



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην προκαλούμενη από
αζιθρομυκίνη αυτοφαγία

Κυθαρίδη Ευαγγελία του Κωνσταντίνου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας
(Επιβλέπουσα)

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας (Συνεπιβλέπουσα)

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2021-2022



UNIVERSITY OF THESSALY

Faculty of Health Sciences

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

Mechanisms involved in azithromycin-induced autophagy

Kytharidi Evangelia

Advisory thesis committee

Apostolia Haziefthimiou, Associate Professor of Medical Physiology (Supervisor)

Anna-Maria Psarra, Associate Professor of Biochemistry

Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology

Bachelor's thesis

Larisa 2021-2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αζιθρομυκίνη, είναι αντιβιοτικό που ανήκει στις μακρολίδες και χορηγείται μακροχρόνια σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού και του καρδιαγγειακού. Οι χρόνιες νόσοι των δύο αυτών συστημάτων συχνά χαρακτηρίζονται από αναδιαμόρφωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός της αντιβιοτικής της δράσης η αζιθρομυκίνη έχει αντιφλεγμονώδη δράση και επηρεάζει τον τόνο και τη μορφολογία λείων μυϊκών ινών του αναπνευστικού. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της αζιθρομυκίνης στα αγγεία, και ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην δράση της.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) και τομές από αορτή κουνελιού. Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες παρουσία και απουσία αζιθρομυκίνης (10^{-5} M) ενώ δακτύλιοι αορτής καλλιεργήθηκαν χωρίς ορό και απουσία αζιθρομυκίνης, με ορό και απουσία αζιθρομυκίνης, με ορό και αζιθρομυκίνη σε συγκεντρώσεις 10^{-7} M και 10^{-5} M για 24 ώρες. Η παρατήρηση των ΛΜΚ έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Η μορφολογία των τομών παρατηρήθηκε μετά από χρώση τους με Cresyl Violet και Toluidine Blue καθώς και με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα για την α-ακτίνη, Beclin και LC3. Η επαγωγή της κινάσης, η οποία καταστέλλει τον TOR, AMPK έγινε με ανοσοαποτύπωση με μέθοδο Dot Blot.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι στις καλλιέργειες των ΛΜΚ, η αζιθρομυκίνη προκαλεί την εμφάνιση κυστιδίων στα κύτταρα, όμοιων με αυτά που παρατηρούνται στην αυτοφαγία. Σε επίπεδο τομών, στις χρώσεις Cresyl Violet και Toluidine Blue, παρατηρήθηκε ότι παρουσία αζιθρομυκίνης οι λείες μυϊκές ίνες εμφάνισαν μια κυματοειδή μορφή, κάτι που δεν παρατηρήθηκε τόσο έντονα στον ανοσοφθορισμό με την α-ακτίνη. Η έκφραση της Beclin και LC3 αυξήθηκε στις τομές που επώαστηκαν παρουσία αζιθρομυκίνης και μάλιστα ήταν πιο έντονη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της (10^{-5} M). Επίσης η έκφραση της Beclin και LC3 αυξήθηκε στις τομές που επώαστηκαν απουσία ορού και αζιθρομυκίνης.

Η AMPK εκφράζεται στο ομογενοποίημα των κυττάρων που επώαστηκαν χωρίς αζιθρομυκίνη ενώ απουσιάζει σε αυτά των κυττάρων που επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία αζιθρομυκίνης, με ή χωρίς ορό.

Συμπερασματικά, η αζιθρομυκίνη στα αγγεία επάγει την αυτοφαγία σε ΛΜΚ τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο ιστού και αλλάζει την μορφολογία των λείων μυϊκών ινών. Η πρόκληση της αυτοφαγίας δεν μεσολαβείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της AMPK.

ABSTRACT

Azithromycin is a macrolide antibiotic that is used long-term in chronic inflammatory diseases of the respiratory and cardiovascular systems. Chronic diseases of these two systems are often characterized by remodeling of smooth muscle cells. Previous studies have shown that in addition to its antibiotic activity azithromycin has anti-inflammatory action and affects the tone and morphology of smooth muscle fibers of the respiratory tract. The purpose of the present study was to investigate the effect of azithromycin on blood vessels, and the mechanism involved in its action.

In this study, we used primary smooth muscle cell (SMC) cultures and rabbit aortic incisions. SMCs were cultured for 72 hours in the presence and absence of azithromycin (10^{-5} M) while aortic rings were cultured without serum and in the absence of azithromycin, with serum and in the absence of azithromycin, with serum and azithromycin at concentrations of 10^{-7} M and 10^{-5} M. SMCs were observed under a reverse phase microscope. The morphology of the sections was observed after staining with Cresyl Violet and Toluidine Blue as well as with indirect immunofluorescence with antibody to α -actin, Beclin and LC3. The induction of the kinase that suppresses TOR, AMPK was done by Dot Blot immunoblotting.

The results of these experiments showed that in the cultures of SMCs, azithromycin causes the appearance of vesicles in the cells, similar to those observed in autophagy. At the intersection level, in Cresyl Violet and Toluidine Blue stains, it was observed that in the presence of azithromycin the smooth muscle fibers showed a wavy pattern, which was not so strongly observed in α -actin immunofluorescence. The expression of Beclin and LC3 increased in the incubations incubated in the presence of azithromycin and was even more intense at its highest concentration (10^{-5} M). Also, the expression of Beclin and LC3 increased in the incubations incubated in the absence of serum and azithromycin.

