} M	4109±484 cpm (N=4)
+IL-1β 15ng/ml+ CCh 10^{-9} M	4062±837 cpm (N=4)
+TNF-α 1ng/ml	7000±426 cpm (N=4)*
+TNF-α 1ng/ml+ACh 10^{-7} M	7133±2163 cpm (N=4)
+TNF-α 1ng/ml+CCh 10^{-9} M	5294±1021 cpm (N=4)

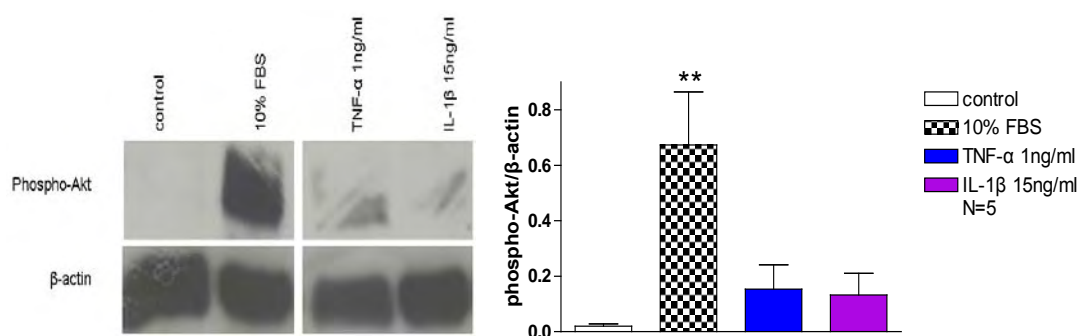
Πίνακας 1.

Η επίδραση των κυτοκινών ιντερλευκίνη-1β (IL-1 β, 15 ng/ml) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor α, TNF- α, 1ng/ml) σε απουσία ή παρουσία ακετυλοχολίνης (ACh, 10^{-7} M) ή καρβαχόλης (CCh, 10^{-9} M) στην ενσωμάτωση 3 [H]-θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SEM και το N αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, **P<0.01 σε σύγκριση με το control

5.1.4 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από φλεγμονώδεις παράγοντες σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

5.1.4.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλϊνοσιτόλης (PI3K) από την ιντερλευκίνη 1β (interleukin 1β, IL-1β) ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Εφόσον παρατηρήθηκε ότι η ιντερλευκίνη 1β και ο TNF-α προκάλεσαν αύξηση στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης από κύτταρα που επώαστηκαν με τους παραπάνω παράγοντες, μελετήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K από τους παράγοντες αυτούς. Με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν με τους παραπάνω παράγοντες ανιχνεύτηκε μικρή ποσότητα της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt πρωτεΐνης. Η ποσότητα της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt πρωτεΐνης δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την ποσότητα που ανιχνεύτηκε σε κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ορού, όπως φαίνεται από τον λόγο φωσφορυλιωμένης Akt/β-actin (Εικόνα 50).

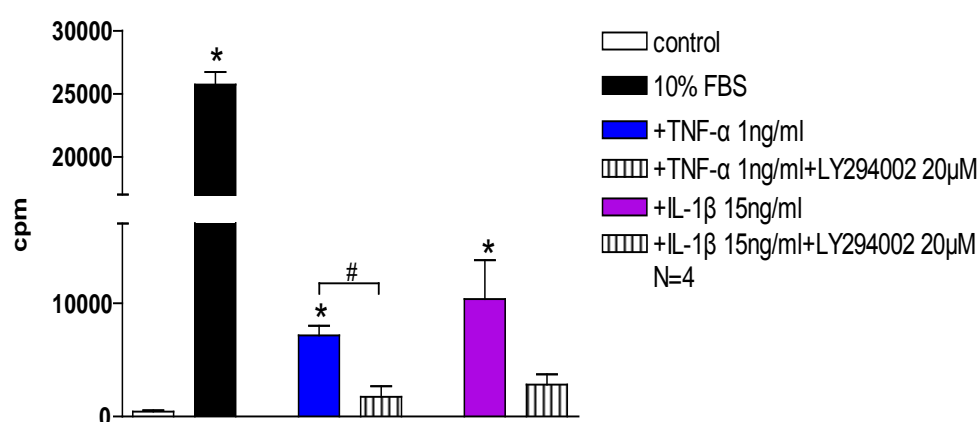


Εικόνα 50.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (IL-1b) (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml)

Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml) Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της ιντερλευκίνης 1β και του TNF-α στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με τους φλεγμονώδεις παράγοντες παρουσία του αναστολέα και παρατηρήθηκε ότι ελαττώθηκε σημαντικά η επαγόμενη από τον TNF-α (1ng/ml) ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης (7165±826.5 απουσία και 1742±946.9 παρουσία του αναστολέα), αλλά όσον αφορά την επαγόμενη από την ιντερλευκίνη 1β ενσωμάτωση να μην ελαττώθηκε, αλλά η μείωσή της δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (10353±3431 απουσία και 2815±924.3 παρουσία του αναστολέα) (Εικόνα 51).



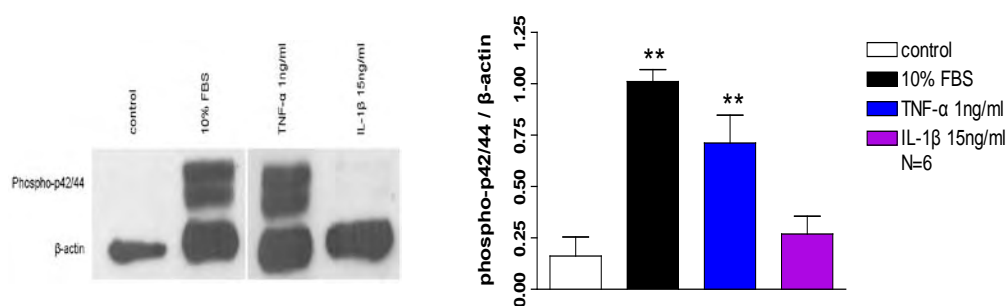
Εικόνα 51.

Επίδραση ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) (15ng/ml) ή TNF α (1ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20μM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control και #P<0,05 σε σύγκριση με τον TNF α μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

5.1.4.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης των MAP κινασών από την ιντερλευκίνη 1β (interleukin 1β, IL-1β) ή τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Μελετήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση δύο διαφορετικών μονοπατιών των MAP κινασών, το μονοπάτι της p42/44 και το μονοπάτι της p38 πρωτεΐνης. Ανιχνεύτηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western οι φωσφορυλιωμένες μορφές των δύο αυτών πρωτεϊνών. Η ανίχνευση έγινε σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν για 4 ώρες με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) και TNF-α (1ng/ml).

Παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του μονοπατιού της p42/44 μόνο από τον TNF-α και της p38 από τον TNF-α και την ιντερλευκίνη 1β. Συγκεκριμένα, ο λόγος φωσφορυλιωμένης p42/44 / β-actin ήταν 0.711 ± 0.13 για τον TNF-α και 0.162 ± 0.092 σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού (Εικόνα 52). Ο λόγος p38/β-actin ήταν 0.255 ± 0.118 και 0.209 ± 0.036 σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία TNF-α ή ιντερλευκίνη 1β αντίστοιχα (Εικόνα 53).



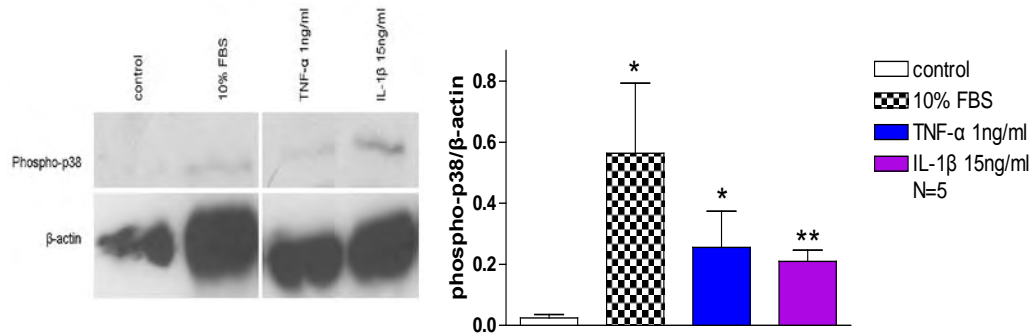
Εικόνα 52.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p42/44, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml)

Ο λόγος phosho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml) Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών μελετήθηκε περαιτέρω με χρήση του αναστολέα του μονοπατιού, PD89005 (100μM). Τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν με τους φλεγμονώδεις παράγοντες παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAP κινασών για 48 ώρες και μετρήθηκε η ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική ελάττωση της επαγόμενης από τον TNF-α της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα από 7165 ± 826.5 cpm σε 3455 ± 1055 cpm παρουσία και του αναστολέα. Επίσης μείωση παρατηρήθηκε στην επαγόμενη από την ιντερλευκίνη 1β ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα κύτταρα παρουσία του PD89005 αν και η μείωση αυτή δεν ήταν

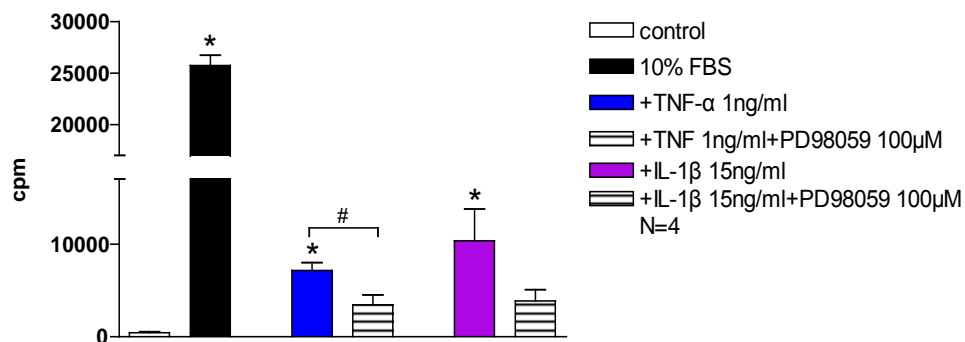
στατιστικά σημαντική (10353 ± 3431 cpm απουσία και 3866 ± 1213 cpm παρουσία του αναστολέα) (Εικόνα 54).



Εικόνα 53.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p38, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml)

Ο λόγος phospho-p38/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) ή με TNF α (1ng/ml) Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



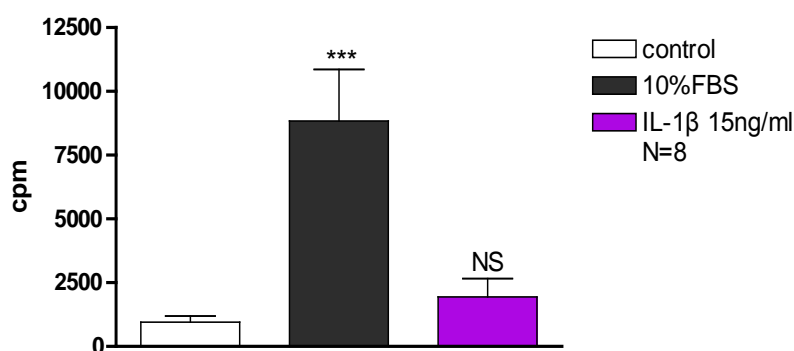
Εικόνα 54.

Επίδραση ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) (15ng/ml) ή TNF α (1ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100μM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control και #P<0,05 σε σύγκριση με τον TNF α μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

5.2 Επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

5.2.1 Επίδραση της ιντερλευκίνης 1β (interleukin 1β, IL 1β) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

Όταν ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων επώαστηκαν με την ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) για 48h δεν αυξήθηκε σημαντικά η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης (Εικόνα 55). Παρόμοια όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ιντερλευκίνη 1β (15ng/ml) για 72h δεν παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των κυττάρων , όπως αυτός εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® Aqueous One Solution Assay (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται).



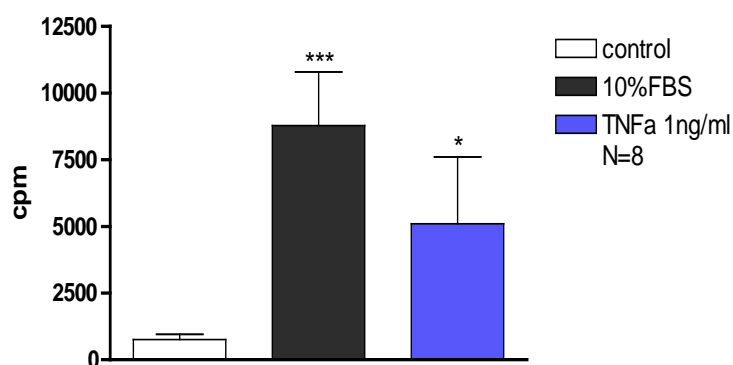
Εικόνα 55.

Επίδραση ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) (15ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

5.2.2 Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

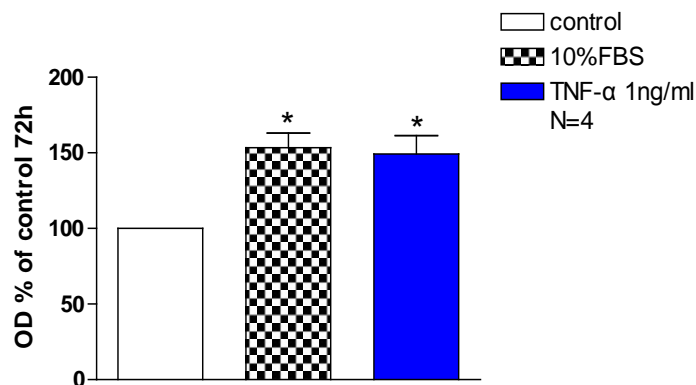
Όταν τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν με TNF-α (1ng/ml) για 48h παρατηρήθηκε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης από 754±198cpm στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία ορού σε 8782±2011cpm, και 5105±2500 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS ή 1ng/ml TNF-α

αντίστοιχα (Εικόνα 56). Η επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου για 72h παρουσία 1ng/ml TNF- α προκάλεσε την αύξηση του αριθμού των κυττάρων όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay (Εικόνα 57). Συγκεκριμένα, η αύξηση η οπτική πυκνότητα ήταν $153.4 \pm 9.71\%$ και $149.2 \pm 12.27\%$ της οπτικής πυκνότητας της ομάδας ελέγχου σε κύτταρα που επωάστηκαν με 10% FBS και 1ng/ml TNF- α , αντίστοιχα.



Εικόνα 56.

Επίδραση TNF α (1ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[^3H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 57.

Επίδραση TNF α (1ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

5.2.3 Επίδραση των φλεγμονωδών παραγόντων ιντερλευκίνη 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) και παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α , TNF- α) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών.

Ταυτόχρονη επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με ιντερλευκίνη 1 β (15ng/ml) ή με TNF- α (1ng/ml), και ακετυλοχολίνη (10^{-7} M) ή καρβαχόλη (10^{-9} M) δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης (Πίνακας 2), μετά από 48 ώρες επώασης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται), παρόλο που ο TNF- α (1ng/ml) από μόνος του αύξησε σημαντικά τόσο την ενσωμάτωση methyl- 3 [H] θυμιδίνης, μετά από 48h επώασης, όσο και τον αριθμό των κυττάρων εκτιμώμενο με την μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay, μετά από 72h επώασης, σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Παράγοντας	ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου
control	1084±318cpm (N=6)
10% FBS	9580±2609cpm (N=6)**
+ACh 10 ⁻⁷ M	1956±550 cpm (N=6)
+CCh 10 ⁻⁹ M	2485± 636 cpm (N=6)
+IL-1β 15ng/ml	2196±718 cpm (N=5)*
+IL-1β 15ng/ml+ ACh 10 ⁻⁷ M	1141±368 cpm (N=5)
+IL-1β 15ng/ml+ CCh 10 ⁻⁹ M	2072±422 cpm (N=5)
+TNF-α 1ng/ml	8421±3393cpm (N=5)*
+TNF-α 1ng/ml+ACh 10 ⁻⁷ M	1745±332cpm (N=5)
+TNF-α 1ng/ml+CCh 10 ⁻⁹ M	1447±71cpm (N=5)

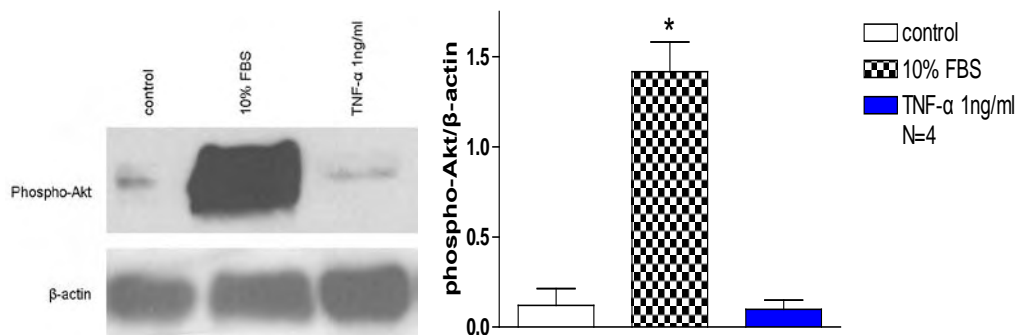
Πίνακας 2.

Η επίδραση των κυτοκινών ιντερλευκίνη-1β (IL-1 β, 15 ng/ml) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor α, TNF- α, 1ng/ml) σε απουσία ή παρουσία ακετυλοχολίνης (ACh, 10⁻⁷M) ή καρβαχόλης (CCh, 10⁻⁹M) στην ενσωμάτωση 3[H]-θυμιδίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SEM και το N αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ανανεζάρτητων πειραμάτων. *P<0.05,* *P<0.01 σε σύγκριση με το control.

5.2.4 Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από φλεγμονώδεις παράγοντες σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

5.2.4.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτιόλης (PI3K) από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF- α) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K από τον TNF-α (1ng/ml), καθώς μόνο αυτός, από τους δύο φλεγμονώδεις παράγοντες που μελετήθηκαν, προκάλεσε πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Ωστόσο, σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν για 4 ώρες με τον TNF-α δεν παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλιωμένης Akt πρωτεΐνης, όπως φάνηκε και από τον λόγο phospho-Akt/β-actin, που είναι ενδεικτικός της ποσότητας της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται με ανάλυση ολικής πρωτεΐνης εκχυλισμάτων κατά Western και ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 58).



Εικόνα 58.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επωάστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml)

Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επωάστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

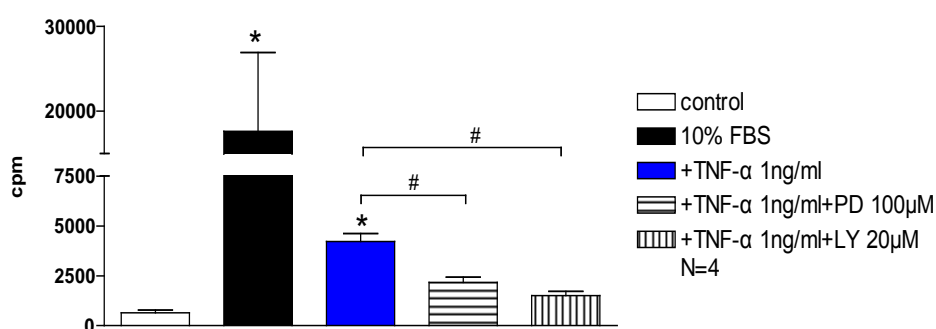
Η μελέτη του συγκεκριμένου μονοπατιού συνεχίστηκε με τη χρήση του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 ή 48 ώρες με τον TNF-α (1ng/ml) παρουσία του αναστολέα και παρατηρήθηκε ότι ελαττώθηκε τόσο η επαγόμενη από τον TNF-α (1ng/ml) ενσωμάτωση της τριτιωμένης θυμιδίνης θ και η επαγόμενη από το νίδιο παράγο ν αύξηση της οπικής πυκνότητας των κυττάρων (από 4213 ± 409.4 cpm σε 807.2 ± 195.8 cpm και από $167.2 \pm 15.12\%$ σε $75.8 \pm 9.14\%$ OD απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα) (Εικόνα 59, 60).

5.2.4.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor α, TNF-α) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη του μονοπατιού των MAP κινασών και συγκεκριμένα του μονοπατιού της p42/44 και της p38 MAP κινάσης. Τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επωάστηκαν για 4 ώρες με TNF-α (1ng/ml) και τα εκχυλίσματά ολικής πρωτεΐνης μελετήθηκαν με ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα κατά της φωσφορυλιωμένης p42/44 και της φωσφορυλιωμένης p38 πρωτεΐνης. Παρουσία TNF-α (1ng/ml) παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλιωμένης p42/44 (Εικόνα 61), αλλά όχι της p38 πρωτεΐνης (Εικόνα 62). Ο λόγος της phospho-

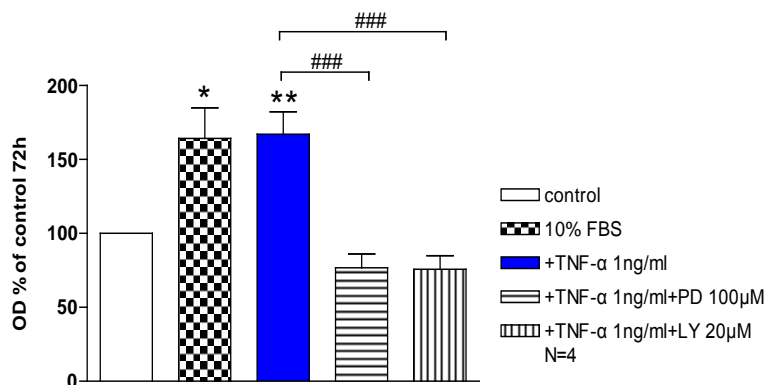
p42/44 / β -actin ήταν 0.242 ± 0.03 σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και 0.44 ± 0.04 σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία TNF- α (1ng/ml).

Περαιτέρω μελέτη του μονοπατιού των MAP κινασών έγινε με την επώαση των κυττάρων παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού PD89005 (100 μ M). Τόσο η ενσωμάτωση methyl- 3 [H]θυμιδίνης, όσο και η μετρούμενη οπτική πυκνότητα από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον TNF α ελαττώθηκαν στατιστικά σημαντικά παρουσία και του αναστολέα (από $4213\pm 409,4$ σε $2172\pm 256,2$ cpm και από $167,2\pm 15,12$ σε $76,74\pm 9,8\%$ OD απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα) (Εικόνα 59, 60).



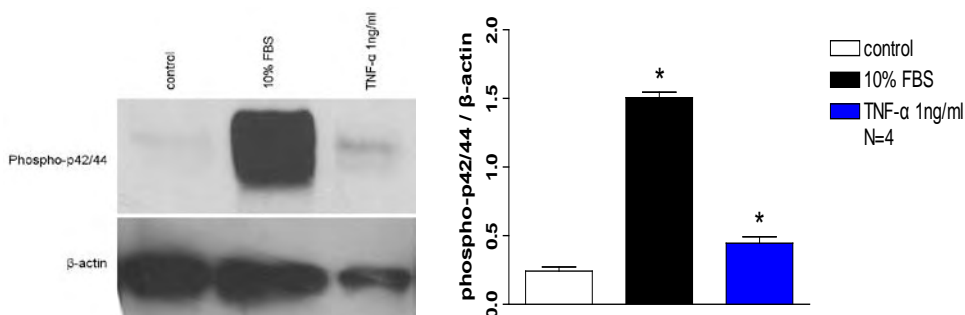
Εικόνα 59.

Επίδραση TNF α (1ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100 μ M) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20 μ M) στην ενσωμάτωση methyl- 3 [H] thymidine σε ΛMK βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, σε σύγκριση με το control και #P<0.05 σε σύγκριση με τον TNF α μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 60.

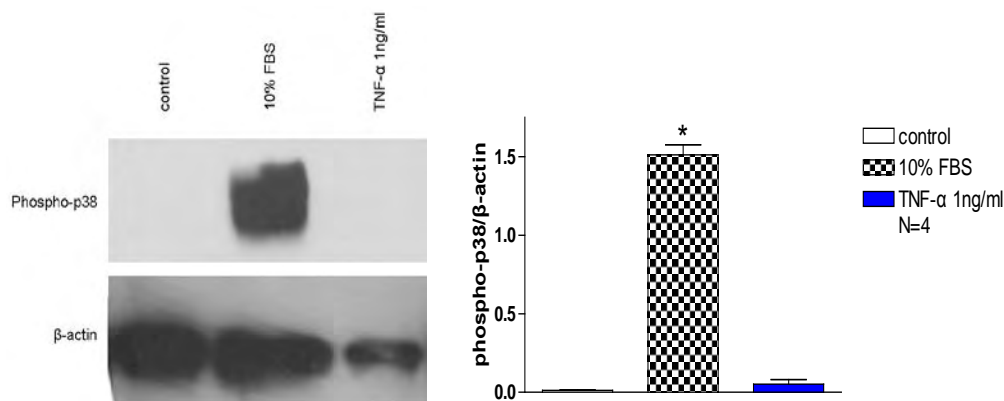
Επίδραση TNF α (1ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100μM) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20μM) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control και ###P<0.001 σε σύγκριση με τον TNF α μόνο του (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)



Εικόνα 61.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p42/44, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επωάστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml)

Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επωάστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml) Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 62.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p38, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml)

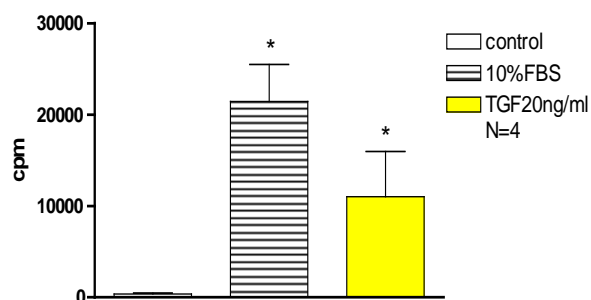
Ο λόγος phospho-p38/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TNF α (1ng/ml) Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

6. Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ

6.1. Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

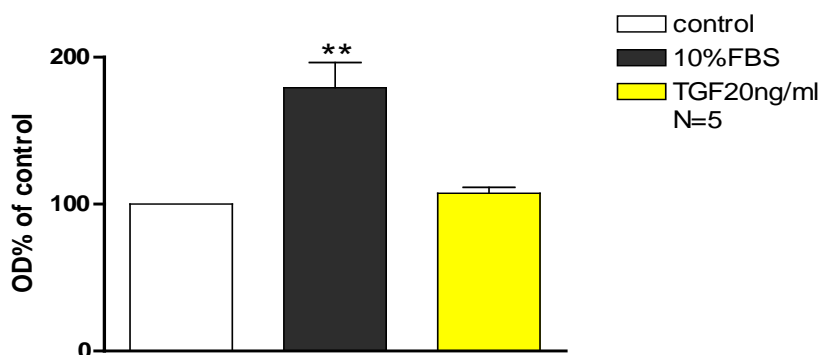
6.1.1 Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor , TGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Ο παράγοντας TGF ανήκει στους αυξητικούς παράγοντες που έχουν δειχθεί ότι παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό κυττάρων του αναπνευστικού και μεταξύ αυτών και των ΛΜΚ των αεραγωγών. Όταν ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν με TGF (20ng/ml) για 48 ώρες, παρατηρήθηκε αύξηση στην ενσωμάτωση της ραδιενέργειας (Εικόνα 63). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 723.3 ± 287.1 cpm, 27912 ± 5443 cpm και 6504 ± 824.6 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ορού, 10% FBS και TGF (20ng/ml) αντίστοιχα. Ωστόσο, ο ίδιος παράγοντας δεν προκάλεσε καμία αύξηση της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας, που αναλογεί στον αριθμό των κυττάρων και μετρήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® Aqueous One Solution Assay, μετά από 72h επώασης (Εικόνα 64).



