



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Π.Μ.Σ: « ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ »**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ  
ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ  
ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΑΛΑΤΑΙ ΕΡΑΛΝΤΑ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ**

**Λάρισα 2012**



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ  
ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Π.Μ.Σ: « ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ  
ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ  
ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΑΛΑΤΑΙ ΕΡΑΛΝΤΑ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ**

**Λάρισα 2012**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**κ. Γερμενής Αναστάσιος**

**Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας**



**κα. Παρασκευά Ευφροσύνη**

**Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας**



**κα. Χατζευθυμίου Αποστολία**


**Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα 2010-2012 υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κας. Παρασκευά Ευφροσύνης Επίκουρης Καθηγήτριας Κυτταρικής Φυσιολογίας. Για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την άρτια υποστήριξη που μου προσέφερε εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Σαλαταί Εράλντα

Λάρισα, 10 Οκτωβρίου 2012



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

**AR:** androgen receptor, υποδοχέας ανδρογόνων

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

**cAMP:** 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate\_3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

**EGF:** elongation growth factor, αυξητικός παράγοντας επιμήκυνσης

**ER:** estrogen receptor, υποδοχέας οιστρογόνων

**ERE:** (Estrogen response element, στοιχεία απόκρισης στην οιστραδιόλη)

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

**FBS:** fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

**IP-3:** inositol 1,4,5- trisphosphate, 1,4,5- τριφωσφορική ινοσιτόλη

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

**PBS:** phosphate buffered saline, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα

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

**PI3K:** phosphatidylinositol -3 kinase, κινάση της 3- φωσφατιδυλinoσιτόλης

**PKC:** protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

**RTK:** receptor tyrosine kinase, υποδοχείς κινάσης τυροσίνης

**TGF:** transforming growth factor, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης

**TNF $\alpha$ :** tumor necrosis factor  $\alpha$ , παράγοντας νέκρωσης όγκων

**NO:** nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου

**ΛMK:** Λεία Μυϊκά κύτταρα

**ΧΑΠ:** Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

**ECM:** extracellular matrix, εξωκυττάρια μήτρα

**ROS:** Reactive Oxygen Species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

**AC:** Adenylate Cyclase, αδενυλική κυκλάση

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

**BMP:** bone morphogenetic protein, μορφογενετικός παράγοντας οστών

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός, παράγοντας

**HSP's:** Heat shock proteins, πρωτεΐνες θερμικού στρες

Πρόλογος	
Συντομογραφίες	
Περίληψη	
Abstract	
1. Λείος μυϊκός ιστός .....	1
1.1 Λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών.....	1
1.2 Φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ.....	2
1.3 Αναδιαμόρφωση (remodeling) των ΛΜΚ.....	3
1.4 Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ των αεραγωγών- Σηματοδοτικά μονοπάτια.....	5
1.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ.....	6
2. Αυξητικοί παράγοντες.....	7
2.1 Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών FGF.....	8
2.2. Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης TGF.....	11
3. Γεννητικές ορμόνες .....	12
3.1 Οιστρογόνα.....	13
3.1.1 Υποδοχείς οιστρογόνων.....	13
3.1.2 Μηχανισμός δράσης οιστρογόνων.....	14
3.1.2.1 Γενωμική δράση οιστρογόνων.....	14
3.1.2.2 Μη γενωμική δράση οιστρογόνων.....	15
3.2 Ανδρογόνα .....	16
3.2.1 Υποδοχείς ανδρογόνων.....	17
3.2.2. Μηχανισμός δράσης ανδρογόνων.....	17
3.2.2.1 Γενωμική δράση ανδρογόνων.....	17
3.2.2.2 Μη γενωμική δράση ανδρογόνων.....	18
3.3 Γεννητικές ορμόνες- Λεία Μυϊκά Κύτταρα -Συσχέτιση με Παθοφυσιολογία αεραγωγών...	19
4. Υλικά και μέθοδοι.....	21
4.1 Καλλιέργεια Κυττάρων .....	22



4.2 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	22
4.3 Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ.....	23
4.4 Στατιστική ανάλυση.....	26
4.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση.....	26
4.5.1 Προετοιμασία εκχυλίσματος κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ.....	26
4.5.2 Υπολογισμός ολικής πρωτεΐνης.....	27
4.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	27
4.5.4 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	29
4.5.5 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	29
4.5.6 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών.....	30
4.5.7 Εμφάνιση πρωτεϊνών.....	31
5. Αποτελέσματα.....	32
5.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο.....	34
5.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο.....	36
5.3 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο.....	39
5.4. Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο.....	42
5.5 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι.....	45
5.6. Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι.....	48
5.7. Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ από τραχεία στο κουνέλι.....	51
5.8. Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ από τραχεία στο κουνέλι.....	54

5.9. Αναστολή του επαγόμενου από τον TGF πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ μέσω των MAPK κινασών και του PI3K μονοπατιού.....	59
6. Συζήτηση.....	60
7. Βιβλιογραφία.....	64

## Abstract

Smooth muscle cells (SMC) are found in the walls of hollow organs such as the blood vessel wall, small arteries, arterioles, veins, within the lymphatic vessels, the bladder, the uterus, the gastrointestinal tract and the respiratory system where they regulate the operation of these organs through contraction and expansion. In chronic inflammatory respiratory diseases an increased release of inflammatory and growth factors is being observed. These disorders such as asthma and COPD appear with different frequency and severity in individuals of different sex thus suggesting the involvement of sex hormones. The purpose of this study was to investigate the synergistic effect sex hormones and growth factors have on the proliferation of airway SMC. This study used tracheal SMC from rabbit and human bronchi. The proliferation of SMC was evaluated by the method of Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay. The signaling pathways activated by the synergistic action of sex hormones and growth factors were studied by Western immunoblotting.

Sex hormones and growth factors induce proliferation of SMC. Co incubation of FGF with sex hormones estradiol and testosterone did not alter the proliferation of the ASMC (airway smooth muscle cells) in rabbit and human cells. Also the co incubation of growth factor TGF with testosterone does not alter the proliferation of SMC both in human and rabbit cells. However the combined effect of estradiol with TGF resulted in reduced proliferation of ASMC in human and rabbit cells.

The results of this study show that the ASMC react to many factors that can induce or inhibit their proliferation. The effect of sex hormones, growth factors and their combinations in ASMC can promote different cellular responses. So the further of the mechanism ASMC proliferation induced by sex hormones in combination with growth factors can help to a better understanding of the pathways that are activated and it would be useful for new pharmaceutical approaches.

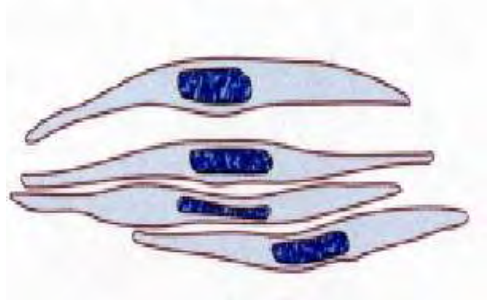
## Περίληψη

Τα Λεία Μυϊκά Κύτταρα (ΛΜΚ) τα συναντάμε σε τοιχώματα κοίλων οργάνων όπως στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, στις μικρές αρτηρίες, στα αρτηρίδια, στις φλέβες, στο εσωτερικό των λεμφαγγείων, στην ουροδόχο κύστη, στη μήτρα, στο γαστρεντερικού σωλήνα και στο αναπνευστικό σύστημα όπου ρυθμίζουν την λειτουργία των οργάνων αυτών μέσω της συστολής και διαστολής. Σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού παρατηρείται αυξημένη απελευθέρωση φλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων. Οι παθήσεις αυτές όπως το άσθμα και η ΧΑΠ εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα και βαρύτητα σε άτομα διαφορετικού φύλου υποδηλώνοντας έτσι την εμπλοκή των γεννητικών ορμονών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συνεργιστική δράση γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ΛΜΚ από τραχεία κουνελιού και βρόγχους ανθρώπου. Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Cell Titer 96® AQueous One Solution Assay. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την συνεργική δράση των γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Οι γεννητικές ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Η συγχορήγηση FGF με γεννητικές ορμόνες οιστραδιόλη και τεστοστερόνη επέφερε κάποια αλλαγή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι και στον άνθρωπο. Επίσης ο αυξητικός παράγοντας TGF σε συγχορήγηση με τεστοστερόνη δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τόσο στον άνθρωπο όσο και στο κουνέλι. Αντιθέτως η δράση της οιστραδιόλης στη συγχορήγηση με TGF είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο και στο κουνέλι.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα ΛΜΚ των αεραγωγών αντιδρούν απέναντι σε πολλούς παράγοντες που μπορούν να επάγουν ή να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό τους. Η επίδραση των γεννητικών ορμονών, των αυξητικών παραγόντων και των συνδυασμών τους στα ΛΜΚ των αεραγωγών έχει σαν αποτέλεσμα διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Έτσι λοιπόν η περεταίρω διερεύνηση του μηχανισμού πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ από την επίδραση των γεννητικών ορμονών σε συνδυασμό με τους αυξητικούς παράγοντες μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μονοπατιών που ενεργοποιούνται και να αποτελέσει στόχο για νέες φαρμακευτικές προσεγγίσεις.

## 1. Λείος μυϊκός ιστός

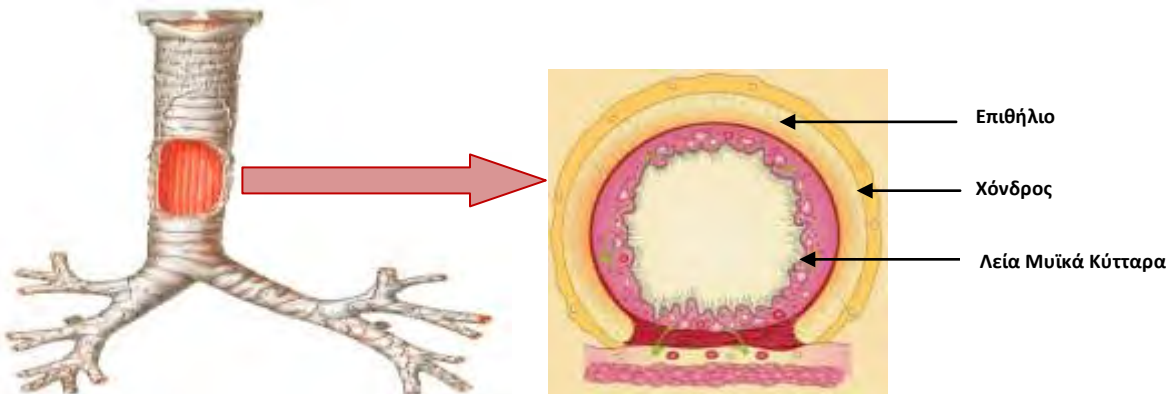
Ο λείος μυϊκός ιστός (ΛΜΙ) απαντά με τη μορφή στοιβάδων ή δεματίων επιμήκων, ατρακτοειδών κυττάρων, με λεπτά άκρα (λεία μυϊκά κύτταρα, ΛΜΚ). Το μήκος των ΛΜΚ ποικίλλει από 20 μm στο τοίχωμα των μικρών αιμοφόρων αγγείων έως 200 μm στο τοίχωμα του εντέρου, ενώ δύναται να φτάσει τα 500 μm στο τοίχωμα της μήτρας κατά την κύηση. Τα ΛΜΚ τα συναντάμε σε τοιχώματα κοίλων οργάνων και στα σπλάχνα και ρυθμίζουν την λειτουργία των οργάνων αυτών μέσω της συστολής. Πιο συγκεκριμένα τα ΛΜΚ βρίσκονται στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, στις μικρές αρτηρίες, στα αρτηρίδια, στις φλέβες, στο εσωτερικό των λεμφαγγείων, στην ουροδόχο κύστη, στη μήτρα, στο γαστρεντερικού σωλήνα, στο αναπνευστικό σύστημα, στην ίριδα του ματιού αλλά και στο σπείραμα των νεφρών.<sup>1</sup>



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των λείων μυϊκών κυττάρων.<sup>1</sup>

### 1.1 Λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών περιγράφονται για πρώτη φορά από τον Reissessen.<sup>2</sup> Η πρώτη αυτή μελέτη και άλλες που ακολούθησαν αργότερα έδειξαν πως τα ΛΜΚ βρίσκονται στους κεντρικούς και περιφερειακούς αεραγωγούς αλλά και στις πιο απομακρυσμένες περιοχές του πνεύμονα. Τα ΛΜΚ τα συναντάμε στο βρογχικό δέντρο των περισσότερων σπονδυλωτών.<sup>3</sup>



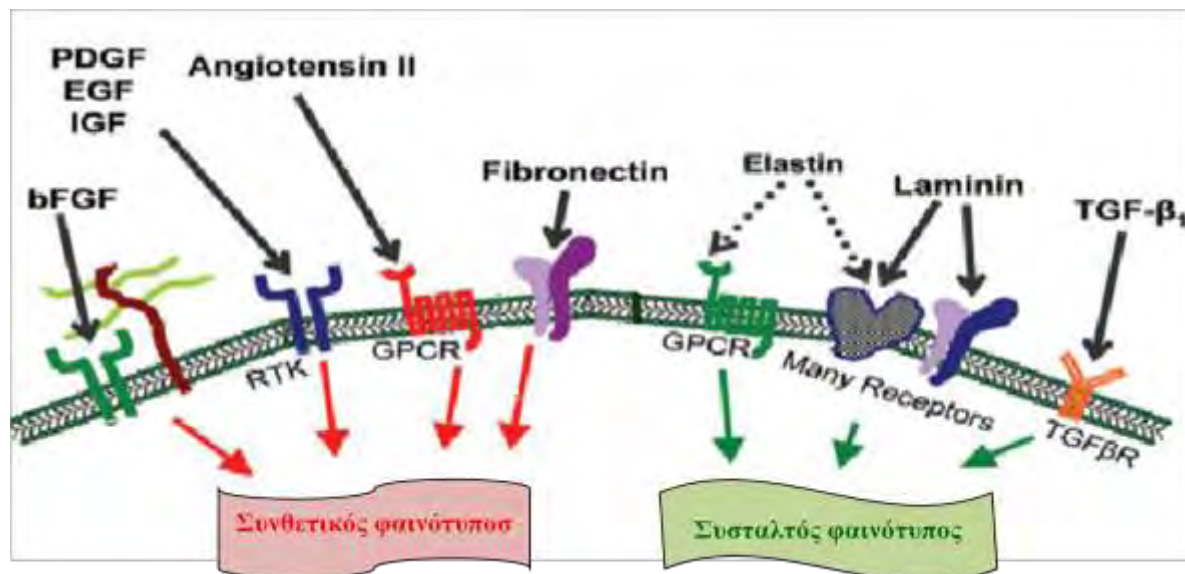
Εικόνα 2. Δομή τραχείας.

Τα ΛΜΚ περιλαμβάνουν τον έλεγχο την διανομή του αέρα, τις μεταβολές στο μέγεθος του πνευμονικού νεκρού χώρου, την συστολή του πνεύμονα, εξωθούν τον αέρα ή άλλα ξένα υλικά, ελέγχουν το διαμέτρημα των αεραγωγών κατά τη διάρκεια διαφόρων φάσεων της αναπνοής και επιτρέπουν διαφοροποιήσεις του τοιχώματος των αεραγωγών σε λειτουργίες όπως η παλιρροϊκή αναπνοή, η βαθιά αναπνοή, ο βήχας και η αναγκαστική εκπνοή.<sup>4</sup> Εκτός από την συστολή/διαστολή και την φαινοτυπική πλαστικότητα τα ΛΜΚ των αεραγωγών παρουσιάζουν και μια άλλη ιδιότητα αυτή του πολλαπλασιασμού ειδικά σε παθολογικές καταστάσεις όπως το άσθμα

## 1.2. Φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ

Σε αντίθεση με τα σκελετικά και με τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα που είναι τελικά διαφοροποιημένα, τα λεία μυϊκά κύτταρα διατηρούν αξιοσημείωτη πλαστικότητα και μπορούν να υποστούν σημαντικές και αναστρέψιμες μεταβολές στο φαινότυπό τους ως απάντηση σε μεταβολές και σε ερεθίσματα που δέχονται από το τοπικό τους περιβάλλον.<sup>5</sup> Τα ΛΜΚ εμφανίζουν δυο 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. Οι διαφορετικοί φαινότυποι αντικατοπτρίζουν και την διαφορετική λειτουργικότητα των κυττάρων, η οποία ελέγχεται από την διαφορά στην έκφραση συγκεκριμένων δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Επίσης, διαφορά υπάρχει και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι ενεργά στους δυο φαινοτύπους.<sup>6,7,8</sup> Η μετατροπή του ενός φαινοτύπου στον άλλο εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του κυττάρου (εικόνα 3). Για παράδειγμα παράγοντες όπως η ινσουλίνη, η ελαστίνη, η λαμινίνη και ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης (transforming growth factor, **TGF**) επάγουν τον συσταλτό φαινότυπο, ενώ ο αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, **PDGF**), ο ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, **FBS**), ο αυξητικός παράγοντας επιμήκυνσης (elongation growth factor, **EGF**), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, **bFGF**), η αγγειοτενσίνη και η φιμπρονεκτίνη επάγουν τον συνθετικό φαινότυπο όπως φαίνεται και στην εικόνα 3. Τα ΛΜΚ παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά την προέλευσή τους, καθώς μπορούν να

διαφοροποιηθούν από ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσεγχειματικά κύτταρα, πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών, από ινοβλάστες και μακροφάγα.<sup>9-11</sup>

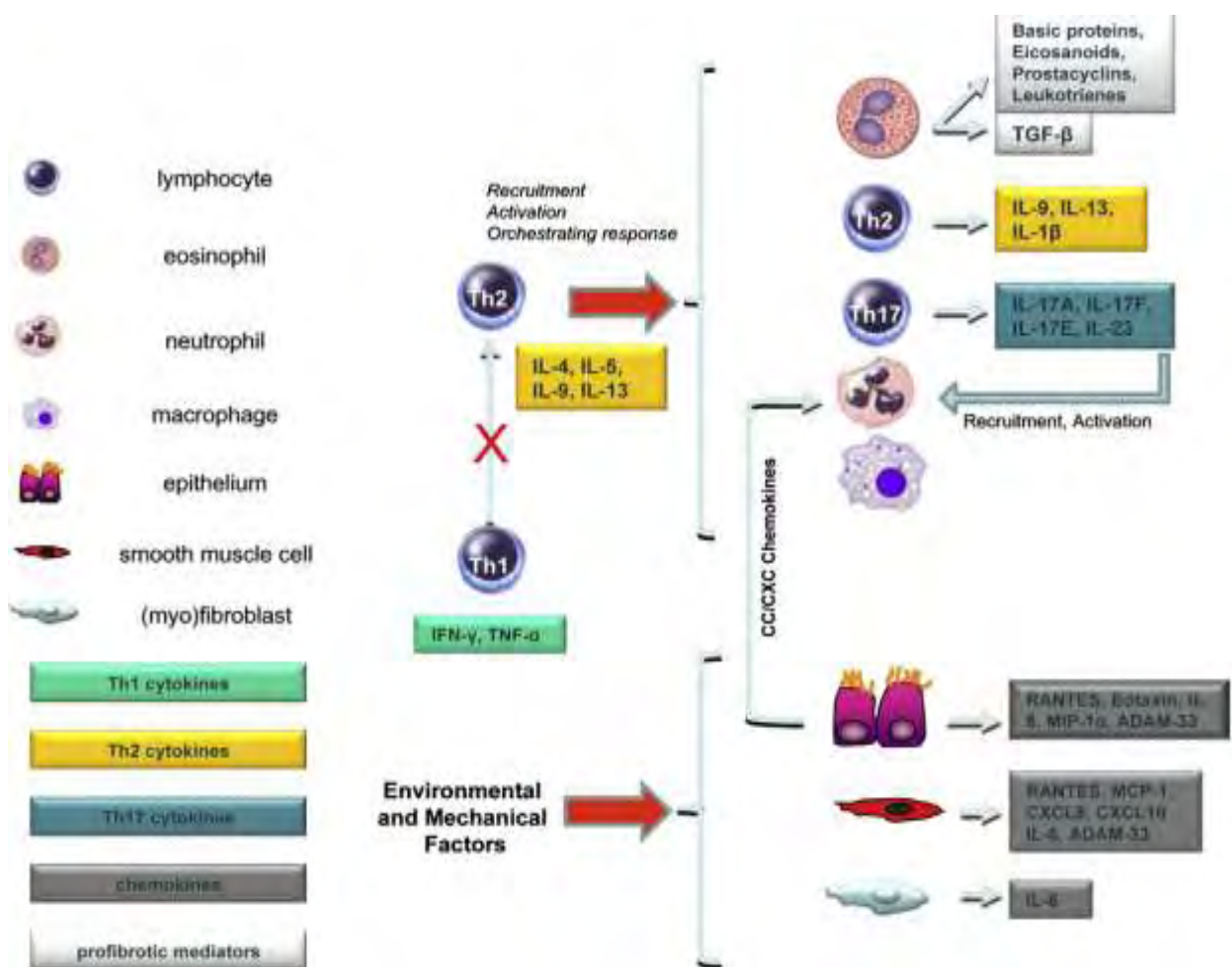


**Εικόνα 3.** Απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών.<sup>10</sup>

### 1.3. Αναδιαμόρφωση (remodeling)

Αναδιαμόρφωση ιστού αναφέρεται σε τροποποιήσεις στην σύνθεση και στην δομική οργάνωση του ιστού και συνήθως λαμβάνει χώρα σε απάντηση προς διάφορες μηχανικές ή φυσιολογικές μορφές στρες. Αναδιαμόρφωση παρουσιάζεται σε διάφορους ιστούς και όργανα όπως το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, η καρδιά, ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι αεραγωγοί και οι πνεύμονες και επίσης μπορεί να παρατηρηθεί σχεδόν όλους τους ιστούς που είναι ευπαθείς σε χρόνια βλάβη, ή σε φλεγμονή ή και στα δύο. Η πρώτη αναφορά για την αναδιαμόρφωση των ΛΜΚ στους αεραγωγούς έγινε πριν από 85 περίπου χρόνια.<sup>12</sup> Αναδιαμόρφωση των αεραγωγών εμφανίζεται σε ασθενείς με διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος όπως άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, κυστική ίνωση, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, και συστηματική σκλήρυνση. Σε αυτές τις ασθένειες, οι φλεγμονώδεις καταστάσεις σχετίζονται με τις κυτταρικές και δομικές αλλαγές που έχουν σαν αποτέλεσμα την πάχυνση του τοιχώματος αεραγωγών, οδηγώντας έτσι σε στένωση του αεραγωγού και περιορισμό του εισερχόμενου αέρα. Η αναδιαμόρφωση σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στους μικρούς αεραγωγούς, ενώ σε ασθενείς με κυστική ίνωση η αναδιαμόρφωση χαρακτηρίζεται από μυϊκές,