Εικόνα 63.

Επίδραση TGF (20ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

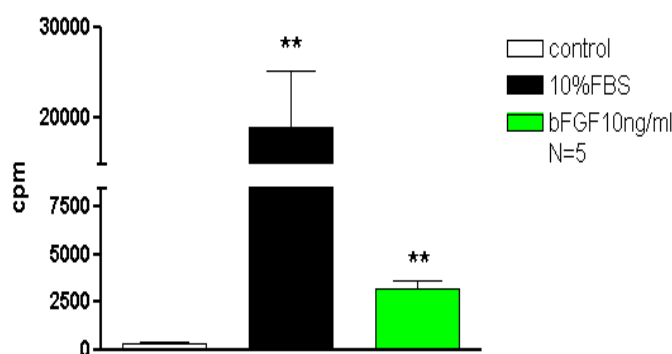


Εικόνα 64.

Επίδραση TGF (20ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

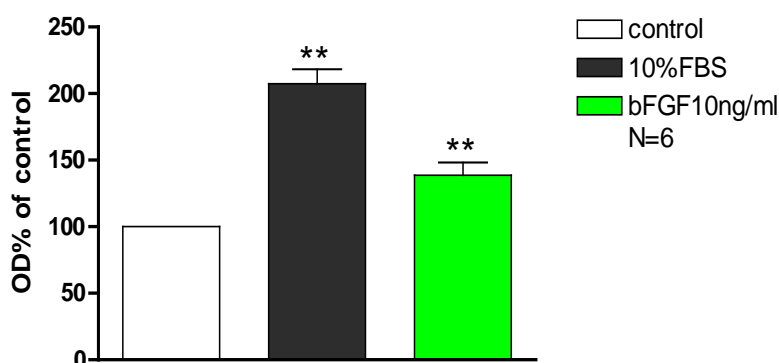
6.1.2. Επίδραση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Οι ινοβλάστες αποτελούν στενά συγγενικό κυτταρικό τύπο με τα ΛΜΚ, παρουσιάζοντας πολλές ομοιότητες μορφολογικές και βιοχημικές. Είναι επομένως αναμενόμενο οι αυξητικοί παράγοντες που επηρεάζουν και συγκεκριμένα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών να επιδρούν και στα ΛΜΚ. Όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με bFGF (10ng/ml) για 48 ώρες, η ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης αυξήθηκε (Εικόνα 65). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 284 ± 73 cpm, 20295 ± 5160 cpm και 7562 ± 4383 cpm σε κύτταρα που επωάστηκαν απουσία ορού, παρουσία 10% FBS ή 10ng/ml bFGF αντίστοιχα. Επίσης, όταν τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επωάστηκαν για 72 ώρες με τον ίδιο αυξητικό παράγοντα, ο αριθμός τους αυξήθηκε, σε σύγκριση με κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, σε ποσοστό $207.3 \pm 10.83\%$ σε κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία 10%FBS και σε $138.7 \pm 9.56\%$ σε κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία bFGF (10ng/ml) (Εικόνα 66).



Εικόνα 65.

Επίδραση bFGF (10ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl- $[^3\text{H}]$ thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P < 0.01$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

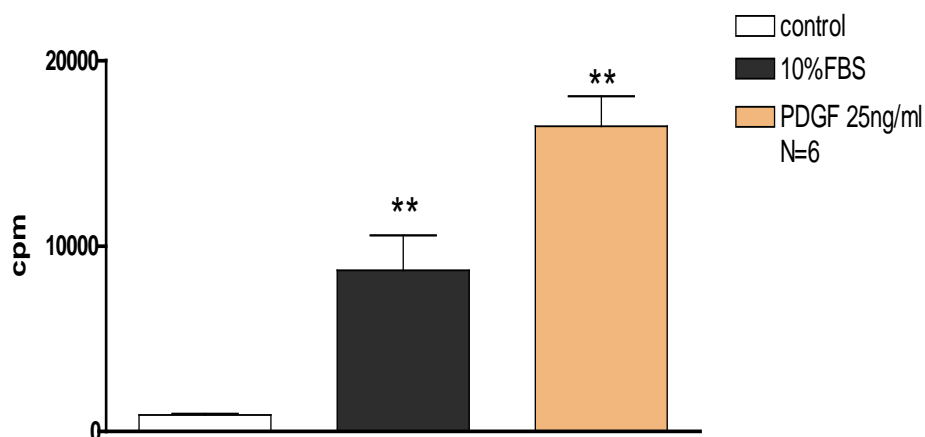


Εικόνα 66.

Επίδραση bFGF (10ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

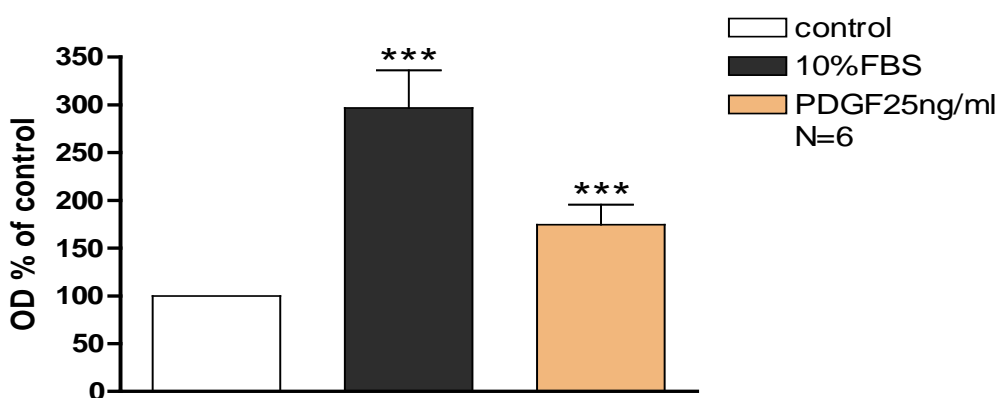
6.1.3. Επίδραση του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Η επώαση των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με τον αυξητικό παράγοντα PDGF (25ng/ml) για 48h αύξησε σημαντικά την ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης από 723.3 ± 287.1 cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό σε 21278 ± 1565 στα κύτταρα που επώαστηκαν με τον PDGF (Εικόνα 67). Επιπλέον, επώαση των κυττάρων για 72 ώρες, με τους ίδιους παράγοντες αύξησε σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκε με την μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay, σε ποσοστό της οπτικής πυκνότητας σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, σε $174.5 \pm 21.06\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με PDGF (25ng/ml) (Εικόνα 68).



Εικόνα 67.

Επίδραση PDGF (25ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 68.

Επίδραση PDGF (25ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

6.1.4. Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών.

Όταν τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν με τον TGF (20ng/ml), τον bFGF (10ng/ml) ή τον PDGF (25ng/ml), παρουσία ακετυλοχολίνης (10^{-7} M) ή καρβαχόλης (10^{-9} M) για 4 & δεν παρατηρήθηκε καμία αθροιστική δράση στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης (Πίνακας 3), αλλά ούτε και στον αριθμό των κυττάρων μετά από 72 ώρες επώασης με τους ίδιους παράγοντες (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται). Τόσο στην περίπτωση του bFGF, όσο και του PDGF ο αριθμός των κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία τους και παρουσία των μουσκαρινικών αγωνιστών, ήταν αυξημένος, αλλά σε καμία περίπτωση δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί συνεργική δράση, καθώς ο αριθμός των κυττάρων ακολουθούσε την αύξηση που προκαλούσε από μόνος του ο αυξητικός παράγοντας.

Παράγοντας	ΛΜΚ τραχείας κουνελιού
control	1002±303 cpm (N=12)
10% FBS	32371±5445 cpm (N=12)***
+ACh 10^{-7} M	8093±2033 cpm (N=12)***
+CCh 10^{-9} M	5112±1413 cpm (N=12)*
+TGF 20ng/ml	11021±4929 cpm (N=4)**
+TGF 20ng/ml+ACh 10^{-7} M	6532±1796 cpm (N=4)
+TGF 20ng/ml+CCh 10^{-9} M	10443±2038 cpm (N=4)
+bFGF 10ng/ml	7224±2116cpm (N=4)**
+bFGF 10ng/ml+ACh 10^{-7} M	7749±1253 cpm (N=4)
+bFGF 10ng/ml +CCh 10^{-9} M	9067±1237 cpm(N=4)
+PDGF 25ng/ml	22883±1841cpm (N=4)**
+PDGF 25ng/ml+ACh 10^{-7} M	22756±842 cpm (N=4)
+PDGF 25ng/ml+CCh 10^{-9} M	20296±563 cpm(N=4)

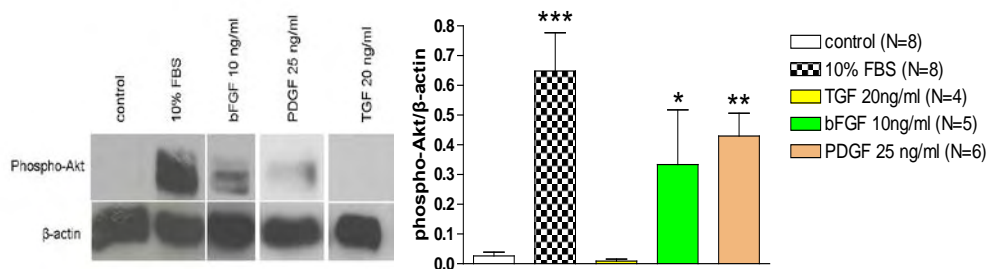
Πίνακας 3.

Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF, 20ng/ml), βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF, 10ng/ml) και αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF, 25ng/ml) απουσία ή παρουσία ακετυλοχολίνης (ACh, 10^{-7} M) ή καρβαχόλης (CCh, 10^{-9} M) στην ενσωμάτωση 3 [H]-θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SEM και το N αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, **P<0.01 και *** P<0.001 σε σύγκριση με το control.

6.1.5. Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από αυξητικούς παράγοντες.

6.1.5.1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI3K) από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Επώαση των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με τους αυξητικούς παράγοντες TGF, bFGF και PDGF για 48 ώρες προκάλεσε αυξημένη ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης. Έτσι, μελετήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K από τους παράγοντες αυτούς. Ελήφθησαν εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν με τους παραπάνω παράγοντες, στα οποία έγινε ανίχνευση φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt πρωτεΐνης, με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Παρατηρήθηκε αυξημένη ποσότητα της πρωτεΐνης και επομένως ενεργοποιημένο μονοπάτι σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν με τον bFGF (10ng/ml) ή τον PDGF (25ng/ml), αλλά όχι με τον TGF (20ng/ml) (Εικόνα 69). Συγκεκριμένα, ο λόγος φωσφορυλιωμένης Akt/ β -actin ήταν 0.026 ± 0.012 για τα κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ορού, 0.333 ± 0.18 και 0.429 ± 0.07 για τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον bFGF και τον PDGF αντίστοιχα.

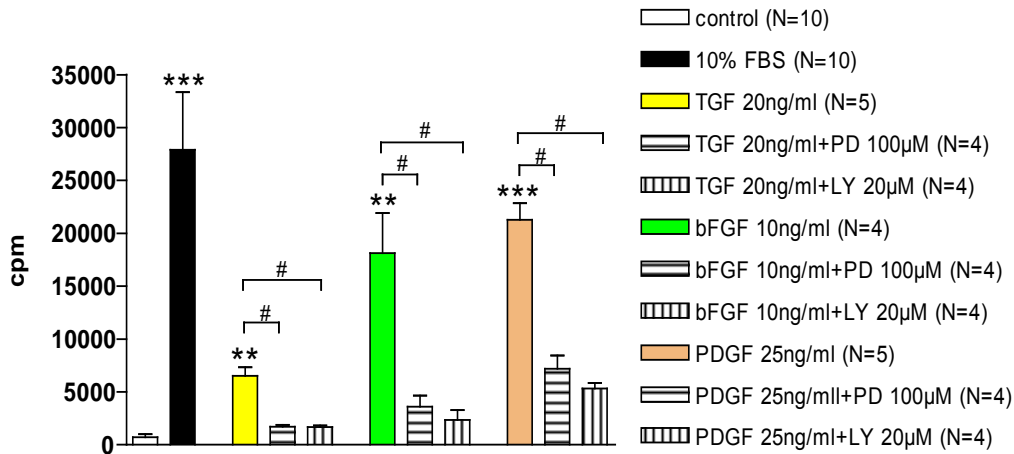


Εικόνα 69.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

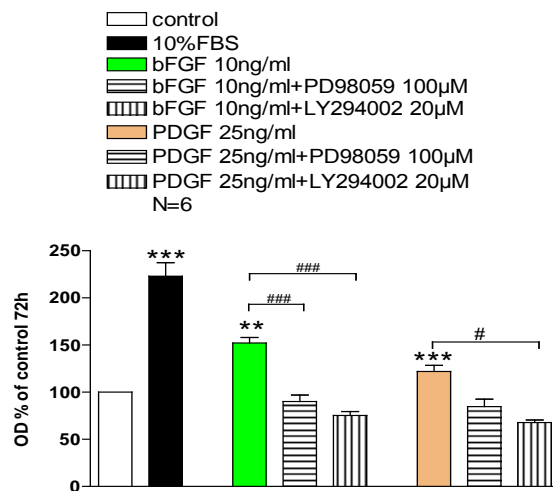
Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των TGF, bFGF και PDGF παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, LY294002 (20μM). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με τους αυξητικούς παράγοντες παρουσία του αναστολέα και παρατηρήθηκε ότι ελαττώθηκε στατιστικώς σημαντικά η επαγόμενη και από τους τρεις αυξητικούς παράγοντες ενσωμάτωση της τριτωμένης θυμιδίνης, από 6504±824.6, 18119±3800 και 21278±1565 σε 1685±134, 2356±930,7 και 5331±516,5 για τον TGF, bFGF και PDGF και τον TGF, bFGF και PDGF παρουσία LY294002 αντίστοιχα (Εικόνα 70, 71).



Εικόνα 70.

Επίδραση TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF (25ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100µM) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20µM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, **P<0.01 και ***P<0.001, σε σύγκριση με το control και #P<0.05 σε σύγκριση με τον αυξητικό παράγοντα μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

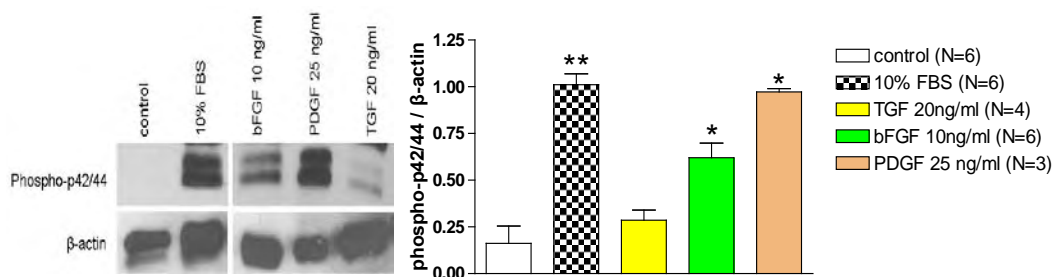


Εικόνα 71.

Επίδραση bFGF (10ng/ml) και PDGF (25ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100µM) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20µM) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control και ###P<0.001 σε σύγκριση με τον αυξητικό παράγοντα μόνο του (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

6.1.5.2. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης των MAP κινασών από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) σε ΛΜΚ τραχειάς κουνελιού.

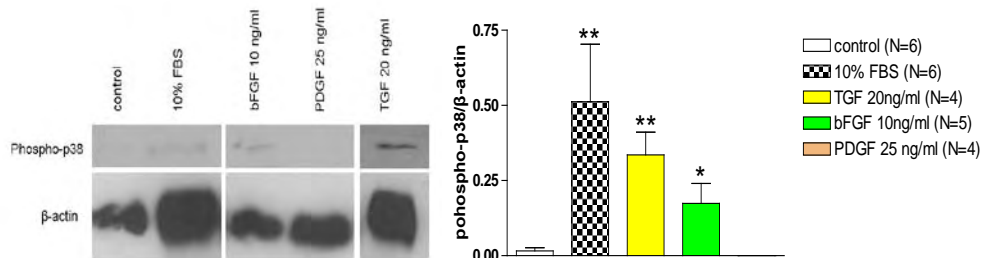
Όπως και στους φλεγμονώδεις παράγοντες έτσι και στους αυξητικούς μελετήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση δύο διαφορετικών μονοπατιών που ανήκουν στο ευρύτερο σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών, το μονοπάτι της p42/44 και το μονοπάτι της p38 πρωτεΐνης. Έγινε ανίχνευση, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, των φωσφορυλιωμένων μορφών αυτών των δύο πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν για 4 ώρες με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF(25ng/ml). Παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του μονοπατιού της p42/44 από τον bFGF και τον PDGF (Εικόνα 72) και της p38 από τον bFGF και τον TGF (Εικόνα 73). Συγκεκριμένα, ο λόγος φωσφορυλιωμένης p42/44 / β-actin ήταν 0.62 ± 0.07 και 0.972 ± 0.17 για τον bFGF και τον PDGF αντίστοιχα, στατιστικά σημαντικός σε σχέση με τον λόγο των εκχυλισμάτων των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού. Αντίστοιχα, ο λόγος p38/ β-actin ήταν 0.173 ± 0.06 για τον bFGF και 0.335 ± 0.07 για τον TGF.



Εικόνα 72.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p42/44, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχειάς κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχειάς κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και **P<0.01 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 73.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p38, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

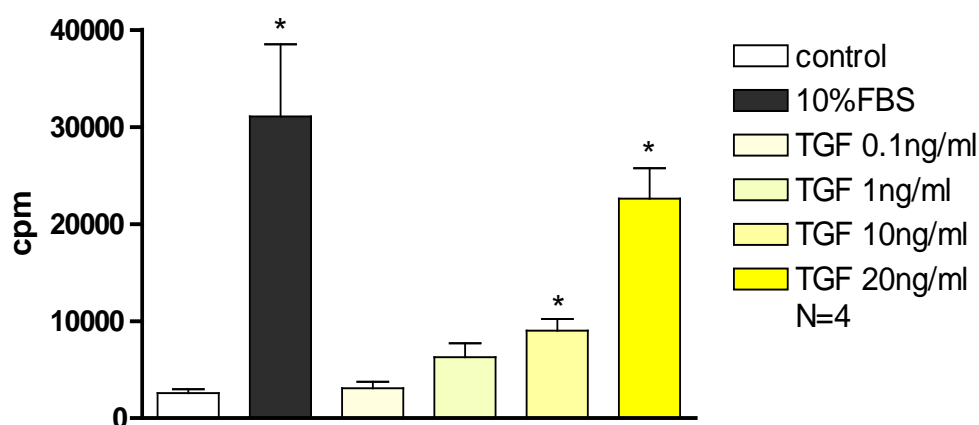
Ο λόγος phospho-p38/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών μελετήθηκε περαιτέρω με χρήση του αναστολέα του μονοπατιού, PD89005 (100μM). Έγινε επώαση των κυττάρων με τους αυξητικούς παράγοντες παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού για 48 ή 72 ώρες και μετρήθηκε η ενσωμάτωση της τριτιωμένης θυμιδίνης ή η οπτική πυκνότητα των κυττάρων. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική ελάττωση της επαγόμενης από τον TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF (25ng/ml) ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης από 6504±824.6 cpm σε 1699±177.9 cpm για τον TGF, από 18119±3800 σε 3608±1042 για τον bFGF και από 21278±1565 σε 7186±1266 για τον PDGF απουσία και παρουσία του αναστολέα PD89005 αντίστοιχα (Εικόνα 70). Όσον αφορά την οπτική πυκνότητα, μόνο ο bFGF παρατηρήθηκε να επάγει αύξηση στατιστικώς σημαντική, επομένως χρησιμοποιήθηκε παρουσία του αναστολέα και παρατηρήθηκε ελάττωση της επαγόμενης από αυτόν τον αυξητικό παράγοντα αύξησης του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 71).

6.2 Επίδραση αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

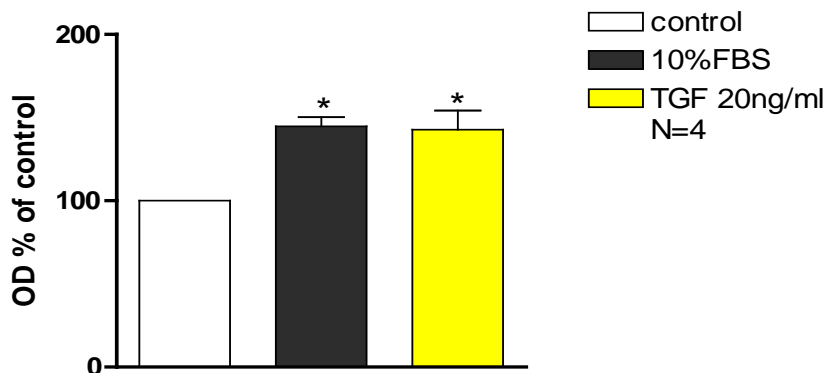
6.2.1. Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor , TGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με διαφορετικές συγκεντρώσεις TGF για 48h προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης (Εικόνα 74). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης ήταν 2582 ± 411.7 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού, 31095 ± 7413 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία ορού και 3094 ± 666.1 cpm, 6289 ± 1412 cpm, 9003 ± 1200 cpm και 22601 ± 3163 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.1, 1, 10 και 20ng/ml TGF αντίστοιχα. Επιπλέον, επώαση των κυττάρων με τον ίδιο αυξητικό παράγοντα σε συγκέντρωση 20ng/ml προκάλεσε αύξηση του αριθμού των κυττάρων, σε ποσοστό της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, σε $144.8 \pm 5.52\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10% ορό και $142.7 \pm 11.42\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με τον TGF για 72 ώρες, (Εικόνα 75).



Εικόνα 74.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων TGF στην ενσωμάτωση methyl- 3 H thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

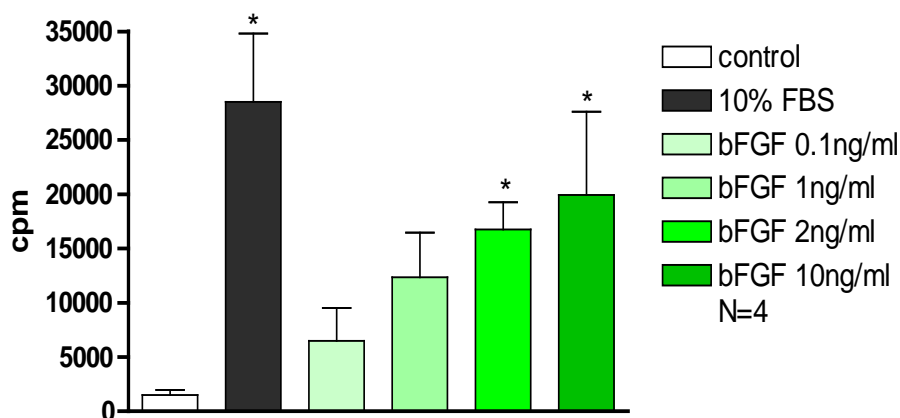


Εικόνα 75.

Επίδραση TGF (20ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

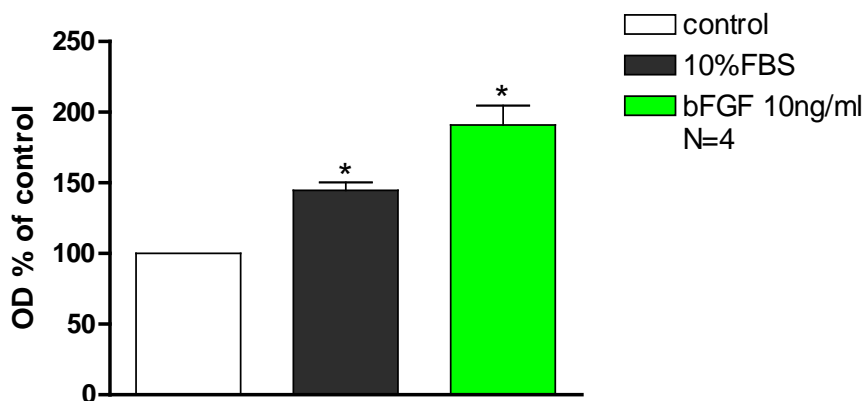
6.2.2. Επίδραση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του bFGF (10ng/ml) σε κύτταρα που επώαστηκαν για 48, 72 ώρες με τον αυξητικό παράγοντα. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων παρουσία του bFGF τόσο όσον αφορά την ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης (Εικόνα 76), όσο και την μετρούμενη οπτική πυκνότητα (Εικόνα 77), και μάλιστα σε επίπεδα που ξεπερνούν τον επαγόμενο από 10% ορό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης παρουσίασε δόσοεξαρτώμενη αύξηση σε $6482\pm3048\text{cpm}$, $12342\pm4135\text{cpm}$, $16767\pm2512\text{cpm}$ και $19945\pm7655\text{cpm}$ για συγκεντρώσεις bFGF 0.1, 1, 2 και 10ng/ml. Σε κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ή παρουσία ορού η ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης ήταν 1510 ± 457.7 και $28503\pm6300\text{cpm}$ αντίστοιχα. Η δε οπτική πυκνότητα ήταν, σε ποσοστό της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, $144.8\pm5.52\%$ για κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και $191\pm13.78\%$ για κύτταρα που επώαστηκαν με τον bFGF (10ng/ml).



Εικόνα 76.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων bFGF στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

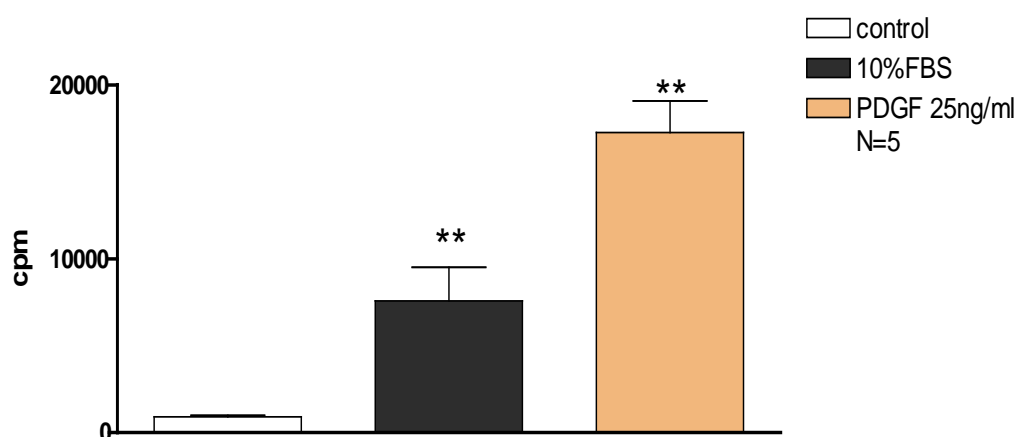


Εικόνα 77.

Επίδραση bFGF (10ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

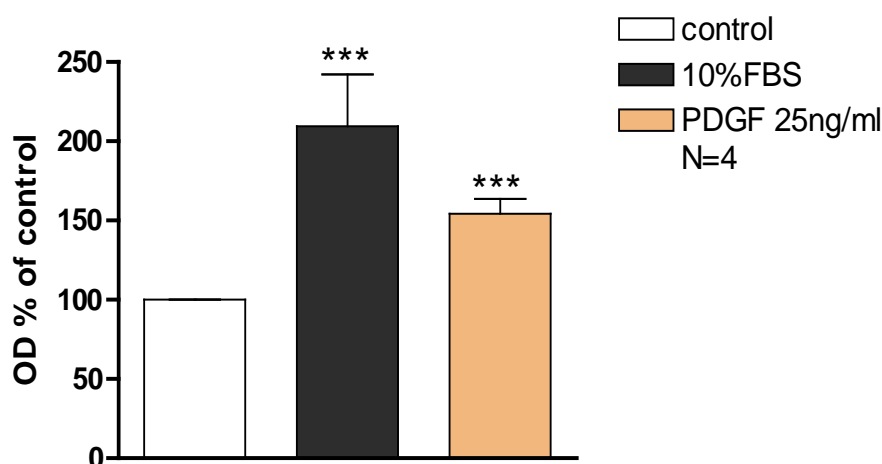
6.2.3. Επίδραση του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Επώαση των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου με PDGF (25ng/ml) για 48 ή 72 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενσωμάτωσης της ραδιενεργής θυμιδίνης (Εικόνα 78) αλλά και της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας, αντίστοιχα (Εικόνα 79). Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας ήταν $915 \pm 73,44$ cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες χωρίς ορό, και αυξήθηκε σε 17262 ± 1815 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με PDGF (25ng/ml), ενώ το ποσοστό της οπτικής πυκνότητας κυττάρων που επώαστηκαν για 72 ώρες με τον αυξητικό παράγοντα ήταν $154.3 \pm 9.3\%$ σε σχέση με κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού.



Εικόνα 78.

Επίδραση PDGF (25ng/ml) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ****P < 0.01** σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 79.

Επίδραση PDGF (25ng/ml) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

6.2.4. Επίδραση του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και του αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία μουσκαρινικών αγωνιστών.

Όταν τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν για 48 ή 72h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF(25ng/ml), παρουσία ακετυλοχολίνης (10^{-7} M) ή καρβαχόλης (10^{-9} M) δεν παρατηρήθηκε κανένα συνεργικό αποτέλεσμα ούτε ως προς την δημιουργία νέων DNA μορίων (Πίνακας 4), ούτε ως προς τον αριθμό των κυττάρων (τα αποτελέσματα δεν απεικονίζονται). Στην περίπτωση του bFGF φάνηκε ότι οι μουσκαρινικοί αγωνιστές ανέστειλαν τον επαγόμενο από τον αυξητικό παράγοντα πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ στην περίπτωση του PDGF ο πολλαπλασιασμός ακολουθούσε τα επαγόμενα από τον αυξητικό παράγοντα επίπεδα και δεν κατεστάλει από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές.

παράγοντας	ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου
control	1046±319 cpm (N=5)
10% FBS	13816±2320 cpm (N=5)**
+ACh 10 ⁻⁷ M	2376±564 cpm (N=5)
+CCh 10 ⁻⁹ M	2924±650 cpm (N=5)
+TGF 20ng/ml	2743±331 cpm (N=5)*
+TGF 20ng/ml+ACh 10 ⁻⁷ M	2259±301 cpm (N=5)
+TGF 20ng/ml+CCh 10 ⁻⁹ M	1427±422 cpm (N=5)
+bFGF 10ng/ml	4033±954 cpm (N=4)*
+bFGF 10ng/ml+ACh 10 ⁻⁷ M	4694±1128 cpm (N=4)
+bFGF 10ng/ml +CCh 10 ⁻⁹ M	2355±562 cpm (N=4)
+PDGF 25ng/ml	17262±1815 cpm(N=4)*
+PDGF 25ng/ml+ACh 10 ⁻⁷ M	3397±320 cpm (N=4)
+PDGF 25ng/ml+CCh 10 ⁻⁹ M	4904±361 cpm(N=4)

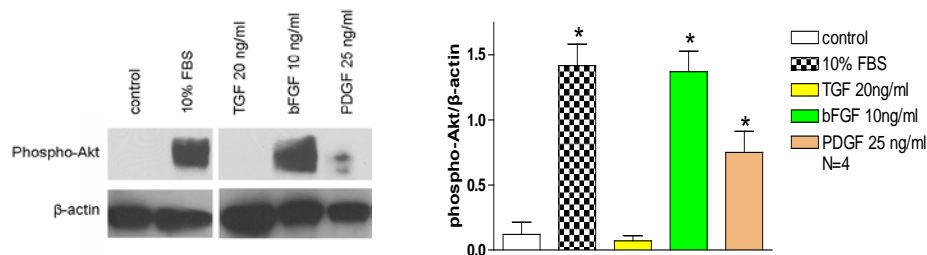
Πίνακας4.

Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF, 20ng/ml), βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF, 10ng/ml) και αυξητικού παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF, 25ng/ml) απουσία ή παρουσία ακετυλοχολίνης (ACh, 10⁻⁷M) ή καρβαχόλης (CCh, 10⁻⁹M) στην ενσωμάτωση ³[H]-θυμιδίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SEM και το N αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05, **P<0.01 σε σύγκριση με το control.

6.2.5. Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από αυξητικούς παράγοντες σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

6.2.5.1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοinosιτόλης (PI3K) από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Εφόσον παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου λόγω της δράσης των αυξητικών παραγόντων, στη συνέχεια μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολάβησαν αυτή την επίδραση. Ο bFGF (10ng/ml) και ο PDGF (25ng/ml), αλλά όχι και ο TGF (20ng/ml) προκάλεσαν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Akt του μονοπατιού της PI3K σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν με τους αυξητικούς παράγοντες για 4 ώρες (Εικόνα 80). Συγκεκριμένα ο λόγος phospho-Akt/β-actin ήταν 0.12±0.09 για κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και 1.37±0.15 για κύτταρα που επώαστηκαν με τον bFGF και 0.75±0.16 με τον PDGF αντίστοιχα.

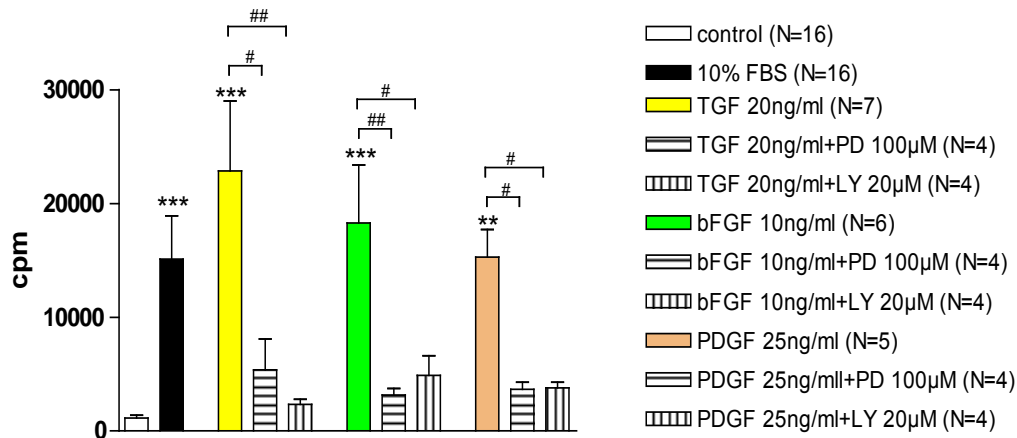


Εικόνα 80.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

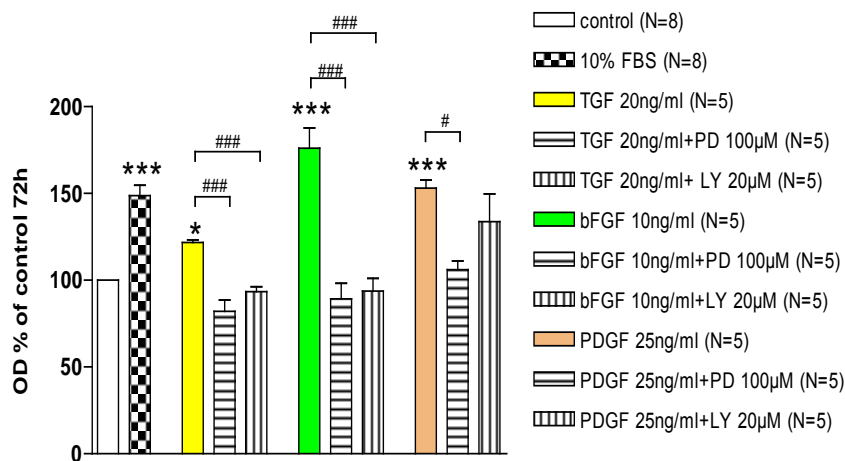
Ο λόγος phospho-Akt/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K μελετήθηκε και με τη χρήση του αναστολέα του μονοπατιού LY294002 (20μM). Έγινε επώαση των κυττάρων με τους αυξητικούς παράγοντες παρουσία του αναστολέα και παρατηρήθηκε ελάττωση του επαγομένου πολλαπλασιασμού, που εκτιμήθηκε τόσο με την μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης (Εικόνα 81), όσο και με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Εικόνα 82) Συγκεκριμένα η ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ελαττώθηκε από 18283 ± 5092 cpm, 15284 ± 2426 cpm, και 22851 ± 6172 cpm σε 4884 ± 1716 cpm, 3792 ± 482.2 cpm και 2339 ± 437.4 cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με bFGF (10ng/ml), PDGF (25ng/ml) και TGF (20ng/ml) απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα. Όσον αφορά την οπτική πυκνότητα, σε ποσοστό της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού για 72 ώρες ελαττώθηκε από $176 \pm 11.66\%$, $153.1 \pm 4.61\%$, και $121.8 \pm 1.35\%$ σε $93.83 \pm 7.26\%$, $133.8 \pm 16\%$ και 93.46 ± 2.75 σε κύτταρα που επώαστηκαν με bFGF (10ng/ml), PDGF (25ng/ml) και TGF (20ng/ml) απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα.



Εικόνα 81.

Επίδραση TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF (25ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100µM) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20µM) στην ενσωμάτωση methyl-[³H] thymidine σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001, σε σύγκριση με το control και #P<0.05, ##P<0.01 σε σύγκριση με τον αυξητικό παράγοντα μόνο του (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

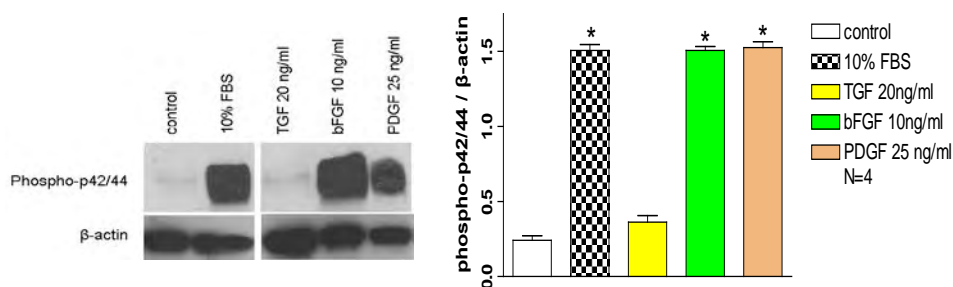


Εικόνα 82.

Επίδραση TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) και PDGF (25ng/ml), παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MAPK, PD89005 (100µM) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3K LY294002 (20µM) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control και #P<0.05, ###P<0.001 σε σύγκριση με τον αυξητικό παράγοντα μόνο του (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

6.2.5.2. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης των MAP κινασών από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF), τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και τον αυξητικό παράγοντα που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF) σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

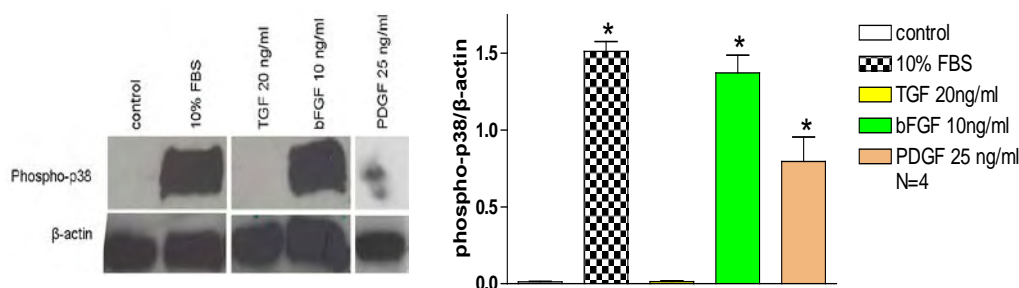
Το επόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι που μελετήθηκε ήταν αυτό των MAP κινασών με μελέτη δύο επιμέρους μονοπατιών, αυτά της p42/44 και της p38. Τόσο ο bFGF (10ng/ml) όσο και ο PDGF (25ng/ml) προκάλεσαν τη φωσφορυλίωση και των δύο πρωτεϊνών, ενώ σε κύτταρα που επώαστηκαν με τον TGF (20ng/ml) ανιχνεύτηκε ελαφρώς φωσφορυλιωμένη p42/44, αλλά η ποσότητά της δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 83, 84). Συγκεκριμένα ο λόγος phospho-p42/44 / β -actin ήταν 0.24 ± 0.03 για κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και 1.5 ± 0.02 για κύτταρα που επώαστηκαν με τον bFGF, 1.52 ± 0.04 τον PDGF και 0.36 ± 0.04 με τον TGF αντίστοιχα. Ενώ ο λόγος phospho-p38/ β -actin ήταν 0.01 ± 0.003 για κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και 1.37 ± 0.11 για κύτταρα που επώαστηκαν με τον bFGF, 0.79 ± 0.15 τον PDGF και 0.01 ± 0.006 με τον TGF αντίστοιχα.



Εικόνα 83.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p42/44, και anti- β -actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

Ο λόγος phospho-Akt/ β -actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)



Εικόνα 84.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p38, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml)

Ο λόγος phospho-p38/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που επώαστηκαν για 4h με TGF (20ng/ml), bFGF (10ng/ml) ή με PDGF (25ng/ml). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *P<0.05 σε σύγκριση με το control (unpaired t-test με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Mann-Whitney test)

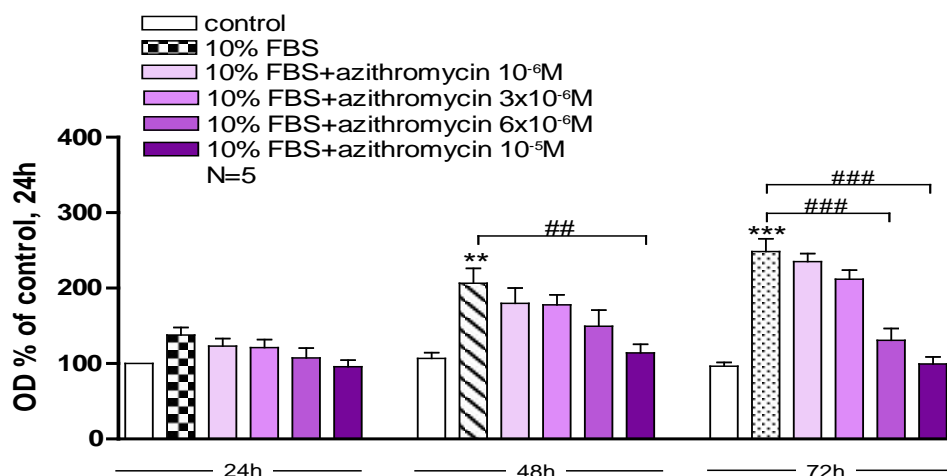
Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών με τη χρήση του αναστολέα του μονοπατιού PD89005 (100μM). Παρατηρήθηκε ελάττωση του επαγομένου από τους αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας ελαττώθηκε από 18283±5092cpm, 15284±2426cpm, και 22851±6172cpm σε 3161±583.7cpm, 3658±627.9cpm και 5350±2725cpm σε κύτταρα που επώαστηκαν με bFGF (10ng/ml), PDGF (25ng/ml) και TGF (20ng/ml) απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα (Εικόνα 81). Ενώ, η οπτική πυκνότητα, μετρούμενη σε ποσοστό της οπτικής πυκνότητας των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού, ελαττώθηκε από 176±11.66%, 153.1±4.61%, και 121.8±1.35% σε 89.23±9.07%, 106.1±4.99% και 82.03±6.55% σε κύτταρα που επώαστηκαν με bFGF (10ng/ml), PDGF (25ng/ml) και TGF (20ng/ml) απουσία και παρουσία του αναστολέα αντίστοιχα (Εικόνα 82).

7. Επίδραση αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ

7.1.1. Επίδραση αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, τα οποία απομονώθηκαν από τραχεία ενήλικου κουνελιού. Τα κύτταρα αφού

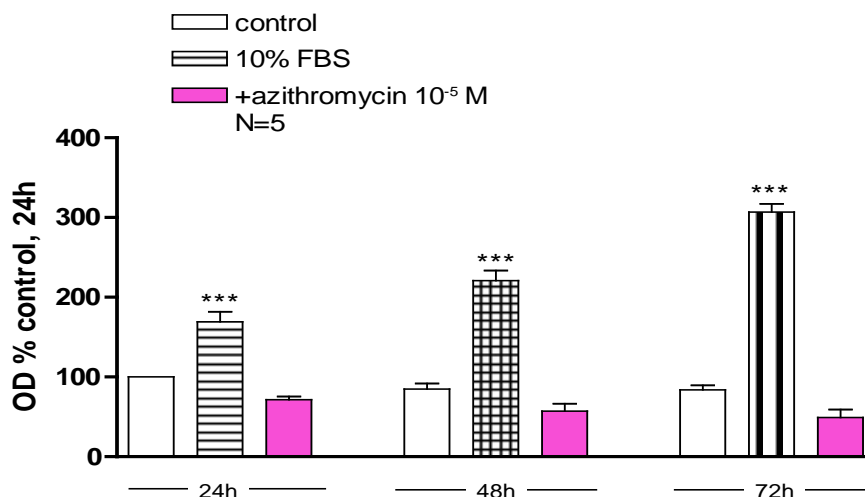
επώαστηκαν για 72 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και θεωρούνται πλέον συγχρονισμένα και μη πολλαπλασιαζόμενα, επώαστηκαν για 24, 48, 72 ώρες με αζιθρομυκίνη 10^{-6} M έως 10^{-5} M. Η ομάδα ελέγχου θεωρείται ότι περιέχει κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται, καθώς αυτά βρίσκονται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Η αζιθρομυκίνη φαίνεται ότι προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη ελάττωση του αριθμού των κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS, μετά από 48 ή/και 72 ώρες επώασης (Εικόνα 85). Ο αριθμός των κυττάρων που επώαστηκαν με 10% FBS ήταν 206.5 ± 19.55 % και 248.5 ± 16.96 % του αριθμού κυττάρων της ομάδας ελέγχου, μετά από 48 και 72 ώρες επώασης αντίστοιχα. Το μέγιστο αποτέλεσμα της αζιθρομυκίνης παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση 10^{-5} M, ενώ η συγκέντρωση 10^{-6} M δεν είχε καμία επίδραση. Στη συγκέντρωση 10^{-5} M, μετά από 48 ώρες επώασης, ο αριθμός των κυττάρων ελαττώθηκε στο 114.1 ± 11.49 % της ομάδας ελέγχου. Ενώ μετά από 72 ώρες επώασης με αζιθρομυκίνη 6×10^{-6} M ή 10^{-5} M μείωσε τον αριθμό των κυττάρων σε 130.9 ± 15.47 % και 99.5 ± 9.18 % της ομάδας ελέγχου αντίστοιχα.



Εικόνα 85.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζιθρομυκίνης, παρουσία 10% FBS στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control και ##P<0.01, ###P<0.001 σε σύγκριση με το 10% FBS μόνο του (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

Επώαση των κυττάρων με αζιθρομυκίνη 10^{-5} M απουσία 10% FBS, για 24, 48 ή 72 ώρες, δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των κυττάρων, καθώς ο αριθμός τους παρέμεινε σταθερός σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (Εικόνα 86).



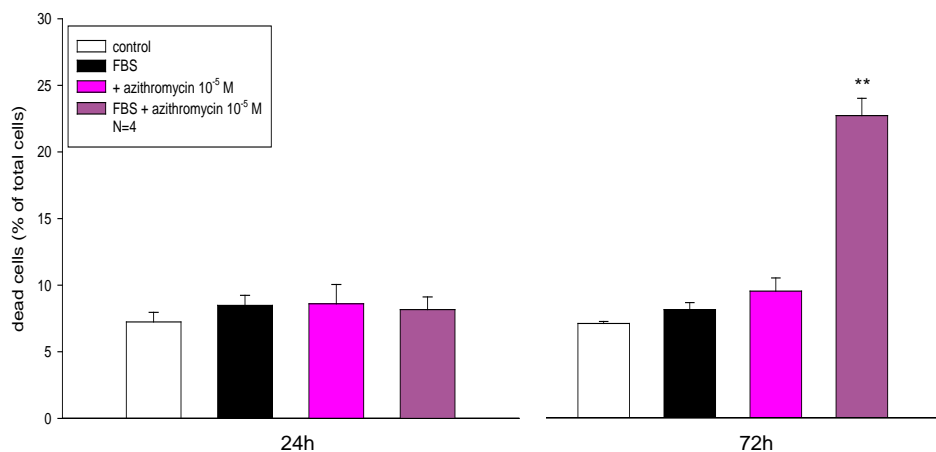
Εικόνα 86.

Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *** $P<0.001$ σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.2. Επίδραση αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

7.1.2.1. Εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με χρώση με Trypan Blue.

Επώαση των κυττάρων με αζιθρομυκίνη για 24 ώρες δεν άλλαξε το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ($7.23\pm 0.15\%$ στην ομάδα ελέγχου, $8,59\pm 1.45\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη $10^{-5}M$, $8.47\pm 0.95\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και $8.16\pm 0.95\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό παρουσία αζιθρομυκίνης). Μετά από 72 ώρες επώασης τα νεκρά κύτταρα αυξήθηκαν στις καλλιέργειες που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη $10^{-5}M$ παρουσία 10% FBS (Εικόνα 87), από $8.29\pm 0.54\%$, σε κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με ορό σε $23.2\pm 1.32\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν και με αζιθρομυκίνη $10^{-5}M$. Η παρουσία της αζιθρομυκίνης στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των νεκρών κυττάρων που επώαστηκαν απουσία 10% FBS ($7.23\pm 0.15\%$ και $9.71\pm 1\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς και με αζιθρομυκίνη, απουσία ορού). Κατά την καταμέτρηση των νεκρών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη εμφάνιζαν μεγαλύτερο μέγεθος και ήταν διογκωμένα σε σχέση με αυτά των ομάδων ελέγχου (καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς 10% FBS απουσία αζιθρομυκίνης).