αδενικές και αγγειακές αλλαγές σε ολόκληρο τον πνεύμονα. Σε ασθενείς με άσθμα, η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών παρουσιάζεται πιο περίπλοκη καθώς περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών όπως αλλαγές στον επιθηλιακό ιστό, υπερπλασία και υπερτροφία των ΛΜΚ, αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών και αγγειακές μεταβολές. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ΛΜΚ των αεραγωγών έχουν συσχετιστεί με την φλεγμονή, την ίνωση, την αυξημένη αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών (εικόνα 4).<sup>13</sup>

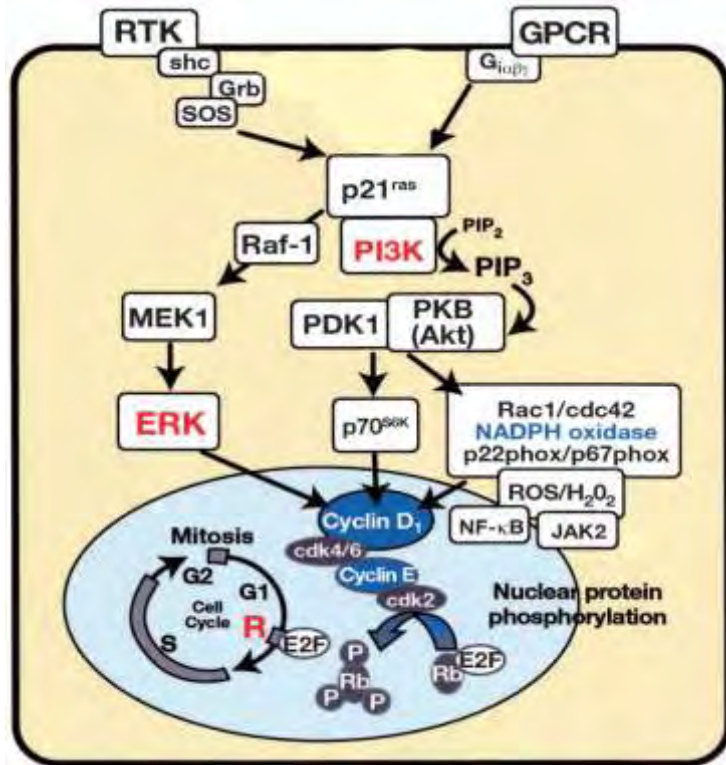


**Εικόνα 4.** Φλεγμονώδεις παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια των αεραγωγών στους ασθματικούς ασθενείς.<sup>11</sup>



#### 1.4. Πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ των αεραγωγών-Σηματοδοτικά μονοπάτια

Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ μπορεί να προκληθεί από πολλούς μιτογόνους παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες, φλεγμονώδεις παράγοντες (ιντερλευκίνη IL-1 $\beta$ , ιντερλευκίνη IL-6 και TNF), λυσοσωμικές υδρολάσες ( $\beta$ -γλυκουρονιδάση), αγωνιστές που συνδέονται σε G-πρωτεΐνες όπως η ενδοθηλίνη-1, η σεροτονίνη και το λευκοτριένιο-D<sub>4</sub>, γεννητικές ορμόνες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, **ROS**), μηχανικό στρες και πρωτεΐνες εξωκύτταριας μήτρας (extracellular matrix, **ECM**).<sup>14</sup> Για τα μιτογόνα τα οποία ενεργοποιούν υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinase, **RTK**), (π.χ PDGF, bFGF, EGF), υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, **GPCR**) (π.χ θρομβίνη) και γλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (π.χ. κυτοκίνες, που επάγουν την σηματοδότηση μέσω γλυκοπρωτεϊνικών συμπλόκων), το μόριο p21 Ras φαίνεται να αποτελεί ένα κομβικό σημείο στα μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται. Τα μονοπάτια PI3K και ERK αποτελούν τα βασικά μονοπάτια που επάγουν και ρυθμίζουν την είσοδο των ΛΜΚ στον κυτταρικό κύκλο και την σύνθεση του DNA.<sup>10</sup> Εκτός όμως από τα παραπάνω μονοπάτια και οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν σε πολλαπλασιασμό. Η Rac1 αποτελεί μέλος του συμπλέγματος των NADPH οξειδασών και προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Στη συνέχεια ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφής της κυκλίνης D1 αλλά και στην ενεργοποίηση των JAK2 και STAT3, τα οποία απαιτούνται για την έκφραση της κυκλίνης D1.<sup>15</sup> Εκτός από τα παραπάνω επαγωγή του πολλαπλασιασμού μπορεί να προκληθεί και από πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να ενισχύουν την δράση των αυξητικών παραγόντων. Μελέτες έχουν δείξει πως οι αυξητικοί παράγοντες δεσμεύουν μόρια εξωκυττάριας ουσίας σχηματίζοντας έτσι σύμπλοκα τα οποία με τη σειρά τους ενισχύουν την δραστηριότητα των αυξητικών παραγόντων μέσω των υποδοχέων τους και των ιντεγκρινών. Επιπλέον οι ιντεγκρίνες που αποτελούν τους βασικούς «υποδοχείς» για την σύνδεση των ΛΜΚ με την εξωκυττάρια μήτρα των αεραγωγών, μπορούν να αποτελέσουν στόχο για φαρμακολογικές προσεγγίσεις και μελέτες για την καλύτερη κατανόηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ σε άσθμα.<sup>16</sup> Τέλος έχει βρεθεί πως οι γεννητικές ορμόνες οιστραδιόλη και τεστοστερόνη μπορούν επίσης να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι μέσω των PI3K και MAPK μονοπατιών.<sup>17</sup>

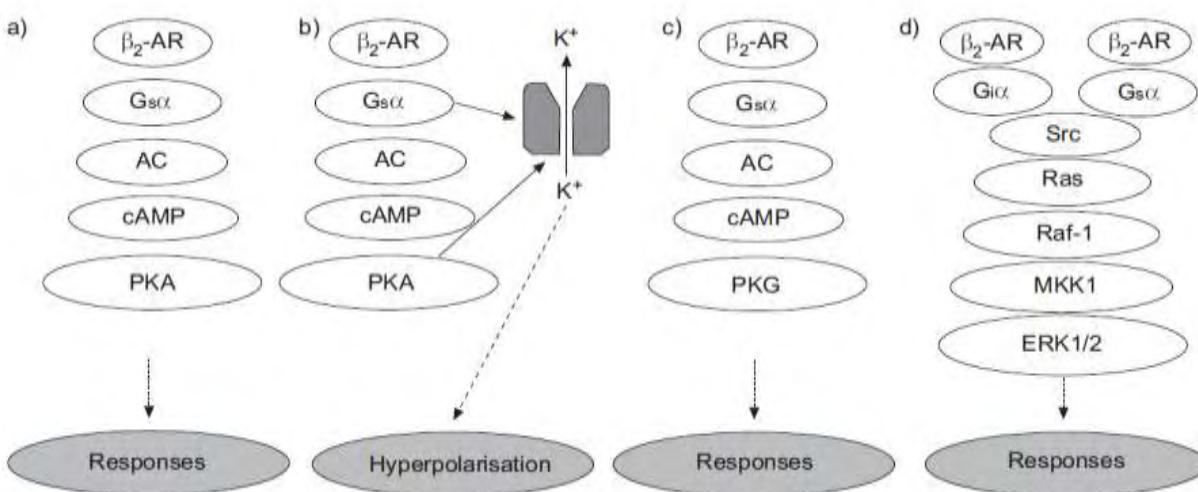


Εικόνα 5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ.<sup>14</sup>

## 1.5 Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ

Δυο είναι οι κύριες ομάδες που προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι β<sub>2</sub>-αδρενεργικοί αγωνιστές και στην δεύτερη τα γλυκοκορτικοειδή. Οι β<sub>2</sub>-αδρενεργικοί αγωνιστές περιλαμβάνουν ουσίες οι οποίες προκαλούν γρήγορη βρογχοδιαστολή και χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του άσθματος. Οι β<sub>2</sub>-αγωνιστές προσδένονται στους β<sub>2</sub>-αδρενεργικούς υποδοχείς και ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει είτε την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (**Adenylate Cyclase, AC**) είτε την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.<sup>18-20</sup> Τα διαφορετικά μονοπάτια τα οποία φαίνεται να ενεργοποιούνται αποτελούν καινούργιους στόχους για φαρμακολογικές μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της αναστολής του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Σε αντίθεση με τους β<sub>2</sub>-αδρενεργικούς αγωνιστές που προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού μέσω της αποικοδόμησης της κυκλίνης D<sub>1</sub>, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την έκφραση του mRNA της κυκλίνης D<sub>1</sub>.<sup>21</sup> Τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να εμφανίζουν επιλεκτικότητα όσον αφορά την δράση τους στα

ΛΜΚ των αεραγωγών, καθώς η δράση τους εξαρτάται από το μιτογόνο που χρησιμοποιείται κάθε φορά.<sup>22</sup> Για παράδειγμα τα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα να αναστέλλουν την δράση των μιτογόνων που δρουν μέσω GPCR υποδοχέων (π.χ θρομβίνη) σε σύγκριση με τα γλυκοκορτικοειδή που δρουν μέσω RTK υποδοχέων (π.χ FGF, EGF).<sup>23</sup> Τέλος εκτός από τις παραπάνω ουσίες η βιταμίνη D μπορεί επίσης να αναστείλει τον επαγόμενο από αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αναστέλλοντας το ρετινοβλάστωμα και την κινάση του πρώτου σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoint kinase 1, chk-1).<sup>24</sup>



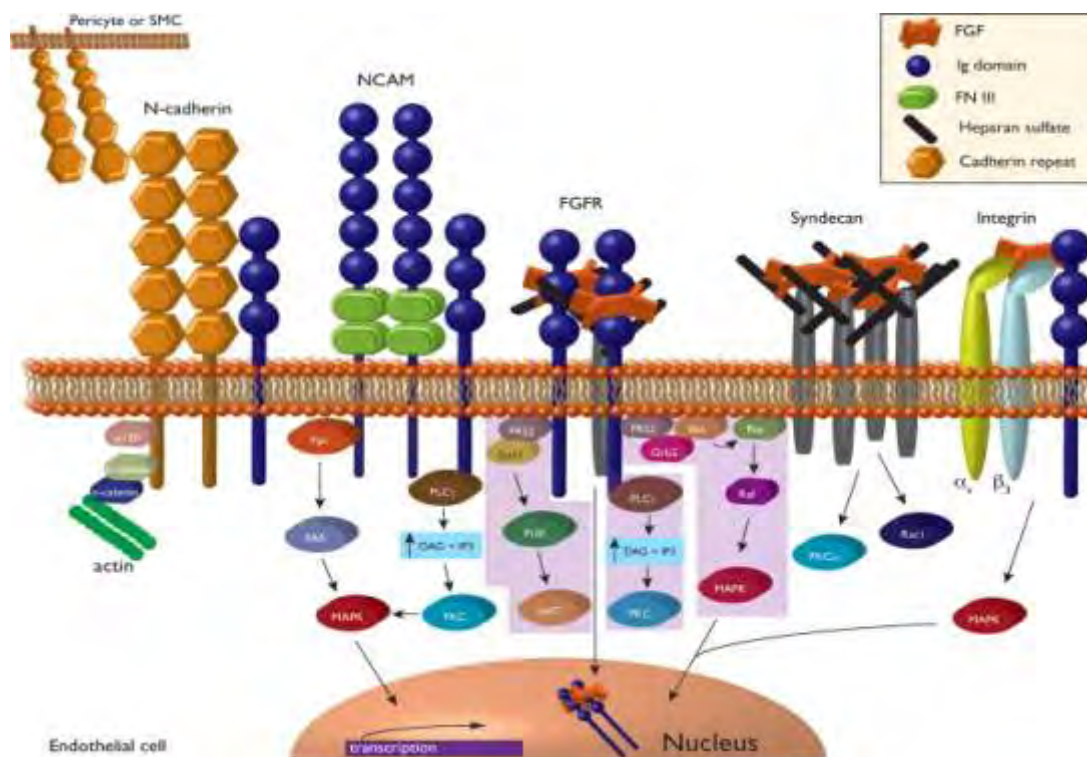
**Εικόνα 6.** Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους  $\beta_2$  αναστολείς και που επάγουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ.<sup>18</sup>

## 2. Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων και ενεργούν ως σηματοδοτικά μόρια μεταξύ των κυττάρων. Παραδείγματα αποτελούν οι κυτοκίνες και οι ορμόνες που προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων τους. Μπορούν να προωθήσουν την διαφοροποίηση αλλά και την ωρίμανση των κυττάρων, και παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη δράση τους. Για παράδειγμα, μορφογενετικός παράγοντας οστών (bone morphogenetic protein, **BMP**) διεγείρει την διαφοροποίηση των κυττάρων των οστών, ενώ ο FGF και ο αγγειακός ενδοθηλιακός **αυξητικός παράγοντας** (vascular endothelial growth factor, **VEGF**) διεγείρουν την διαφοροποίηση αγγείων (αγγειογένεση). Στη συνέχεια αναλύεται η δράση των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών.

## 2.1 Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών FGF

Η οικογένεια του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF) περιλαμβάνει 22 πρωτεΐνες που ρυθμίζουν μία πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών στον οργανισμό. Μέχρι το 2000 δεν ήταν γνωστό εάν μεταλλάξεις στα γονίδια του FGF μπορούσαν να συσχετιστούν με παθολογικές καταστάσεις. Σήμερα επτά από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως λεύκωμα, απλασία, καρκίνωμα και νόσος Πάρκινσον.<sup>25</sup> Το πιο μελετημένο μέλος της οικογένειας FGF στην παθοφυσιολογία του άσθματος είναι ο FGF2. Αυτός ο αυξητικός παράγοντας προσδιορίστηκε πρώτος σε εκχυλίσματα υποφύσεως βοοειδών και, μαζί με τον FGF1, πήρε το όνομά του με βάση την ικανότητά τους να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό κυτταρική σειράς ινοβλαστών NIH3T3<sup>26</sup>. Υπάρχουν τέσσερα είδη υποδοχέων του FGF το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 802-822 αμινοξέα και ονομάζονται FGFR1, FGFR2, FGFR3 και FGFR4. Η έκφραση τους ποικίλλει στον οργανισμό αλλά μέχρι στιγμής ο FGFR1 αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο υποδοχέα. Όσον αφορά το αναπνευστικό σύστημα μελέτες έχουν δείξει πως ο FGFR1 εκφράζεται στα ΛΜΚ των αγγείων και στους αεραγωγούς.<sup>27</sup> Πρόκειται για διαμεμβρανικούς υποδοχείς που περιέχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοπλασματική ουρά με δράση κινάσης τυροσίνης. Η ενεργοποίηση τους περιλαμβάνει τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίησή του. Ακολουθεί η πρόσδεση των πρωτεϊνών-προσαρμογών και ενεργοποίηση μονοπατιών των MAPK, PKC και PI3K όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Ο ρόλος του FGF2 στην παθοφυσιολογία του άσθματος δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι και σήμερα. Οι πρώτες μελέτες που αναφέρουν την υπερέκφραση του FGF2 ασθματικούς ιστούς έχουν ξεκινήσει από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Αρχικά, βρογχοκυψελιδικό δείγμα έδειξε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του FGF2 σε ασθματικούς ασθενείς σε σύγκριση με ομάδες ελέγχου.<sup>28</sup> Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός πως τα επίπεδα έκφρασης του FGF ανεβαίνουν 10 λεπτά μετά την πρόκληση του αλλεργιογόνου.<sup>29</sup> Η προέλευση της επαγόμενης από αλλεργιογόνο απελευθέρωσης του FGF2 ή τα αυξημένα επίπεδα υπερέκφρασης που έχουν παρατηρηθεί σε ασθματικούς αεραγωγούς είναι ακόμα ασαφείς. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να γίνουν προκειμένου να καθοριστεί η λειτουργική συνάφεια αυτού του αυξητικού παράγοντα με την παθοφυσιολογία του άσθματος.

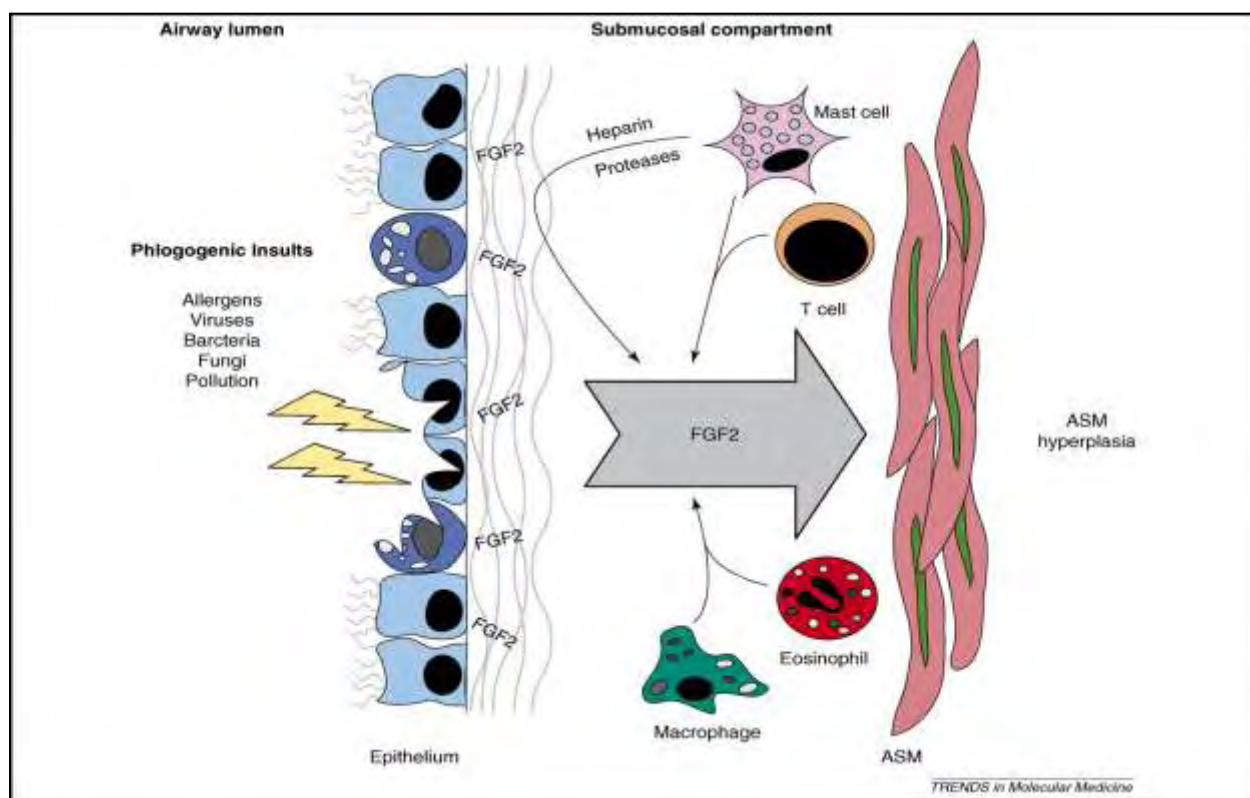


**Εικόνα 7.** Μηχανισμός δράσης των FGFR και τα μονοπάτια που ενεργοποιούν.<sup>41</sup>

Ο FGF2 προκαλεί υπερπλασία των ΛΜΚ των αεραγωγών σε ασθματικές καταστάσεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό του FGF2 στον πνεύμονα στον άνθρωπο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών των αεραγωγών και στους πυρήνες των κυττάρων που βρίσκονται στην υποεπιθηλιακή περιοχή (ΛΜΚ και ενδοθηλιακά κύτταρα).<sup>27,30-31</sup> Σε ασθματικές καταστάσεις η αυξημένη συγκέντρωση του FGF2 (απελευθέρωση είτε επαγόμενη από το αλλεργιογόνο, είτε υπερέκφραση του FGF2) παραμένει ακόμα άγνωστη. Ένας μηχανισμός που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για να προσδιοριστεί η συμβολή του κάθε μηχανισμού στην απελευθέρωση του FGF2 και να προσδιοριστεί η σχέση μεταξύ του ρόλου αυτού του αυξητικού παράγοντα στο άσθμα με την αιτιολογία του άσθματος. Ο FGF2 αποθηκεύεται σε μεμβράνες και δεσμεύεται στην πρωτεογλυκάνη. Η κυτταροπλασματική μορφή του FGF2 στα επιθηλιακά κύτταρα είναι η κύρια πηγή του FGF2 σε ασθματικούς αεραγωγούς και απελευθερώνεται από το ενδοκυττάριο από διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες που προκαλούν βλάβη του επιθηλίου. Φλεγμονώδη κύτταρα που κινητοποιούνται μέσα στους αεραγωγούς, όπως τα μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα, και



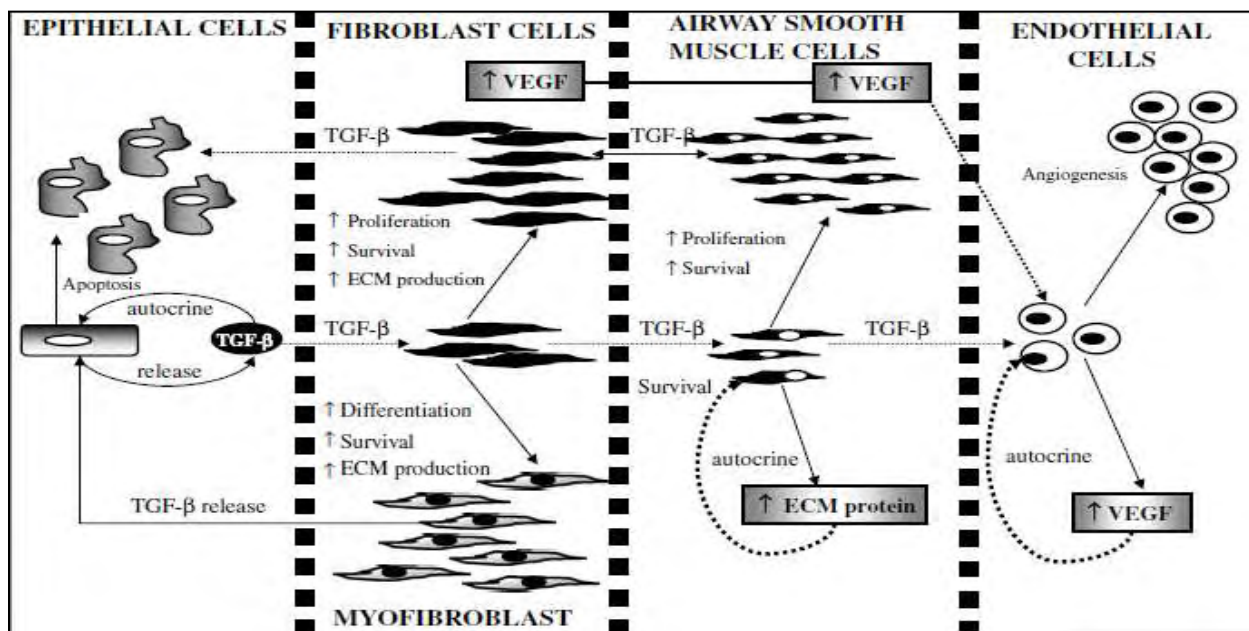
T-κύτταρα μπορούν να αποτελέσουν επίσης πηγές του FGF2. Άλλες πηγές για απελευθέρωση του FGF2 αποτελούν τα κύτταρα μαστού και τα ηωσινόφιλα. Δυστυχώς μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι το FGF2 οδηγεί σε υπερπλασία των ΛΜΚ *in vivo*. Παρ' όλα αυτά μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως υποδόρια χορήγηση ανασυνδυασμένου FGF2 (rFGF2) πριν από κάθε ενδορινική πρόκληση με αλλεργιογόνο προλαμβάνει την εκδήλωση του συνδρόμου της υπερευαισθησίας των αεραγωγών (AHR).<sup>32</sup> Σε αντίθεση με τις *in vivo* μελέτες σχετικά με τις επιπτώσεις του FGF2 στην υπερπλασία των ΛΜΚ *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν πως η χορήγηση FGF2 προκαλεί επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ.<sup>33</sup> Τέλος ο FGF2 ενεργοποιεί το μονοπάτι p38 MAPK και παρουσιάζει συνεργιστική δράση με άλλους παράγοντες όπως ο PDGF, IGF-1 και EGF.<sup>34-36</sup>



**Εικόνα 7.** Μηχανισμός επαγωγής υπερπλασίας στα ΛΜΚ των αεραγωγών από τον FGF.<sup>33</sup>

## 2.2 Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης TGF

Ο TGF- $\beta$  είναι ένα διμερές πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 25kDa που μπορεί και διαχέεται μέσω κυτταρικών συνδέσμων.<sup>37-38</sup> Ο TGF- $\beta$  παρουσιάζει 3 ισομορφές στα θηλαστικά τον TGF- $\beta$ 1, τον TGF- $\beta$ 2 και τον TGF- $\beta$ 3.<sup>39</sup> Ο ρόλος του TGF- $\beta$ 1 στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις έχει μελετηθεί αρκετά. Το επίπεδο έκφρασης του TGF- $\beta$ 2 είναι μεγαλύτερο σε ασθματικούς και φυσιολογικούς αεραγωγούς σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του TGF- $\beta$ 1. Τα υψηλότερα επίπεδα του TGF- $\beta$ 2 σε ασθματικούς αεραγωγούς θεωρείται πλέον ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ασθένειας, καθώς τα επίπεδα του TGF- $\beta$ 1 δεν αλλάζουν κατά την διάρκεια του άσθματος.<sup>40-41</sup> Ο TGF- $\beta$  εκκρίνεται κυρίως από ηωσινόφιλα, αλλά και από άλλα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα μαστού.<sup>42</sup>



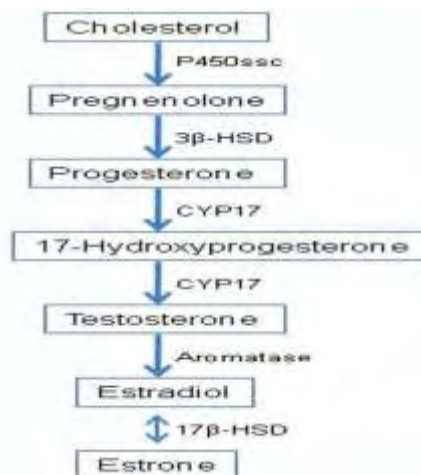
**Εικόνα 8.** Κύτταρα που ενεργοποιούνται από τον TGF- $\beta$  και που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των ΛΜΚ στους αεραγωγούς.