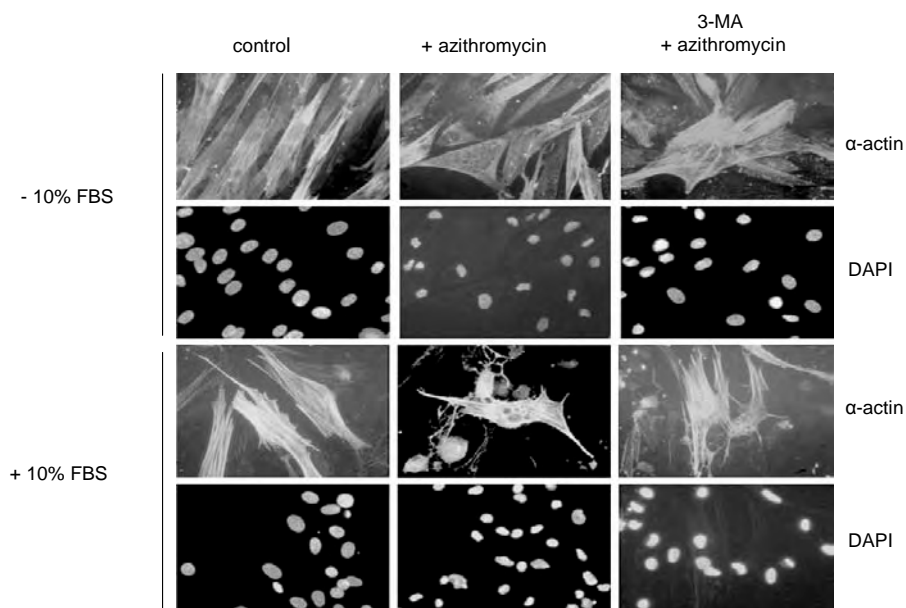


Εικόνα 87.

Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), στη βιωσιμότητα των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.3. Επίδραση αζιθρομυκίνης στη μορφολογία των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Επώαση των κυττάρων με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$) για 24 ώρες, παρουσία ή απουσία 10% FBS, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και τη συρρίκνωση των πυρήνων, όπως παρατηρήθηκε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού, με χρήση αντισώματος για την α -ακτίνη του λείου μυός και χρωστική DAPI για την χρώση των πυρήνων των κυττάρων (Εικόνα 88).



Εικόνα 88.

Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), απουσία και παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA (10mM), μετά από επώαση 24h στη μορφολογία των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

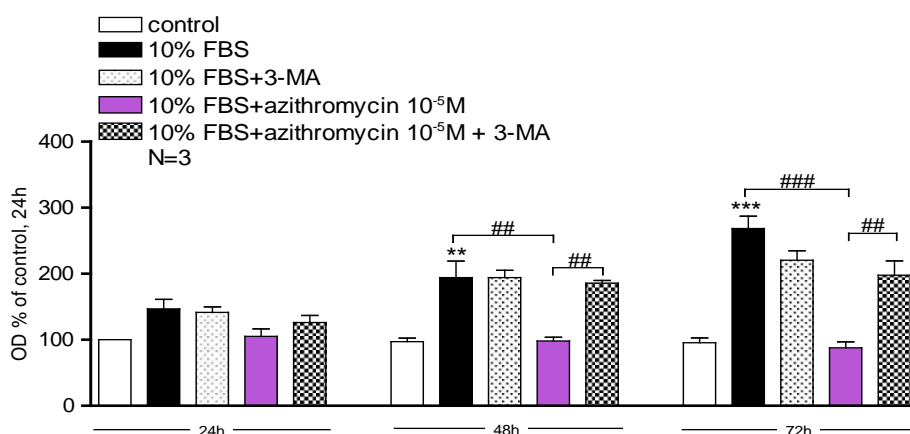
7.1.4. Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεσίνη (3MA)

7.1.4.1. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεσίνη (3-MA)

Τα κυστίδια που παρατηρήθηκαν μετά την επώαση με αζιθρομυκίνη, αποτελούν χαρακτηριστικό της αυτοφαγίας. Προκειμένου να διευκρινιστεί αν όντως τα κυστίδια που προκλήθηκαν από την αζιθρομυκίνη ήταν αυτοφαγισώματα, χρησιμοποιήθηκε το 3-MA (10mM), ένας αναστολέας της αυτοφαγίας. Η ουσία αυτή αναστέλλει την ενεργοποίηση των τάξης III κινασών της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του καταρράκτη των αντιδράσεων που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο προκειμένου να προχωρήσει σε αυτοφαγία. Επώαση των κυττάρων με το 3-MA ανέστειλε τον σχηματισμό κυστιδίων που προκάλεσε η αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$) και περιόρισε εν μέρει τη συρρίκνωση των πυρήνων στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία ή απουσία 10%FBS και παρουσία αζιθρομυκίνης (Εικόνα 88).

7.1.4.2. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεονίνη (3-MA)

Σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία της 3-MA δεν παρατηρήθηκε η αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκάλεσε η αζιθρομυκίνη, παρουσία 10%FBS. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας ως προς την οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού ήταν $146.79 \pm 14.4\%$, $105.24 \pm 11.34\%$ και $126.16 \pm 10.56\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, αζιθρομυκίνη με ορό και αζιθρομυκίνη με ορό παρουσία 3-MA, αντίστοιχα, για 24 ώρες, $194 \pm 25.17\%$, $98.09 \pm 5.77\%$ και $185.66 \pm 4.31\%$ για 48 ώρες και $268.33 \pm 18.84\%$, $81.05 \pm 9.42\%$ και $197.76 \pm 21.74\%$ για 72 ώρες. Παρουσία 3-MA και αζιθρομυκίνης ο αριθμός των κυττάρων ήταν στα επίπεδα που παρατηρήθηκαν στις ομάδες ελέγχου (Εικόνα 89).

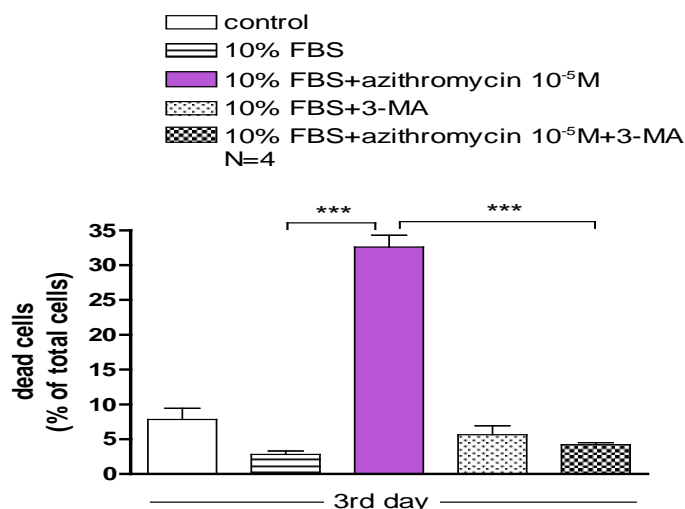


Εικόνα 89.

Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-5}M), παρουσία 10% FBS και του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA (10mM) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P < 0.01$ και $***P < 0.001$ σε σύγκριση με το control και $##P < 0.01$, $###P < 0.001$ σε σύγκριση με το 10% FBS ή με την αζιθρομυκίνη παρουσία 10% FBS (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.4.3. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδερίνη (3-MA)

Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των νεκρών κυττάρων σε καλλιέργειες που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη παρουσία 3-MA ($4.22\pm 0.28\%$, ποσοστό νεκρών κυττάρων ως προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων), ήταν παρόμοιος με αυτόν της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου ($2.82\pm 0.48\%$), (Εικόνα 90). Δηλαδή, η 3-MA ανέστειλε πλήρως την προκαλούμενη από την αζιθρομυκίνη ελάττωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού μετά από 72 ώρες επώασης ($32.6\pm 1.69\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη παρουσία ορού).



Εικόνα 90.

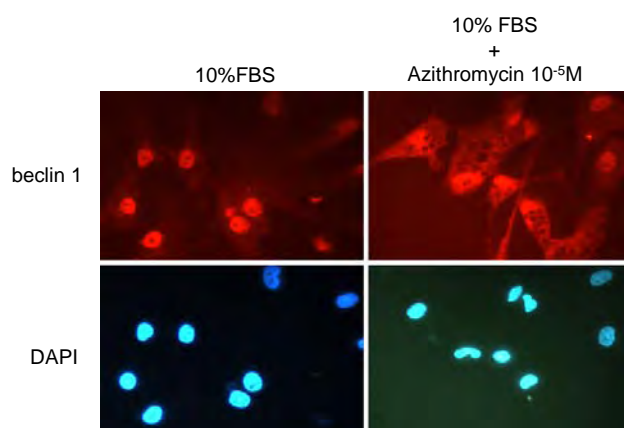
Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$) παρουσία 10% FBS και του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA (10mM), στη βιωσιμότητα των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το 10% FBS ή με την αζιθρομυκίνη παρουσία 10% FBS (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.5 Ενεργοποίηση πρωτεϊνών αυτοφαγίας από την αζιθρομυκίνη.

7.1.5.1. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στην ενεργοποίηση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης beclin-1 σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

7.1.5.1.1. Εντοπισμός της πρωτεΐνης beclin-1 με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Όταν χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της πρωτεΐνης beclin-1 και στη συνέχεια δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα CY3, εμφανίστηκε εντονότερο σήμα στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$), σε σύγκριση με τα κύτταρα που επώαστηκαν απουσία αζιθρομυκίνης (Εικόνα 91). Ο εντοπισμός της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί μια από τις πρωτεΐνες των σηματοδοτικών μονοπατιών της αυτοφαγίας, δείχνει ότι η αζιθρομυκίνη όντως επάγει την αυτοφαγία σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν βαφτεί με DAPI για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό των κυττάρων.

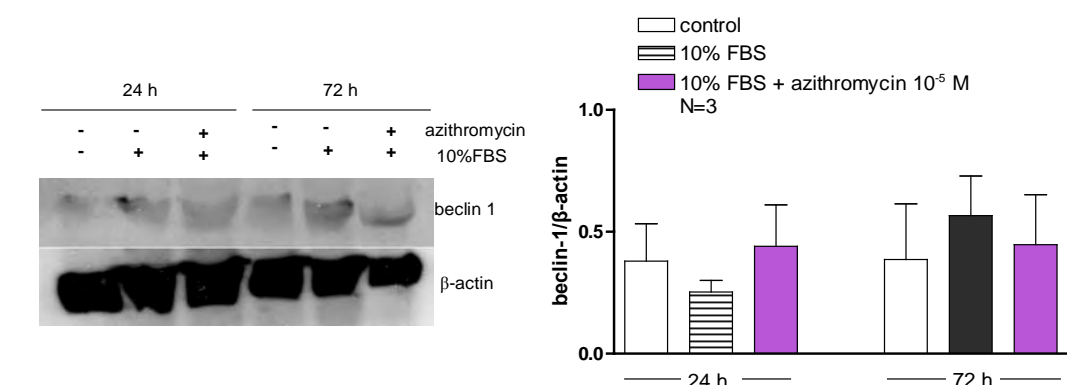


Εικόνα 91.

Εντοπισμός, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, της αυτοφαγικής πρωτεΐνης beclin 1 και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, μετά από 24h επώαση με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$).

7.1.5.1.2. Εντοπισμός της πρωτεΐνης beclin-1 με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Παρόλο που στις εικόνες που λήφθηκαν με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού εμφανιζόταν αυξημένη παρουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, η ανάλυση κατά Western σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης από ΛΜΚ που είχαν επωαστεί με ή /και χωρίς αζιθρομυκίνη, δεν έδειξε υψηλότερα επίπεδα της beclin-1 παρουσία της αζιθρομυκίνης) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 92). Το δεδομένο αυτό επιβεβαιώνεται και από την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο λόγος της ανιχνευόμενης πρωτεΐνης προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη ήταν 0.38 ± 0.15 στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, 0.25 ± 0.04 στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, 0.44 ± 0.17 στα κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη παρουσία ορού για 24 ώρες και 0.38 ± 0.22 , 0.56 ± 0.16 και 0.44 ± 0.2 για 72 ώρες αντίστοιχα.



Εικόνα 92.

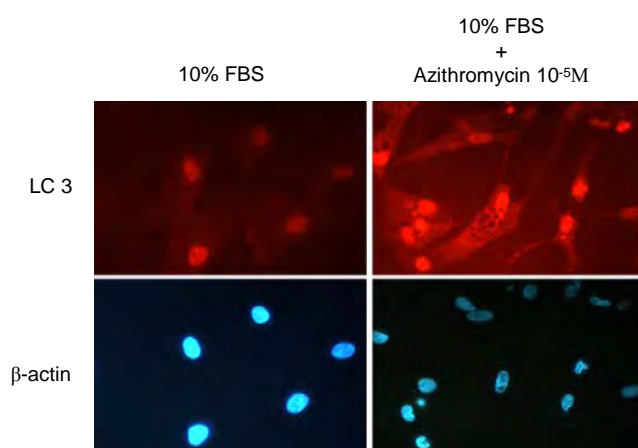
Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-beclin 1, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη (10^{-5} M).

Ο λόγος beclin 1/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη (10^{-5} M). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

7.1.5.2. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στην ενεργοποίηση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης LC3 σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

7.1.5.2.1. Εντοπισμός της πρωτεΐνης LC3 με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Η πρωτεΐνη της αυτοφαγίας LC3 (Light Chain 3) εντοπίστηκε σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη, με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της πρωτεΐνης αυτής και τη χρήση δεύτερου αντισώματος στη συνέχεια συζευγμένου με το φθοριόχρωμα CY3 (Εικόνα 93). Το σήμα που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη ήταν πολύ εντονότερο σε σχέση με αυτό που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίστηκαν με DAPI για τον εντοπισμό των κυττάρων.



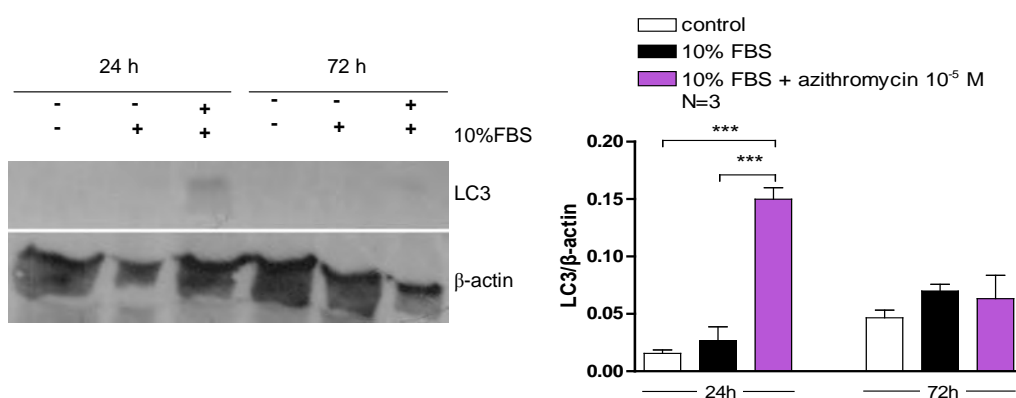
Εικόνα 93.

Εντοπισμός, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, της αυτοφαγικής πρωτεΐνης LC3 (light chain 3) και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, μετά από 24h επώαση με αζιθρομυκίνη (10^{-5} M).

7.1.5.2.2. Εντοπισμός της πρωτεΐνης LC3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Η πρωτεΐνη LC3 ανιχνεύθηκε σε εκχυλίσματα ολικής πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με αζιθρομυκίνη, ενώ απουσίαζε σε κύτταρα των ομάδων ελέγχου (Εικόνα 94). Η ανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης αυτής. Η αύξηση των επιπέδων της

πρωτεΐνης LC3 είναι εμφανής και από την ποσοτικοποίηση που ακολούθησε την ανίχνευσή της, με τη χρήση της αναλογίας σήματος LC3 προς σήμα της πρωτεΐνης σταθερής έκφρασης β-ακτίνη, καθώς ο λόγος αυξήθηκε από 0.02 ± 0.01 στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό σε 0.15 ± 0.01 στα κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη παρουσία ορού για 24 ώρες. Η αύξηση αυτή δεν εμφανίζεται μετά από 72 ώρες επώασης, καθώς η πρωτεΐνη πλέον δεν φαίνεται να είναι ενεργοποιημένη (0.04 ± 0.006 , 0.07 ± 0.005 και 0.06 ± 0.02 σε κύτταρα control, σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού και σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού και αζιθρομυκίνης για 72 ώρες, αντίστοιχα)



Εικόνα 94.

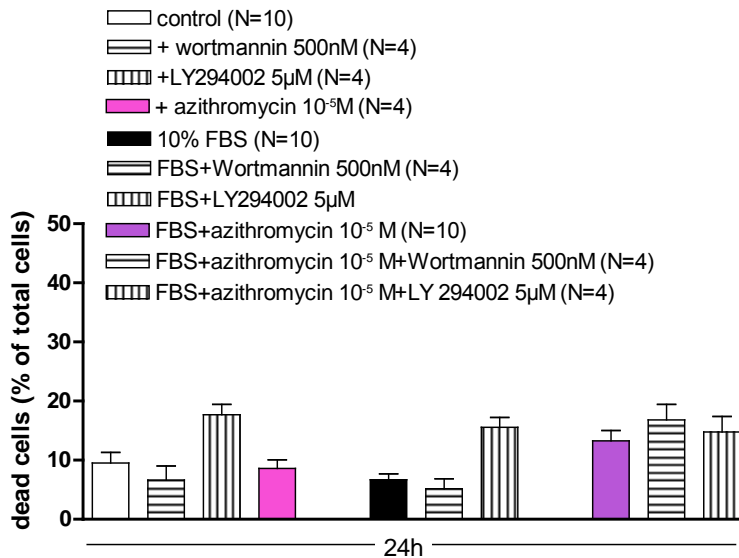
Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-LC3, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$).

Ο λόγος LC3/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. ***P<0.001 σε σύγκριση με το αρνητικό ή θετικό control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.6. Ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών από την αζιθρομυκίνη

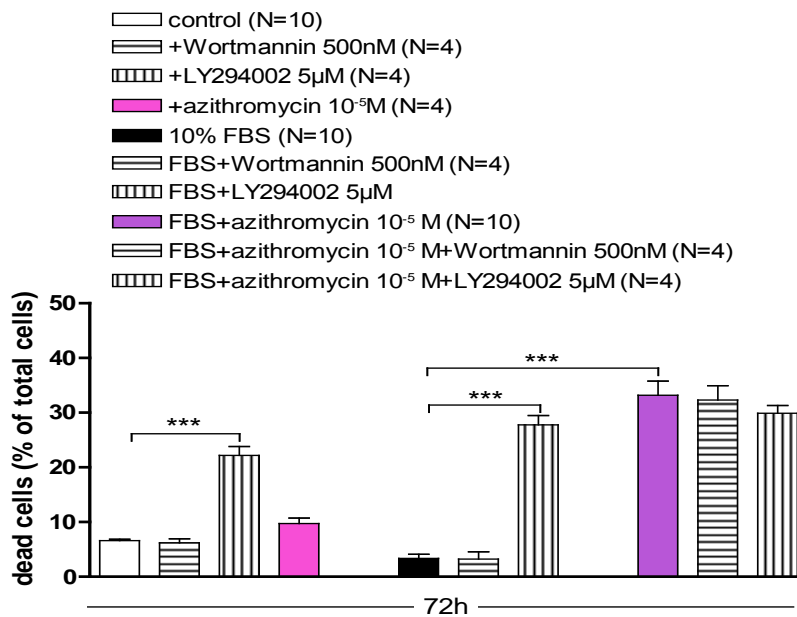
7.1.6.1. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη βιωσιμότητα ΔΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K, LY 294002 και Wortmannin.

Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με τον αναστολέα του μονοπατιού της κινάσης της 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), Wortmannin (500nM) και κατόπιν με αζιθρομυκίνη, δεν παρατηρήθηκε καμία αναστολή της επίδρασης της αζιθρομυκίνης (Εικόνα 95, 96). Το ποσοστό των νεκρών κυττάρων, ως προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων, παρέμεινε αυξημένο παρουσία αζιθρομυκίνης, μετά από 72 ώρες επώασης. Συγκεκριμένα ήταν $8.59 \pm 1.45\%$ και $9.71 \pm 1\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, $13.26 \pm 1.75\%$ και $33.2 \pm 2.55\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη και $16.82 \pm 2.6\%$ και $32.32 \pm 2.62\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη και ορό παρουσία Wortmannin για 24 (Εικόνα 95) και 72 ώρες (Εικόνα 96) αντίστοιχα. Ο αναστολέας της PI3K, LY294002 (5 μ M), από μόνος του προκάλεσε αυξημένη θνητότητα στα κύτταρα. Το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ως προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων παρουσία LY294002 αυξήθηκε σε $22.18 \pm 1.64\%$ και σε $27.77 \pm 1.7\%$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ($6.61 \pm 0.23\%$) ή παρουσία ορού ($9.71 \pm 1\%$) μετά από 72 ώρες, αντίστοιχα. Επίσης το LY294002 (5 μ M) δεν ανέστειλε την προκαλούμενη από την αζιθρομυκίνη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από 72 ώρες επώασης (Εικόνα 96) ($8.59 \pm 1.45\%$ και $9.71 \pm 1\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, $13.26 \pm 1.75\%$ και $33.2 \pm 2.55\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη και $14.75 \pm 2.63\%$ και $29.87 \pm 1.44\%$ στα κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη και ορό παρουσία LY 294002 για 24 και 72 ώρες αντίστοιχα). Παρόλα αυτά, δεν εμφανίστηκε κάποια συνεργική δράση μεταξύ του αναστολέα αυτού και της αζιθρομυκίνης, καθώς δεν προέκυψε καμία διαφορά στο ποσοστό των νεκρών κυττάρων που επώαστηκαν για 72 ώρες ταυτόχρονα με LY294002 και αζιθρομυκίνη με αυτό των κυττάρων που επώαστηκαν μόνο με LY294002 ($29.87 \pm 1.44\%$ και $27.77 \pm 1.7\%$ αντίστοιχα).



Εικόνα 95.

Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K LY294002 ($5\mu M$) και Wortmannin ($500nM$), μετά από 24h στη βιωσιμότητα των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

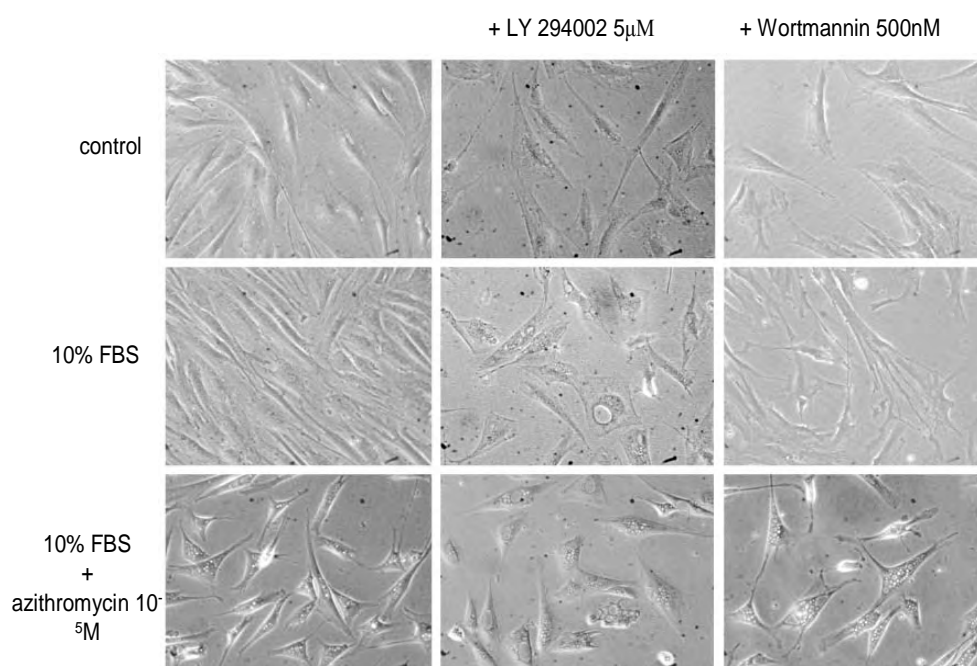


Εικόνα 96.

Επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K LY294002 ($5\mu M$) και Wortmannin ($500nM$), μετά από 72h στη βιωσιμότητα των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το αρνητικό ή θετικό control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.6.2. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K, LY 294002 και Wortmannin.

Στα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία αζιθρομυκίνης (10^{-5}M) και του αναστολέα του μονοπατιού της PI3 κινάσης, Wortmannin, η επίδραση της αζιθρομυκίνης δεν φαίνεται να αντιστράφηκε ή να παρεμποδίστηκε από τη Wortmannin καθώς εξακολούθησαν να εμφανίζουν στο κυτταρόπλασμά τους αυτοφαγικά κυστίδια. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η επώαση των κυττάρων με αζιθρομυκίνη παρουσία LY294002 (Εικόνα 97). Οι εικόνες αυτές δείχνουν ότι η αναστολή του μονοπατιού της PI3 κινάσης δεν αναστέλλει τον προκαλούμενο από την αζιθρομυκίνη σχηματισμό αυτοφαγικών κυστιδίων. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το LY294002 από μόνο του είναι ικανό να προκαλέσει το σχηματισμό αυτών των κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

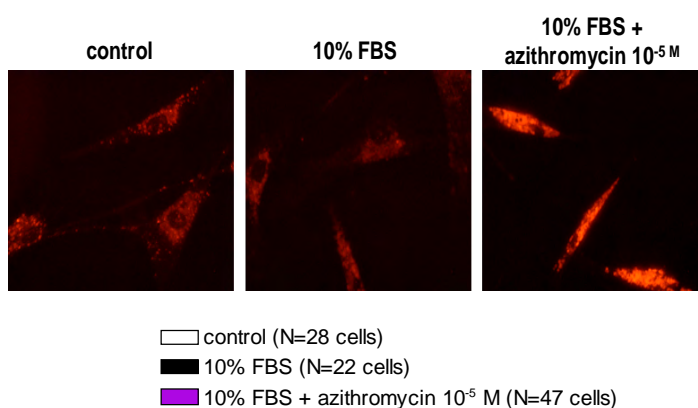


Εικόνα 97.

Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-5}M), απουσία και παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού της PI3K LY294002 (5 μM) και Wortmannin (500nM), μετά από επώαση 72h στη μορφολογία των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

7.1.7. Επίδραση αζιθρομυκίνης στα λυσοσώματα ΑΜΚ τραχείας κουνελιού

Τα λυσοσώματα των κυττάρων που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης, χρωματίστηκαν με την χρωστική Lysotracker Red. Η χρωστική αυτή είναι όξινο φθοριόχρωμα το οποίο αφού εισέλθει σε ζωντανά κύτταρα ενσωματώνεται στα λυσοσώματα του κυττάρου, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν μέσω του φθορισμού που εκπέμπουν, σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η ενσωμάτωση της χρωστικής Lysotracker Red σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη για 24 ώρες ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή που εμφάνιζαν τα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς ορό (Εικόνα 98). Συγκεκριμένα, η ένταση του επιπέδου του φθορισμού αυξήθηκε από 21.26 ± 2.66 σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, σε 79.64 ± 6.19 σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$). Αυτό καταδεικνύει την αυξημένη παρουσία λυσοσωμάτων σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία αζιθρομυκίνης.



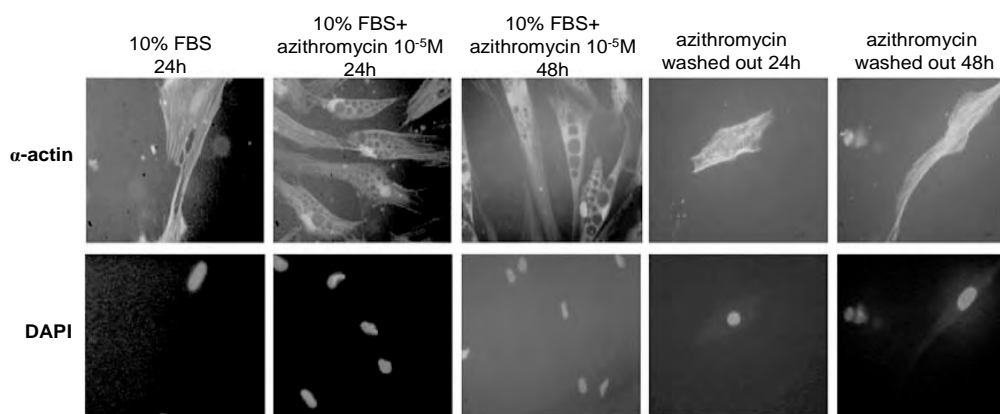
Εικόνα 98.

Χρώση λυσοσωμάτων με Lysotracker Red μετά από επώαση με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$), για 24h σε ΑΜΚ τραχείας κουνελιού. Η ένταση του φθορισμού παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των κυττάρων. *** $P < 0.001$ σε σύγκριση με το 10%FBS (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.8. Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

7.1.8.1. Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Πειράματα ανοσοφθορισμού με αντίσωμα κατά της α -ακτίνης του κυτταροσκελετού των ΛΜΚ, έδειξαν ότι η δημιουργία κυστιδίων, χαρακτηριστικών της αυτοφαγίας, αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η διάρκεια της επώασης των κυττάρων με αζιθρομυκίνη. Επιπλέον, όταν η αζιθρομυκίνη αφαιρέθηκε από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με ορό για 24 ή 48 ώρες, το πρότυπο της α -ακτίνης του κυτταροσκελετού των ΛΜΚ επανήλθε στη φυσιολογική μορφή του. Δηλαδή η επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και πιο συγκεκριμένα στο σχηματισμό των αυτοφαγικών κυστιδίων αντιστράφηκε μετά την αφαίρεσή της από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Εικόνα 99).

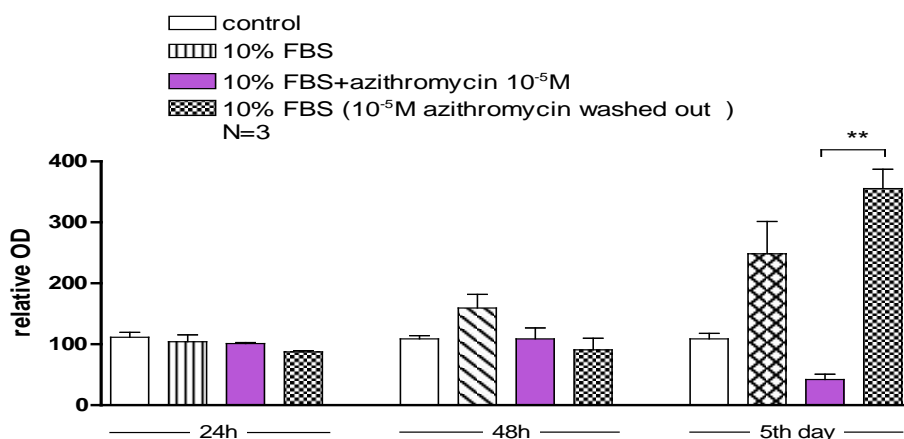


Εικόνα 99.

Αντιστρεπτή επίδραση αζιθρομυκίνης ($10^{-5}M$), στη μορφολογία των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που ανιχνεύτηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά της α -actin και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI.

7.1.8.2 Η αντιστρεπτή επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΔΜΚ τραχείας κουνελιού.

Κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη για 48 ώρες ξεπλύθηκαν και το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με υλικό που δεν περιείχε αζιθρομυκίνη. 24 ή/και 48 ώρες μετά την αντικατάσταση αυτή ο αριθμός των κυττάρων που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη παρέμεινε χαμηλός. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά της οπτικής πυκνότητας ως προς την οπτική πυκνότητα των κυττάρων control σε κάθε περίπτωση, ήταν $101.15 \pm 1.74\%$ και $108.9 \pm 17.7\%$ σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με ορό, $104.28 \pm 11.21\%$ και $159.48 \pm 22.22\%$ σε κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη παρουσία ορού και $87.39 \pm 2.08\%$ και $90.89 \pm 18.81\%$ σε κύτταρα που αφαιρέθηκε η αζιθρομυκίνη και αντικαταστάθηκε από θρεπτικό υλικό με ορό, μετά από 24 και 72 ώρες επώασης αντίστοιχα (Εικόνα 100). Παραδόξως, 5 ημέρες μετά την απομάκρυνση της αζιθρομυκίνης από το θρεπτικό υλικό των κυττάρων, τα κύτταρα επανάκτησαν το φυσιολογικό δυναμικό του πολλαπλασιασμού τους. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των κυττάρων που ανέκαμπταν από την επίδραση της αζιθρομυκίνης ήταν 248.56% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ως ομάδα ελέγχου θεωρήθηκαν τα κύτταρα που επωαζόταν απουσία ορού την ημέρα που αφαιρέθηκε η αζιθρομυκίνη από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας), ενώ ήταν 355.53% ο αριθμός των κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία ορού, δηλαδή που είχαν το μέγιστο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, ο αριθμός των κυττάρων που εξακολούθησαν να βρίσκονται υπό την επίδραση της αζιθρομυκίνης ήταν σαφώς ελαττωμένος στο 42.03% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

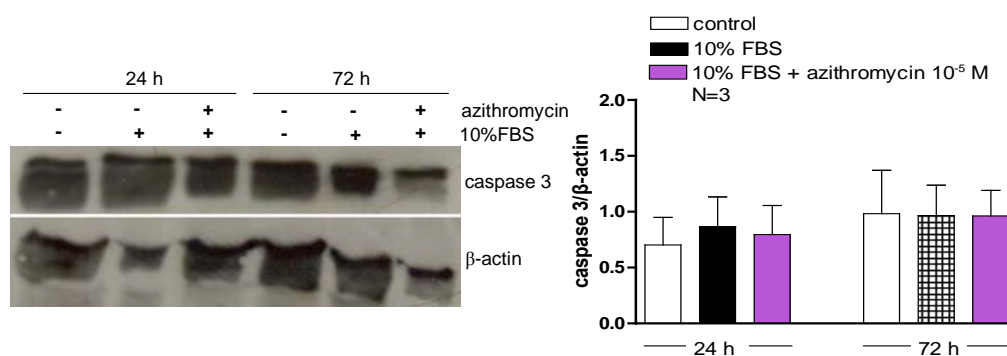


Εικόνα 100.

Αντιστρεπτή επίδραση αζιθρομκίνης ($10^{-5}M$), στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P<0.01$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.1.9. Ενεργοποίηση απόπτωσης από την αζιθρομκίνη σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αζιθρομκίνη μπορεί να οδηγεί τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού στο θάνατο μέσω απόπτωσης, μελετήθηκε η βασική πρωτεΐνη του αποπτωτικού μονοπατιού κασπάση-3. Η μελέτη της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης αυτής έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης από κύτταρα που είχαν επωαστεί για 24 και 72 ώρες με θρεπτικό υλικό παρουσία ή απουσία αζιθρομκίνης, και χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της κασπάσης 3. Η κασπάση-3 ανιχνεύτηκε σε όλα τα κύτταρα ανεξαρτήτως συνθηκών επώασης, όπως φαίνεται και από την ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος σε σχέση με το σήμα της β - ακτίνης των κυττάρων (Εικόνα 101). Δεν παρατηρήθηκε επιπλέον αύξηση της πρωτεΐνης κασπάση-3 σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομκίνη.



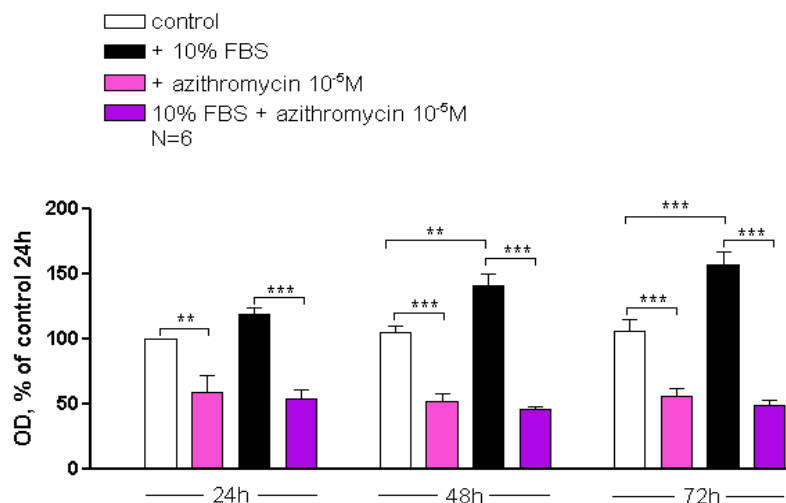
Εικόνα 101.

Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-caspase 3, και anti-β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$).

Ο λόγος caspase 3/β-actin σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 24h ή 72h με αζιθρομυκίνη ($10^{-5}M$). Το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

7.2. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου

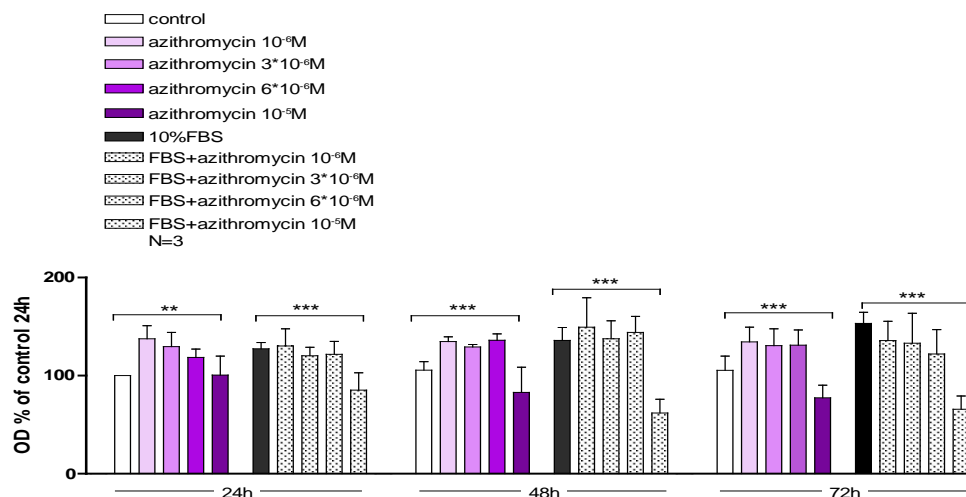
Μελετήθηκε η επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ που απομονώθηκαν από ανθρώπινους βρόγχους. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να είναι κατά το δυνατόν συγχρονισμένα και να σταματήσουν να πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια επώαστηκαν για 24, 48, 72 ώρες παρουσία αζιθρομυκίνη $10^{-5}M$. Παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των κυττάρων που επώαστηκαν με την μακρολίδη σε $59.3 \pm 12.5\%$, $51.7 \pm 6.5\%$ και $56.2 \pm 6.2\%$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, στις 24, 48, 72 ώρες επώασης, αντίστοιχα. Παρόμοια ελάττωση του αριθμού των κυττάρων παρατηρήθηκε και όταν στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας εκτός από την αζιθρομυκίνη υπήρχε και ορός (Εικόνα 102). Συγκεκριμένα, το ποσοστό της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας, ήταν $54.2 \pm 6.31\%$, $46.4 \pm 1.9\%$ και $49.5 \pm 4.0\%$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώασης με αζιθρομυκίνη αντίστοιχα. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά διατηρούσαν το δυναμικό του πολλαπλασιασμού τους στην καλλιέργεια, εφόσον κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό που περιείχε μόνο ορό πολλαπλασιάστηκαν και το ποσοστό τους έφτασε σε $118.7 \pm 5.2\%$, $141.2 \pm 9.1\%$ και 157.4 ± 9.4 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αντίστοιχα.



Εικόνα 102.

Επίδραση αζιθρομυκίνης, απουσία και παρουσία 10% FBS στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το αντίστοιχο control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

Είναι σημαντικό ότι στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου δεν εμφανίστηκε δόσοεξαρτώμενη επίδραση της αζιθρομυκίνης, καθώς κύτταρα που επωάστηκαν με αζιθρομυκίνη σε συγκεντρώσεις 10^{-6} M ως 6×10^{-6} M, τόσο παρουσία όσο και απουσία ορού δεν επηρεάστηκαν ως προς τον αριθμό τους στην καλλιέργεια (Εικόνα 103).



Εικόνα 103.

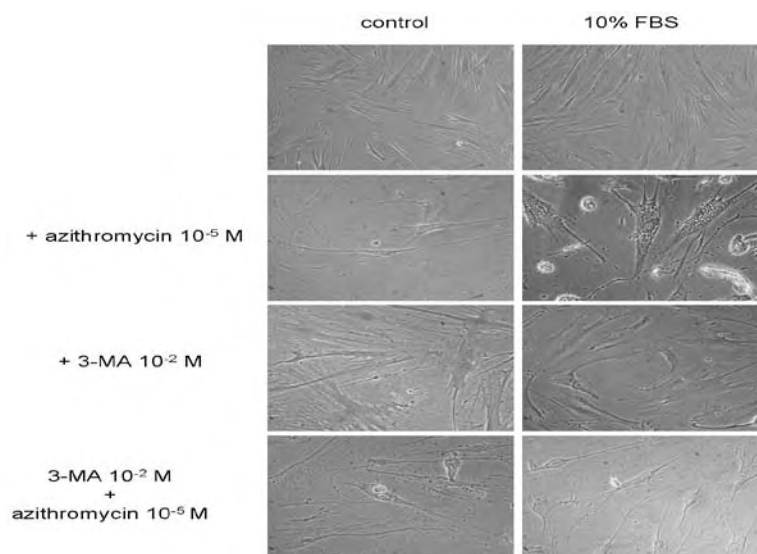
Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζιθρομυκίνης, απουσία και παρουσία 10% FBS στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. **P<0.01 και ***P<0.001 σε σύγκριση με το control ή το 10% FBS (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.2.1. Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεσίνη (3MA)

7.2.1.1. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεσίνη (3MA)

Όταν τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη 10⁻⁵M για 24 ώρες, η μορφολογία τους άλλαξε καθώς εμφανίστηκαν κυτταροπλασματικά κυστίδια, τα οποία είναι χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας. Ο σχηματισμός των κυστιδίων ήταν εμφανής τόσο σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία όσο και απουσία ορού.

Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 3 ώρες με τον αναστολέα της αυτοφαγίας 3MA, πριν την επώαση, για 24 ώρες, με την αζιθρομυκίνη, τα κυστίδια εξακολούθησαν να είναι εμφανή, στα πολλαπλασιαζόμενα και μη κύτταρα (Εικόνα 104).

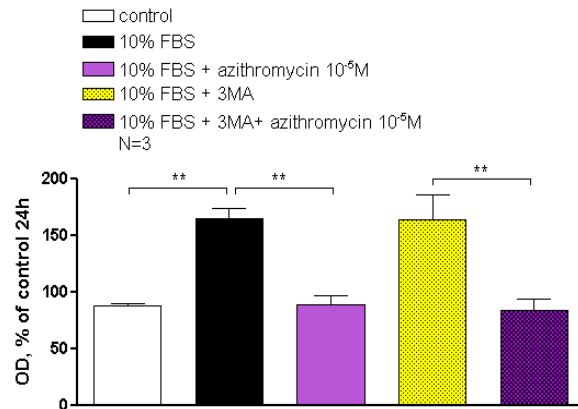


Εικόνα 104.

Επίδραση αζιθρομυκίνης (10⁻⁵M), απουσία και παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA (10mM), μετά από επώαση 24h στη μορφολογία των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

7.2.1.2. Επίδραση της αζιθρομυκίνης στον αριθμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, παρουσία του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-μέθυλοαδεονίνη (3-MA)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν η 3-MA (10mM), που αναστέλλει τις τάξεις III κινάσες της 3-φωσφατιδυλοinositolής και κατ' επέκταση την διαδικασία της αυτοφαγίας μπορεί να επιδράσει στην προκαλούμενη από την αζιθρομυκίνη ελάττωση του αριθμού των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με 3-MA για 3 ώρες και στη συνέχεια για 24 ώρες με το αντιβιοτικό, δεν παρουσιάστηκε καμία αναστολή στην επαγόμενη από την αζιθρομυκίνη ελάττωση του αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 105). Συγκεκριμένα, το ποσοστό της μετρούμενης οπτικής πυκνότητας ως προς την οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώατηκαν για 24 ώρες χωρίς ορό ήταν 158.31±7.32% σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, 130.79±22.75% σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό παρουσία 3-MA, 108.77±9.98% σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη και 104.64±17.31% σε κύτταρα που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη παρουσία 3-MA.

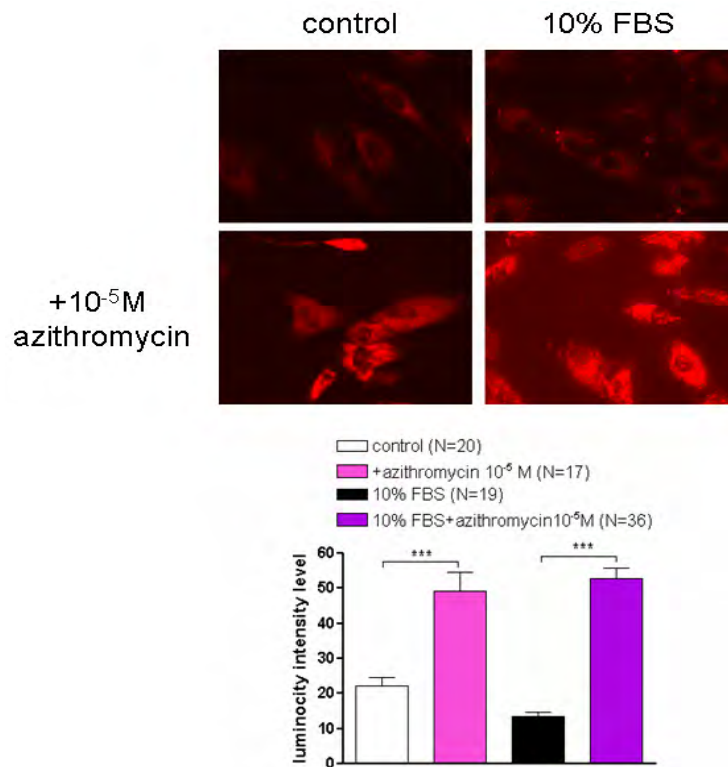


Εικόνα 105.

Επίδραση αζιθρομυκίνης (10^{-5} M), παρουσία 10% FBS και του αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA (10mM) στον αριθμό των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. $**P<0.01$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο control (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

7.2.2. Επίδραση αζιθρομυκίνης στα λυσοσώματα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου.

Όπως προαναφέρθηκε, η αζιθρομυκίνη 10^{-5} M προκάλεσε τον σχηματισμό κυστιδίων στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Προκειμένου να καθοριστεί η φύση αυτών των κυστιδίων έγινε χρώση των κυττάρων που είχαν επωαστεί με το αντιβιοτικό για 24 ώρες με την χρωστική Lysotracker Red, με την οποία γίνεται εφικτός ο εντοπισμός λυσοσωμάτων σε ζωντανά κύτταρα. Η χρωστική αυτή απορροφήθηκε από τα κύτταρα και παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ενσωμάτωσής της από τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με αζιθρομυκίνη (Εικόνα 106). Συγκεκριμένα τα επίπεδα φθορισμού των κυττάρων που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη ήταν 49.18 ± 5.34 και 52.75 ± 2.89 σε κύτταρα που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη απουσία και παρουσία ορού αντίστοιχα, σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού των υπολοίπων κυττάρων, που ήταν 22.2 ± 2.54 για τα κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού και 13.41 ± 1.2 για τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία 10%FBS. Επομένως, είναι φανερό ότι η αζιθρομυκίνη προκάλεσε αυξημένη συγκέντρωση λυσοσωμάτων στα ΛΜΚ, χαρακτηριστική σε κύτταρα που υπόκεινται σε αυτοφαγία καθώς τα λυσοσώματα ενώνονται με τα αρχικά αυτοφαγικά κυστίδια δημιουργώντας τα αυτοφαγώματα.



Εικόνα 106.

Χρώση λυσοσωμάτων με Lysotracker Red μετά από επώαση με αζιθρομυκίνη (10⁻⁵M), για 24h σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Η ένταση του φθορισμού παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων μετρήσεων. ***P<0.001 σε σύγκριση με το control ή το 10% FBS (One-way ANOVA με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων να καθορίζονται από Bonferonni's post test)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αρχικός χαρακτηρισμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν με αντισώματα κατά της α -ακτίνης και της δεσμίνης επιβεβαίωσε τον κυτταρικό τύπο τους. Τα ΛΜΚ εκφράζουν τις δύο αυτές πρωτεΐνες στον κυτταροσκελετό τους σε συγκεκριμένους σχηματισμούς, που δημιουργούν ένα πρότυπο αποκλειστικά για τα ΛΜΚ.

Τα ΛΜΚ τόσο της τραχείας κουνελιού όσο και των βρόγχων ανθρώπου, εμφάνισαν δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αύξηση του πολλαπλασιασμού τους παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων FBS. Ο ορός περιέχει ένα μίγμα αυξητικών παραγόντων απαραίτητων για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού η δράση του ορού είναι στατιστικά σημαντική από την συγκέντρωση 0.1%, ενώ στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου από τη συγκέντρωση 3%, όσον αφορά την ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης. Το γεγονός ότι τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ορού σε σχέση με τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, προκειμένου να επαχθεί η αντιγραφή DNA στα κύτταρα, είναι ενδεικτικό του ότι οι δύο καλλιέργειες ΛΜΚ που χρησιμοποιήθηκαν δεν αντιδρούν με πανομοιότυπο τρόπο απέναντι στα ερεθίσματα που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό τους. Παρόλα αυτά και στους δύο τύπους κυττάρων μετά τη συγκέντρωση 5% ορού η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων φτάνει σε ένα μέγιστο επίπεδο. Επομένως, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση 10% FBS ως θετική ομάδα ελέγχου, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα διέθεταν την μέγιστη ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Οι γεννητικές ορμόνες επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών συστημάτων του οργανισμού και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις εμφανίζονται φυλοεξαρτώμενες διαφορές, όπως για παράδειγμα στην αθηροσκλήρωση (65), στην οστεοπόρωση (66) και σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές (67). Έχει βρεθεί ότι οι γεννητικές ορμόνες επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων, τόσο στο στάδιο της οργανογένεσης (200, 201) ή και αργότερα (202). Στο αναπνευστικό σύστημα η συμμετοχή των ορμονών έχει δειχθεί σε μελέτες που αφορούν την ανταποκρισιμότητα των αεραγωγών (64, 73, 74), αλλά και σε μελέτες που διερευνούν τον ρόλο των ορμονών στην εμφάνιση παθήσεων του αναπνευστικού, κυρίως στο άσθμα (203, 204, 69, 70).

Αν και η δράση των στεροειδών ορμονών μπορεί να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία ορισμένων ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος όπως το Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας στα πρόιμα νεογνά ή στο Βρογχικό Άσθμα, ο μηχανισμός δράσης των γεννητικών ορμονών στο αναπνευστικό σύστημα δεν είναι γνωστός. Οι ασθένειες αυτές εμφανίζονται με μμεγαλύτερη συχνότητα στα αγόρια. Κατά την ενηλικίωση το άσθμα παρουσιάζει μμεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες (205, 206). Η εμπλοκή των γεννητικών ορμονών στην παθογένεια του άσθματος ή/και στην εξέλιξη της νόσου πιθανολογείται λόγω της διαφορετικής συχνότητας εμφάνισης της νόσου στα δύο φύλα αλλά και λόγω της επιδείνωσης του άσθματος σε φάσεις του εμμήνου κύκλου (207, 79). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η εκτίμηση της βαρύτητας του άσθματος σε άτομα που λαμβάνουν ορμονοθεραπεία είναι δύσκολη, λόγω τροποποίησης των συμπτωμάτων της νόσου σε αυτά τα άτομα (80, 81), καθώς επίσης και ότι η λειτουργία των αεραγωγών σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση εμφανίζει διαφορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη λειτουργία τους πριν την εμμηνόπαυση (208, 209).

Οι παρατηρούμενες, λοιπόν, διαφορές στις παθήσεις του αναπνευστικού σε άτομα που βρίσκονται σε διαφορετική ορμονική κατάσταση έκαναν ενδιαφέρουσα τη διερεύνηση της επίδρασης των γεννητικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Παρατηρήθηκε ότι επώαση των ΛΜΚ τραχείας τόσο αρσενικού όσο και θηλυκού κουνελιού, με τεστοστερόνη ($10^{-8}M$) οδήγησε σε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης, αλλά και σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως αυτός μετρήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η τεστοστερόνη επάγει την αντιγραφή του DNA στα κύτταρα αυτά και προωθεί τον διπλασιασμό τους, δρώντας ως μιτογόνο ερέθισμα. Επώαση των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού ή θηλυκού κουνελιού με οιστραδιόλη ($10^{-8} M$) οδήγησε σε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης, αλλά όχι του αριθμού των κυττάρων, όπως αυτός μετρήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay. Ήταν εμφανές ότι οι δύο ορμόνες δεν είχαν την ίδια ακριβώς επίδραση στα κύτταρα, καθώς η οιστραδιόλη δεν εμφάνισε μιτογόνο δράση, παρά μόνο αύξησε την αντιγραφή του DNA στα κύτταρα, σε αντίθεση με την τεστοστερόνη.

Παρόλο που στην παθοφυσιολογία του άσθματος διαφαίνεται η εμπλοκή των γεννητικών ορμονών και είναι γνωστή η άμεση σχέση της χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στο άσθμα με την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών

(210), δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά στοιχεία που να αναφέρονται στην επίδραση των γεννητικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό κυττάρων του αναπνευστικού. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που αφορούν ινοβλάστες και ΛΜΚ αγγείων (211, 212, 213, 214), καθώς και κύτταρα προστάτη (215, 216). Η επίδραση της τεστοστερόνης, διϋδροτεστοστερόνης, προγεστερόνης και της οιστραδιόλης ποικίλει και μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του πολλαπλασιασμού (211, 212, 213) ή σε επάγωγή του (214, 215), καταδεικνύοντας την πολυπλοκότητα του μηχανισμού δράσης τους. Η οιστραδιόλη φαίνεται να έχει διαφορετικό τρόπο δράσης σε σχέση με τα ανδρογόνα, καθώς μπορεί να επάγει σύνθεση DNA στα κύτταρα που επιδρά αλλά και να ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς (217, 218).

Στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού ο επαγόμενος πολλαπλασιασμός ανεστάλει από τον αναστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων φλουταμίδη και στα δύο φύλα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά της ύπαρξης ενεργού υποδοχέα ανδρογόνων σε κύτταρα τόσο αρσενικού όσο και θηλυκού ατόμου. Επιπλέον, φαίνεται ότι η δράση της τεστοστερόνης μεσολαβείται από την πρόσδεσή της στον συγκεκριμένο κυτταροπλασματικό υποδοχέα. Είναι εξάλλου γνωστό ότι τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων (64).

Ο επαγόμενος από την τεστοστερόνη πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ τραχείας αρσενικού κουνελιού και ο επαγόμενος από την οιστραδιόλη πολλαπλασιασμός σε κύτταρα θηλυκού κουνελιού, ανεστάλει και από τους αναστολείς των μονοπατιών της PI3 κινάσης και των MAP κινασών, γεγονός ενδεικτικό της ενεργοποίησης αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών από την τεστοστερόνη και την οιστραδιόλη. Οι γεννητικές ορμόνες έχουν δείξει να επάγουν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών σε ΛΜΚ (213, 214, 215) κυρίως των MAP κινασών, αλλά και της PI3 κινάσης. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών μεσολαβείται από την αρχική δέσμευση της ορμόνης στον υποδοχέα ανδρογόνων ή οιστρογόνων αντίστοιχα (214, 215, 216, 219, 220, 221).

Από τις μελέτες που έχουν γίνει σε ΛΜΚ άλλων οργάνων αλλά και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται η σπουδαιότητα της δράσης των γεννητικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό κυττάρων, των οποίων ο αριθμός επηρεάζει την έκβαση σοβαρών ασθενειών. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των ορμονών παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος, καθώς η πολυπλοκότητά του είναι ιδιαίτερη. Η τεστοστερόνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τραχείας από

κουνέλια και των δύο φύλων, αλλά η δράση της περιορίζεται στις πρώτες 24 ώρες της επώασης. Η ορμόνη είναι συνεχώς παρούσα σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα αρσενικά μόνο άτομα και είναι πιθανό να ασκεί τη δράση της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μόνο σε αυτές τις συνθήκες. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η τεστοστερόνη εμφανίζει προστατευτική μη γενωμική δράση στους αεραγωγούς, καθώς προκαλεί χάλαση (64). Το γεγονός ότι στη δράση των γεννητικών ορμονών εμπλέκονται γενωμικές και μη γενωμικές διαδικασίες, τροποποιώντας το αποτέλεσμα τους καθιστά τη διερεύνηση της δράσης αυτής ιδιαίτερα σημαντική.

Σε φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, όπως και αύξηση της μάζας του λείου μυ των αεραγωγών (102,222). Έτσι κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της πιθανής συμμετοχής της ενεργοποίησης των μουσκαρινικών υποδοχέων στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη οδήγησε σε αυξημένη ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ενσωμάτωση θυμιδίνης από ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Ανάλογα αποτελέσματα απουσίας δράσης μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ έχουν παρατηρηθεί και σε ΛΜΚ τραχείας ανθρώπου (223) ή βοός (224). Η διαφορετική ανταπόκριση των ΛΜΚ που έχουν ληφθεί από διαφορετικά τμήματα του αναπνευστικού, απέναντι στο ίδιο ερέθισμα δηλώνει την εξάρτηση του αποτελέσματος της ενεργοποίησης των μουσκαρινικών υποδοχέων από τον κυτταρικό τύπο. Τόσο τα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού όσο και τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, εκφράζουν M2 και M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς, αλλά μόνο τα ΛΜΚ αεραγωγών κουνελιού εκφράζουν επιπρόσθετα και έναν ακόμη τύπο μουσκαρινικών υποδοχέων, τους M4 μουσκαρινικούς υποδοχείς (95). Παρόλο που η πιθανή συμμετοχή των M4 μουσκαρινικών υποδοχέων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ των αεραγωγών δεν έχει ακόμη διερευνηθεί, υπάρχουν μερικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση των M4 μουσκαρινικών υποδοχέων συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό άλλων κυτταρικών τύπων, όπως επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδή χιτώνα ανθρώπου (225) και νευρικά βλαστοκύτταρα (226).

Παρά την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στην ενσωμάτωση θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τόσο η ακετυλοχολίνη όσο και η καρβαχόλη δεν είχαν καμία επίδραση στον αριθμό των κυττάρων, μετά από 72 ώρες επώασης. Είναι πιθανόν, η επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στα συγκεκριμένα κύτταρα

να εξαρτάται από τον φαινότυπο των κυττάρων και/ή από την πυκνότητα των μουσκαρινικών υποδοχέων στην επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης. Όταν έγινε παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο της μορφολογίας των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη, διαπιστώθηκε ότι η μορφολογία των κυττάρων ήταν παρόμοια αυτής που παρατηρείται σε κύτταρα που επωάζονται με 10% FBS. Δηλαδή, σταδιακά ο φαινότυπός τους άλλαξε στον λιγότερο επιμήκη, 'συνθετικό' φαινότυπο που εμφανίζεται σε κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία ορού. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης κυττάρων που επώαστηκαν με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη, έδειξε αυξημένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p42/44 πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές, σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το μονοπάτι των p42/p44 MAP κινασών εμπλέκεται στην τροποποίηση του φαινοτύπου ΛΜΚ (6, 7), συμπεριλαμβανομένων και ΛΜΚ αεραγωγών (5, 227), προς έναν φαινότυπο λιγότερο συσταλτό. Όταν τα ΛΜΚ αεραγωγών καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον 'συσταλτό' φαινότυπο αυξάνεται (9), καθώς και η έκφραση των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων (8). Με βάση τα δεδομένα αυτά εξετάστηκε η επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 7 μέρες. Τα αποτελέσματα αυτής της ομάδας πειραμάτων έδειξαν ότι τόσο η ακετυλοχολίνη όσο και η καρβαχόλη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των ΛΜΚ μετά από 24 ώρες επώασης, οι οποίες ακολούθησαν τις 7 ημέρες στέρησης ορού. Φαίνεται, επομένως, ότι η επαγωγή του πολλαπλασιασμού από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές, εξαρτάται από τον φαινότυπο του κυττάρου, αλλά και από την πυκνότητα των μουσκαρινικών υποδοχέων

Η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων σε ΛΜΚ αεραγωγών οδηγεί σε ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K ή των MAP κινασών (228). Η ακετυλοχολίνη και η καρβαχόλη επηρέασαν κυρίως την έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt πρωτεΐνης, ενώ η φωσφορυλιωμένη μορφή της p42/44 πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρά ποσά σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν με τους παραπάνω μουσκαρινικούς αγωνιστές. Ωστόσο, ο αναστολέας του μονοπατιού της PI3K, LY 294002 (20 μM) ελάττωσε την επαγόμενη από ακετυλοχολίνη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης, ενώ ο αναστολέας του

μονοπατιού των MAP κινασών, PD 89005 (100 μ M) ελάττωσε την επαγόμενη από καρβαχόλη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παρόλο που η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού οδηγεί σε αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης ενεργοποιώντας τα μονοπάτια της PI3K ή των MAP κινασών, τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται διαφορετικά από τους αγωνιστές των μουσκαρινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνη και καρβαχόλη.

Τόσο η ακετυλοχολίνη όσο και η καρβαχόλη είναι αγωνιστές όλων των τύπων μουσκαρινικών υποδοχέων αλλά και των νικοτινικών υποδοχέων. Η βασική διαφορά των δύο αγωνιστών είναι η αντίστασή τους στη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης, καθώς η καρβαχόλη δεν διασπάται από το ένζυμο. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η ακετυλοχολίνη και η καρβαχόλη αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς τύπους μουσκαρινικών υποδοχέων (103).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της ενεργοποίησης των M2 ή M3 μουσκαρινικών υποδοχέων στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Έτσι, στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές των M2 υποδοχέων γκαλαμίνη (10mM), και των M2-M3 υποδοχέων τιοτρόπιο (30, 100nM). Τόσο η γκαλαμίνη όσο και το τιοτρόπιο αύξησαν από μόνοι τους την ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που είχαν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, δηλαδή σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ενώ δεν είχαν καμία επίδραση σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS. Φαίνεται πως η σύνδεση των ανταγωνιστών στους M2 υποδοχείς μπορεί να ενεργοποίησε ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Υπάρχουν εξάλλου στοιχεία που δείχνουν ότι η σύνδεση αλοστερικών συνδεόμενων μορίων σε μουσκαρινικούς υποδοχείς, απουσία των κλασικών αγωνιστών μπορεί να προκαλέσει απευθείας την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών (229, 230, 231).

Παρόλα αυτά, η γκαλαμίνη δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη από ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Το τιοτρόπιο όμως ελάττωσε την επαγόμενη από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές ενσωμάτωση της ραδιενέργειας, αλλά η ελάττωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στις δύο συγκεντρώσεις του τιοτροπίου, που ήταν ένδειξη ότι από την συγκέντρωση 30nM το τιοτρόπιο ήδη έχει τη μέγιστη δράση. Επομένως, βγαίνει το συμπέρασμα ότι η δράση

της ακετυλοχολίνης και της καρβαχόλης στην αύξηση της ενσωμάτωσης ραδιενέργειας από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού μεσολαβείται κατά πάσα πιθανότητα μέσω ενεργοποίησης μουςκαρινικών υποδοχέων εκτός των M2.

Οι κυταροκίνες TNF-α και IL-1β, που παράγονται πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, είναι παρούσες, σε μόνιμη βάση, στους αεραγωγούς ατόμων που πάσχουν από άσθμα. Θεωρούνται ότι ρυθμίζουν τη λειτουργία των ΛΜΚ, μέσω σύνδεσης σε συγκεκριμένους υποδοχείς οι οποίοι εκφράζονται και εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Φυσιολογικά σε ιστούς τραχείας εκφράζονται οι υποδοχείς στους οποίους συνδέεται ο TNF-α, TNFR-1 και TNFR-2 (232). Ο TNFR-1 φαίνεται ότι είναι ο υποδοχέας που ρυθμίζει την επαγόμενη από τον TNF-α έκφραση των IL-6, ICAM-1 και RANTES σε ΛΜΚ αεραγωγών ανθρώπου (233).

Η επίδραση του TNF-α και της IL-1β στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ των αεραγωγών που μελετήθηκαν έδειξε ποικίλα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, τόσο ο TNF-α, όσο και η IL-1β προκάλεσαν αύξηση στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, αλλά όχι του αριθμού των κυττάρων. Σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου επίδραση τόσο στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης, όσο και στον αριθμό των κυττάρων είχε μόνο ο TNF-α, και όχι η IL-1β. Η επίδραση των φλεγμονωδών παραγόντων αυτών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ανεστάλει από τους αναστολείς των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών. Ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκε ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών με ανάλυση κατά Western σε εκχυλίσματα κυττάρων που είχαν επωαστεί με TNF-α και IL-1β. Τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν ενδεικτικά του ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια παίζουν βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών, παρόλο που η ενεργοποίησή τους δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμη.

Το γεγονός ότι ο TNF-α και η IL-1β εμφανίζουν αντικρουόμενες επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό κυττάρων δεν αποτελεί ασυνήθιστο εύρημα. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι συγκεκριμένοι φλεγμονώδεις παράγοντες αποτελούν μιτογόνες ουσίες για ΛΜΚ αεραγωγών και η επαγωγή του πολλαπλασιασμού εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού της p42/p44 MAPK (234, 235, 236). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τόσο ο TNF-α όσο και η IL-1β είτε αδυνατούν να επάγουν πολλαπλασιασμό από μόνοι τους (137, 237, 238), είτε αναστέλλουν τον επαγόμενο από αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμό των κυττάρων (239). Τα εκ πρώτης όψεως αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν λαμβάνοντας υπ όψιν ότι οι κυταροκίνες ενεργοποιούν την IFNβ (240) και την εξαρτώμενη από

cAMP πρωτεϊνική κινάση (239), οι οποίες οδηγούν σε παύση του πολλαπλασιασμού, ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών που επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή τροποποιούν την επίδραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ αεραγωγών. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να οδηγεί σε αύξηση ή μείωση του πολλαπλασιασμού η οποία εξαρτάται από την παρουσία άλλων αυξητικών παραγόντων (241, 239). Εν κατακλείδι, τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της πολυπλοκότητας της επίδρασης των προ-φλεγμονωδών παραγόντων στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ αεραγωγών.

Στις χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού υπάρχει φλεγμονή στους αεραγωγούς, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του επιθηλίου. Προκειμένου να αποκατασταθεί η ακεραιότητα του επιθηλίου απελευθερώνονται στους αεραγωγούς αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι μεταξύ άλλων οδηγούν και σε πολλαπλασιασμό τα ΛΜΚ των αεραγωγών (12). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται από μια πληθώρα διαφορετικών κυττάρων, τόσο φλεγμονωδών, όπως τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα, όσο και δομικών, όπως τα επιθηλιακά και ακόμη και τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (117, 114).

Έρευνες δείχνουν ότι ο TGF (transforming growth factor, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης), ο bFGF (basic fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών), και ο PDGF (platelet derived growth factor, αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από αιμοπετάλια) επάγουν αύξηση του αριθμού των ΛΜΚ αεραγωγών σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα ή ΧΑΠ (117, 242). Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση αυτών των αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ αεραγωγών τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου. Και οι τρεις αυξητικοί παράγοντες προκάλεσαν αύξηση στην ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης τόσο σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού όσο και βρόγχων ανθρώπου. Επιπλέον, ο bFGF και ο PDGF προκάλεσαν και αύξηση του αριθμού των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, ενώ ο αριθμός των ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου αυξήθηκε όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με καθένα από τους τρεις διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται ότι ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν τα κύτταρα σε πολλαπλασιασμό (118, 119, 120, 121).

Στην παρούσα μελέτη η επίδραση των αυξητικών παραγόντων τόσο σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού όσο και βρόγχων ανθρώπου, ελαττώθηκε από τους αναστολείς των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών. Παρόλο που ο επαγόμενος

πολλαπλασιασμός των κυττάρων ανεστάλει όταν τα σηματοδοτικά μονοπάτια ήταν μη ενεργά, η ανάλυση κατά Western κυτταρικών εκχυλισμάτων από ΛΜΚ που είχαν επωαστεί με τους τρεις αυξητικούς παράγοντες, δεν ανίχνευσε, σε όλες τις περιπτώσεις των παραγόντων, επαγωγή της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Akt, p42/44 και p38. Ωστόσο, φαίνεται ότι αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια της PI3K και των MAP κινασών και προωθούν την αντιγραφή του DNA και την κυτταρική διαίρεση.

Ο ρόλος του TGF στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι αμφιλεγόμενος. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ο TGF επάγει τον πολλαπλασιασμό σε ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες ή ΛΜΚ (243) αλλά αυτή η επαγωγή εξαρτάται από το επίπεδο κορεσμού της καλλιέργειας σε κύτταρα και από τη συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα που χορηγείται στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο TGF επάγει πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ αγγείων ή αεραγωγών όταν η καλλιέργεια είναι κορεσμένη και τα κύτταρα σχηματίζουν μονοστιβάδα. Αντίθετα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων, όταν η καλλιέργεια δεν είναι κορεσμένη (244, 245, 246, 247). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μικρή δόση TGF-β1 επάγει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών, χονδροκυττάρων και αρτηριακών ΛΜΚ, ενώ μεγάλη δόση αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων (243, 244, 245, 247, 248). Ο ίδιος αυξητικός παράγοντας επάγει τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ αεραγωγών τραχείας βοός, ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών (242, 249).

Όσον αφορά τους άλλους δύο αυξητικούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι ο bFGF επάγει τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των p38 MAP κινασών (138), μόνος του ή παρουσία και άλλων αυξητικών παραγόντων, όπως TGF ή PDGF (250). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο PDGF δρα ως μιτογόνο ερέθισμα σε ανθρώπινα ΛΜΚ στεφανιαίας αρτηρίας (251), όπως και σε ανθρώπινα ΛΜΚ τραχείας (252).

Όταν χρησιμοποιήθηκαν μουσκαρινικοί αγωνιστές παρουσία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή των αυξητικών παραγόντων που προαναφέρθηκαν δεν εμφανίστηκε καμία συνεργική δράση όσον αφορά την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού ή βρόγχων ανθρώπου. Αντίθετα, η ακετυλοχολίνη και η καρβαχόλη είτε ανέστειλαν, είτε δεν είχαν καμία επίδραση στον επαγόμενο από τις κυτταροκίνες ή τους αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμό των

κυττάρων. Μια πιθανή εξήγηση της παρατήρησης αυτής μπορεί να είναι ότι οι αυξητικοί παράγοντες ή οι κυτταροκίνες οδηγούν το κύτταρο σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο πολλαπλασιασμού, το οποίο δεν είναι δυνατόν να ενισχυθεί περαιτέρω από τους μουσκαρινικούς αγωνιστές.

Είναι γνωστό ότι οι αυξητικοί παράγοντες δεσμεύονται σε υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinases, RTKs) και η αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα τους, οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές από την άλλη δεσμεύονται σε υποδοχείς του τύπου G πρωτεϊνών (G-coupled protein receptors), οι οποίοι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους RTKs και να ενεργοποιήσουν τα ίδια μονοπάτια με αυτούς (15). Επιπλέον, οι δύο διαφορετικοί φαινότυποι, 'συσταλτός' και 'συνθετικός', των ΛΜΚ εμφανίζουν και διαφορές ως προς το είδος και το πλήθος των υποδοχέων που διαθέτουν (230, 231), ελαττώνοντας πιθανόν την επίδραση των μουσκαρινικών αγωνιστών, λόγω αδυναμίας σύνδεσής τους σε μουσκαρινικούς υποδοχείς, καθώς ο αριθμός τους εμφανίζεται μειωμένος σε κύτταρα που εμφανίζουν τον 'συσταλτό' φαινότυπο, εξαιτίας της απουσίας ορού στο θρεπτικό υλικό. Ακόμη, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του κυττάρου από δύο διαφορετικά ερεθίσματα που επάγουν τον πολλαπλασιασμό του μπορεί να μην έχει αθροιστική δράση καθώς τα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο δεσμεύονται μεν σε διαφορετικούς υποδοχείς αλλά ενεργοποιούν ο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι.

Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δειχθεί πιθανή συνεργική δράση μεταξύ μουσκαρινικών αγωνιστών και αυξητικών παραγόντων. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η μεταχολίνη αυξάνει την μιτογένεση που επάγεται από τον PDGF, ακολουθώντας δοσοεξαρτώμενο πρότυπο σε ΛΜΚ τραχείας βοός, τα οποία έχουν λειτουργικούς M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς (253). Επιπλέον, η καρβαχόλη επαυξάνει τον επαγόμενο από τον EGF (elongating growth factor, αυξητικός παράγοντας επιμήκυνσης) πολλαπλασιασμό σε ΛΜΚ τραχείας ανθρώπου. Η δράση της αυτή μεσολαβείται με ενεργοποίηση της p70 S6 κινάσης (254). Ακόμη, ο ίδιος μουσκαρινικός αγωνιστής ενεργοποιεί τον υποδοχέα του EGF καθώς και την επαγόμενη από τον TGF-β δράση σε ινοβλάστες σκληρού χιτώνα οφθαλμού ποντικού και ανθρώπου, μέσω του μονοπατιού των MEK-ERK-MAP κινασών (255). Ωστόσο έχουν αναφερθεί και αντίθετα αποτελέσματα, όπως το ότι η καρβαχόλη καταστέλλει τον επαγόμενο από τον FGF-2 πολλαπλασιασμό στα ίδια κύτταρα. (255). Οι αντικρουόμενες δράσεις που αναφέρθηκαν είναι ενδεικτικές της πολυπλοκότητας που

υπάρχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από ερεθίσματα που συνδέονται στους RTKs (receptor tyrosine kinase) και στους υποδοχείς των G συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

Συνοπτικά, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές επάγουν τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού αλλά όχι ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την διαφορετική απόκριση των κυττάρων αυτών στο ίδιο ερέθισμα. Ο επαγόμενος πολλαπλασιασμός φαίνεται να μεσολαβείται από τη σύνδεση των αγωνιστών σε M3 μουσκαρινικούς υποδοχείς και την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών.

Οι φλεγμονώδεις και οι αυξητικοί παράγοντες που συνήθως απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες παθήσεις των αεραγωγών, όπως το άσθμα κι η ΧΑΠ, εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών. Ο TNF- α , ο TGF, ο bFGF και ο PDGF επάγουν τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ αεραγωγών τόσο κουνελιού όσο και ανθρώπου, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K, όπως και της p38 και /ή της p42/44 MAP κινάσης, αλλά δεν εμφανίζουν συνεργική δράση με τους μουσκαρινικούς αγωνιστές.

Επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση παθήσεων του αναπνευστικού, στις οποίες συχνά εμφανίζεται αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών. Υπάρχουν κλινικές μελέτες που δείχνουν ότι η θεραπεία με μακρολίδες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς που πάσχουν από τέτοιες ασθένειες. Ωστόσο, οι αντιφλεγμονώδεις και οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των μακρολιδών δεν είναι αρκετές για να εξηγηθεί η βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών (256, 257).

Έχουν γίνει μερικές μελέτες που δείχνουν ότι οι μακρολίδες μπορούν να επηρεάσουν την ανταποκρισιμότητα των λείων μυικών ινών τραχείας κουνελιού, σε πειράματα σύζευξης σύσπασης- συστολής (171) αλλά και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και η δράση τους αυτή είναι ανεξάρτητη της αντιφλεγμονώδους και της βακτηριοστατικής τους δράσης (173, 172, 258). Συγκεκριμένα, η ροξιθρομυκίνη, ο SAR943, που είναι ένα ανάλογο της ραπαμυκίνης, αλλά και η ίδια η ραπαμυκίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ στεφανιαίας αρτηρίας ανθρώπου (172), επιθηλιακών κυττάρων και ΛΜΚ αεραγωγών, αντίστοιχα (173). Άλλες μακρολίδες, όπως η ερυθρομυκίνη, επηρεάζουν κυτταρικές διεργασίες, καθώς αναστέλλει αλλαγές που οδηγούν σε υπερτροφία ή μεταπλασία σε κύτταρα goblet σε ρινικό επιθήλιο

αρουραίου (258). Σε κλινικές μελέτες η αζιθρομυκίνη χορηγείται σε συγκεντρώσεις που έχουν ως αποτέλεσμα συγκέντρωση 8.93 mg/l στον πνεύμονα, η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αζιθρομυκίνης περίπου 10^{-5} M (175, 259). Οι ίδιες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού χρησιμοποιήθηκαν και σε μελέτες που διερευνούσαν την αντιφλεγμονώδη και την αντιβακτηριδιακή δράση του (260, 261).

Για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις αζιθρομυκίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 10^{-5} M έως 10^{-6} M. Η αζιθρομυκίνη επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου. Συγκεκριμένα, η αζιθρομυκίνη ελαττώνει, με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με 10% ορό. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δράση της αζιθρομυκίνης στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, εντοπίζεται κυρίως σε ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, καθώς η παρουσία 10% ορού οδηγεί τα κύτταρα στο μέγιστο επίπεδο πολλαπλασιαστικής ικανότητας.