Κυτοκίνες όπως η IL-5, η IL-13, καθώς και ο ίδιος ο TGF- $\beta$  μπορούν να επάγουν την παραγωγή και έκκριση του TGF- $\beta$  από αυτά τα κύτταρα.<sup>43</sup> Ο TGF- $\beta$  μπορεί να ενεργοποιήσει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, ωστόσο ο κύριος μηχανισμός δράσης του είναι μέσω Smad πρωτεϊνών.<sup>37,42,44</sup> Επίσης TGF- $\beta$  μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι των MAPK κινασών και

το PI3K μονοπάτι.<sup>45</sup> Ο TGF-β παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως ρύθμιση της διαφοροποίησης, της απόπτωσης, επιβίωση και πολλαπλασιασμός διαφόρων κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, την επούλωση πληγών, το άσθμα και την ανάπτυξη καρκίνου. Η ενεργοποίηση εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο αλλά και το μικροπεριβάλλον του. Τα επίπεδα έκφρασης του TGF-β σε ασθματικές καταστάσεις είναι αυξημένα.<sup>29,46</sup> Ο TGF-β επάγει την σύνθεση των πρωτεϊνών του ECM αλλά και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών.<sup>47</sup> Επίσης ο TGF-β μπορεί να παρουσιάσει συνεργιστική δράση με τον FGF-2.<sup>33</sup>

### 3. Γεννητικές ορμόνες

Οι γεννητικές ορμόνες παράγονται από τα γεννητικά όργανα (τις γονάδες δηλαδή τους όρχεις και τις ωοθήκες) καθώς και από το φλοιό των επινεφριδίων και χωρίζονται σε ανδρογόνα και οιστρογόνα. Τα ανδρογόνα περιλαμβάνουν την τεστοστερόνη αλλά και τις ορμόνες δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ανδροστενδιόνη. Η πιο ισχυρή ανδρογόνος ορμόνη η οποία παράγεται σε όλα τα είδη των θηλαστικών είναι η τεστοστερόνη. Τα ανδρογόνα αποτελούν επίσης πρόδρομη μορφή όλων των οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα αποτελούνται από την 17β-οιστραδιόλη η οποία θεωρείται η αρχική φυσική ορμόνη, ενώ οι υπόλοιπες φυσικές ορμόνες (οιστρόνη και οιστριόλη) είναι προϊόντα μεταβολισμού της οιστραδιόλης. Τα φυσικά οιστρογόνα παράγονται κυρίως στις ωοθήκες. Τα επινεφρίδια, το ωχρό σωμάτιο και ο πλακούντας, αποτελούν επίσης φυσική πηγή οιστρογόνων κυρίως κατά το τέλος της κύησης. Πρόδρομο μόριο των γεννητικών ορμονών, όπως και όλων των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη.<sup>48</sup>

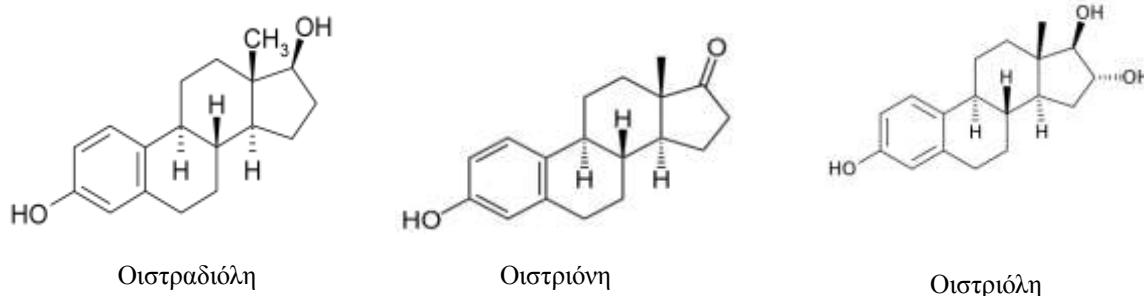


**Εικόνα 9.** Οδός σύνθεσης γεννητικών ορμονών.<sup>42</sup>



### 3.1. Οιστρογόνα

Το πρώτο οιστρογόνο που απομονώθηκε από τις ωοθήκες και του οποίου η οιστρογονική δραστηριότητα αποδείχτηκε σε βιολογικά δείγματα περιγράφηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Ο όρος "οιστρογόνο" αναφέρεται σήμερα σε μια ομάδα θηλυκών ορμονών με ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες σε διάφορους ιστούς και τύπους κυττάρων. Τα οιστρογόνα προέρχονται από τα ανδρογόνα με την προσθήκη ενός αρωματικού δακτυλίου μέσω του ενζύμου αρωματάση. Οι κύριες ομάδες των οιστρογόνων είναι η προγεστερόνη, η οιστραδιόλη η οιστριόνη και η οιστριόλη. Η οιστριόλη αποτελεί το κυρίαρχο οιστρογόνο κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η οιστραδιόλη εμφανίζεται τα μεγαλύτερα επίπεδα στις προ εμμηνοπαυσιακές μη έγκυες γυναίκες, ενώ η οιστριόνη παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα κατά την διάρκεια της εμμηνόπαυσης.<sup>49</sup> Τέλος η οιστραδιόλη προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια στους οιστρογονικούς υποδοχείς σε σύγκριση με τους μεταβολίτες της οιστριόνης και οιστριόλης.

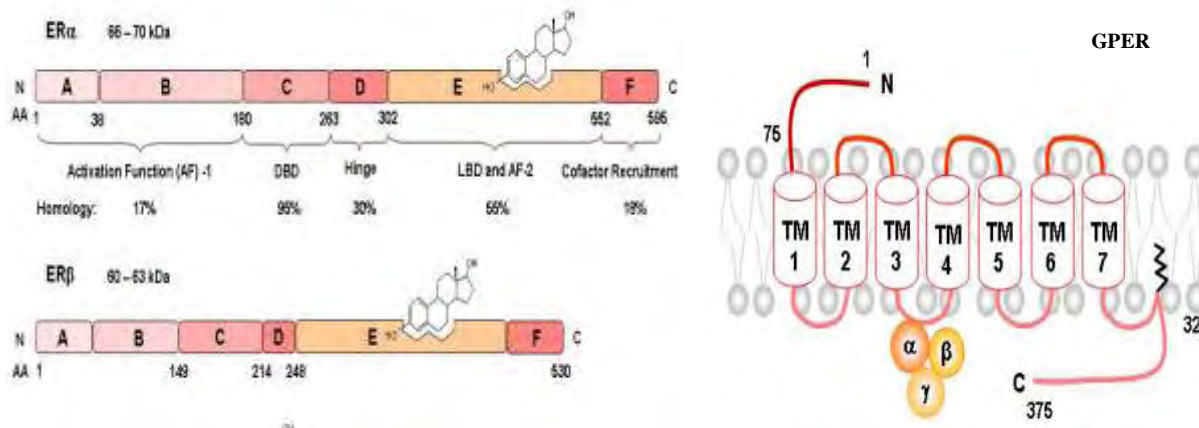


**Εικόνα 10.** Δομή των κυριότερων οιστρογόνων.

#### 3.1.1 Υποδοχείς οιστρογόνων

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων (Estrogen Receptor) χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: στους υποδοχείς ERα και ERβ.<sup>50</sup> Και οι δυο υποδοχείς λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες, αλλά μπορούν επίσης να εντοπιστούν και στην πλασματική μεμβράνη. Ο υποδοχέας ERα εκφράζεται σε αφθονία στη μήτρα, στις ωοθήκες, στον μαστό και στον υποθάλαμο.<sup>51</sup> Ο υποδοχέας ERβ, εκφράζεται στον προστάτη και στις ωοθήκες, και σε μικρότερο βαθμό στον πνεύμονα, στον εγκέφαλο και στα οστά.<sup>52</sup> Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται σε δυο διαφορετικά χρωμοσώματα: ο υποδοχέας ERα κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 6q (25.1) ενώ ο υποδοχέας ERβ κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 14q (23-24.1). Οι δυο υποδοχείς

παρουσιάζουν περίπου 40% ομολογία μεταξύ τους στην ακολουθία των αμινοξέων όπως φαίνεται και στην εικόνα.<sup>53</sup>



Εικόνα 11. Σχηματική δομή των οιστρογονικών υποδοχέων ERα, ERβ και GPER.<sup>45</sup>

Εκτός από τις ισομορφές ERα και ERβ των υποδοχέων οιστρογόνων, το 1997 ένα τρίτο είδος υποδοχέα οιστρογόνων βρέθηκε με τη μορφή μιας διαμεμβρανικής G-πρωτεΐνης (**G-protein coupled estrogen receptor GPER**).<sup>54</sup> Ο GPER υποδοχέας μετά την πρόσδεση της οιστραδιόλης ενεργοποιεί καταρράκτη αντιδράσεων και σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το μονοπάτι των κινασών που ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια ερεθίσματα (extracellular signal regulated kinases, ERK) και το PI3K μονοπάτι.<sup>55</sup> Ο υποδοχέας προγεστερόνης (Progesterone Receptor, PR) παρουσιάζει επίσης δυο ισομορφές PR-A και PR-B.

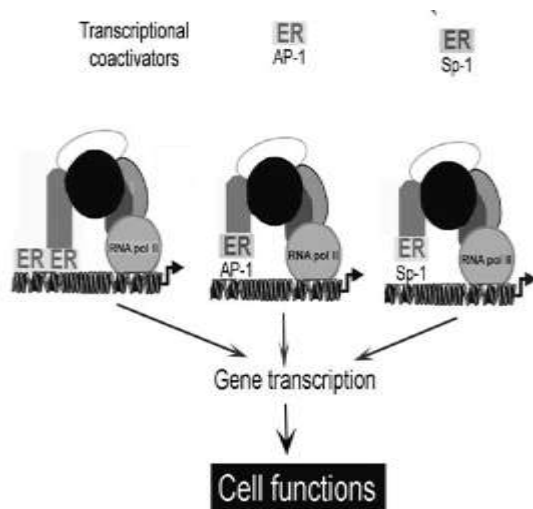
### 3.1.2. Μηχανισμός δράσης οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα μπορούν να δράσουν με δυο τρόπους, είτε μέσω της κλασικής ή γενωμικής δράσης τους, που περιλαμβάνει την πρόσδεση σε ενδοκυττάριους υποδοχείς και την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων, είτε μέσω της μη γενωμικής δράσης που περιλαμβάνει την απευθείας ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών.

#### 3.1.2.1 Γενωμική δράση οιστρογόνων

Σε αντίθεση με την μη γενωμική δράση η γενωμική δράση της οιστραδιόλης είναι πιο αργή και περιλαμβάνει την πρόσδεσή της σε ενδοκυττάριους υποδοχείς. Η πρόσδεση προκαλεί τον διμερισμό του υποδοχέα και την μετακίνηση του στον πυρήνα. Στον πυρήνα η οιστραδιόλη ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων είτε μέσω πρόσδεσης του διμερισμένου υποδοχέα στον

υποκινητή των γονίδιων στόχων (άμεση πρόσδεση), είτε με πρόσδεση του διμερισμένου υποδοχέα σε μεταγραφικούς παράγοντες (έμμεση πρόσδεση) όπως το sp-1 (Stimulating factor -1 και Ap-1 activating protein-1).<sup>56</sup> Η πρόσδεση της οιστραδιόλης στο DNA γίνεται στην αλληλουχία ERE (Estrogen response element, στοιχεία απόκρισης στην οιστραδιόλη) που βρίσκεται στην περιοχή του cis-υποκινητή. Αντιθέτως η έμμεση πρόσδεση δεν απαιτεί ο υποκινητής να έχει την αλληλουχία ERE αλλά είναι απαραίτητη η μεσολάβηση ενός μεταγραφικού παράγοντα. Αυτός ο μηχανισμός δράσης της οιστραδιόλης αναφέρεται ως “transcriptional cross-talk” και χρησιμοποιείται από περίπου 35% των μορίων οιστραδιόλης που έχουν γενωμική δράση.<sup>56</sup>

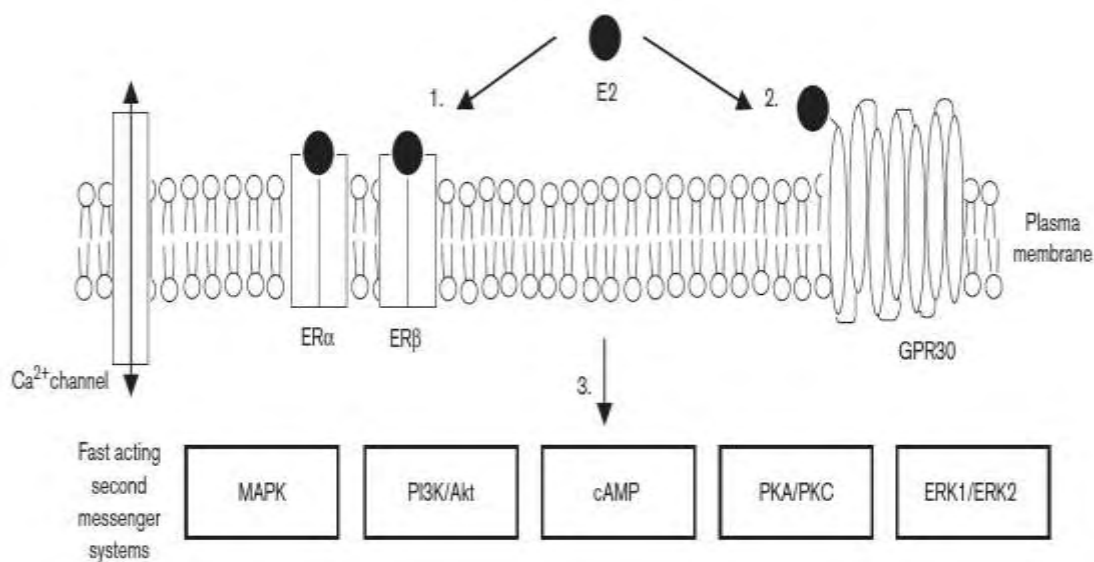


**Εικόνα 12.** Ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον διμερισμένο υποδοχέα της οιστραδιόλης.<sup>57</sup>

### 3.1.2.2. Μη γενωμική δράση οιστρογόνων

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσεις της οιστραδιόλης φαίνονται στην εικόνα 15. Αρχικά η 17-β-οιστραδιόλη συνδέεται στους υποδοχείς ERα ή ERβ που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Η οιστραδιόλη προκαλεί τον διμερισμό του υποδοχέα και τον σχηματισμό του συμπλόκου οιστραδιόλη-διμερισμένος υποδοχέας. Επίσης η οιστραδιόλη μπορεί να προσδεθεί στον διαμεμβρανικό GPER υποδοχέα. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα επάγει την διάσπαση της G-πρωτεΐνης σε α υπομονάδα δεσμευμένη με GTP και στο διμερές της β+γ υπομονάδας. Η υπομονάδα Gα-GTPαση ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση και την φωσφολιπάση C. Η κυτταρική σηματοδότηση επάγεται και από τους δυο τύπους των υποδοχέων που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Τα πολύ γρήγορα δεύτερα μηνύματα δημιουργούνται μέσω

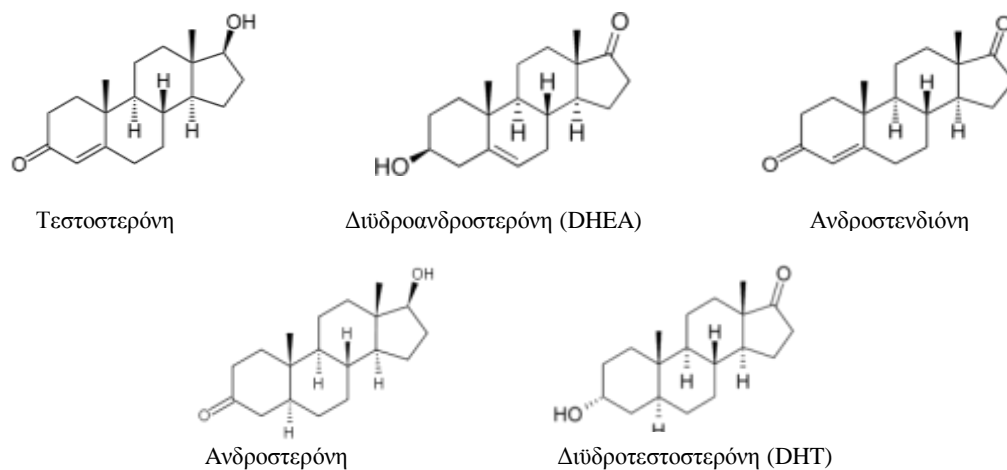
των μονοπατιών MAPK, PI3K, cAMP, PKA/PKC και ERK1/ERK2 όπως φαίνεται και στην εικόνα 15.<sup>57</sup>



**Εικόνα 13.** Μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση της οιστραδιόλης σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς.<sup>58</sup>

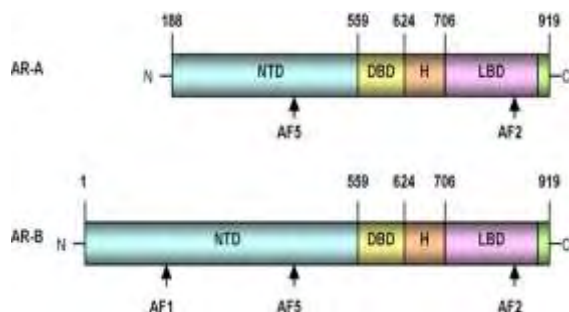
### 3.2 Ανδρογόνα

Τα ανδρογόνα ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1936 και αποτελούν πρόδρομη ουσία όλων των οιστρογόνων (εικόνα 17). Το πιο γνωστό ανδρογόνο είναι η τεστοστερόνη. Άλλα ανδρογόνα αποτελούν η διϋδροτεστοστερόνη (DHT) η ανδροστενδιόνη (Δ4-A), η διϋδροανδροστερόνη (DHEA) και η ανδροστερόνη (εικόνα 17).



**Εικόνα 14.** Δομή των κυριότερων ανδρογόνων.

### 3.2.1 Υποδοχείς ανδρογόνων



**Εικόνα 15.** Σχηματική δομή των ανδρογονικών υποδοχέων ARα και ARβ.<sup>63</sup>

Υπάρχουν δύο τύποι του υποδοχέα τεστοστερόνης (Androgen Receptor, AR) ο AR-A και ο AR-B οι οποίοι παρουσιάζουν μικρές δομικές διαφορές μεταξύ τους.<sup>58-59</sup> Οι υποδοχείς ανδρογόνων ενεργοποιούνται από την πρόσδεση της τεστοστερόνης ή της διϋδροτεστοστερόνης σε αυτούς.<sup>60</sup> Η τεστοστερόνη μπορεί να συνδεθεί απευθείας στον υποδοχέα ή μπορεί να μετατραπεί αρχικά σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη μέσω του

ενζύμου 5α-αναγωγάση και ύστερα να προσδεθεί.<sup>61</sup> Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα AR βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (q11-12).<sup>62</sup>

### 3.2.2 Μηχανισμός δράσης ανδρογόνων

Τα ανδρογόνα όπως και τα οιστρογόνα παρουσιάζουν επίσης δυο μηχανισμούς δράσεις, τον γενωμικό και τον μη γενωμικό.

#### 3.2.2.1 Γενωμική δράση ανδρογόνων

Αρχικά η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάσης και στη προσδένεται στον ενδοκυτταρικό υποδοχέα. Η πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα προκαλεί μεταβολή στη διαμόρφωσή του, την απομάκρυνση των πρωτεϊνών θερμικού στρες (Heat shock proteins, HSPs) αλλά και την στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών που στοχεύουν στην σταθεροποίηση του συμπλέγματος ορμόνης-υποδοχέα-βοηθητικών πρωτεϊνών και που προάγουν την μετατόπιση του συμπλέγματος προς τον πυρήνα. Ακολουθεί η μεταφορά του συμπλέγματος στον πυρήνα και ο διμερισμός του υποδοχέα. Στη συνέχεια, το διμερές του υποδοχέα δεσμεύεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA, η οποία είναι γνωστή ως στοιχείο ορμονικής απόκρισης (hormone response element) HRE που προωθεί την στρατολόγηση των συν-ενεργοποιητών με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Αυτό επιτρέπει τη δέσμευση της TBP πρωτεΐνης (TATA binding protein) και να ξεκινήσει η RNA πολυμεράση II (RNA polII) την μεταγραφή. Οι ελεύθεροι υποδοχείς ανδρογόνων μπορούν, είτε να γυρίσουν

πίσω στο κυτταρόπλασμα και να αναζητήσουν καινούργιο προσδέτη, είτε να οδηγηθούν στο πρωτεόσωμα για να υποστούν την διαδικασία της ουβικουιτίνωσης. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα τεστοστερόνης οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά των MAPK κινάσων και της PI3 κινάσης.<sup>63-65</sup>

### **3.2.2.2. Μη γενωμική δράση ανδρογόνων**

Ο μη γενωμικός τρόπος δράσης των ανδρογόνων περιλαμβάνει ενεργοποίηση του μεμβρανικού υποδοχέα και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας AR μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλά μόρια σηματοδότησης στην κυτταρική μεμβράνη. Ο AR αλληλεπιδρά άμεσα με την ρυθμιστική υπομονάδα p85 της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνositόλης (PI3K) και ενεργοποιεί αυτό το μονοπάτι. Επιπλέον ο AR αλληλεπιδρά με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η caveolin-1 που βρίσκονται στις μικροεγκολπώσεις που σχηματίζει η πλασματική μεμβράνη ενεργοποιώντας την σηματοδότηση κινάσων μέσω διαφορετικών μονοπατιών όπως ERK, PI3K και Akt. Παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1 (IGF-1), ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων (KGF), ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας (EGF), οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTK) που βρίσκονται επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις εγκολπώσεις ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα AR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή σηματοδοτικών καταρρακτών που θα οδηγήσουν στην μεταγραφή των γονιδίων στόχων.<sup>62</sup>

### **3.3 Γεννητικές ορμόνες- Λεία Μυϊκά Κύτταρα -Συσχέτιση με Παθοφυσιολογία αεραγωγών.**

Αν και ο μηχανισμός δράσης και συνεπώς οι επιπτώσεις των γεννητικών ορμονών στις ΛΜΚ των αεραγωγών δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως είναι σαφές πως οι γεννητικές ορμόνες σχετίζονται με την συχνότητα εμφάνισης παθήσεων του αναπνευστικού όπως το άσθμα και η ΧΑΠ (Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια). Η συχνότητα και η βαρύτητα των φλεγμονωδών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος διαφοροποιούνται ανάμεσα στα δυο φύλα με τις γυναίκες να παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά. Η τεστοστερόνη έχει βρεθεί ότι προκαλεί χάλαση των αεραγωγών που βρίσκονται σε σύσπαση με ακετυλοχολίνη ή καρβαχόλη ενεργοποιώντας την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών.<sup>66</sup> Η τεστοστερόνη επιτελεί αυτή την δράση της μέσω μη γενωμικού μηχανισμού. Η επίδραση της είναι γρήγορη μόνο 5 λεπτά μετά την χορήγηση της ορμόνης. Η χορήγηση

ανδρογονικού ανταγωνιστή φλουταμίδη και του αναστολέα σύνθεσης του DNA ακτινομυκίνη D (actinomycin) δεν επηρέασαν την δράση της τεστοστερόνης. Επιπλέον η προεπώαση των ΛΜΚ με τεστοστερόνη και χορήγηση καρβαχόλης στη συνέχεια δεν επηρέασε την δράση της οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα πως η ορμόνη δρα στα ΛΜΚ μέσω ενός μη γενωμικού μηχανισμού. Επίσης έρευνες έχουν δείξει πως τα ανδρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πνευμόνων κατά την διάρκεια της κυοφορίας του εμβρύου.<sup>67</sup> Από την άλλη πλευρά έχειδειχθεί πως τα οιστρογόνα ελαττώνουν την σύσπαση που προκαλεί η ακετυλοχολίνη στα ΛΜΚ των αεραγωγών.<sup>68</sup> 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 οιστρογόνων και μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών της PI3K και των MAP κινασών.

## Σκοπός της εργασίας

Τα λεία μυϊκά κύτταρα τα συναντάμε σε τοιχώματα κοίλων οργάνων όπου ρυθμίζουν την λειτουργία τους μέσω της συστολής. Πιο συγκεκριμένα τα ΛΜΚ βρίσκονται στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, στις μικρές αρτηρίες, στα αρτηρίδια, στις φλέβες, στο εσωτερικό των λεμφαγγείων, στην ουροδόχο κύστη, στη μήτρα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο αναπνευστικό σύστημα αλλά και στην ίριδα του ματιού. Στο αναπνευστικό σύστημα 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. Σε παθολογικές καταστάσεις όπως το άσθμα και η ΧΑΠ τα ΛΜΚ των αεραγωγών πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα την πάχυνση των τοιχωμάτων των αεραγωγών και τον περιορισμό του εισερχόμενου αέρα. Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ οφείλεται στην ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και PI3K από αυξητικούς παράγοντες όπως οι FGF, TGF, PDGF και EGF.

Επιδημιολογικά στατιστικά στοιχεία έχουν δείξει πως παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα στα δυο φύλα υποδεικνύοντας την εμπλοκή των γεννητικών ορμονών στην παθογένεια του αναπνευστικού. Οι γεννητικές ορμόνες τεστοστερόνη και οιστραδιόλη επάγουν επίσης τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της συνεργικής δράσης των γεννητικών ορμονών (τεστοστερόνη, οιστραδιόλη) και των αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Μελετήθηκε η επίδραση σε καλλιέργειες ύστερα από επώαση για 24, 48 και 72ώρες με τους παράγοντες FGF και TGF και τις ορμόνες τεστοστερόνη και οιστραδιόλη καθώς και με τους συνδυασμούς ορμόνη/αυξητικός παράγοντας. Επίσης μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό το p44/42 MAPK, το p38 MAPK και το μονοπάτι της Akt.

Ο συνεργικός μηχανισμός δράσης γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών και η κατανόηση των μονοπατιών που ενεργοποιούνται μπορεί να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας του αναπνευστικού συστήματος και να αποτελέσουν πιθανούς στόχους για φαρμακευτικές προσεγγίσεις.



# **Υλικά και μέθοδοι**

#### **4. Υλικά και μέθοδοι:**

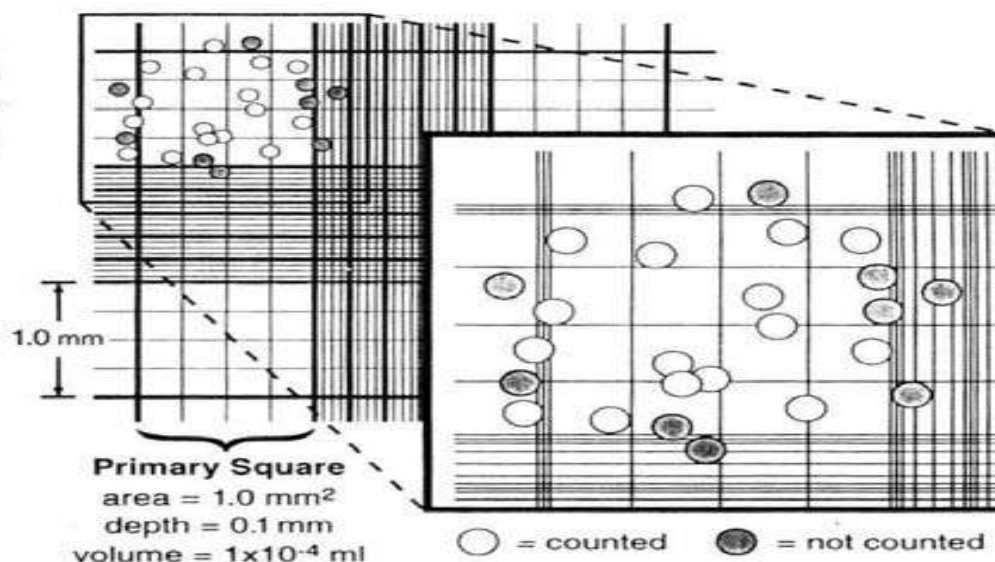
Για την παραπάνω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τα οποία είχαν απομονωθεί από τραχεία κουνελιού <sup>69</sup> και κυτταρική σειρά ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων από βρόγχους (cc-2576, Bronchial Smooth Muscle Cells, Lonza, Walkersville, MD, United States).

##### **4.1 Καλλιέργεια Κυττάρων**

Τα ΔΜΚ καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα των 75 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% CO<sub>2</sub>. Αλλαγή του θρεπτικού πραγματοποιήθηκε ανά 2-3 μέρες. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν την φλάσκα σε μορφή μονοστοιβάδας σε ποσοστό 70%-80% της συνολικής επιφάνειας, ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 0,2% σε διάλυμα PBS. Ακολούθησαν ανακαλλιέργειες των κυττάρων σε φλάσκες ή σε τρυβλία καλλιέργειών. Τα πειράματα διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας κύτταρα τα οποία βρίσκονταν μεταξύ του 3<sup>ο</sup> και 7<sup>ο</sup> σταδίου ανακαλλιέργειας.

##### **4.2 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer**

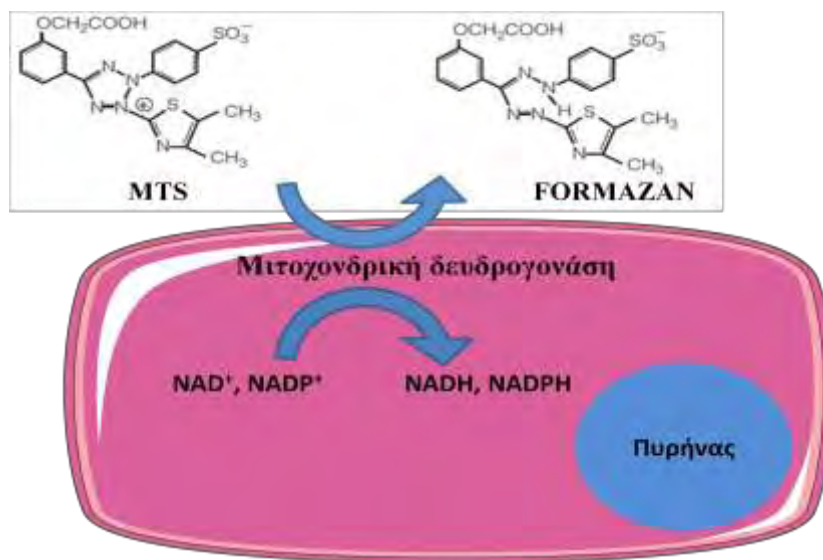
Τα κύτταρα καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon YS2T, (Nikon Inc., Melville, New York, United States) με τη βοήθεια πλάκας Neubauer. Η πλάκα Neubauer η αλλιώς αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση αιμακυτταρόμετρου Neubauer

### 4.3 Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επαγωγή ή αναστολή πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση ενσωμάτωσης –μεταβολισμού MTS –τετραζολίου από ζωντανά ΛΜΚ. Η CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay είναι μια χρωματομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού ή κυτταροτοξικότητας. Η τεχνική Cell Titer AQueous 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. Το ένζυμο δεϋδρογονάση των μιτοχονδρίων μετατρέπει το MTS-τετραζόλιο σε έγχρωμο προϊόν του (RNHN==CR'-N==NR', formazan). 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 και σε σχέση 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 17.** Μεταβολισμός του MTS από τα ζωντανά κύτταρα.

Αρχικά τα κύτταρα που βρισκόταν σε καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε πιάτα ELISA 96 θέσεων με πυκνότητα: 2000 κύτταρα/θέση για τα ανθρώπινα και 3000 κύτταρα/θέση τα κύτταρα που προέρχονται από το κουνέλι.

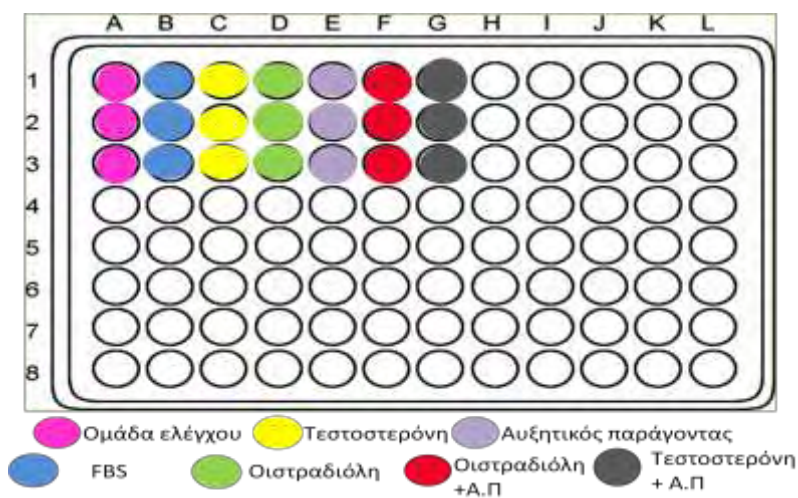
Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με τη βοήθεια της χρωστικής Trypan blue (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) η οποία χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα, καθώς εισέρχεται από τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες. Με αυτόν τον τρόπο μετρήθηκαν τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα και έγινε αναγωγή σε αριθμό κυττάρων ανά ml κυτταρικού αιωρήματος, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{\text{αριθμός κυττάρων στα 8 τετράγωνα}}{8} \times 5 \times 10^4$$

Ο παραπάνω τύπος μας βοήθησε να υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων (πυκνότητα) ανά θέση σε πιάτα ELISA 96 θέσεων. Για τα ΛΜΚ από τον άνθρωπο η πυκνότητα ήταν 2000 κύτταρα/θέση ενώ για τα ΛΜΚ από το κουνέλι η πυκνότητα ήταν 3000 κύτταρα/θέση.

Τα κύτταρα επωάστηκαν ολονύκτια 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% CO<sub>2</sub>. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και ακολούθησε πλύσιμο των κυττάρων 2 φορές με διάλυμα 1×PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και στη συνέχεια επωάστηκαν για 24 ώρες 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% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα με τις ίδιες συνθήκες τοποθετήθηκαν σε επανάληψη των 3 θέσεων στο πιάτο ELISA. Στα παραπάνω πειράματα μια ομάδα κυττάρων αποτελούσε την ομάδα ελέγχου (control), τα οποία ήταν κύτταρα που επωάστηκαν απουσία ορού και επομένως δεν πολλαπλασιάζονταν, μια άλλη ομάδα κυττάρων επωάστηκαν με 10% FBS και επομένως εμφάνιζαν το μέγιστο πολλαπλασιασμό και οι υπόλοιπες ομάδες κυττάρων επωάστηκαν με διαφορετικές ουσίες και με συνδυασμό ουσιών όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 18.** Σχηματική αναπαράσταση πιάτου ELISA 96 θέσεων.

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν για 24, 48 και 72 ώρες με αυξητικούς παράγοντες (FGF, TGF) οι οποίες είτε επάγουν είτε αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Οι ουσίες και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ουσία	Συγκέντρωση	Ιδιότητα
<b>FGF</b>	20ng/ml	Αυξητικός παράγοντας
<b>TGF</b>	20ng/ml	Αυξητικός παράγοντας
<b>Τεστοστερόνη</b>	10 <sup>-8</sup> M	Γεννητική ορμόνη
<b>Οιστραδιόλη</b>	10 <sup>-8</sup> M	Γεννητική ορμόνη

**Πίνακας 1.** Ουσίες που επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων

Μετά την επώαση των κυττάρων με τους επαγωγείς ή τους αναστολείς του πολλαπλασιασμού για 24, 48, 72 ώρες προστέθηκε απευθείας σε κάθε θέση 20% διάλυμα MTS –τετραζολίου και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub>. Τα πιάτα Elisa τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 490nm. Η οπτική πυκνότητα κάθε θέσης εκφράστηκε σε ποσοστό % της οπτικής πυκνότητας των θέσεων κυττάρων του control (δηλαδή των κυττάρων που επώαστηκαν απουσία ορού). 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 την μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού.

#### **4.4 Στατιστική ανάλυση**

Στη συνέχεια ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με σκοπό την μεταξύ τους σύγκριση ομάδων που είχαν καλλιεργηθεί σε διαφορετικές συνθήκες. Οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με βάση την μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και μέσω της στατιστικής ανάλυσης T-test τιμές οι οποίες υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος excel.

#### **4.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση**

##### **4.5.1 Προετοιμασία εκχύλισματος κυτταρικών πρωτεϊνών από ΛΜΚ**

Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 10cm και επώαστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 4 ώρες και στη συνέχεια αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό ακολούθησε 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 2). Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου eppendorf, επώαστηκε για 10 λεπτά σε πάγο και 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 το υπόλοιπο υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση.

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 <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
β-glycerolphosphate	10 mM

**Πίνακας 2.** Διάλυμα λύσης

#### 4.5.2 Υπολογισμός ολικής πρωτεΐνης

Για να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. 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 φυγοκέντρωσης 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).

#### 4.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στην αρχή της κίνησης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μακρομορίων όπως

πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Ο διαχωρισμός αυτός μπορεί να γίνει σε πηκτώματα, ένα από τα οποία είναι το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου κατά την διάρκεια του οποίου ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια N-Nμεθυλεν-δις-ακρυλαμιδίου, ενώνοντας διαφορετικές αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου. Καταλύτη για την αντίδραση του πολυμερισμού αποτελεί το NNN'N'-τετραμεθυλεθυλενοδιαμίνη (TEMED), ενώ απαραίτητη είναι και η παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου που προκύπτουν από τα υπερθειικά ιόντα ( $S_2O_3^{2-}$ ). Ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων όπως το SDS. Το SDS δεσμεύεται σε πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS ανά gr πρωτεΐνης), τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να αναδιατάσσεται η δευτεροταγής δομή τους. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών παραγόντων -όπως είναι η διθειοθρεϊτόλη (DTT) έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 3-5 λεπτά στους  $95^{\circ}C$ , παρουσία όλων των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων. Επειδή το ποσό του SDS που δεσμεύεται ανά μονάδα βάρους κάθε πρωτεΐνης είναι σταθερό, όλες οι πρωτεΐνες έχουν το ίδιο φορτίο και η ανάλυση γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος.

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 με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι δύο πηκτές διαφέρουν ως προς τη σύσταση και το pH τους. Η σύσταση των πηκτών και του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης αναφέρεται στους πίνακες που ακολουθούν.



Ουσία	Πηκτή επιστοίβαξης, pH 6.8	Πηκτή διαχωρισμού, pH 8.8
ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ: BIS ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ	4.5%	8-12%
SDS	0.1%	0.1%
TRIS-HCL	0.125 M	0.375 M
EDTA	2 mM	2 mM
APS	0.08%	0.04%
TEMED	0.04%	0.04%

**Πίνακας 3.** Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης και πηκτής διαχωρισμού

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης pH 8.9	
Ουσία	Συγκέντρωση
Tris	50 mM
Γλυκίνη	0.38 M
EDTA	2 mM
SDS	0.1%

**Πίνακας 4.** Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

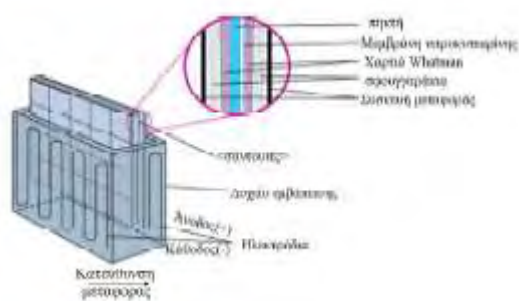
#### 4.5.4 Προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναμίχθηκαν με 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 αποδιάταξη των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 95° C. Στη συνέχεια από τα δείγματα, 30 ή 40 μg πρωτεΐνης τοποθετήθηκαν με σύριγγα Hamilton, στη πηκτή επιστοίβαξης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες 200Volt, 400mA, για 35 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 4.5.5 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 αυτή έγινε σε υγρή φάση (Wet transfer), ως εξής :

Η τοποθέτησή της πηκτής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη από χαρτιά Whatman με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 100Volt, 350mA για 55 λεπτά. Η διάταξη αυτή τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς και η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα μεταφοράς (Tris 48mM, glycine 39mM, SDS 1.3mM, methanol 20%) Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος, παρουσία πάγου για να διατηρηθεί χαμηλή η θερμοκρασία του διαλύματος. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς έγινε με βαφή της μεμβράνης με Ponceau S 0,2%, καθώς η συγκεκριμένη χρωστική χρωματίζει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη και επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών πάνω σε αυτή.