Όσον αφορά τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, η δράση της αζιθρομυκίνης δεν περιορίζεται μόνο σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, αλλά επεκτείνεται και σε κύτταρα που έχουν σταματήσει να πολλαπλασιάζονται καθώς επώαστηκαν απουσία ορού, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η δράση της στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου είναι ανεξάρτητη της μιτωτικής κατάστασης του κυττάρου. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη επίδραση καθώς η δράση του αντιβιοτικού σε αυτά τα κύτταρα ήταν 'όλα ή τίποτα', δηλαδή ήταν δραστικό σε συγκέντρωση 10^{-5} M και μόνο και η μέγιστη δράση παρατηρήθηκε στις πρώτες 24 ώρες επώασης χωρίς να εμφανίζεται κάποιου είδους κλιμάκωση. Η δράση αυτή πιθανόν αντικατοπτρίζει το γεγονός η αζιθρομυκίνη να αποτελεί ιδιαίτερα έντονο ερέθισμα για τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου. Οι διαφορές στην απόκριση των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού στην αζιθρομυκίνη (262) σε σχέση με τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου, που προαναφέρθηκε, μπορεί ίσως να αποδοθεί σε διαφορές στους κυτταρικούς πληθυσμούς στις καλλιέργειες, καθώς η προέλευση των κυττάρων είναι από δύο διαφορετικά είδη οργανισμών. Επιπλέον, τα ΛΜΚ κουνελιού έχουν απομονωθεί από αεραγωγούς του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, δηλαδή από τραχεία, ενώ τα ΛΜΚ ανθρώπου από κατώτερους αεραγωγούς, δηλαδή βρόγχους. Εξάλλου, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι δύο αυτοί πληθυσμοί ΛΜΚ εμφανίζουν διαφορές ως προς την απόκρισή τους σε ερεθίσματα που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό τους, όπως μουσκαρινικούς αγωνιστές, φλεγμονώδεις και αυξητικούς παράγοντες.

Η αξιθρομυκίνη προκάλεσε τον σχηματισμό κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου και συρρίκνωση των πυρήνων στα κύτταρα του κουνελιού. Επιπλέον, η αναστολή του πολλαπλασιασμού, η αύξηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων, ο σχηματισμός των κυστιδίων και η συρρίκνωση των πυρήνων, όπως αυτή φαίνεται από τη χρώση με DAPI, που προκάλεσε η αξιθρομυκίνη ανεστάλησαν από τον αναστολέα της αυτοφαγία 3-MA, σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Η χρήση του αναστολέα οδήγησε σε διάστικτη εμφάνιση του κυτταροπλάσματος, όπως αυτό παρουσιάζεται με χρώση της α-ακτίνης του κυτταροσκελετού, η οποία πιθανόν οφείλεται στη συσσώρευση πρωτεϊνικών αθροισμάτων τα οποία θα απομακρυνόταν φυσιολογικά με την αυτοφαγία. Αντίθετα σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου η δράση της αξιθρομυκίνης δεν ανεστάλει από τη χρήση 3-MA.

Η αυτοφαγία θεωρείται ένας βασικός μηχανισμός μη αποπτωτικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (263, 264). Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, συμπύκνωση της χρωματίνης, αποικοδόμηση του DNA και κατακερματισμό του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια. Τα κύτταρα που υφίστανται κυτταρικό θάνατο με αυτοφαγία, ωστόσο, χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό κυστιδίων που περιβάλλονται από απλή ή διπλή μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα. Αυτά τα κυστίδια εγκοπλώνουν πρωτεΐνες και οργανίδια τα οποία πρόκειται να αποικοδομηθούν (265). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3 κινάσης (17, 199) όπως και των αυτοφαγικών πρωτεϊνών beclin 1 και/ή LC3 (light chain) (265).

Η συμμετοχή του μονοπατιού της PI3K στη δράση της αξιθρομυκίνης μελετήθηκε με τη χρήση αναστολέων του μονοπατιού αυτού, όπως το LY294002 ή η wortmannin. Η Wortmannin δεν επηρέασε τη δράση της αξιθρομυκίνης, ενώ η παρουσία αξιθρομυκίνης σε συνδυασμό με LY294002 δεν είχε αθροιστική δράση, όσον αφορά τη βιωσιμότητα των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, σε σύγκριση με κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με LY294002. Η απουσία αθροιστικής επίδρασης υποδεικνύει ότι τόσο το LY294002 όσο και η αξιθρομυκίνη μπορεί να δρουν μέσω των ίδιων μονοπατιών, τα οποία πιθανόν να έχουν κορεστεί. Στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που είχαν επωαστεί με αξιθρομυκίνη ανιχνεύτηκε η αυτοφαγική πρωτεΐνη LC3, δείχνοντας την ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας ως απόκριση στη μακρολιδη.

Τα κυστίδια που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας, συγχωνεύονται με λυσοσώματα και το περιεχόμενό τους αποικοδομείται από τη

δράση των λυσοσωμικών ενζύμων. Η αζιθρομυκίνη αύξησε την απορρόφηση της χρωστικής Lysotracker Red από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού και βρόγχων ανθρώπου. Η χρωστική αυτή είναι ειδική για χρώση των λυσοσωμάτων και το ποσό της ουσίας που απορροφάται είναι ανάλογο του αριθμού των λυσοσωμάτων που υπάρχουν στο κύτταρο. Κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε αυτοφαγία ήταν αναμενόμενο να περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό λυσοσωμάτων.

Η αυτοφαγία εμφανίζει διακριτές διαφορές με την απόπτωση. Συγκεκριμένα, στον κυτταρικό θάνατο με αυτοφαγία οι αλλαγές που συμβαίνουν στον πυρήνα των κυττάρων, όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης, εμφανίζονται αργότερα σε σύγκριση με την απόπτωση. Επιπλέον, στην αυτοφαγία δεν εμφανίζεται κατακερματισμός του DNA ή σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων (199). Παρόλο που η αυτοφαγία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό κυττάρων θηλαστικών που υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, η λειτουργία της στα κύτταρα που πεθαίνουν δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (17). Υπάρχουν μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι η αυτοφαγία και η απόπτωση δεν είναι διαδικασίες αμοιβαία αποκλειόμενες, αλλά συχνά η αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση (199, 196, 197). Τα στρεσογόνα ερεθίσματα μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο σε αυτοφαγία ή σε απόπτωση, ανάλογα με τη φύση, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος, αλλά και ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την ενεργειακή κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο τη στιγμή που δέχεται το ερέθισμα (198).

Σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού η αναστολή του πολλαπλασιασμού από την αζιθρομυκίνη ήταν αντιστρέψιμη, καθώς η αφαίρεση του αντιβιοτικού μετά από 48 ώρες επώασης, οδήγησε τα κύτταρα στην επανάκτηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας. Ο σχηματισμός κυστιδίων γινόταν πιο έντονος καθώς αυξανόταν ο χρόνος επώασης με αζιθρομυκίνη, αλλά η δράση αυτή αντιστράφηκε όταν αφαιρέθηκε το αντιβιοτικό και τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό με ορό. Επιπλέον, η αζιθρομυκίνη αδυνατούσε να προκαλέσει απόπτωση στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, στις συνθήκες της καλλιέργειας, καθώς δεν οδήγησε σε επιπρόσθετη ενεργοποίηση της αποπτωτικής πρωτεΐνης κασπάση-3. Αντίθετα σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου έχει βρεθεί ότι η αζιθρομυκίνη αυξάνει το ποσοστό των προ-αποπτωτικών κυττάρων, καθώς ενεργοποιεί τα αποπτωτικά μονοπάτια από τις πρώτες 24 ώρες της επώασης (199). Πιθανόν για τα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου η αζιθρομυκίνη να αποτελεί πολύ έντονο ερέθισμα που οδηγεί τα κύτταρα σε αυτοφαγία που μεταπίπτει

πολύ γρήγορα σε απόπτωση, ενώ κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού.

Η αυτοφαγία λειτουργεί σε βασικά επίπεδα σε κύτταρα θηλαστικών αλλά επάγεται από στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως στέρηση θρεπτικών υλικών ή αυξητικών παραγόντων (197). Η διαδικασία της αυτοφαγίας ρυθμίζεται από ένα σύνολο κυτταρικών μονοπατιών, και κατ' επέκταση από μόρια, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν αυτά τα μονοπάτια (17). Μεταξύ αυτών είναι και η μακρολίδη ραπαμυκίνη η οποία επάγει την αυτοφαγία, καθώς συνδέεται στον mTOR, μια πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία, και τον απενεργοποιεί. Επίσης, η μακρολίδη μπαφιλομυκίνη A1 αναστέλλει την αυτοφαγία, αναστέλλοντας τη δράση της ΑΤΡάσης των κυστιδίων (198). Ακόμη η αζιθρομυκίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε φωσφολιπίδια και ως εκ τούτου να επηρεάζει τις ιδιότητες βιολογικών μεμβρανών (266), και να ενεργοποιεί μονοπάτια αυτοφαγίας καθώς τα σφιγγολιπίδια ανήκουν στα μόρια που ρυθμίζουν την αυτοφαγία (17). Υπάρχουν ακόμη μελέτες οι οποίες δείχνουν την επαγωγή απόπτωσης από μακρολίδες. Για παράδειγμα η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη επάγουν απόπτωση σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (267, 178).

Συμπερασματικά:

- ❖ τα ΛΜΚ των αεραγωγών επηρεάζονται από παράγοντες οι οποίοι είναι παρόντες στους αεραγωγούς σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα οι γεννητικές ορμόνες,
- ❖ από παράγοντες που εντοπίζονται στους αεραγωγούς σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε παθολογικές καταστάσεις, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, όπως οι μουσκαρινικοί αγωνιστές, οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες.
- ❖ από παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μέσα σε λοιμώξεις, όπως το αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη.

Η μελέτη του τρόπου με τον οποίο επηρεάζουν οι προαναφερθείσες ουσίες τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών έχει ιδιαίτερη σημασία, τόσο ως προς την κατανόηση των μηχανισμών που λειτουργούν, αλλά και ως προς τη διερεύνηση πιθανών κλινικών εφαρμογών σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος.

Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι:

- ❖ Η σύνδεση παραγόντων σε μεμβρανικούς υποδοχείς ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του ΛΜΚ, δηλαδή τα μονοπάτια της PI3 κινάσης και των MAP κινασών.
- ❖ Ορισμένα ερεθίσματα, όπως η αζιθρομυκίνη, είναι ικανά να ενεργοποιήσουν περίπλοκους μηχανισμούς οι οποίοι θα συμβάλουν στην προσπάθεια επιβίωσης του κυττάρου ή θα το οδηγήσουν σε θάνατο αν είναι ανέφικτη η διάσωσή του.
- ❖ Οι μηχανισμοί δράσης των παραγόντων που μελετηθηκαν φαίνεται ότι εμπεριέχουν την συμμετοχή υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου αλλά και σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία τελικά οδηγούν σε ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων απαραίτητων για τη φυσιολογική απόκριση και λειτουργία των ΛΜΚ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **McGeown JG, Μολυβδάς ΠΑ, Γουργουλιάνης Κ, Χατζηευθυμίου Α.** Συνοπτική Φυσιολογία του ανθρώπου, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη.
2. **Berne RM, Levy MN,** Αρχές Φυσιολογίας, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
3. **Halayko AJ, Tran T, Gosens R.** Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc* 2008, 5:80-88.
4. **Halayko AJ, Stelmack GL, Yamasaki A, McNeill K, Unruh H, Rector E.** Distribution of phenotypically disparate myocyte subpopulations in airway smooth muscle. *CanJ Physiol Pharmacol* 2005, 83:104-116.
5. **Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME et al** Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol* 1999, 276: 197-206.
6. **Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K.** Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1999, 145: 727–740
7. **Roy J, Kazi JM, Hedin U, Thyberg J.** Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK 1/2. *Differentiation* 2001, 67: 50–58.
8. **Hirst SJ.** Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 1996, 9:808-20.
9. **Gosens R, Meurs H, Bromhaar MM, McKay S, Nelemans SA, Zaagsma J.** Functional characterization of serum- and growth factor-induced phenotypic changes in intact bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002, 137: 459–466.
10. **Kim V, Rogers TJ, Criner GJ.** New concept in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008, 5: 478-485
11. **Bentley JK, Hershenson MB.** Airway smooth muscle growth in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2008, 5:89-96.
12. **Vignola A, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V et al.** Airway remodelling in asthma. *Chest* 2003, 123:417S-422S.
13. **Jeffery PK.** Remodelling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164: 28–38.
14. **Zhou L, Hershenson MB.** Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2002, 137:295-308
15. **Gosens R, Roscioni SS, Dekkers BGJ, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D et al** Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. *European J of Pharmacology* 2008, 585: 385-397.

16. **Gozuacik D, Kimchi A.** Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007, 78: 217-45.
17. **Tsujimoto Y, Shimizu S.** Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 2005, 12: 1528-1534.
18. **Yan CH, Yang YP, Qin ZH, Gu ZL, Reid P, Liang ZQ** Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28: 540-548.
19. **Abell K, Watson CJ.** The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity. *Cell Cycle* 2005, 4: 897-900.
20. **Brachmann SM.** Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Mol. Cell Biol* 2005, 25: 2593-2606.
21. **Katso R.** Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, 17: 615-675.
22. **Vanhaesebroeck B, Waterfield MD.** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999, 253: 239-254.
23. **Nathan T, Ihle A.** Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling, *Mol Cancer Ther* 2004, 3: 763-772
24. **www.fermentek.co.il/wortmannin.htm**
25. **Vanhaesebroeck B.** Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 2001.
26. **Liu Y.** Polo-like Kinases Inhibited by Wortmannin: Labeling Site and Downstream Effects. *J Biol Chem* 2007,282(4): 2505-11.
27. **Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF.** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994, 269: 5241-5248.
28. **Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW.** Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 (18): 6940-3.
29. **Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001, 22 (2): 153-83.
30. **Chang L, Karin M.** Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001, 410 (6824): 37-40.
31. **Weston CR, Lambright DG, Davis RJ.** Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* 2002, 296: 2345-7.
32. **Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH.** ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem* 2001, 276 (11): 7927-31.

33. **Chen YR, Tan TH** The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. *Int J Oncol* 2000, 16(4):651-62.
34. **Enslin H, Brancho DM, Davis R J.** Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J* 2000, 19:1301-1311.
35. **Kyriakis JM, Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev* 2001, 81:807-869.
36. **Ono K, Han J.** The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000, 12:1-13.
37. **Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ et al.** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem* 1995, 270:7420-7426.
38. **Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B et al.** MAP kinases. *Chem Rev* 2001, 101:2449-2476.
39. **Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ.** The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1beta-dependent PGE (2) release via mechanistically distinct processes. *J Biol Chem* 2000, 130(6):1353-61.
40. **Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR.** A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92: 7686-7689.
41. **Alessi DR, Cuenda A, Coehn P, Dudley DT, Saltiel AR.** PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1995, 270: 27489–27494.
42. **Liu PY, Death AK, Handelsman DJ** Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev.* 2003, 24(3):313-40.
43. **Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M.** Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000, 52(4):513-56.
44. **Lösel R, Wehling M.** Nongenomic actions of steroid hormones *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4(1):46-56.
45. **Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ et al.** International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* 2006, 58 (4): 782–97.
46. **Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK et al.** Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 1999, 55: 309–52.
47. **Wilson CM, McPhaul MJ.** A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994, 91 (4): 1234–8.
48. **Davison SL, Bell R.** Androgen physiology. *Semin Reprod Med* 2006, 24 (2): 71–70

49. **Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG** Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987, 8 (1): 1–28.
50. **Heemers HV, Tindall DJ.** Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007, 28 (7): 778–808.
51. **Heinlein CA, Chang C.** The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002, 16 (10): 2181–7.
52. **Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH.** Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101 (30): 10919–24.
53. **Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C.** Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001, 98 (13): 7200–5.
54. **Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS et al.** International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006, 58 (4): 773–81.
55. **Levin ER** Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005, 19 (8): 1951–9.
56. **Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL.** Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 1999, 10 (2): 471–86.
57. **Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M.** Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2004, 24 (17): 7681–94.
58. **Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS** Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res.* 2005, 7 (1): 101–12.
59. **Björnström L, Sjöberg M** Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept* 2004, 2 (1): 3-8.
60. **Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA.** GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol* 2007, 265-266: 138–42.
61. **Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D et al** G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 2008, 149 (10): 4846–56.
62. **Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH** Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004, 101 (49): 17126–31.

63. **Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H et al.** Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995, 270 (5241): 1491–4.
64. **Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA** Sexual dimorphism in airway responsiveness to sex hormones in rabbits *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293: L516-520.
65. **Meyer MR, Haas E, Barton M.** Sex differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signalling. *Hypertension* 2006, 47:1019–1026.
66. **Most W, van der Wee-Pals L, Ederveen A, Papapoulos S, Lowik C.** Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. *Bone* 1997, 20:27–30.
67. **Gillies GE, Murray HE, Dexter D, McArthur S.** Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2004, 78:513–522.
68. **Rhodes L, Moorman JE, Redd SC.** Sex differences in asthma prevalence and other disease characteristics in eight states. *J Asthma* 2005, 42: 777–782.
69. **Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G.** Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol* 2003, 56:180–187.
70. **Prescott E, Lange P, Vestbo J.** Effect of gender on hospital admissions for asthma and prevalence of self-reported asthma: a prospective study based on a sample of the general population. *Thorax* 1997, 52:287–289.
71. **Real FG, Svanes C, Omenaas ER, Anto JM, Plana E, Jarvis D et al.** Lung function, respiratory symptoms, and the menopausal transition. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:72–80.
72. **Lieberman D, Kopernik G, Porath A, Lazer S, Heimer D.** Sub-clinical worsening of bronchial asthma during estrogen replacement therapy in asthmatic post-menopausal women. *Maturitas* 1995, 21:153–157.
73. **Degano B, Prévost MC, Berger P, Molimard M, Pontier S, Rami J et al.** Estradiol decreases the acetylcholine-elicited airway reactivity in ovariectomized rats through an increase in epithelial acetylcholinesterase activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001, 164:1849-54.
74. **Matsubara¹ S, Swasey¹ CH, Loader¹ JE, Dakhama¹ A, Joetham¹ A, Ohnishi¹ H et al.** Estrogen Determines Sex Differences in Airway Responsiveness after Allergen Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, 38: 501–508.
75. **Wilson CM, McPhaul MJ.** A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 1996, 120(1): 51-7.
76. **Osman M.** Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy. *Arch Dis Child.* 2003, 88(7):587-90.
77. **de Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P.** Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 162(1):68-74.

78. **Eliasson O, Scherzer HH, DeGraff AC Jr.** Morbidity in asthma in relation to the menstrual cycle. *J Allergy Clin Immunol* 1986, 77:87–94.
79. **Redmond AM, James AW, Nolan SH, Self TH.** Premenstrual asthma: emphasis on drug therapy options. *J Asthma* 2004, 41:687–693.
80. **Barr RG, Wentowski CC, Grodstein F, Somers SC, Stampfer MJ, Schwartz J et al** Prospective study of postmenopausal hormone use and newly diagnosed asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2004, 164:379–386.
81. **Troisi RJ, Speizer FE, Willett WC, Trichopoulos D, Rosner B.** Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma: a prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:1183–1188.
82. **Semple PD, Beastall GH, Watson WS, Hume R** Serum testosterone depression associated with hypoxia in respiratory failure. *Clin Sci* 1980, 58(1):105-6.
83. **Semple PD, Beastall GH, Brown TM, Stirling KW, Mills RJ, Watson WS.** Sex hormone suppression and sexual impotence in hypoxic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1984, 39(1):46-51.
84. **Kamischke A, Kemper DE, Castel MA, Lüthke M, Rolf C, Behre HM et al** Testosterone levels in men with chronic obstructive pulmonary disease with or without glucocorticoid therapy. *Eur Respir J* 1998, 11(1):41-5.
85. **Creutzberg EC, Casaburi R.** Endocrinological disturbances in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003, 46:76-80.
86. **Viegi G, Scognamiglio A, Baldacci S, Pistelli F, Carrozzi L.** Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiration* 2001, 68(1):4-19.
87. **Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ et al.** Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162(6):2152-8.
88. **Kanner RE, Connett JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP et al.** Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150(4):956-61.
89. **Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J** Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J*. 1997, 10(4):822-7.
90. **Nilsson S, Carstensen JM, Pershagen G.** Mortality among male and female smokers in Sweden: a 33 year follow up. *J Epidemiol Community Health*. 2001, 55(11):825-30.
91. **Mannino DM.** COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002, 121(5 Suppl):121-126.
92. **Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H.N** Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *Engl J Med* 1992, 326(18):1187-91.
93. **Demko CA, Byard PJ, Davis PB.** Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol*. 1995, 48(8):1041-9.

94. **Rosenfeld M, Davis R, FitzSimmons S, Pepe M, Ramsey B.** Gender gap in cystic fibrosis mortality. *Am J Epidemiol.* 1997, 145(9):794-803.
95. **Barnes PJ.** Muscarinic receptors subtypes in airways. *Eur Respir J.* 1993, 6:328-31.
96. **Johnson A, Gordon G.** PDQ Pharmacology (2nd ed.). Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. 2002 pp. 311-321.
97. **Richelson C, Elliott H** Cholinergic Transduction, Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress. American College of Neuropsychopharmacology 2002 <http://www.acnp.org>.
98. **Burford NT, Nahorski SR** Muscarinic M₁ receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by Gs alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. *Biochem J* 1996, 315: 883-8.
99. **Ten Berge RE, Roffel AF, Zaagsma J.** The interaction of selective and non-selective antagonists with pre- and post-junctional muscarinic receptor subtypes in guinea pig trachea. *Eur j pharmacol* 1993, 233:279-84.
100. **Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ.** Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006, 7:73-77.
101. **Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ.** A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1989, 67:2461-5.
102. **Coulson FR, Fryer AD.** Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 2003, 98(1):59-69.
103. **Mitchelson FM, Ziegler A.** The effect of gallamine, gallopamil and nifedipine on responses to acetylcholine and carbachol in the taenia of the guinea pig caecum. *Br J Pharmacol* 1984, 83: 145-155.
104. **Gnagay AL, Seidenberg M, Ellis J.** Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharm* 1999, 56:1245-1253.
105. **Webster's Online Dictionary - Flaxedil.** <http://www.websters-online-dictionary.org>.
106. **Raathbun FJ, Hamilton JT.** Effect of gallamine on cholinergic receptors. *Can Anaes Soc J* 1970, 17:574-590.
107. **Barnes PJ.** The pharmacological properties of tiotropium. *Chest* 2000, 117:63-66.
108. **Hvizdos KM, Goak L.** Tiotropium bromide. *Drugs* 2002, 62:1195-203.
109. **Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek T, Hammer R.** Tiotropium (spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life sciences* 1999, 64:457-464.

110. **Barnes PJ, Belvisi MG, Mak JCW.** Tiotropium bromide (Ba679BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease. *Life science* 1995, 56:853-859.
111. **Gosens R, Bos S, Zaagsma J, Meurs H.** Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Resp Crit Care Med* 2005, 171:1096-1102.
112. **Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE.** Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide. *Life sciences* 2007, 80(24-25):2270-3.
113. **Bai TR, Knight DA.** Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci* 2005,109(6):463-77
114. **Hirst SJ, Twort CH, Lee TH.** Differential effects of extracellular matrix proteins on human smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23: 335-44.
115. **McKay S, Sharma HS.** Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir Res* 2002, 3(1): 11-15.
116. **Halayko A, Amrani Y.** Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2003, 137: 209-222.
117. **Stewart DM, Tian C, Nelson PC.** Linking cellular activation to cytoskeletal reorganization: Wiskott- Aldrich syndrom as a model. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001, 1(6): 525-33.
118. **Karpova AY, Abe MK, Li J, Liu PT, Rhee JM, Kuo WL et al.** MEK1 is required for PDGF-induced ERK activation and DNA synthesis in tracheal myocytes. *Am J Physiol* 1997, 272: 558-65.
119. **Kelleher D, Murphy A, Freighery C, Casey EB.** Leucocyte function-associated antigen1 (LFA-1) and CD44 are signalling molecules for cytoskeleton-dependent morphological changes in activated T- cells. *J Leukoc Biol* 1995, 58 : 539-46.
120. **Krymskaya VP, Penn RB, Ossini MJ, Scott PH, Plevin RJ, Walker TR et al.** Phosphatidylinositol 3 -kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 1999, 277: 65-78.
121. **Walker F, Kato A, Gonez LJ, Hibbs ML, Pouliot N, Levitzki A et al.** Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Mol Cell Biol* 1998, 18:7192-204.
122. **Kuno K, Matsushima K** The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* 1994, 56 (5): 542-7.
123. **Arend WP.** Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991, 88 (5): 1445-51.
124. **Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P.** Tumor necrosis factor signaling *Cell Death Differ.* 2003, 10 (1): 45-65.
125. **Chen G, Goeddel DV.** TNF-R1 signalling: a beautiful pathway. *Science* 2002, 296 (5573): 1634-5.
126. **Dinarello CA** The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J.* 1994, 8 (15): 1314-25.

127. **Morgan MM, Clayton CC, Heinricher MM.** Dissociation of hyperalgesia from fever following intracerebroventricular administration of interleukin-1beta in the rat. *Brain Res.* 2004, 1022 (1-2): 96–100.
128. **Old LJ.** Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985, 230 (4726): 630–2.
129. **Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988, 53 (1): 45–53.
130. **Tang P, Hung MC, Klostergaard J** Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996, 35 (25): 8216–25.
131. **Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF et al.** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997, 385 (6618): 729–33.
132. **Gaur U, Aggarwal BB** Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol* 2003, 66 (8): 1403–8.
133. **Robinson DR, Wu YM, Lin SF.** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000, 19 (49): 5548–5557.
134. **Zwick, E. Bange, J. Ullrich, A.** Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies". *Endocr. Relat. Cancer* 2001, 8 (3): 161–173.
135. **Kelleher MD, Abe MK, Chao TS, Jain M, Green JM, Solway J et al.** Role of MAP kinase activation in bovine tracheal smooth muscle mitogenesis. *Am J Physiol.* 1995, 268: 894-901.
136. **Lee JW, Juliano R.** Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells.* 2004, 17(2):188-202.
137. **Orsini MJ, Krymskaya VP, Eszterhas AJ, Benovic JL, Panettieri RA Jr, Penn RB.** MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am J Physiol* 1999, 277: 479-88
138. **Fernandes DJ, Ravenhall CE, Harris T, Tran T, Vlahos R, Stewart AG.** Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific. *Br J Pharmacol* 2004, 142: 1182-90.
139. **Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A.**The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci.* 1999, 10:408-12.
140. **Halayko AJ, Kartha S, Stelmack GL, McConville J, Tam J, Camoretti-Mercado B et al** Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of rapamycin/p70S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004, 3:266-75.
141. **Khalil N** TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999, 1 (15): 1255–63
142. **Annes JP, Munger JS, Rifkin DB** Making sense of latent TGFβ activation. *J Cell Sci* 2003, 116: 217–224.