Εικόνα 19. Μεταφορά πρωτεϊνών

#### 4.5.6 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με την ανοσοσφαιρίνη IgG του πρώτου και παράλληλα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο-δείκτη (συνήθως το HRP). Το HRP αντιδρά με υπόστρωμα που προστίθεται εξωγενώς και εκλύει φωταύγεια ή δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χρώματος. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε για 20 λεπτά σε διάλυμα (Blocking buffer)

που περιείχε 5% γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε 1×PBS-0.1% Tween 20. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε με σκοπό να μπλοκαριστούν οι θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος και να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται στη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα 1×PBS-0.1% Tween 20, για 10 λεπτά, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του blocking buffer. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε ολονύκτια στους 4°C με το πρώτο αντίσωμα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Cell signaling), οι αραιώσεις τους καθώς και οι πρωτεΐνες τις οποίες στοχεύουν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

1 <sup>ο</sup> Αντίσωμα	Αραίωση αντισώματος	Πρωτεΐνη που στοχεύει
Phospho-Akt (PI3K)	1:1000	Φωσφορυλιωμένη Akt (PI3K)
Akt (PI3K)	1:1000	Ολική πρωτεΐνη Akt (PI3K)
Phospho-p42-44 (MAPK)	1:1000	Φωσφορυλιωμένη p42/44 (MAPK)
p 44/42 (MAPK)	1:1000	Ολική πρωτεΐνη p 44/42 (MAPK)
Phospho- p38(MAPK)	1:1000	Φωσφορυλιωμένη p38 (MAPK)
p 38(MAPK)	1:1000	Ολική πρωτεΐνη p38 (MAPK)

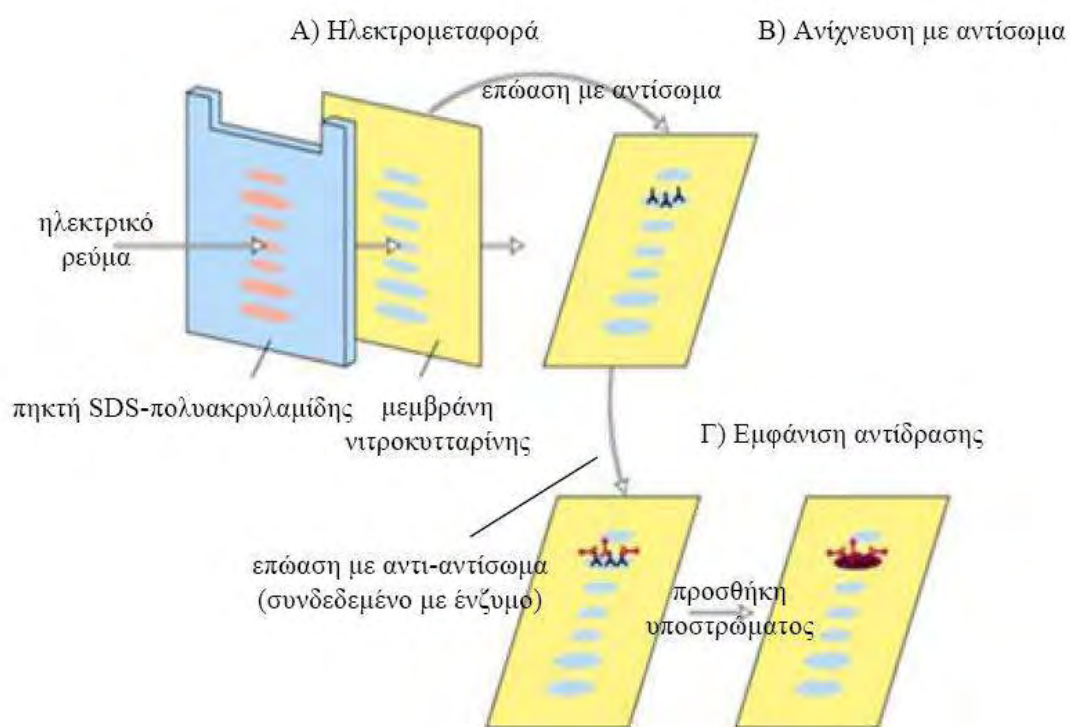
**Πίνακας 5.** Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

Μετά την ολονύκτια επώαση με το 1<sup>ο</sup>αντίσωμα ακολούθησαν 3 διαδοχικά ξεπλύματα των 10 λεπτών η καθεμία με διάλυμα 1×PBS-0.1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκε 2<sup>ο</sup> αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου Anti rabbit IgG σε αραιώση 1:3000. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα των 10 λεπτών η καθεμία με διάλυμα 1×PBS-0.1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.

#### 4.5.7 Εμφάνιση πρωτεϊνών

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χημифωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 10ml λουμινόλης (1.25 mM σε 0.1M Tris-Cl pH 8.5), στο οποίο προστέθηκαν 10μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM σε DMSO), για 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ

(ECL Hyperfilm, Amersham). Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά όλα τα στάδια της ηλεκτρομεταφοράς και της εμφάνισης των πρωτεϊνών .



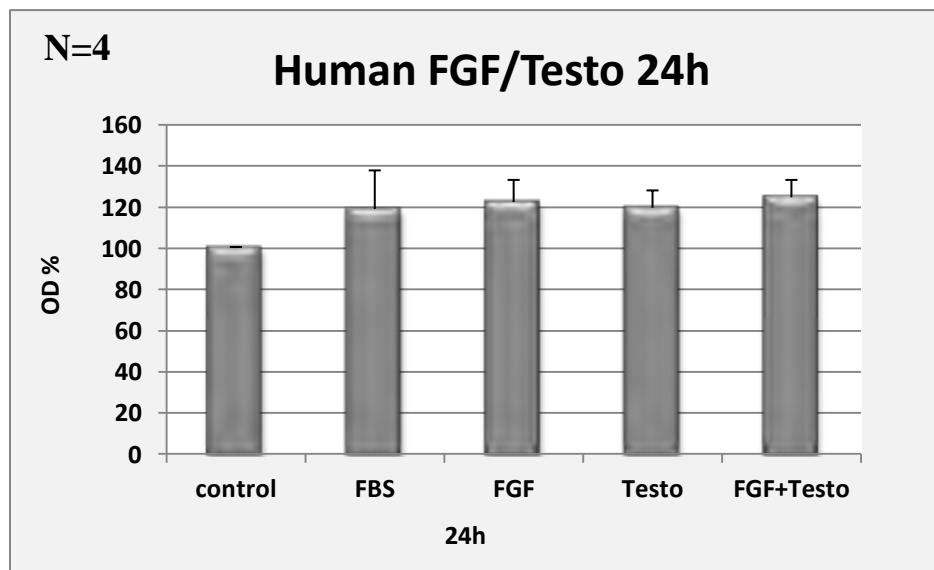
**Εικόνα 20.** Συνοπτική παρουσίαση των διαδικασιών ηλεκτρομεταφοράς, ανοσοανίχνευσης και εμφάνισης σήματος

# **Αποτελέσματα**

## 5. Αποτελέσματα:

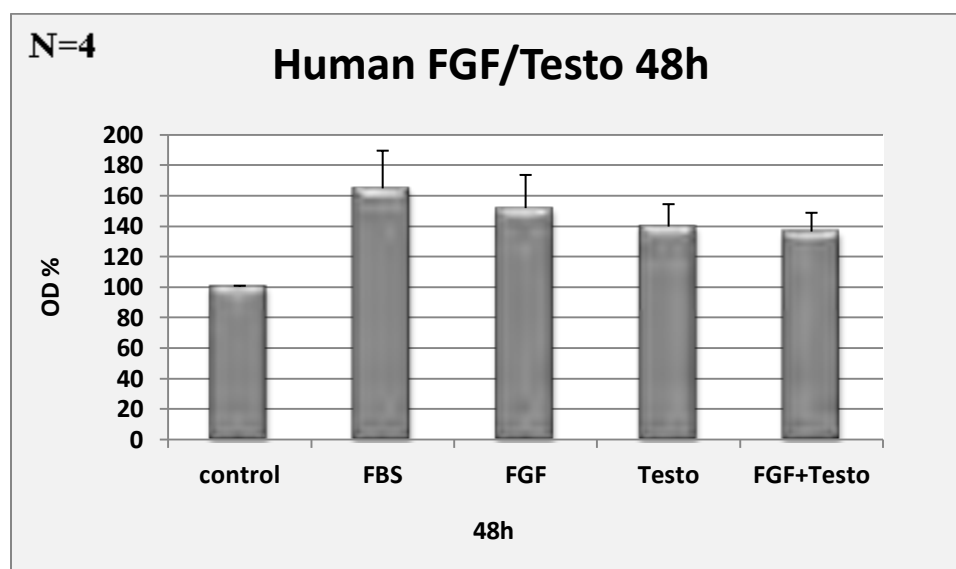
### 5.1 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των AMK των αεραγωγών στον άνθρωπο.

Πρωτογενή ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M), FGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=4$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), ο αυξητικός παράγοντας FGF, η τεστοστερόνη και ο συνδυασμός FGF/τεστοστερόνη αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικά (διάγραμμα 1). Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $0.92 \pm 18\%$ ,  $123 \pm 10,7\%$ ,  $120 \pm 8,4\%$  και  $125 \pm 8.4\%$  σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) αντίστοιχα.



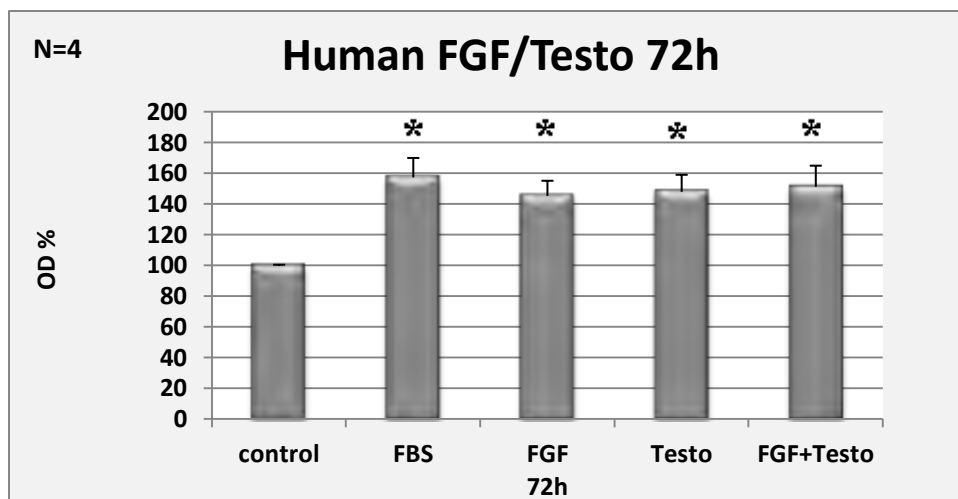
Διάγραμμα 1. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}$ M), του FGF 20ng/ml και του συνδυασμού FGF/ τεστοστερόνη 20ng/ml/ ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων AMK βρόγχων μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ύστερα από 48 ώρες στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, τεστοστερόνη, FGF και τον συνδυασμό τεστοστερόνη/FGF παρατηρείται αυξημένος πολλαπλασιασμός χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικός (διάγραμμα 2). Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $164.8 \pm 24.7\%$ ,  $151.9 \pm 21.7\%$ ,  $139.8 \pm 14.7\%$ ,  $136.5 \pm 12.3\%$  σε κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με 10%FBS, 20ng/ml FGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ ) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ )/FGF (20ng/ml) αντίστοιχα. Ο πολλαπλασιασμός στα κύτταρα που επώαστηκαν με τον συνδυασμό τεστοστερόνη/FGF συγκρινόμενος με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επώαστηκαν μόνο με FGF είναι μειωμένος. Ωστόσο η μείωση αυτή δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 2. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}\text{M}$ ), του FGF 20ng/ml και του συνδυασμού FGF/ τεστοστερόνη 20ng/ml/ ( $10^{-8}\text{M}$ ) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ύστερα από 72 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, FGF, τεστοστερόνη και τον συνδυασμό FGF/τεστοστερόνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου εμφανίζουν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική (διάγραμμα 3). Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $157.4 \pm 12.6\%$ ,  $145.3 \pm 9.87\%$ ,  $148.0 \pm 11.0\%$  και  $151.2 \pm 13.7\%$  σε κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ ) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ )/FGF (20ng/ml) αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό χωρίς ορό των οποίων η οπτική πυκνότητα ήταν  $100.0 \pm 0.4\%$



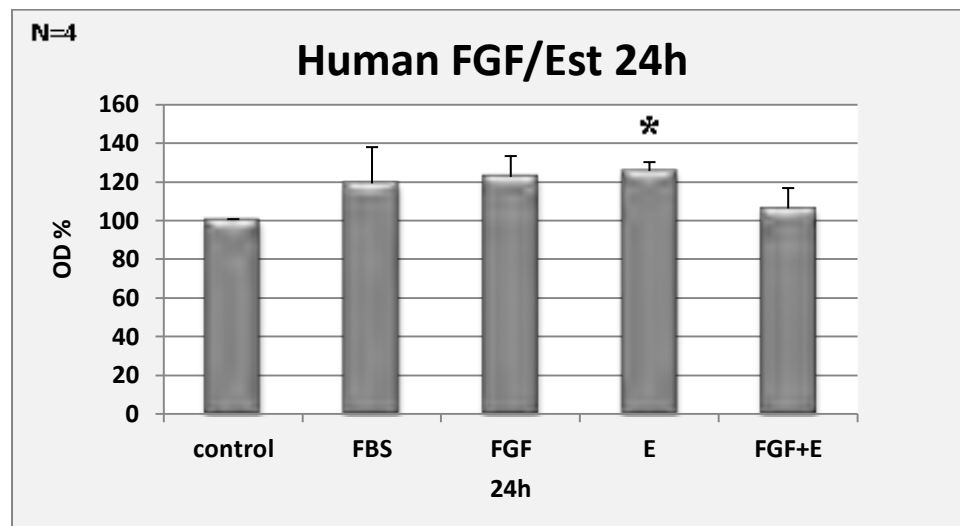
Διάγραμμα 3. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}$ M), του FGF 20ng/ml και του συνδυασμού FGF/ τεστοστερόνη 20ng/ml/ ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΑΜΚ βρόγχων μετά από 72 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.. \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

## 5.2 Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΑΜΚ των αεραγωγών στον άνθρωπο

Πρωτογενή ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M), FGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=4$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), ο αυξητικός παράγοντας FGF, η οιστραδιόλη και ο συνδυασμός FGF/οιστραδιόλη αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και μόνο ο πολλαπλασιασμός που προκάλεσε η οιστραδιόλη ήταν στατιστικά σημαντικός (διάγραμμα 4). Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $92.6 \pm 18.8\%$ ,  $122.5 \pm 10.7\%$ ,  $106.2 \pm 10.5\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, και οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό των οποίων η οπτική πυκνότητα ήταν  $100.0 \pm 0.4$ . Η οπτική πυκνότητα που παρουσίασαν τα

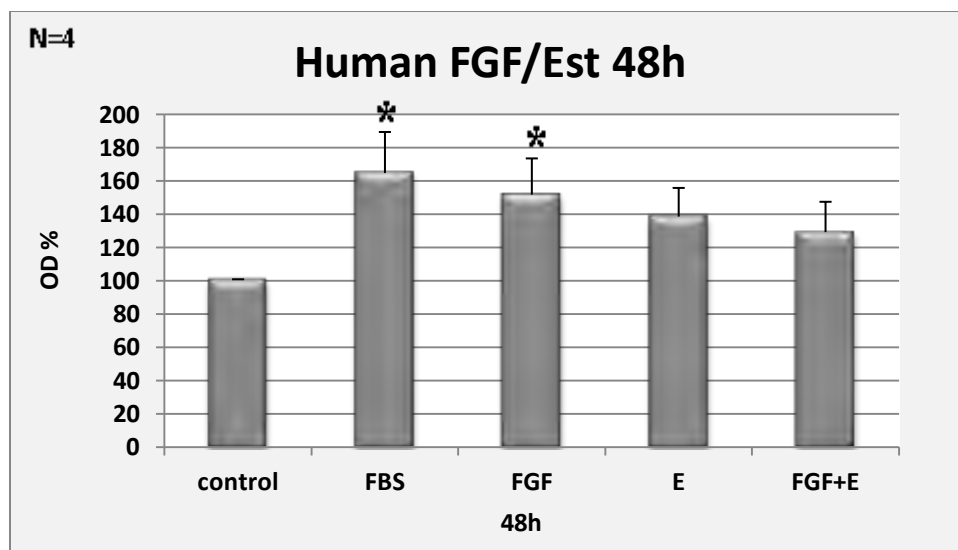


κύτταρα τα οποία επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε οιστραδιόλη ( $10^{-8}\text{M}$ ) ήταν  $125.5 \pm 4.6\%$ . Επιπλέον η επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό φαίνεται πως είναι αρνητική καθώς η συγχορήγηση φαίνεται να έχει προκαλέσει μικρότερο πολλαπλασιασμό σε σχέση με τον FGF μόνο του και η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



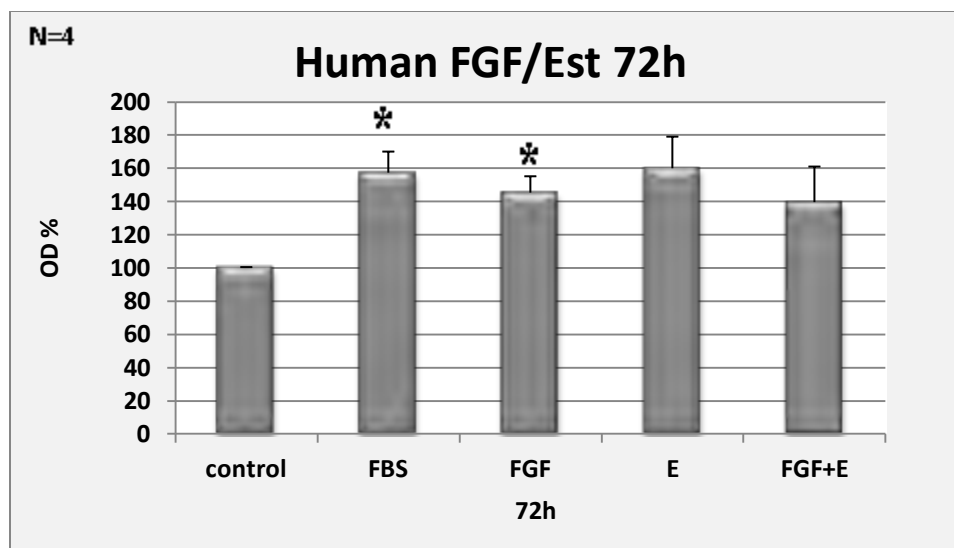
Διάγραμμα 4. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}\text{M}$ ), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}\text{M}$ ) στον αριθμό των ανθρώπινων ΑΜΚ βρόγχων μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.05$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

Ύστερα από 48 ώρες στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, οιστραδιόλη, FGF και τον συνδυασμό FGF/οιστραδιόλη παρατηρήθηκε αυξημένος πολλαπλασιασμός σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικά (διάγραμμα 5). Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $164.8 \pm 24.7\%$ ,  $151.9 \pm 21.7\%$ ,  $138.17\%$  και  $129.3 \pm 18.2\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, οιστραδιόλη και οιστραδιόλη ( $10^{-8}\text{M}$ )/FGF (20ng/ml). Επιπλέον ο συνδυασμός FGF/οιστραδιόλη συγκρινόμενος με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με FGF ο πολλαπλασιασμός είναι μειωμένος και η μείωση αυτή δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 5. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}$ M), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη( $10^{-8}$ M), στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE 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. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

Ύστερα από 72 ώρες ο αριθμός των κυττάρων που επώαστηκαν με τα FBS, FGF, οιστραδιόλη και τον συνδυασμό FGF/οιστραδιόλη είναι αυξημένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 6). Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και FGF. Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $157.4 \pm 12.6\%$ ,  $145.3 \pm 9.8\%$ ,  $160.0 \pm 9.8\%$  και  $139.6 \pm 21.4\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν για 72 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, οιστραδιόλη και οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον συνδυασμό FGF/οιστραδιόλη παρουσιάζουν ελάχιστα μειωμένο πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με FGF, αλλά η μείωση αυτή στον πολλαπλασιασμό δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική.

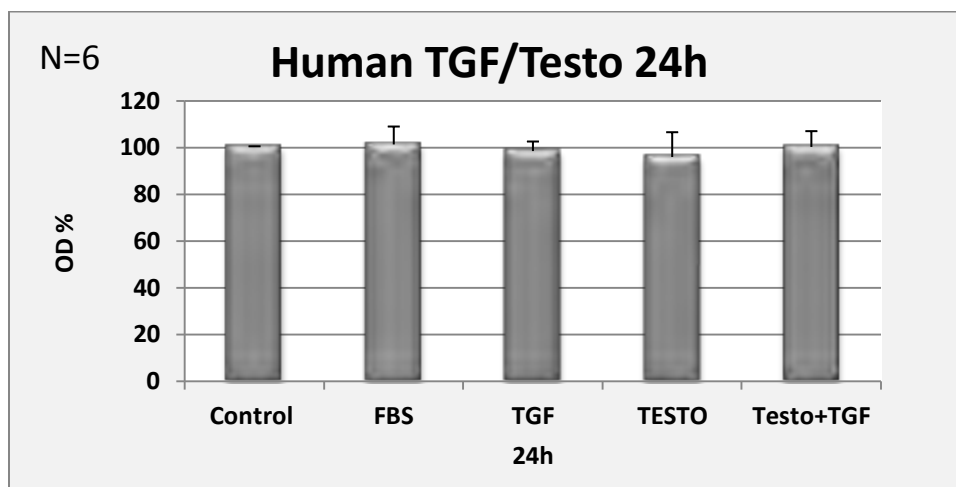


Διάγραμμα 6. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του FGF(20ng/ml) και του συνδυασμού FGF20ng/ml/οιστραδιόλη  $10^{-8}M$  στον αριθμό των ανθρώπινων AMK βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P<0.05$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

### 5.3 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των AMK των αεραγωγών στον άνθρωπο.

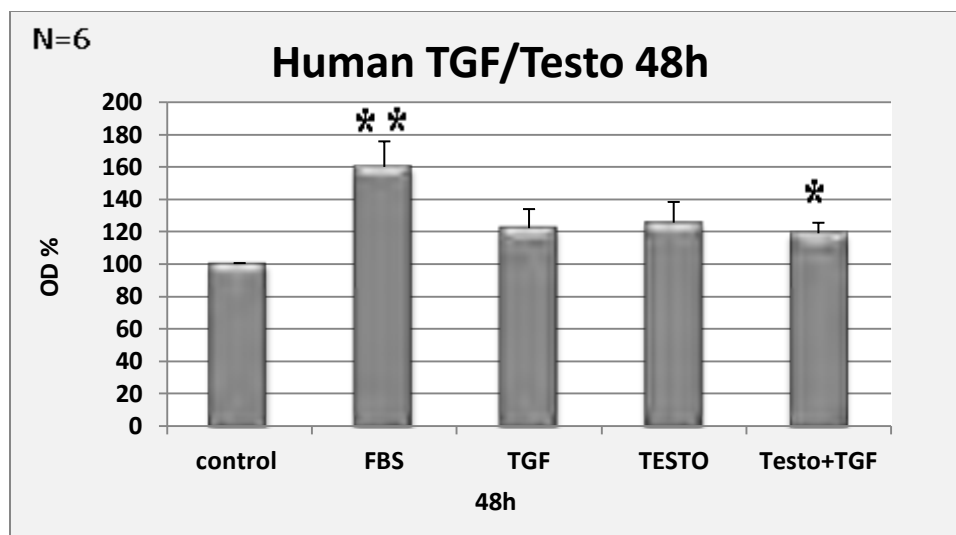
Πρωτογενή ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ), TGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ )/TGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=6$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), ο αυξητικός παράγοντας TGF, η τεστοστερόνη και ο συνδυασμός TGF/τεστοστερόνη δεν προκάλεσαν κάποια επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 7). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον συνδυασμό TGF/τεστοστερόνη σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με τεστοστερόνη παρουσιάζουν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $101.2 \pm 7.6\%$ ,  $98.4 \pm 4.07\%$ ,  $95.9 \pm 10.6\%$  και  $100.1 \pm 6.7\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS, 20ng/ml TGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ ) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ )/TGF (20ng/ml) αντίστοιχα.



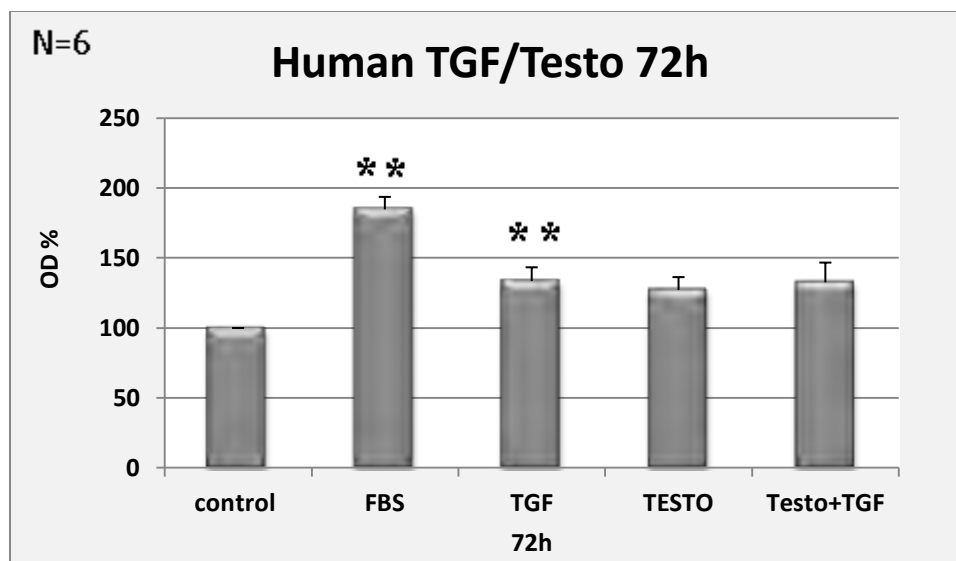
Διάγραμμα 7. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}\text{M}$ ), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF (20ng/ml)/ τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ ) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ύστερα από 48 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, τεστοστερόνη, TGF και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη αύξησαν τον πολλαπλασιασμό τους σε με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 8). Μόνο ο πολλαπλασιασμός που προσκαλεί ο FBS και ο συνδυασμός TGF/τεστοστερόνη φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικό. Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $159.9 \pm 15.8\%$ ,  $122.1 \pm 15.8\%$ ,  $125.6 \pm 12.7\%$  και  $119.0 \pm 6.4\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS, 20ng/ml TGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ ) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}\text{M}$ )/TGF (20ng/ml) αντίστοιχα.



Διάγραμμα 8. Επίδραση της τεστοστερόνης, του TGF και του συνδυασμού TGF/ τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

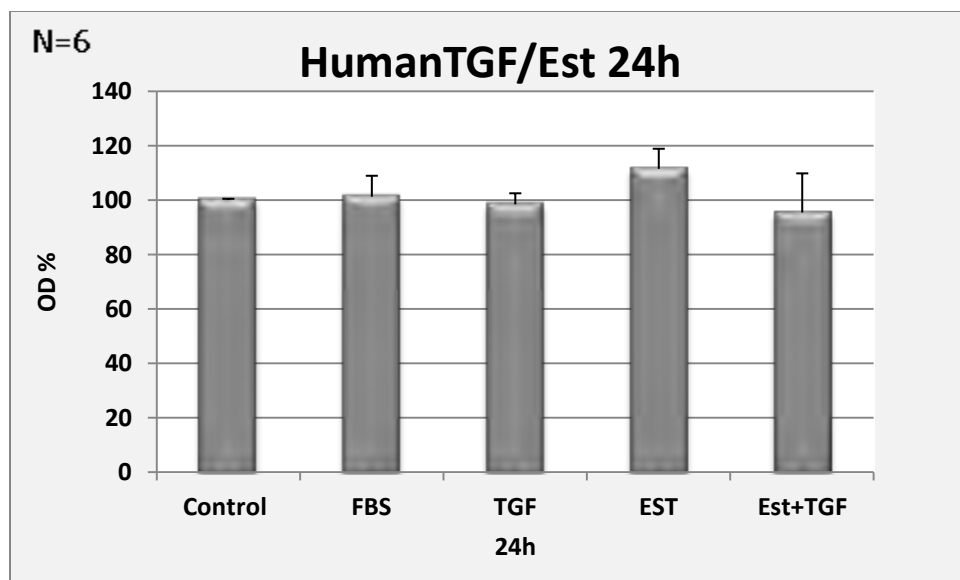
Ύστερα από 72 ώρες ο αριθμός των κυττάρων που επώαστηκαν με FBS, TGF, τεστοστερόνη και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη ήταν αυξημένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 9). Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και TGF. Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $184.7\pm 8.98\%$  και  $133.5\pm 9.83\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS και 20ng/ml TGF αντίστοιχα. Αντιθέτως η αύξηση στον πολλαπλασιασμό στα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M)/TGF (20ng/ml) αυξήθηκε σε ποσοστό  $127.1\pm 9.18\%$  και  $132.6\pm 14.09\%$  αντίστοιχα.



Διάγραμμα 9. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}$ M), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF (20ng/ml)/τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 72 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE 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. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

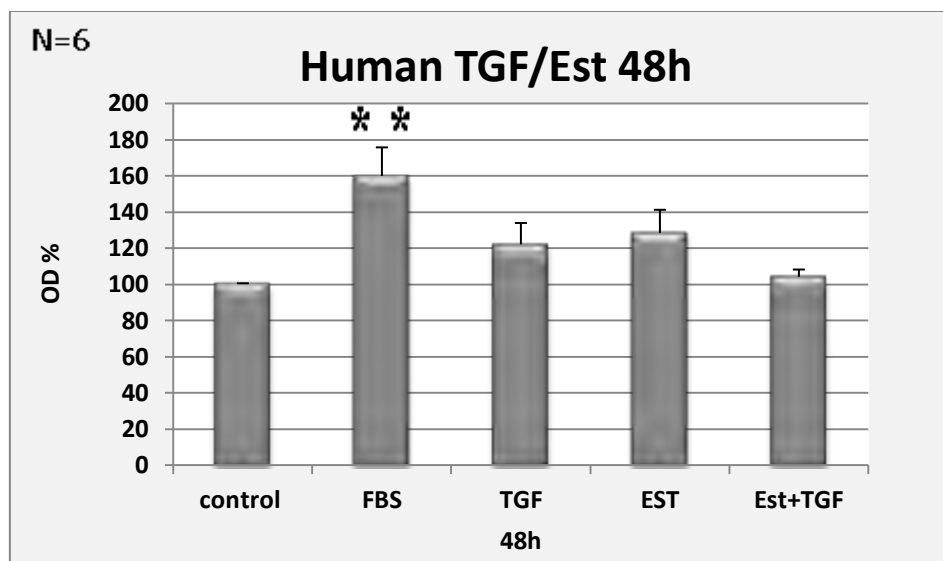
#### 5.4 Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ

Πρωτογενή ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M), FGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=4$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), ο αυξητικός παράγοντας TGF και ο συνδυασμός FGF/οιστραδιόλη δεν αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 10). Τα μόνα κύτταρα στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση πολλαπλασιασμού ήταν τα κύτταρα που επώαστηκαν οιστραδιόλη χωρίς όμως η αύξησή αυτή να παρουσιάζεται στατιστικά σημαντικό. Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $111.49 \pm 7.38\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M).



Διάγραμμα 10. Επίδραση της οιστραδιόλης( $10^{-8}$ M), του TGF (20ng/ml)και του συνδυασμού TGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

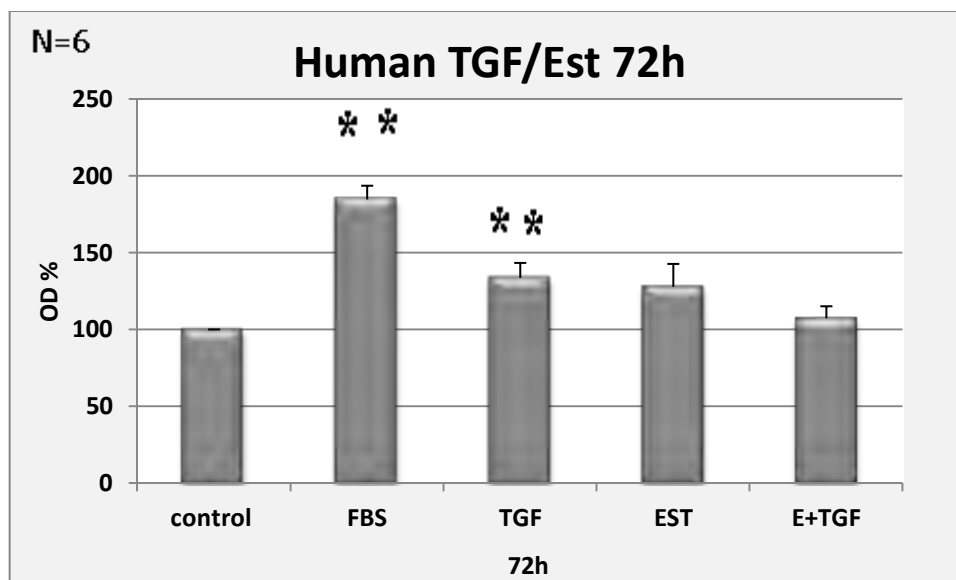
Ύστερα από 48 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, οιστραδιόλη, TGF και τον συνδυασμό TGF/ οιστραδιόλη παρουσίασαν αυξημένο πολλαπλασιασμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 11). Μόνο τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $159.99 \pm 15.79\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με 10% FBS.



Διάγραμμα 11. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}$ M), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF (20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE 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. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

Στις 72 ώρες, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου τα κύτταρα επώαστηκαν με FBS, TGF, οιστραδιόλη και τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη προκάλεσαν αύξηση στον πολλαπλασιασμό (διάγραμμα 12). Η μεγαλύτερη αύξηση του πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF και οιστραδιόλη και στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίστηκε στις ομάδες που επώαστηκαν με FBS και TGF. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $184.73 \pm 7.87\%$  και  $133.53 \pm 9.83\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και TGF αντίστοιχα.



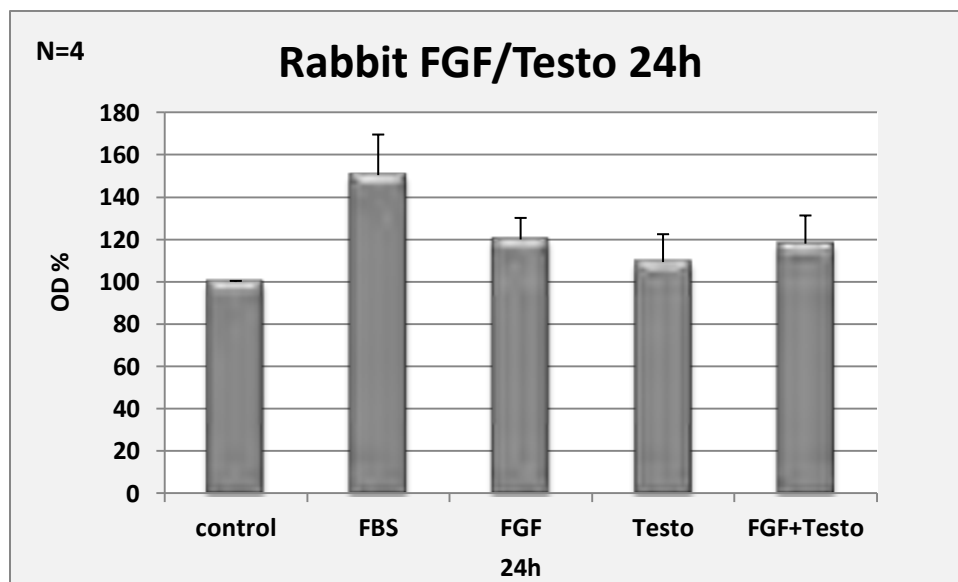


Διάγραμμα 12. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}$ M), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF (20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων  $**P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

### 5.5 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι

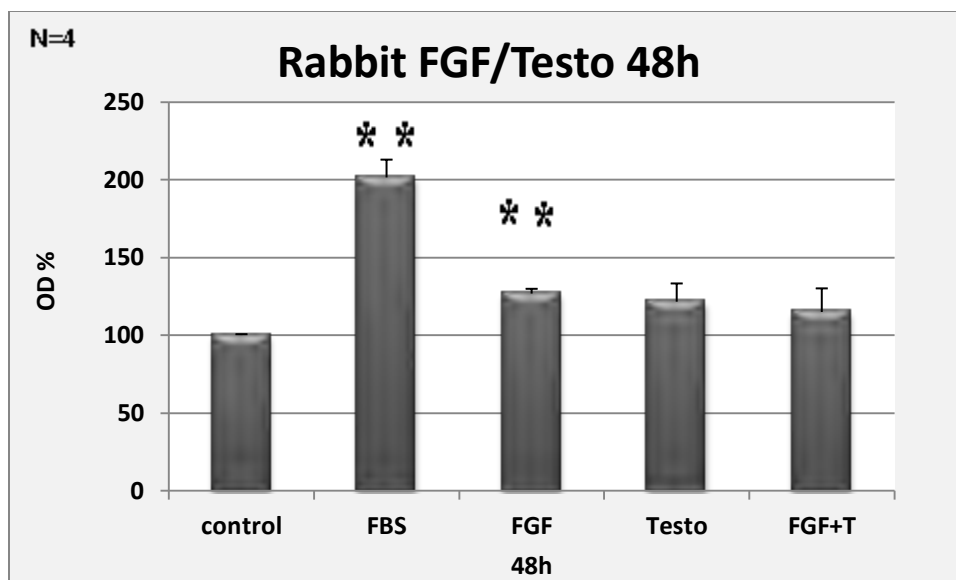
Πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα από τραχεία κουνελιού τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M), FGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα έλεγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=4$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), και σε μικρότερο βαθμό ο αυξητικός παράγοντας FGF, η τεστοστερόνη και ο συνδυασμός FGF/τεστοστερόνη αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικά (διάγραμμα 13). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $150.44 \pm 19.19\%$ ,  $120.04 \pm 10.1\%$ ,  $109.37 \pm 13.17\%$  και  $118.07 \pm 13.30\%$  σε κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 10% FBS, 20ng/ml FGF, τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) και τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) αντίστοιχα.

Τα κύτταρα που παρουσίασαν τον μικρότερο πολλαπλασιασμό ήταν τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με τεστοστερόνη σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Τέλος δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία FGF και τεστοστερόνης σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με FGF ή μόνο με τεστοστερόνη.



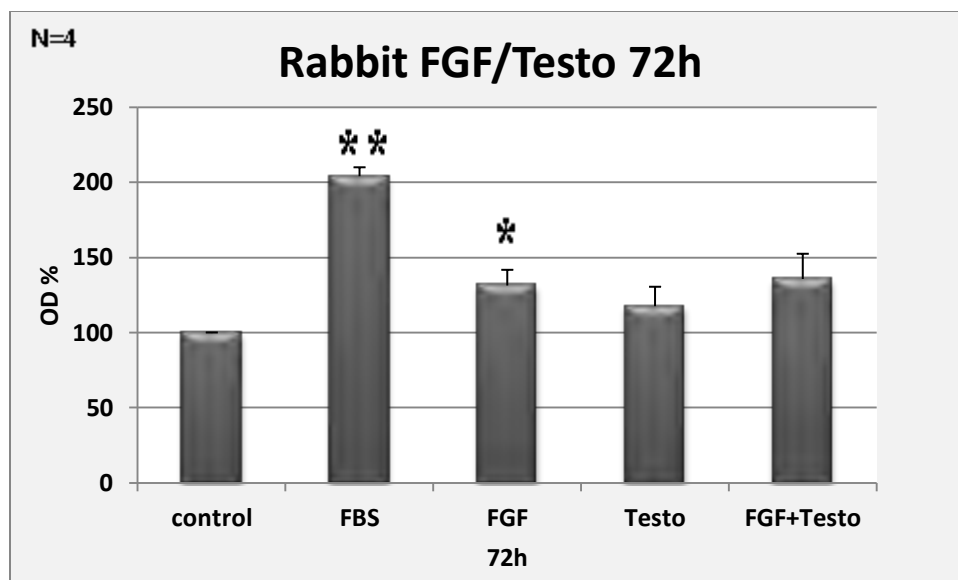
Διάγραμμα 13. Επίδραση της τεστοστερόνης( $10^{-8}$ M), του FGF(20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/ τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στις 48 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού σε όλες τις ομάδες και η οποία ήταν στατιστικά σημαντική για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και FGF (διάγραμμα 14). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $201.46\pm 11.4\%$  και  $126.81\pm 3.05\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και FGF αντίστοιχα. Ενώ η οπτική πυκνότητα των κυττάρων που επώαστηκαν με τεστοστερόνη και με τον συνδυασμό FGF/ τεστοστερόνη αύξησαν την οπτική πυκνότητα σε ποσοστό  $121.60\pm 11.71\%$  και  $114.98\pm 15.17\%$  αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τις ομάδες που επώαστηκαν με τεστοστερόνη, FGF και τον συνδυασμό FGF/ τεστοστερόνη μεταξύ τους, φαίνεται πως ο συνδυασμός FGF/ τεστοστερόνη προκαλεί μείωση του πολλαπλασιασμού χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό.



Διάγραμμα 14. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}M$ ), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF (20ng/ml)/ τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \*\* $P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επωάστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

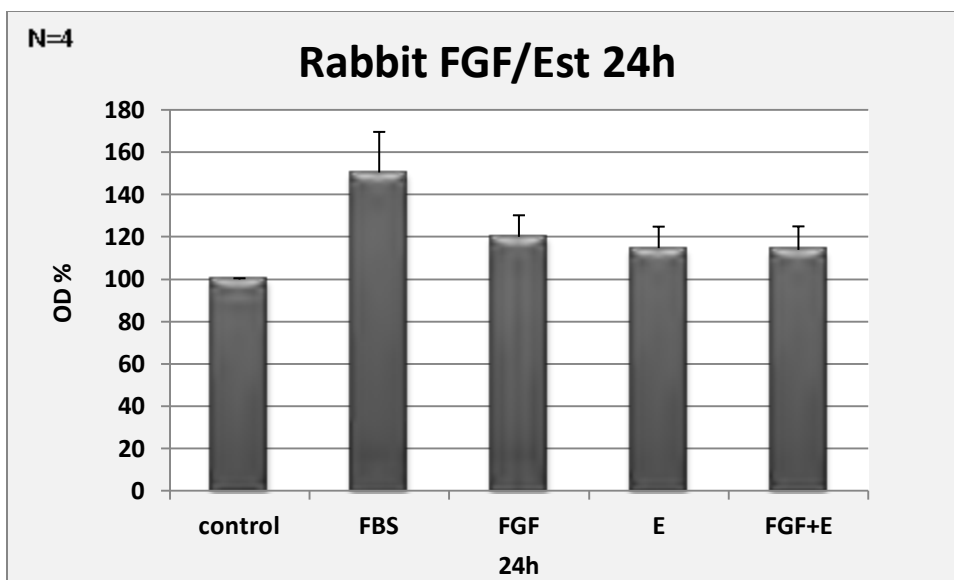
Στις 72 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στα κύτταρα που επωάστηκαν με FBS, FGF και τον συνδυασμό FGF/ τεστοστερόνη παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού (διάγραμμα 15). Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίστηκε στις ομάδες των κυττάρων που επωάστηκαν με FBS και FGF. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα στα κύτταρα που επωάστηκαν με FBS και FGF αυξήθηκε σε ποσοστό  $204.12 \pm 5.93\%$  και  $131.35 \pm 10.44\%$  αντίστοιχα. Ο συνδυασμός FGF/ τεστοστερόνη δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική διαφορά στον πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με FGF ή μόνο με τεστοστερόνη.



Διάγραμμα 15. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}$ M), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/τεστοστερόνη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

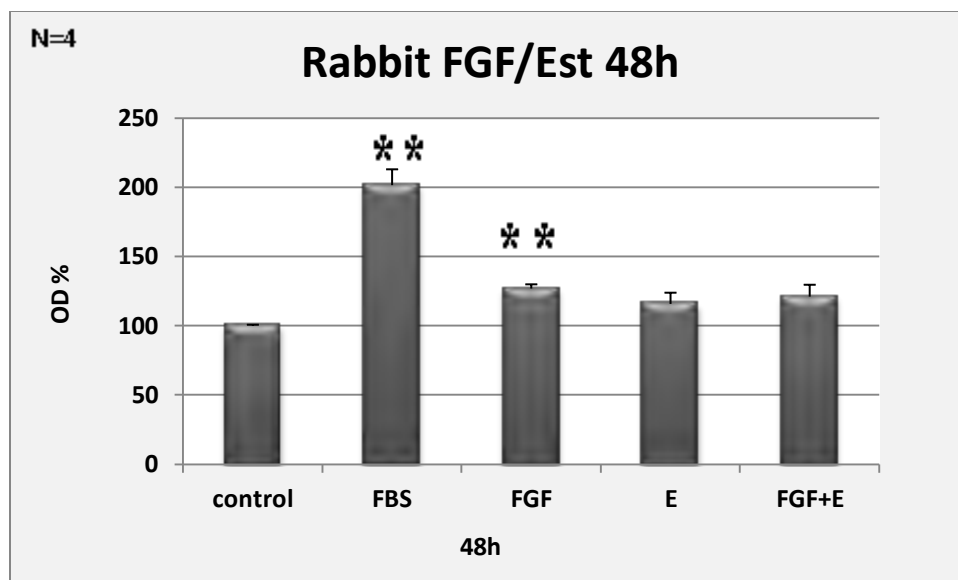
### 5.6. Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών στο κουνέλι

Πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα από τραχεία κουνελιού τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M), FGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M)/FGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα έλεγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=4$ ). Στις 24 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, με FGF, με οιστραδιόλη και με τον συνδυασμό FGF/οιστραδιόλη παρουσίασαν αύξηση του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (διάγραμμα 16). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, FGF, οιστραδιόλη και τον συνδυασμό οιστραδιόλη/ FGF αυξήθηκε σε ποσοστό  $150.44 \pm 19.19\%$ ,  $120.049 \pm 10.16\%$ ,  $114.73 \pm 10.12\%$  και  $113.85 \pm 11.11\%$  αντίστοιχα.



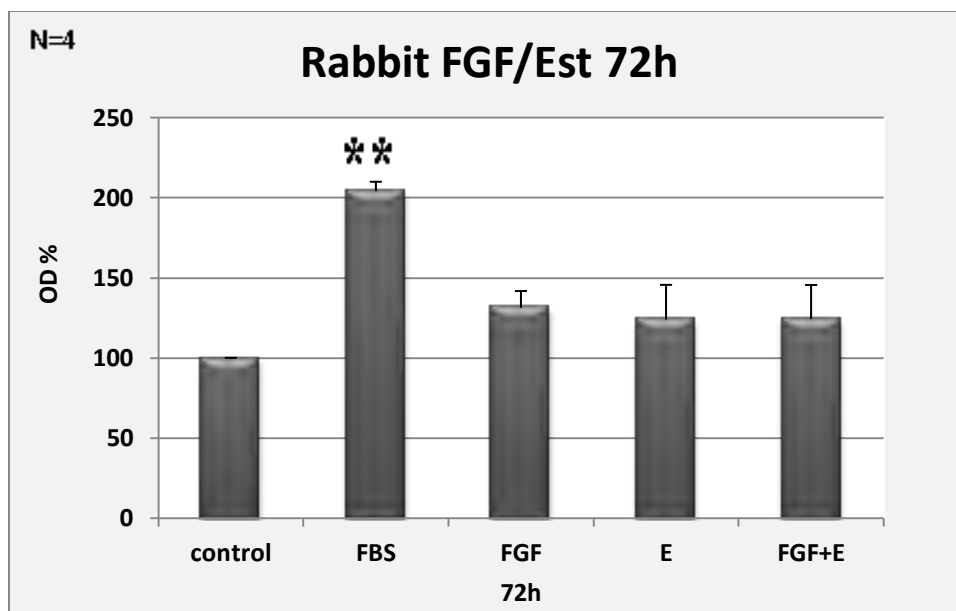
Διάγραμμα 16. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στις 48 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μόνο τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και FGF παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (διάγραμμα 17). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $201.46 \pm 11.4\%$  για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και σε ποσοστό  $126.81 \pm 3.05\%$  για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FGF. Συγκρίνοντας τις ομάδες που επώαστηκαν με οιστραδιόλη, FGF και τον συνδυασμό FGF/ οιστραδιόλη μεταξύ τους, φαίνεται πως ο συνδυασμός FGF/οιστραδιόλη προκαλεί μείωση του πολλαπλασιασμού χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό.