143. **Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C et al** Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol.* 2002, 62 (1): 58–64.
144. **Ornitz DM, Itoh N** Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001, 2 (3): 3005-10.
145. **Duchesne L, Tissot B** N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding. *J Biol Chem* 2006, 281 (37): 27178–27189.
146. **Coutts JC, Gallagher JT.** Receptors for fibroblast growth factors. *Immunol Cell Biol* 1995, 73 (6): 584–589.
147. **Soulet F; Al Saati T, Roga S, Amalric F, Bouche G** Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 289 (2): 591–6.
148. **Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, Presta M** The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, 18 (3-4): 327–34.
149. **Liu Y, Song Z, Zhao Y, Qin H, Cai J, Zhang H et al.** A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 346 (1): 131–9.
150. **Matsui T, Heidarman M, Miki T** Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 1989, 243 (4892): 800–4.
151. **Heidarman MA, Pierce JH, Yu JC.** Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol Chem* 1991, 266 (30): 20232–7.
152. **Heidarman MA, Pierce JH, Jensen RA, Matsui T, Aaronson SA** Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *J Biol Chem* 1990, 265 (31): 18741–4.
153. **Yu JC, Li W, Wang LM, Uren A, Pierce JH, Heidarman MA** Differential requirement of a motif within the carboxyl-terminal domain of alpha-platelet-derived growth factor (alpha PDGF) receptor for PDGF focus forming activity chemotaxis, or growth. *J Biol Chem* 1995, 270 (13): 7033–6.
154. www.multi-targetedtherapy.com. PDGF Pathways.
155. **Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Kobayashi T, Miyazaki S, Yamaguchi K.** Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress response. *J Infect Chemother* 2000, 6:1-7.
156. **Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K.** Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 1996, 63:42-8.
157. **Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Oshima T, Takasaka T.** Effects of long-term low-dose macrolide administration on neutrophil

- recruitment and IL-8 in the nasal discharge of chronic sinusitis patients. *Tohoku j Exp med* 1997, 182:115-24.
158. **Irokawa T, Sasaki T, Shimura S, Sasamori K, Oshiro T, Nara M et al** Cholinomimetic action of macrolide antibiotics on airway gland electrocyte secretion *Am J physiol* 1999, 276:951-7.
 159. **Tagaya E, Tamaoki J, Kondo M, Nagai A.** Effect of a short course of clarithromycin therapy on sputum production in patients with chronic airway hypersecretion *Chest* 2002,122:213-8.
 160. **Mathis C, Malbert CH** Erythromycin gastrokinetic activity is partially vagally mediated. *Am J Physiol* 1998, 274: 80–86.
 161. **Nissan A, Freund HR, Hanani M** Direct inhibitory effect of erythromycin on human alimentary tract smooth muscle *Am J Surg* 2002, 183 : 413–418.
 162. **Van Vlem B, Schoonjans R, Vanholder R, De Vos M, Depoortere I, Peeters TL et al** In vitro evaluation of motilin agonism by macrolide immunosuppressive drugs *Nephrol Dial Transplant* 2002, 17 : 973–977.
 163. **Nissan A, Maudlej N, Bebglaibter N, Haskel Y, Freund HR, Hanani M** A direct inhibitory effect of erythromycin on rat urinary bladder smooth muscle *J Urol* 1999, 161:1006–1009.
 164. **Celik H, Ayar A, Sapmaz E** Effects of erythromycin on stretch-induced contractile activity of isolated myometrium from pregnant women, *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001, 80 : 697–701.
 165. **Celik H, Ayar A, Baltaci A, Tug N** Erythromycin inhibits prostaglandin F₂alpha-induced contractions of myometrium isolated from non-pregnant rats, *BJOG* 2002, 109: 1036–1040.
 166. **Celik H, Ayar A** Clarithromycin inhibits myometrial contractions in isolated human myometrium independent of stimulus *Physiol Res* 2002, 51: 239–245.
 167. **England RC, Norman RI, Elliott RA** Direct inhibition of rat detrusor muscle contraction by erythromycin *Neurourol Urodyn* 2004, 23: 273–279.
 168. **Liu H, Zhu T, Ma Y, Qu S.** Effect of erythromycin on contractile response of uterine smooth muscle strips in non-pregnant rats *Pol J Pharmacol* 2003, 55: 57–62.
 169. **Navarro H, Arruebo MP, Alcalde AI, Sorribas V.** Effect of erythromycin on d-galactose absorption and sucrase activity in rabbit jejunum *Can J Physiol Pharm* 1993, 71: 191–194.
 170. **Gaeta GB, Utili R, Adinolfi LE, Abernathy CO, Giusti G** Characterization of the effects of erythromycin estolate and erythromycin base on the excretory function of the isolated rat liver *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, 80: 185–192.
 171. **Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgouljanis KI, Molyvdas PA.** Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2006, 553:280-287.
 172. **Tomita H, Osanai T, Toki T, Maeda N, Murakami R, Chen Z et al** Roxithromycin is an inhibitor of human coronary artery smooth muscle cells proliferation: a potential ability to prevent coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2005, 182:87–95.

173. **Fujitani Y, Trifilieff A.** In vivo and in vitro effects of SAR 943, a rapamycin analogue, on airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167:193–198.
174. **Buitrago-Molina LE, Pothiraju D, Laml'e J, Marhenke S, Kossatz U, Breuhahn K et al** Rapamycin Delays Tumor Development in Murine Livers by Inhibiting Proliferation of Hepatocytes with DNA Damage *Hepatology* 2009, 50: 2-6.
175. **Takahashi Y, Shimizu T, Sakakura Y.** Effects of indomethacin, dexamethasone, and erythromycin on endotoxin-induced intraepithelial mucus production of rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997, 106:683–687.
176. **Roche Y, Gougerot-Pocidallo MA, Fay M, Forest N, Pocidallo JJ** Macrolides and immunity: effects of erythromycin and spiramycin on human mononuclear cell proliferation *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1986, 17:195-203.
177. **Mizunoe S, Kadota J, Tokimatsu I, Kishi K, Nagai H, Nasu M.** Clarithromycin and azithromycin induce apoptosis of activated lymphocytes via down-regulation of Bcl-xL. *Int Immunopharmacol* 2004, 4:1201-1207.
178. **Stamatiou R, Boukas K, Paraskeva E, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A.** Azithromycin reduces the viability of human bronchial smooth muscle cells. *J Antibiot* 2010 Epub ahead of print.
179. **Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M.** Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:1829–1832.
180. **Oishi K, Sonoda F, Kobayashi S, Iwagaki A, Nagatake T, Matsushima K et al** Role of interleukin-8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airway of patients with chronic airway diseases. *Infect Immun* 1994, 62:4145–4152.
181. **Shirai T, Sato A, Chida K.** Effect of 14-membered ring macrolide therapy on chronic respiratory tract infections and polymorphonuclear leukocyte activity. *Intern Med* 1995, 34:469–474.
182. **Miyatake H, Taki F, Taniguchi H, Suzuki R, Takagi K, Satake T.** Erythromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Chest* 1991, 99:670–673.
183. **Cazzola M, Salzillo A, Diamare F.** Potential role of macrolides in the treatment of asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000, 55:231-236.
184. **Yorimitsu T, Klionsky DJ** Autophagy: molecular machinery for self-eating *Cell Death and Differentiation* 2005 12: 1542–1552.
185. **Tsujimoto Y, Shimizu S** Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 2005, 12: 1528-34.
186. **Mizushima N, Klionsky DJ** Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annual Review of Nutrition* 2007, 27: 19–40.
187. **Stromhaug PE, Klionsky DJ** Approaching the Molecular Mechanism of Autophagy *Traffic* 2001, 2 (8): 524-8.
188. **Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G et al** Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998, 72 (11): 8586–96.

189. **Yue Z, Horton A, Bravin M DeJager PL, Selimi F, Heintz N** A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice *Neuron* 2002, 35 (5): 921–33.
190. **Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P.** Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signalling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 2000, 275:992-998.
191. **Seglen PO, Gordon PB.** 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:1889-1892.
192. **Schmid D, Muenz C** Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity* 2007, 27(1):11-21.
193. **Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007, 282 (33): 24131-45.
194. **Schwartz LM** Do All Programmed Cell Deaths Occur Via Apoptosis? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, 90: 980–984.
195. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26 (4): 239–57
196. **Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T.** Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Biol Pharm Bull* 2007, 30:859-864.
197. **Yan CH, Yang YP, Qin ZH, Gu ZL, Reid P, Liang ZQ** Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28:540-548.
198. **Shacka J, Klocke B, Shibata M, Uchiyama Y, Datta G, Schmidt R et al** Bafilomycin A1 inhibits Chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol* 2006, 69:1125-1136.
199. **Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P.** Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 2005, 92:1228-1242.
200. **Levesque BM, Vosatka RJ, Nielsen HC** Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants. *Pediatr Res* 2000, 47: 481-91.
201. **Hume R, Conner C, Gilmour M.** Lung maturation. *Proc Nutr Soc* 1996, 55(1B):529-42.
202. **Dashtaki R, Whorton AR, Murphy TM, Chitano P, Reed W, Kennedy TP** Dehydroepiandrosterone and analogs inhibit DNA binding of AP-1 and airway smooth muscle proliferation. *J Pharmacol Expert Her* 1998, 285(2):876-83.
203. **Lim R. H., Kobzik L.** Editorial: Sexual Tension in the Airways The Puzzling Duality of Estrogen in Asthma *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 2008, 38: 499–500.

204. **Rhodes L, Moorman JE, Redd SC.** Sex differences in asthma prevalence and other disease characteristics in eight states. *J Asthma* 2005, 42: 777–782.
205. **Abramson M, Kutin JJ, Raven J, Lanigan A, Czarny D, Walters EH.** Risk factors for asthma among young adults in melbourne, australia. *Respirology* 1996, 1:291–297.
206. **Strachan DP, Butland BK, Anderson HR.** Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national british cohort. *BMJ* 1996, 312:1195–1199
207. **Eliasson O, Scherzer HH, DeGraff AC Jr.** Morbidity in asthma in relation to the menstrual cycle. *J Allergy Clin Immunol* 1986, 77:87–94.
208. **Real FG, Svanes C, Omenaas ER, Anto JM, Plana E, Jarvis D et al** Lung function, respiratory symptoms, and the menopausal transition. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:72–80
209. **Lieberman D, Kopernik G, Porath A, Lazer S, Heimer D.** Sub-clinical worsening of bronchial asthma during estrogen replacement therapy in asthmatic post-menopausal women. *Maturitas* 1995, 21:153–157
210. **Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM.** Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling, *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 161 :1720–1745
211. **Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ** 17 β Estradiol, Its Metabolites, and Progesterone Inhibit Cardiac Fibroblast Growth. *Hypertension* 1998, 31: 522-528
212. **Moraghan T, Antonucci DM, Grenert JP, Sieck GC, Johnson C, Miller VM et al.** Differential Response in Cell Proliferation to Beta Estradiol in Coronary Arterial Vascular Smooth Muscle Cells Obtained from Mature Female Versus Male Animals. *Endocrinology* 1996, 137: 11-17.
213. **Liu HM, Zhao XF, Guo LN, Tan Z, Wang TH** Effects of caveolin-1 on the 17 β -estradiol-mediated inhibition of VSMC proliferation induced by vascular injury *Life Sciences* 2007, 80: 800–812.
214. **Yang Z, Cheng B, Song J, Wanb Y, Wang Q, Cheng B et al** Estrogen accelerates G1 to S phase transition and induces a G2/M phase-predominant apoptosis in synthetic vascular smooth muscle cells. *International Journal of Cardiology* 2007, 118 : 381–388
215. **Gatson JW, Kaur P, Singh M** Dihydrosterone differentially modulates the MAPK and the PI3 kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology* 2006, 10:1210-15.
216. **Maffini MV, Geck P, Powell CE, Sonnenschein C, Soto AM.** Mechanism of Androgen Action on Cell Proliferation: AS3 Protein as a Mediator of Proliferative Arrest in the Rat Prostate *Endocrinology* 2007, 143(7):2708–2714
217. **Luo Y, Waladali W, Li S, Zheng X, Hu L, Zheng H et al.** 17 β -Estradiol affects proliferation and apoptosis of rat prostatic smooth muscle cells by modulating cell cycle transition and related proteins *Cell Biology International* 2008, 32 :899-905

218. **Scarano WR, Cordeiro RS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR** Tissue remodeling in Guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. *Cell Biol Int* 2005, 29(9):778-84.
219. **Kiss AL, Turi A, Mullner N, Kova'cs E, Botos E, Greger A.** Oestrogen-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its effect on the oestrogen receptor localisation: An in vivo study *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005, 245 : 128–137
220. **Somjen D, Kohen F, Gayer B, Kulik T, Knoll E., Stern N** Role of putative membrane receptors in the effect of androgens on human vascular cell growth *Journal of Endocrinology* 2004, 180: 97–106
221. **Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF** Estrogen Regulation of Endothelial and Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation Role of p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002, 22:1585-1590.
222. **Gosens R, Zaagsma J, Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H,** Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 2004, 500: 193– 201
223. **Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA Jr, et al** Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000, 23: 546-54.
224. **Gosens R, Nelemans SA, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Zaagsma S, Meurs H.** Muscarinic M3 receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am.J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28: 257-62
225. **Liu S, Li J, Tan DT, Beuerman RW.** Expression and function of muscarinic receptor subtypes on human cornea and conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 2987-96.
226. **Ma W, Maric D, Li BS, Hu Q, Andreadis JD, Grant GM.** Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2000, 12: 1227–40.
227. **Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ.** Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD .*Respir Res* 2006, 7:73-78.
228. **Gardner AL, Choo LK, Mitchelson F..** Comparison of the effects of some muscarinic agonists on smooth muscle function and phosphatidylinositol turnover in the guinea-pig taenia caeci *Br. J. Pharmacol.* 1988, 94: 199-211
229. **Jakubík J, Bacáková L, Lisá V, el-Fakahany EE, Tucek S** Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 8705-9.
230. **Jakubík J, Haga T, Tucek S.** Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-gamma-[35S] thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/Go protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* 1998, 54: 899-906
231. **Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA Jr.** Activation of p55 tumor necrosis factor-alpha receptor-1 coupled to tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 stimulates

- intercellular adhesion molecule-1 expression by modulating a thapsigargin-sensitive pathway in human tracheal smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2000, 58: 237-45.
232. **Amrani Y, Ammit AJ, Panettieri RA Jr.** Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2001, 60: 646-55.
 233. **Zhai W, Eynott PR, Oltmanns U, Leung SY, Chung KF.** Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation. *BrJPhar* 2004, 143: 1042-9.
 234. **Yang CM, Luo SF, Wang CC, Chiu CT, Chien CS, Lin C et al** Tumour necrosis factor- α - and interleukin-1 β -stimulated cell proliferation through activation of mitogen-activated protein kinase in canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2000, 130: 891-9.
 235. **Amrani Y, Panettieri RA Jr, Frossard N, Bronner C.** Activation of the TNF α -p55 receptor induces myocyte proliferation and modulates agonist-evoked calcium transients in cultured human tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 15: 55-63.
 236. **McKay S, Bromhaar MM, de Jongste JC, Hoogsteden HC, Saxena PR, Sharma HS.** Pro-inflammatory cytokines induce c-fos expression followed by IL-6 release in human airway smooth muscle cells. *Mediators Inflamm* 2001, 10: 135-42.
 237. **McKay S, Hirst SJ, Haas MB, de Jongste JC, Hoogsteden HC, Saxena PR et al.** Tumor necrosis factor- α enhances mRNA expression and secretion of interleukin-6 in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000, 23: 103-11.
 238. **Misior AM, Yan H, Pascual RM, Deshpande DA, Panettieri RA, Penn RB.** Mitogenic effects of cytokines on smooth muscle are critically dependent on protein kinase A and are unmasked by steroids and cyclooxygenase inhibitors. *MolPharm* 2008, 73: 566-74.
 239. **Tliba O, Tliba S, Da Huang C, Hoffman RK, DeLong P, Panettieri RA Jr, Amrani Y.** Tumor necrosis factor α modulates airway smooth muscle function via the autocrine action of interferon β . *J Biol Chem* 2003, 278: 50615-23.
 240. **Vlahos R, Stewart AG.** Interleukin-1 α and tumour necrosis factor- α modulate airway smooth muscle DNA synthesis by induction of cyclo-oxygenase-2: inhibition by dexamethasone and fluticasone propionate. *BJPharm* 1999, 126 : 1315-24.
 241. **Chen G, Khalil N.** TGF- β 1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases *Respiratory Research* 2006, 7:2-8.
 242. **Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R.** TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*. 1990, 63: 515-24.
 243. **Goodman LV, Majack RA..** Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor- β receptor phenotypes as a function of cell density in culture. *J.Biol.Chem* 1989, 264: 5241-4.

244. **Majack RA.** Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures. *J Cell Biol.* 1987, 105: 465-71.
245. **Majack RA, Majesky MW, Goodman LV.** 1990. Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*1990, 111: 239-47.
246. **Okona-Mensah KB, Shittu E., Page C, Costello J, Klifeather SA.** Inhibition of serum and transforming growth factor beta (TGF-beta1)-induced DNA synthesis in confluent airway smooth muscle by heparin *BrJPharmacology* 1998, 125: 599-606
247. **Fukuda H, Motohiro T, Nakai K, Yamamichi K, Nakane Y, Fujisawa J et al** Negative effect of transforming growth factor-beta-1 on intestinal anastomotic tissue regeneration. *Eur Surg Res* 2001, 33: 388-94.
248. **Shin JH, Shim JW, Kim DS, Shim JY** TGF-beta effects on airway smooth muscle cell proliferation, VEGF release and signal transduction pathways. *Respirology* 2009, 14: 347-53.
249. **Bossé Y, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** FGF2 and TGFβ1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006, 34(6):746-53.
250. **Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Pacher P.** Cannabinoid CB1 receptor inhibition decreases vascular smooth muscle migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 377: 1248-52
251. **Freyer AM, Johnson SR, Hall IP.** Effects of Growth Factors and Extracellular Matrix on Survival of Human Airway Smooth Muscle Cells *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 25: 569–576.
252. **Gosens R, Nelemans A, Bromhaar MG, McKay S, Zaagsma J, Meurs H.** Muscarinic M3- receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28: 257-62.
253. **Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA et al** Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G-protein coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23:546-554.
254. **Barathi VA, Weon SR, Beuerman RW.** Expression of muscarinic receptors in human and mouse sclera and their role in the regulation of scleral fibroblasts proliferation. *Molecular Vision* 2009, 15:1277-1293
255. **Ekici A, Ekici M, Erdemoglu AK.** Effect of azithromycin on the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *J Asthma* 2002; 39:181-185.
256. **Yates B, Murphy DM, Forrest IA, Ward C, Rutherford RM, Fisher AJ, Lordan JL, Dark JH, Corris PA.** Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:772-775.
257. **Danesi, R., Lupetti, A., Barbara, C., Ghelardi, E., Chella, A., Malizia, T., Senesi, S., Angeletti, C.A., Del Tacca, M., Campa, M.** Comparative distribution of azithromycin in lung tissue of patients given oral daily doses of 500 and 1000 mg. *J. Antimicrob Chemother* 2003; 51: 939–945.

258. **Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y.** In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:581–587.
259. **Patel KB, Xuan D, Tessier PR, Russomanno JH, Quintiliani R, Nightingale CH.** Comparison of bronchopulmonary pharmacokinetics of clarithromycin and azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2375–2379.
260. **Phaff SJ, Tiddens HA, Verbrugh HA, Ott A.** Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57:741–5
261. **Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulis KI, Molyvdas P-A, Hatziefthimiou A.** Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2009, 34 :1-11
262. **Clarke PG.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990, 181:195-213.
263. **Gozuacik D, Kimchi A.** Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007, 78:217-45.
264. **Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T.** Augmentation of oridonin-induced apoptosis observed with reduced autophagy. *J Pharmacol Sci* 2006, 101:230-239.
265. **Fa N, Ronkart S, Schanck A, Deleu M, Gaigneaux A, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq MP.** Effect of the antibiotic azithromycin on thermotropic behavior of DOPC or DPPC bilayers. *Chem Phys Lipids* 2006, 144:108-116.
266. **Mizunoe S, Kadota J, Tokimatsu I, Kishi K, Nagai H, Nasu M.** Clarithromycin and azithromycin induce apoptosis of activated lymphocytes via down-regulation of Bcl-xL. *Int Immunopharmacol* 2004, 4:1201-1207
267. **Halayko AJ, Amrani Y** Mechanisms of inflammation- mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodelling in asthma. *Resp Physiol Neurobiol* 2003, 137:209-222

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού εμφανίζεται διαφορά στη συχνότητα και τη βαρύτητα της νόσου σε άτομα διαφορετικού φύλου. Στις παθήσεις αυτές παρατηρείται αυξημένη χολινεργική διαβίβαση, καθώς και απελευθέρωση φλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων. Οι χρόνιες νόσοι του αναπνευστικού συχνά χαρακτηρίζονται από αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών, στην οποία μεταξύ άλλων συμμετέχει και η αύξηση της μάζας των ΛΜΚ. Στην θεραπεία μερικών από αυτές τις χρόνιες παθήσεις χορηγούνται μακρολίδες, εξαιτίας όχι μόνο της αντιμικροβιακής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους αλλά και λόγω της απευθείας επίδρασης τους στα κύτταρα των αεραγωγών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση παραγόντων, όπως οι γεννητικές ορμόνες, οι μουσκαρινικοί αγωνιστές, φλεγμονώδεις και αυξητικοί παράγοντες και το αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη, στα ΛΜΚ των αεραγωγών.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ΛΜΚ από τραχεία κουνελιού και βρόγχους ανθρώπου. Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης σε νεοσυντιθέμενα μόρια DNA, και με τη μέθοδο Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Assay, με την οποία εκτιμάται ο αριθμός των κυττάρων. Η βιωσιμότητα των κυττάρων και ο αριθμός των λυσοσωμάτων εκτιμήθηκαν με χρώσεις με Trypan blue και Lysotracker red, αντίστοιχα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τα ερεθίσματα που προαναφέρθηκαν, μελετήθηκαν με τη χρήση αναστολέων και με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Οι γεννητικές ορμόνες επάγουν τον πολλαπλασιασμό ΛΜΚ τραχείας αρσενικού και θηλυκού κουνελιού τις πρώτες 24 ώρες της επώασης και η δράση τους μεσολαβείται μέσω των κλασικών υποδοχέων ανδρογόνων και μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών. Οι μουσκαρινικοί αγωνιστές επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ κουνελιού αλλά όχι ανθρώπου και η δράση τους φαίνεται να μεσολαβείται μέσω M3 μουσκαρινικών υποδοχέων και των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών. Οι παράγοντες TNF α , TGF β , bFGF και PDGF έχουν μιτογόνο δράση σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου και επάγουν την ενσωμάτωση ραδιενέργειας από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, μέσω ενεργοποίησης των παραπάνω μονοπατιών, αλλά δεν εμφανίζουν συνεργική δράση με τους

μουσκαρινικούς αγωνιστές. Η μακρολίδη αζιθρομυκίνη ελάττωσε τον πολλαπλασιασμό και προκάλεσε αυτοφαγία σε ΛΜΚ αεραγωγών κουνελιού και ανθρώπου. Η δράση της στα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού περιορίστηκε σε ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ήταν δοσοεξαρτώμενη, χρονοεξαρτώμενη και δεν οδήγησε τα κύτταρα σε απόπτωση, ενώ στα ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου ελάττωσε τον αριθμό των κυττάρων σε όλες της συνθήκες της καλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα ΛΜΚ των αεραγωγών αντιδρούν απέναντι σε μια πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι βρίσκονται στους αεραγωγούς σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις. Η φύση, η ένταση και η διάρκεια του ερεθίσματος καθορίζει την κυτταρική απόκριση που περιλαμβάνει ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν το κύτταρο σε πολλαπλασιασμό ή σε ενεργοποίηση διαδικασιών απαραίτητων για την επιβίωσή του. Ο τρόπος με τον οποίο αντιδρούν τα κύτταρα εξαρτάται τόσο από την προέλευση τους αλλά και από τις συνθήκες της καλλιέργειας.

ABSTRACT

Chronic airway inflammatory diseases appear with a different frequency and severity in people with different genders. In these diseases increased cholinergic transmission is observed, as well as release of inflammatory and growth factors in the airway. Chronic airway diseases are often characterized by remodeling of the airway wall, in which an increase in SMC mass is observed among others. In the treatment of some of these diseases macrolides are used, due to not only their antimicrobial and anti-inflammatory effect, but also to their direct effect on the cells of the airway. The aim of the present study was to examine the effect of factors, such as gender hormones, muscarinic agonists, inflammatory and growth factors as well as the antibiotic azithromycin, on the airway SMCs.

In the present study SMCs from rabbit trachea and human bronchii were used. The proliferation of SMCs was estimated using the radioactive thymidine incorporation and the Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Assay method, which estimates the cell number. The cell viability and the number of lysosomes were estimated with the biological dyes Trypan blue and LysoTracker red respectively. The signal pathways that are activated by the previously referred to stimuli, were studied using pathway inhibitors as well as Western blot analysis, while intracellular proteins were tracked by indirect immunofluorescence.

Gender hormones increase the male and female adult rabbit tracheal SMC proliferation, within the first 24h and their effect is mediated by classic androgen receptors and by the activation of the PI3K and MAPK signal pathways. Muscarinic agonists increase rabbit but not human SMC proliferation and their effect seems to be mediated by M3 muscarinic receptors and the PI3K and MAPK signal pathways. TNF α , TGF, bFGF and PDGF act as mitogens in human bronchial SMCs and increase

the radioactive thymidine incorporation in rabbit tracheal SMCs, through activation of the above mentioned pathways, but have no synergetic effect with muscarinic agonists. The macrolide azithromycin inhibits the rabbit and human airway SMC proliferation and causes autophagy. Its effect on rabbit tracheal SMCs was confined in actively proliferating cells, it was dose-dependent and time-dependent and did not lead the cells to apoptosis, while in human bronchial SMCs it decrease the cell number in all culture conditions.

The results of the present study show that airway SMCs react towards a variety of factors that are present in the airways in normal and pathological conditions. The nature, the intensity and the duration of the stimuli determines the cellular response which includes activation of signal pathways that lead the cell to proliferate or to activate procedures nessesary for the cell survival. The effect of these stimuli is mediated by binding to cellular receptors and activating the PI3K and MAPK signal pathways. The way the cells react is depended on their source as well as the culture conditions.