Διάγραμμα 17. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του FGF (20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE 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. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

Στις 72 ώρες στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, FGF και τον συνδυασμό FGF/οιστραδιόλη προκλήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 18). Ο μεγαλύτερος πολλαπλασιασμός παρατηρήθηκε στις ομάδες που επώαστηκαν με FBS και η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS αυξήθηκε σε ποσοστό  $204.12 \pm 5.93\%$ . Επιπλέον ο συνδυασμός FGF/οιστραδιόλη δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφορά στον πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με οιστραδιόλη ή μόνο με FGF.

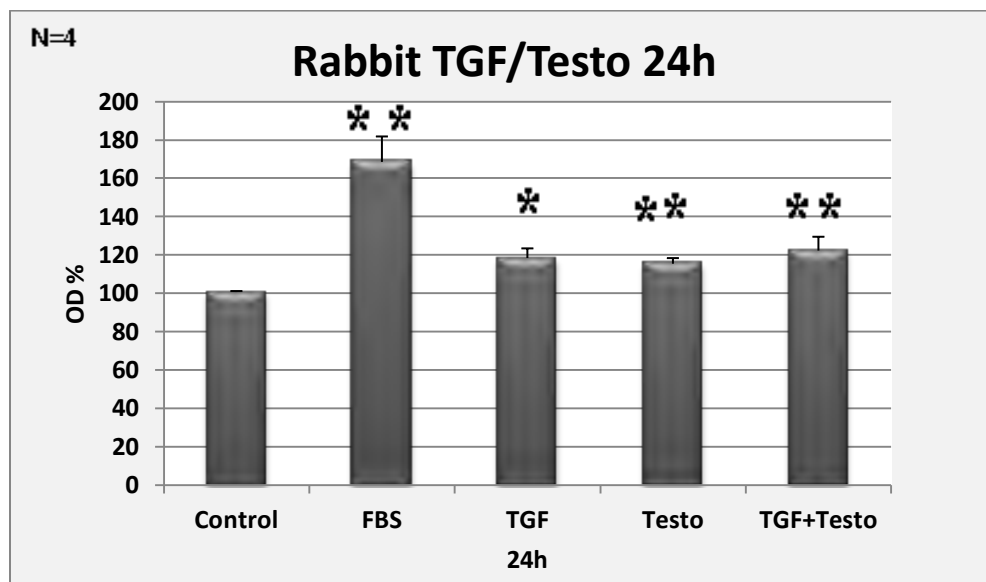


Διάγραμμα 18. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του FGF(20ng/ml) και του συνδυασμού FGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 72 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \*\* $P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

### 5.7 Επίδραση της τεστοστερόνης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ από τραχεία στο κουνέλι

Πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα από τραχεία κουνελιού τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ), TGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ )/TGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα έλεγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=6$ ). Στις 24 ώρες ο ορός (FBS), ο αυξητικός παράγοντας TGF, η τεστοστερόνη και ο συνδυασμός TGF/τεστοστερόνη αύξησαν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 19). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $168.52 \pm 13.25$ ,  $118.40 \pm 5.03\%$ ,  $115.41 \pm 2.96\%$  και  $122.28 \pm 7.20\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν

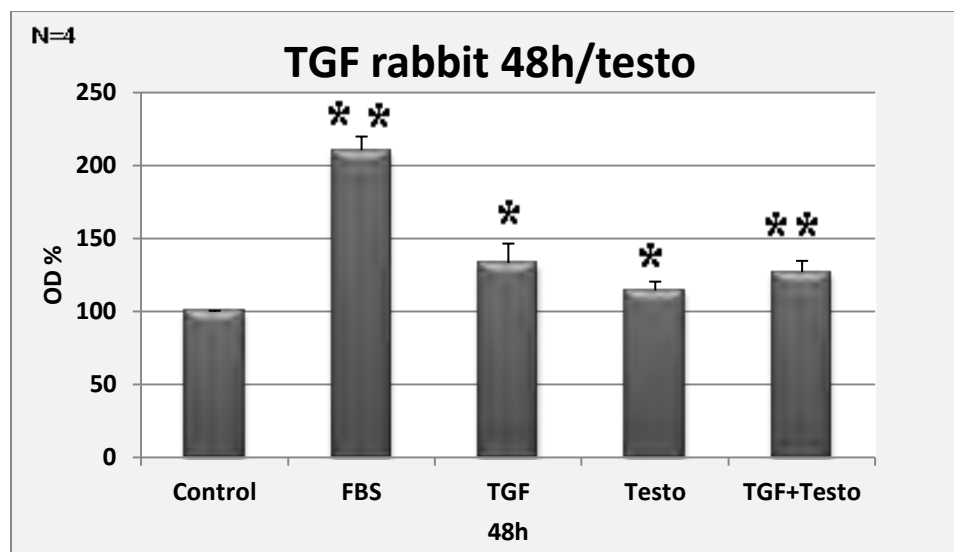
με FBS, TGF, τεστοστερόνη και τον συνδυασμό τεστοστερόνη/TGF. Τέλος ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων παρουσία συνδυασμού τεστοστερόνη/TGF δεν διαφέρει σημαντικά από τον πολλαπλασιασμό που προκαλεί η επώαση παρουσία TGF.



Διάγραμμα 19. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}M$ ), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF(20ng/ml)/τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

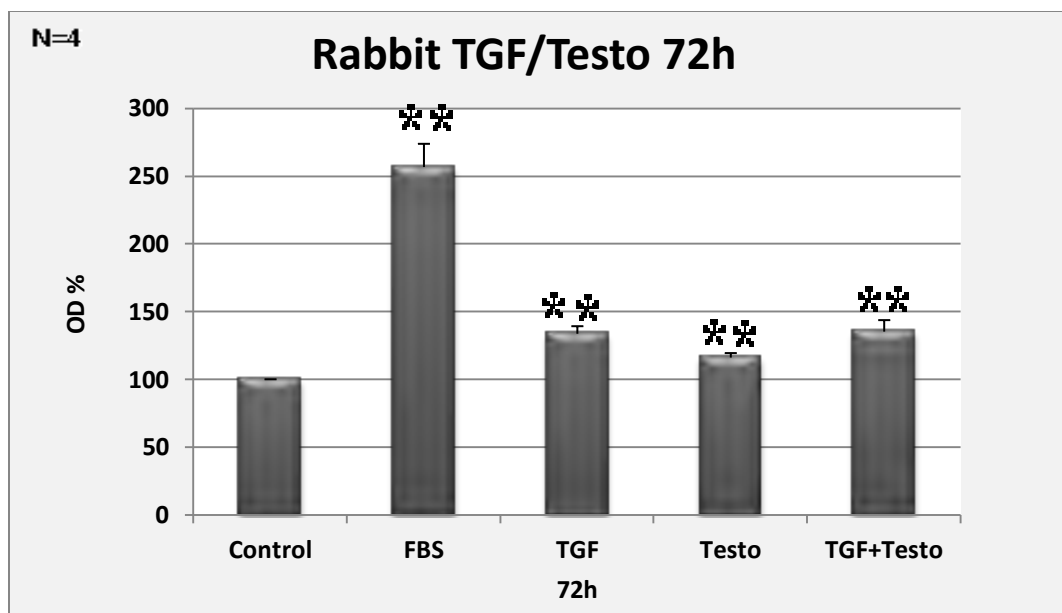
Στις 48 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, τεστοστερόνη, TGF και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στον πολλαπλασιασμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 20). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $210.38 \pm 9.36\%$ ,  $133.05 \pm 13.34\%$ ,  $114.27 \pm 6.04\%$  και  $126.78 \pm 7.78\%$  για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, τεστοστερόνη, TGF και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τις ομάδες που επώαστηκαν με τεστοστερόνη, TGF και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη μεταξύ τους, φαίνεται πως ο συνδυασμός TGF/ τεστοστερόνη προκαλεί μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό σε σχέση με την τεστοστερόνη μόνη της ή τον FGF μόνο του χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.





Διάγραμμα 20. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}M$ ), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF (20ng/ml)/ τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

Στις 72 ώρες, στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF, τεστοστερόνη και τον συνδυασμό TGF/ τεστοστερόνη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 21). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $256.69\pm 17.13\%$ ,  $133.70\pm 5.61\%$ ,  $116.13\pm 3.33\%$  και  $135.29\pm 8.48\%$  για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF, τεστοστερόνη και τον συνδυασμό τεστοστερόνη/TGF αντίστοιχα. Η επώαση με τον συνδυασμό τεστοστερόνη/TGF δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική αλλαγή του πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με TGF.

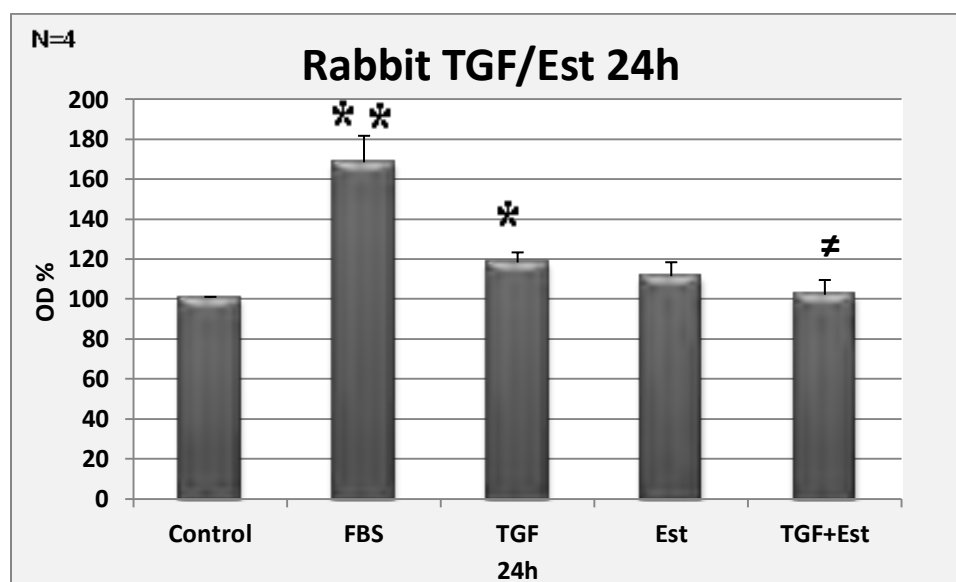


Διάγραμμα 21. Επίδραση της τεστοστερόνης ( $10^{-8}M$ ), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF(20ng/ml)/τεστοστερόνη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 72 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων.  $**P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

### 5.8 Επίδραση της οιστραδιόλης στον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ από τραχεία στο κουνέλι

Πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα από τραχεία κουνελιού τοποθετήθηκαν σε πιάτα Elisa 96 θέσεων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να συγχρονιστούν. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκε οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ), TGF (20ng/ml), και ο συνδυασμός οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ )/TGF (20ng/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται και αποτελούν την ομάδα έλεγχου. Επίσης ως θετικοί μάρτυρες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία 10% FBS. Ο συνολικός αριθμός πειραμάτων ήταν ( $n=6$ ).

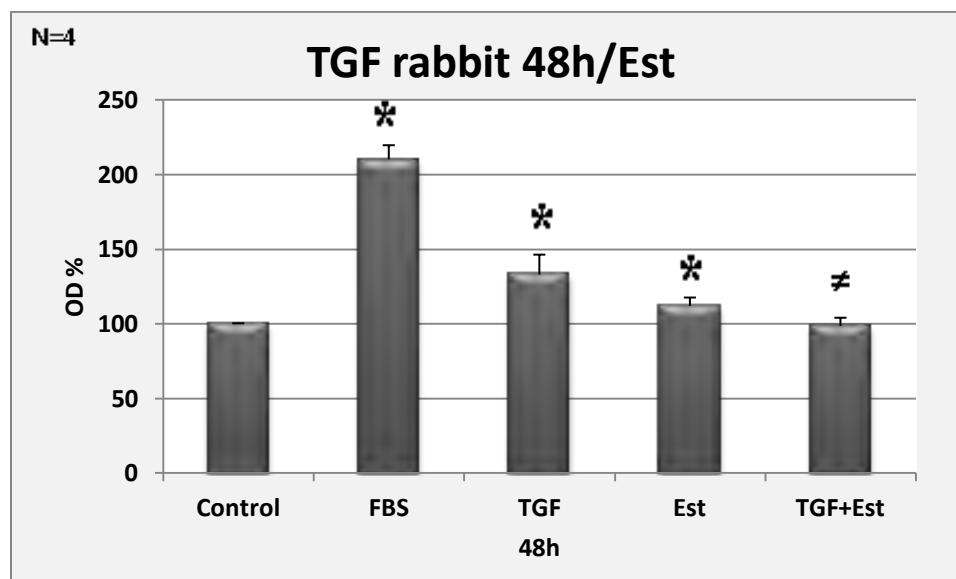
Στις 24 ώρες ο ορός και ο αυξητικός παράγοντας TGF αύξησαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 22). Αντίθετα η οιστραδιόλη και ο συνδυασμός TGF/οιστραδιόλη δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση στον πολλαπλασιασμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $168.52 \pm 13.25\%$  και  $118.40 \pm 5.03\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και TGF αντίστοιχα. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που επώαστηκαν με τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη είναι σημαντικά μικρότερος από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επώαστηκαν μόνο με TGF. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα μειώθηκε από  $118.40 \pm 5.03\%$  και  $111.52 \pm 6.98\%$  σε  $102.19 \pm 7.41\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με TGF, οιστραδιόλη και τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη.



Διάγραμμα 22. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του TGF(20ng/ml) και του συνδυασμού TGF20(ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE και το N αναφέρεται στον αριθμό των ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) δηλαδή κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού. # $P < 0.05$  ως προς τον TGF. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων

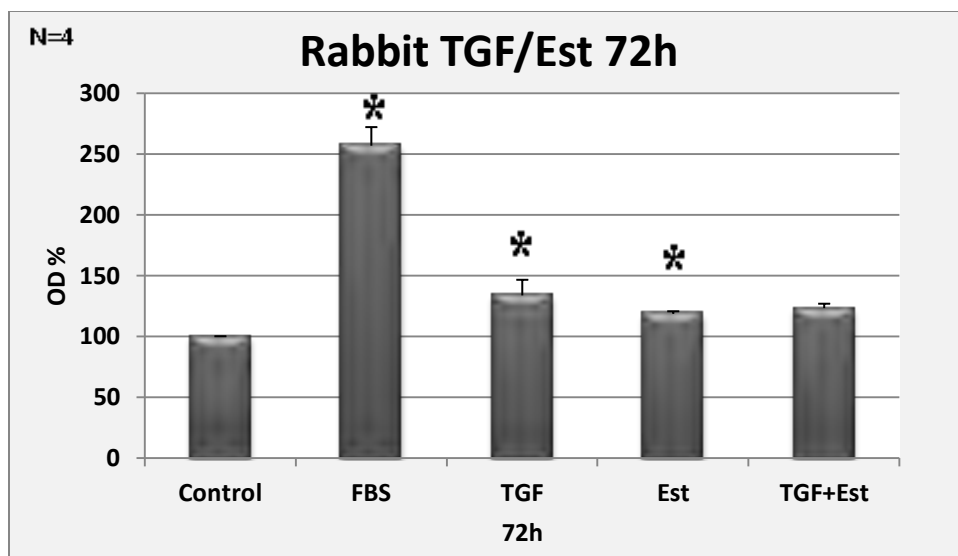
Στις 48 ώρες η επώαση των κυττάρων με ορό, αυξητικό παράγοντα TGF και με οιστραδιόλη προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 23). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $210.38 \pm 9.36$ ,  $133.05 \pm 13.3\%$  και  $112.07 \pm 5.55\%$  για τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF και οιστραδιόλη αντίστοιχα. Αντίθετα ο συνδυασμός TGF/οιστραδιόλη δεν προκάλεσε αύξηση

του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όπως και στις 24 ώρες, παρατηρήθηκε πως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που επώαστηκαν με τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη για 48 ώρες είναι σημαντικά μικρότερος από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που επώαστηκαν μόνο με TGF. Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα μειώθηκε από  $133.05 \pm 13.34\%$  σε  $98.65 \pm 75.45\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με TGF και τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη αντίστοιχα.



Διάγραμμα 23. Επίδραση της οιστραδιόλης ( $10^{-8}M$ ), του TGF (20ng/ml) και του συνδυασμού TGF(20ng/ml)/οιστραδιόλη ( $10^{-8}M$ ) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SE 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.  $\neq P < 0.05$  ως προς τον TGF. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

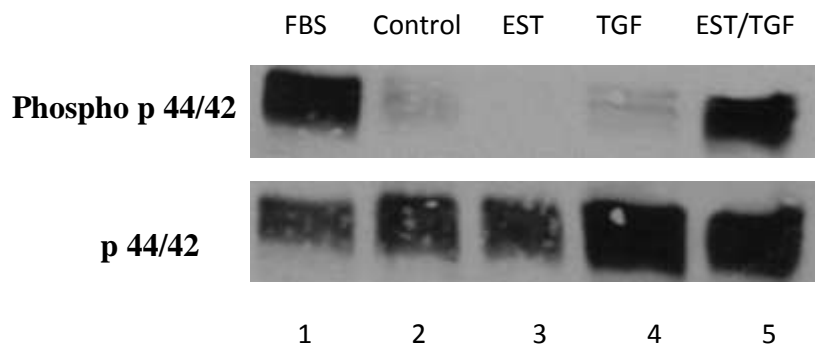
Στις 72 ώρες τα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF και οιστραδιόλη παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 24). Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα αυξήθηκε σε ποσοστό  $256.69 \pm 15.30\%$ ,  $133.70 \pm 12.81\%$  και  $118.45 \pm 2.18\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS, TGF και οιστραδιόλη. Τέλος, τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον πολλαπλασιασμό τους τόσο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όσο και με τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία TGF.



Διάγραμμα 24. Επίδραση της οιστραδιόλης, του TGF και του συνδυασμού TGF/οιστραδιόλη ( $10^{-8}$ M) στον αριθμό των ΛΜΚ τραχείας από κουνέλι μετά από 48 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SE 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. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων προσδιορίστηκαν μέσω T-test.

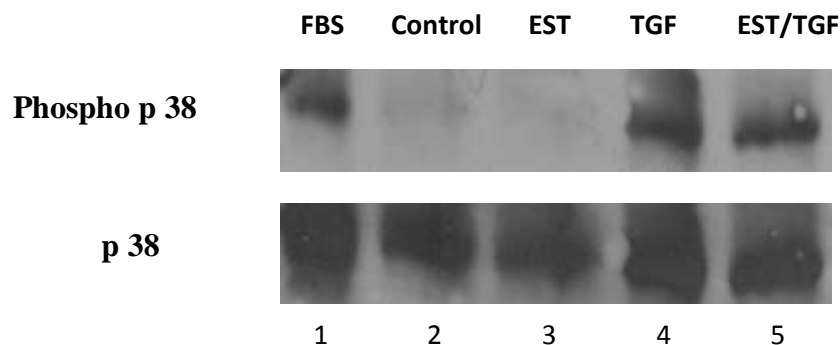
### 5.9 Μελέτη της επίδρασης του TGF και της οιστραδιόλης στην ενεργοποίηση των MAPK και PI3K σηματοδοτικών μονοπατιών σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού

Προκειμένου να διερευνήσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου η οιστραδιόλη μειώνει τον επαγόμενο από τον TGF πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, εξετάσαμε την επίδραση της στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Για τον σκοπό αυτό ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν για 4 ώρες με  $10^{-8}$ M οιστραδιόλη, 20ng/ml TGF και τον συνδυασμό τους. Παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και ανιχνεύτηκαν οι ενεργές-φωσφορυλιωμένες μορφές πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως θετικός μάρτυρας της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν με FBS. Αρχικά μελετήθηκε η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού μέσω της φωσφορυλιωμένης p44/42 πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης p44/42 ανιχνεύεται μόνο στα κύτταρα που επώαστηκαν με FBS και τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλης.



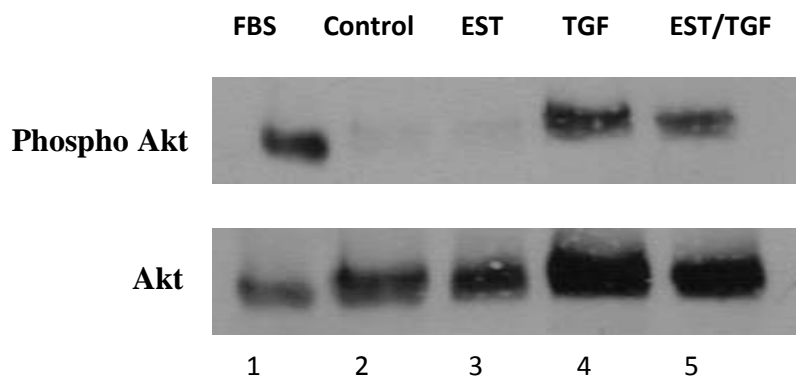
**Εικόνα 21.** Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p44/42, και p 44/42 σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με  $10^{-8}$ M οιστραδιόλη και 20ng/ml TGF.

Μια άλλη πρωτεΐνη του μονοπατιού των MAPK κινασών που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό είναι και η πρωτεΐνη p38. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 δεν ανιχνεύονται σε κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (εικόνα διαδρομή 2) ή σε κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη (εικόνα 22 διαδρομή 3). Η επώαση των κυττάρων με FBS οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλιωμένης p38 (εικόνα 22 διαδρομή 1). Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν τόσο με TGF (εικόνα 22 διαδρομή 4) όσο και με τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη (εικόνα 22 διαδρομή 5).



**Εικόνα 22.** Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-p38, και p 38 σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με  $10^{-8}$ M οιστραδιόλη και 20ng/ml TGF.

Ένα άλλο μονοπάτι το οποίο οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι το PI3K. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Akt. ΛΜΚ τραχείας κουνελιού επώαστηκαν για 4 ώρες με  $10^{-8}$ M οιστραδιόλη, 20ng/ml TGF και τον συνδυασμό τους. Ως θετικός μάρτυρας της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν με FBS. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Akt δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα που επώαστηκαν απουσία ορού (εικόνα 23 διαδρομή 2) και στα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη (εικόνα 23 διαδρομή 3). Η επώαση των κυττάρων με FBS οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλιωμένης Akt (εικόνα 23 διαδρομή 1). Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν τόσο με TGF (εικόνα 23 διαδρομή 4) όσο και με τον συνδυασμό TGF/οιστραδιόλη (εικόνα 23 διαδρομή 5).



**Εικόνα 23.** Ανάλυση κατά Western με αντισώματα anti-phospho-Akt, και Akt σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων από ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, που επώαστηκαν για 4h με  $10^{-8}$ M οιστραδιόλη και 20ng/ml TGF.

## Συζήτηση

Σε παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ παρατηρείται συχνά αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών. Ενώ η αναδιαμόρφωση αποτελεί τη βασική παθολογική αλλαγή στη δομή των ΛΜΚ των αεραγωγών, το πιο βασικό χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας του βρογχικού άσθματος αποτελεί η φλεγμονή των αεραγωγών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και η φλεγμονή σχετίζονται μεταξύ τους.<sup>70</sup> Ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους η χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών στο βρογχικό άσθμα προωθεί την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών παραμένουν αγνωστοί. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων από τα επιθηλιακά κύτταρα σε μια προσπάθεια τους να για ανάπλαση του επιθηλίου.<sup>71-72</sup> Οι αυξητικοί παράγοντες μπορούν επίσης να απελευθερωθούν από κύτταρα της φλεγμονής.<sup>73</sup> Όλοι οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν τον πολλαπλασιασμό ή την διαφοροποίηση κυττάρων μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών όπως των MAP κινασών και της PI3K.<sup>70</sup>

Εκτός όμως από τους αυξητικούς παράγοντες και οι γεννητικές ορμόνες έχει δείχτει να σχετίζονται με την παθογένεια του αναπνευστικού συστήματος. Η συχνότητα και η βαρύτητα των φλεγμονωδών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος, όπως άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και κυστική ίνωση (CF) διαφοροποιούνται ανάμεσα στα δυο φύλα με τις γυναίκες να παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά. Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι εκτός από την ηλικία και το φύλο του ασθενούς μπορεί να σχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, τη σοβαρότητα και την εξέλιξη του άσθματος.<sup>74</sup> Για παράδειγμα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής 60% των ανθρώπων που πάσχουν από άσθμα είναι γυναίκες (στοιχεία που προκύπτουν σύμφωνα με το Center for Disease Control and Prevention για το 2010). Εκτός όμως από το αναπνευστικό σύστημα οι γεννητικές ορμόνες εμφανίζονται φυλοεξαρτώμενες διαφορές και σε άλλα συστήματα του οργανισμού σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα η αθηροσκλήρωση, η οστεοπόρωση και διάφορες νευρολογικές διαταραχές.<sup>75-77</sup> Οι άντρες παρουσίαζαν μεγαλύτερα ποσοστά για την ΧΑΠ τις προηγούμενες δεκαετίες, ωστόσο επειδή τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των γυναικών που καπνίζουν έχει αυξηθεί, οι γυναίκες τελικά εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά της νόσου σε σχέση με τους άντρες.<sup>78</sup> Το άσθμα θεωρείται η πιο διαδεδομένη νόσος του αναπνευστικού συστήματος στις έγκυες γυναίκες κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της εγκυμοσύνης (όταν τα επίπεδα των οιστρογόνων στο αίμα είναι υψηλά και η μήτρα συμπιέζει τους πνεύμονες),



ωστόσο μόνο το ένα τρίτο των γυναικών παρουσιάζουν επιδείνωση των συμπτωμάτων, ενώ οι υπόλοιπες παρουσιάζουν βελτίωση των συμπτωμάτων του άσθματος. Τέλος, παρόλο που η κυστική ίνωση είναι μια σπάνια γενετική ασθένεια, η οποία εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα και στα δυο φύλα, για αδιευκρίνιστους λόγους οι γυναίκες ασθενείς έχουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με τους άντρες ασθενείς.<sup>79</sup> Στο σύνολό τους, όλα τα παραπάνω κλινικά δεδομένα δείχνουν πως οι γεννητικές ορμόνες ρυθμίζουν τον τόνο των αεραγωγών και σχετίζονται με τις παθήσεις του αναπνευστικού.

Τα παραπάνω δεδομένα λοιπόν όσον αφορά την πολυπλοκότητα της αναδιαμόρφωσης και φλεγμονής των ΑΜΚ των αεραγωγών, την εμπλοκή και τον μηχανισμό δράσης των αυξητικών παραγόντων και την συσχέτιση των γεννητικών ορμονών με την παθοφυσιολογία του άσθματος αποτέλεσαν αφορμή για την μελέτη της συνεργικής επίδρασης των γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ΑΜΚ.

Τα ΑΜΚ τόσο της τραχείας κουνελιού και των βρόγχων ανθρώπου δεν παρουσίασαν ίδια συμπεριφορά κατά την καλλιέργεια τους. Για να παρατηρηθεί η επίδραση των γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων τα κύτταρα τοποθετηθήκαν με διαφορετική πυκνότητα στις φλάσκες καλλιέργειας (3000 κύτταρα από κουνέλι ανά θέση και 2000 ανθρώπινα κύτταρα ανά θέση στο πιάτο Elisa) γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα κύτταρα αυτά αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στα μιτογόνα ή μη ερεθίσματα και στο μικροπεριβάλλον τους. Ακόμα τα κύτταρα από κουνέλι πολλαπλασιάστηκαν μετά από 24 ώρες υπό την επίδραση και του FBS, TGF, αυξητικού παράγοντα και του συνδυασμού TGF/αυξητικού παράγοντα σε αντίθεση με τα ανθρώπινα κύτταρα τα οποία άρχισαν να πολλαπλασιάζονται από το δεύτερο 24ωρο. Το γεγονός αυτό δηλώνει πως τα ανθρώπινα κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην καλλιέργεια σε σχέση με τα κύτταρα από κουνέλι. Συγκρίνοντας τον επαγόμενο από γεννητικές ορμόνες πολλαπλασιασμό των ΑΜΚ του κουνελιού και του ανθρώπου παρατηρούμε πως στα ανθρώπινα κύτταρα η δράση αυτή είναι πιο έντονη. Επίσης στα ανθρώπινα κύτταρα η τεστοστερόνη φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό σε σχέση με την οιστραδιόλη δράση η οποία περιορίζεται κυρίως το πρώτο 24ώρο. Την τεστοστερόνη τη συναντάμε σε θηλυκά και σε αρσενικά άτομα μόνο που σε ιδιαίτερα μεγάλες συγκεντρώσεις τη συναντάμε στους άντρες και είναι πιθανό να προκαλεί πολλαπλασιασμό σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Επιπλέον ενώ η οιστραδιόλη παρουσιάζει προστατευτική δράση για τα ΑΜΚ των αγγείων φαίνεται πως η τεστοστερόνη εμφανίζει προστατευτική μη γενωμική δράση στα ΑΜΚ των αεραγωγών, προκαλώντας χάλαση.<sup>66</sup> Το

γεγονός ότι οι γεννητικές ορμόνες μπορούν να δράσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς (γενωμικούς και μη γενωμικούς) καθιστά τη διερεύνηση της δράσης τους ιδιαίτερα σημαντική. Οι αυξητικοί παράγοντες που 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. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει πως η δράση του TGF (transforming growth factor, αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης), και του bFGF (basic fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών), προκαλούν πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αεραγωγών σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα ή ΧΑΠ.<sup>33,80-81</sup>

Σε όλες τις περιπτώσεις και ο TGF και ο FGF μόνος του προκάλεσαν πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ με τα ανθρώπινα κύτταρα να παρουσιάζουν έντονο πολλαπλασιασμό μετά το δεύτερο 24ώρο. Ο TGF και ο bFGF 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. Ενώ για τον FGF τα πράγματα είναι ξεκάθαρα και προκαλεί πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ ο ρόλος του TGF στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι αμφιλεγόμενος. Η δράση του TGF φαίνεται να είναι δωσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη καθώς η μικρές δόσεις επάγουν τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών, χονδροκυττάρων και αρτηριακών ΛΜΚ, ενώ οι μεγάλες δόσεις αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ίδιων κυττάρων. Επίσης ο TGF επάγει τον πολλαπλασιασμό σε ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες ή ΛΜΚ αλλά αυτή η επαγωγή εξαρτάται από το επίπεδο κορεσμού της καλλιέργειας σε κύτταρα και από τη συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα. Συγκεκριμένα, ο TGF επάγει πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ αγγείων ή αεραγωγών σε κορεσμένες καλλιέργειες και τον αναστέλλει σε μη κορεσμένες καλλιέργειες.<sup>82</sup> Χορήγηση TGF φαίνεται πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό το πρώτο 24ώρο ενώ προκαλεί επαγωγή του πολλαπλασιασμού μετά το δεύτερο κα τρίτο 24ώρο.<sup>45</sup> Από όλους τους συνδυασμούς (γεννητικών ορμονών και αυξητικών παραγόντων) ο μόνος συνδυασμός που παρουσίασε σημαντικό αποτέλεσμα ήταν η επώαση των ΛΜΚ στο κουνέλι σε θρεπτικό υλικό με οιστραδιόλη και TGF. Ενώ η οιστραδιόλη μόνη της και ο TGF μόνος του φαίνεται να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ, όταν χορηγούνται μαζί προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού. Η επαγωγή από τον TGF είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την οιστραδιόλη γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η οιστραδιόλη μπλοκάρει την δράση του TGF. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας δείχνει να μην εμπλέκει το

MAPK ή το PI3K μονοπάτι. Ενώ η μη γενωμική δράση της οιστραδιόλης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK, PI3K, cAMP, PKA/PKC και ERK1/ERK2 στα αποτελέσματα φαίνεται πως με κάποιον άλλον μηχανισμό η οιστραδιόλη προκαλεί την αναστολή του πολλαπλασιασμού.

Επίσης αξίζει να σημειωθεί το γεγονός πως η οιστραδιόλη είχε την τάση να ειωσει τον επαγόμενο από τον FGF πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς όμως το αποτέλεσμα αυτό να είναι (οριακά) στατιστικά σημαντικό.

Συμπερασματικά είναι κατανοητό πως η συμβολή ενός συγκεκριμένου παράγοντα, αυξητικού ή γεννητικής ορμόνης στην δημιουργία ενός ασθματικού φαινοτύπου (υπερπλασία ΛΜΚ) είναι ανεπαρκής για να εξηγήσει την παθογένεια του άσθματος. Συσσωρευμένοι παράγοντες με προσθετική ή συνεργική δράση μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ υπερπλασία των κυττάρων και την εκδήλωση των συμπτωμάτων του άσθματος. Η ορμονοεξαρώμενη συχνότητα εμφάνισης αναπνευστικών νόσων μπορεί να σχετίζεται με την επίδραση που έχουν οι γεννητικές ορμόνες και σε άλλα είδη κυττάρων όπως για παράδειγμα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος όπως τα επιθηλιακά ή σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος Β ή Τ λεμφοκύτταρα δέχονται επιδράσεις από τις γεννητικές ορμόνες.<sup>74</sup>

Επιπλέον τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν να συσχετιστούν με κλινικά/επιδημιολογικά δεδομένα λόγω διαφορετικής συμπεριφοράς των κυττάρων σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες καθώς τα διαφορετικά ορμονικά πρότυπα, σε διαφορετικές ηλικίες και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ορμονών μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα.

Τέλος, αν και η δράση των στεροειδών ορμονών μπορεί να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία ορισμένων ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος, της μήτρας ή του καρδιαγγειακού συστήματος ο μηχανισμός δράσης των γεννητικών ορμονών στα λεία μυϊκά κύτταρα δεν είναι πλήρως γνωστός. Οι προστατευτικές ή μη προστατευτικές ιδιότητες των ορμονών εμπλέκουν γενωμικούς και μη γενωμικούς μηχανισμούς, τροποποιώντας το αποτέλεσμα των ορμονών και καθιστούν την περεταίρω διερεύνηση του τρόπου δράσης τους ιδιαίτερα σημαντική.

## Βιβλιογραφία:

1. Caplice, N.M. & Doyle, B. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev* **14**, 122-139 (2005).
2. Reisseisen, F.D. & Hecker, J.F.C. *Über den bau der lungen. Eine von der Königlichen akademie der wissenschaften zu Berlin gekrönte preisschrift ... Mit 6 colorirten kupfertafeln*, (A. Rücker, Berlin,, 1822).
3. James, A. & Carroll, N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J* **15**, 782-789 (2000).
4. Macklin, C.C. The Musculature of the Bronchi and Lungs: A Retrospect. *Can Med Assoc J* **20**, 404 (1929).
5. Pratushevich, V.R., Seow, C.Y. & Ford, L.E. Plasticity in canine airway smooth muscle. *J Gen Physiol* **105**, 73-94 (1995).
6. Halayko, A.J., *et al.* Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol* **276**, L197-206 (1999).
7. Hayashi, K., *et al.* 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* **145**, 727-740 (1999).
8. Roy, J., Kazi, M., Hedin, U. & Thyberg, J. Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differentiation* **67**, 50-58 (2001).
9. Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R.E. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **16**, 467-491 (2010).
10. Hirota, J.A., Nguyen, T.T., Schaafsma, D., Sharma, P. & Tran, T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther* **22**, 370-378 (2009).
11. Xie, S.Z., *et al.* Differentiation of smooth muscle progenitor cells in peripheral blood and its application in tissue engineered blood vessels. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**, 923-930 (2008).
12. Crepea, S.B. & Harman, J.W. The pathology of bronchial asthma. I. The significance of membrane changes in asthmatic and non-allergic pulmonary disease. *J Allergy* **26**, 453-460 (1955).
13. Al-Muhsen, S., Johnson, J.R. & Hamid, Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 451-462; quiz 463-454 (2011).
14. Hirst, S.J., *et al.* Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* **114**, S2-17 (2004).
15. Simon, A.R., Takahashi, S., Severgnini, M., Fanburg, B.L. & Cochran, B.H. Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L1296-1304 (2002).
16. Nguyen, T.T., Ward, J.P. & Hirst, S.J. beta1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 217-223 (2005).
17. Stamatiou, R., Paraskeva, E., Papagianni, M., Molyvdas, P.A. & Hatziefthimiou, A. The mitogenic effect of testosterone and 17beta-estradiol on airway smooth muscle cells. *Steroids* **76**, 400-408 (2011).
18. Koike, K., Yamashita, Y., Horinouchi, T., Yamaki, F. & Tanaka, Y. cAMP-independent mechanism is significantly involved in beta2-adrenoceptor-mediated tracheal relaxation. *Eur J Pharmacol* **492**, 65-70 (2004).
19. Tanaka, Y., *et al.* Evidence for a significant role of a Gs-triggered mechanism unrelated to the activation of adenylyl cyclase in the cyclic AMP-independent relaxant response of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**, 437-441 (2003).

20. Giembycz, M.A. & Newton, R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *Eur Respir J* **27**, 1286-1306 (2006).
21. Fernandes, D., *et al.* Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 77-88 (1999).
22. Stewart, A.G., Fernandes, D. & Tomlinson, P.R. The effect of glucocorticoids on proliferation of human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* **116**, 3219-3226 (1995).
23. Vlahos, R., *et al.* Differential inhibition of thrombin- and EGF-stimulated human cultured airway smooth muscle proliferation by glucocorticoids. *Pulm Pharmacol Ther* **16**, 171-180 (2003).
24. Damera, G., *et al.* Vitamin D inhibits growth of human airway smooth muscle cells through growth factor-induced phosphorylation of retinoblastoma protein and checkpoint kinase 1. *Br J Pharmacol* **158**, 1429-1441 (2009).
25. Krejci, P., Prochazkova, J., Bryja, V., Kozubik, A. & Wilcox, W.R. Molecular pathology of the fibroblast growth factor family. *Hum Mutat* **30**, 1245-1255 (2009).
26. Gospodarowicz, D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* **250**, 2515-2520 (1975).
27. Kranenburg, A.R., *et al.* Enhanced expression of fibroblast growth factors and receptor FGFR-1 during vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 517-525 (2002).
28. Redington, A.E., *et al.* Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 384-387 (2001).
29. Redington, A.E., *et al.* Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 642-647 (1997).
30. Shute, J.K., *et al.* Epithelial expression and release of FGF-2 from heparan sulphate binding sites in bronchial tissue in asthma. *Thorax* **59**, 557-562 (2004).
31. Cordon-Cardo, C., Vlodavsky, I., Haimovitz-Friedman, A., Hicklin, D. & Fuks, Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* **63**, 832-840 (1990).
32. Jeon, S.G., *et al.* Recombinant basic fibroblast growth factor inhibits the airway hyperresponsiveness, mucus production, and lung inflammation induced by an allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 831-837 (2007).
33. Bosse, Y., Thompson, C., Stankova, J. & Rola-Pleszczynski, M. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 746-753 (2006).
34. Fernandes, D.J., *et al.* Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific. *Br J Pharmacol* **142**, 1182-1190 (2004).
35. Bonner, J.C., Badgett, A., Lindroos, P.M. & Coin, P.G. Basic fibroblast growth factor induces expression of the PDGF receptor-alpha on human bronchial smooth muscle cells. *Am J Physiol* **271**, L880-888 (1996).
36. Ediger, T.L. & Toews, M.L. Synergistic stimulation of airway smooth muscle cell mitogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 1076-1082 (2000).
37. Perng, D.W., *et al.* Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 101-107 (2006).
38. Kaminska, B., Kocyk, M. & Kijewska, M. TGF Beta Signaling and Its Role in Glioma Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* **986**, 171-187 (2013).
39. Ungefroren, H., Groth, S., Ruhnke, M., Kalthoff, H. & Fandrich, F. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor/ALK5-dependent activation of the GADD45 gene mediates the induction of biglycan expression by TGF-beta. *J Biol Chem* **280**, 2644-2652 (2005).

40. Chu, H.W., *et al.* Transforming growth factor-beta2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am J Pathol* **165**, 1097-1106 (2004).
41. McMillan, S.J., Xanthou, G. & Lloyd, C.M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol* **174**, 5774-5780 (2005).
42. Xu, Y.D., *et al.* Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L527-539 (2003).
43. Yue, J. & Mulder, K.M. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 30765-30773 (2000).
44. Ma, B., *et al.* Adenosine metabolism and murine strain-specific IL-4-induced inflammation, emphysema, and fibrosis. *J Clin Invest* **116**, 1274-1283 (2006).
45. Chen, G. & Khalil, N. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir Res* **7**, 2 (2006).
46. Chaudhari, B.R., Murphy, R.F. & Agrawal, D.K. Following the TRAIL to apoptosis. *Immunol Res* **35**, 249-262 (2006).
47. Black, J.L., Burgess, J.K. & Johnson, P.R. Airway smooth muscle--its relationship to the extracellular matrix. *Respir Physiol Neurobiol* **137**, 339-346 (2003).
48. Muller, M., Grobbee, D.E., Thijssen, J.H., van den Beld, A.W. & van der Schouw, Y.T. Sex hormones and male health: effects on components of the frailty syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 289-296 (2003).
49. Tam, A., *et al.* The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health* **11**, 24 (2011).
50. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-5930 (1996).
51. Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* **27**, 299-402 (2006).
52. Miller, V.M. & Duckles, S.P. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* **60**, 210-241 (2008).
53. Zhu, B.T., Han, G.Z., Shim, J.Y., Wen, Y. & Jiang, X.R. Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* **147**, 4132-4150 (2006).
54. Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R. & Ando, J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 737-741 (1997).
55. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J. & Dong, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 624-632 (2005).
56. Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* **7**, 497-508 (2006).
57. Lokuge, S., Frey, B.N., Foster, J.A., Soares, C.N. & Steiner, M. The rapid effects of estrogen: a mini-review. *Behav Pharmacol* **21**, 465-472 (2010).
58. Wilson, C.M. & McPhaul, M.J. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* **120**, 51-57 (1996).
59. Li, J. & Al-Azzawi, F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* **63**, 142-148 (2009).
60. Roy, A.K., *et al.* Regulation of androgen action. *Vitam Horm* **55**, 309-352 (1999).
61. Davison, S.L. & Bell, R. Androgen physiology. *Semin Reprod Med* **24**, 71-77 (2006).

62. Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W. & Gobe, G.C. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 813-827 (2010).
63. Heinlein, C.A. & Chang, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* **16**, 2181-2187 (2002).
64. Fix, C., Jordan, C., Cano, P. & Walker, W.H. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10919-10924 (2004).
65. Heemers, H.V. & Tindall, D.J. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* **28**, 778-808 (2007).
66. Kouloumenta, V., Hatziefthimiou, A., Paraskeva, E., Gourgoulialis, K. & Molyvdas, P.A. Sexual dimorphism in airway responsiveness to sex hormones in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L516 (2007).
67. Levesque, B.M., Vosatka, R.J. & Nielsen, H.C. Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants. *Pediatr Res* **47**, 481-491 (2000).
68. Matsubara, S., *et al.* Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 501-508 (2008).
69. Chachami, G., *et al.* Exposure of differentiated airway smooth muscle cells to serum stimulates both induction of hypoxia-inducible factor-1{alpha} and airway responsiveness to ACh. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L913-922 (2007).
70. Bai, T.R. & Knight, D.A. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)* **108**, 463-477 (2005).
71. Proud, D. & Leigh, R. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev* **242**, 186-204 (2011).
72. Tagaya, E. & Tamaoki, J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* **56**, 331-340 (2007).
73. Halayko, A.J. & Amrani, Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* **137**, 209-222 (2003).
74. Balzano, G., Fuschillo, S., Melillo, G. & Bonini, S. Asthma and sex hormones. *Allergy* **56**, 13-20 (2001).
75. Cordero, A. & Alegria, E. Sex differences and cardiovascular risk. *Heart* **92**, 145-146 (2006).
76. 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* **20**, 27-30 (1997).
77. Gillies, G.E., Murray, H.E., Dexter, D. & McArthur, S. Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* **78**, 513-522 (2004).
78. Wise, R.A. Changing smoking patterns and mortality from chronic obstructive pulmonary disease. *Prev Med* **26**, 418-421 (1997).
79. Johannesson, M., Ludviksdottir, D. & Janson, C. Lung function changes in relation to menstrual cycle in females with cystic fibrosis. *Respir Med* **94**, 1043-1046 (2000).
80. Stewart, D.M., Tian, L. & Nelson, D.L. Linking cellular activation to cytoskeletal reorganization: Wiskott-Aldrich syndrome as a model. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **1**, 525-533 (2001).
81. Bategay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F. & Ross, R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* **63**, 515-524 (1990).
82. Black, P.N., Young, P.G. & Skinner, S.J. Response of airway smooth muscle cells to TGF-beta 1: effects on growth and synthesis of glycosaminoglycans. *Am J Physiol* **271**, L910-917 (1996).