AMPK is expressed in homogenates of cells incubated without azithromycin, while absent in those cells incubated for 24 hours in the presence of azithromycin, with or without serum.

In conclusion, azithromycin induces autophagy in vascular SMCs at both cellular and tissue level and changes the morphology of smooth muscle fibers. The induction of autophagy is not mediated through the AMPK signaling pathway.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο διάστημα 2021-2022. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς όλους όσους συνέβαλλαν στην παραγματοποίηση της Διπλωματικής μου. Συγκεκριμένα, Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ.Αποστολία Χατζηευθυμίου, για όλη τη συμβολή της στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης, την ευχαριστώ για την καθοδήγηση της και την εμπιστοσύνη της σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου και που μοιράστηκε μαζί μου πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας κ.Άννα-Μαρία Ψαρρά, που καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου ήταν πρόθυμη να με κατευθύνει στα πραγματικά ερωτήματα της έρευνας και να μοιραστεί μαζί μου την πολύτιμη εμπειρία της στο επιστημονικό πεδίο.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ.Άννα Βασιλάκη, για τις γνώσεις της που τόσο απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε τεχνικά όσο και σε θεωρητικά ζητήματα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την κ.Ροδόπη Σταματίου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας για τη διαρκή παρακολούθηση της και για την υπομονή της, κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης των πειραμάτων.

Συντομογραφίες

ΑΝΣ: αυτόνομο νευρικό σύστημα

ΛΜΚ: Λεία Μυϊκά κύτταρα

3MA: 3 methyladenine, 3 μεθυλοαδενίνη

Ambra1: Autophagy And Beclin 1 Regulator 1, μόριο ενεργοποίησης σε αυτοφαγία ρυθμιζόμενη από Beclin 1

AMPK: AMP activated protein kinase, πρωτεΐνης που ενεργοποιείται από το AMP

Atg: autophagy-related genes, γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, πρωτεΐνη που σχετίζεται με το λέμφωμα Β-κυττάρων 2

BSA: bovine serum albumine, αλβουμίνη ορού βοός

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

DMSO: dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

ECM: extracellular matrix, εξωκυττάρια ουσία

EDTA: ethylenediamine, αιθυλενοδιαμίνη

FBS: fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

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

IL-1: interleukin-1, ιντερλευκίνη-1

LC3: light chain 3, ελαφριά αλυσίδα 3

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

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

MMP: Matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεΐνάση της εξωκυττάριας ουσίας

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

NF-κB: nuclear factor κB, πυρηνικός παράγοντας κB

PBS: phosphate buffered saline, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα

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

PE: Phosphate ethylamide, φωσφατιδυλαιθανολαμίνης

PFA: Paraformaldehyde, παραφορμαλδεΐδης

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

PMSF: phenylmethylsulfoxide, φαινυλμεθυλοσουλφοξείδιο

PS: penicillin/streptomycin, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, φωσφατάση

RLC: Regulatory light chain, ρυθμιστική ελαφρά αλυσίδα

ROS: reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου

SMC: smooth muscle cell, λεία μυϊκά κύτταρα

TBS: tris-buffered saline, αλατούχο διάλυμα με tris ρυθμιστικό διάλυμα

TIMP: tissue inhibitors of metalloproteinases, αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών του ιστού

TNF α : tumor necrosis factor α , παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TF: tissue factor, παράγοντα ιστού

UVRAG: UV radiation resistance-associated gene protein, πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αντίσταση στην υπεριώδη ακτινοβολία

Vps34: vacuolar protein sorting 34, πρωτεΐνη που βοηθά στην ταξινόμηση και βρίσκεται στα κενοτόπια 34

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι λείες μυϊκές ίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας μιας ποικιλίας κοίλων οργάνων, όπως αγγείων, αεραγωγών και πολλών άλλων, αλλάζοντας το σχήμα ενός οργάνου μέσω χάλασης και συστολής. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις γίνεται αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αγγείων (remodeling) που χαρακτηρίζεται από μεταβολή στην δομή των αγγείων και αλλαγή στη μορφολογία των λείων μυϊκών ινών.

Η αζιθρομυκίνη έχει αντιφλεγμονώδη δράση και χρησιμοποιείται σε χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού και του καρδιαγγειακού. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παρατηρηθεί η δράση της αζιθρομυκίνης σε επίπεδο ιστού πέρα από κυττάρου και να μελετηθεί με ποιον τρόπο η αζιθρομυκίνη ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της αυτοφαγίας. Η διερεύνηση της επίδρασης της αζιθρομυκίνης στο μονοπάτι της αυτοφαγίας μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της παθογένειας των νόσων του καρδιαγγειακού και στην περαιτέρω αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	6
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1.Εισαγωγή	12
1.1 Λείες μυϊκές ίνες	12
1.1.1 Λείες μυϊκές ίνες των αγγείων	12
1.1.2 Μορφολογία ΛΜΚ	13
1.1.3 Συστολή ΛΜΚ	13
1.1.4 Φαινότυπος ΛΜΚ- ο ρόλος των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος (remodeling) των αγγείων	15
1.1.5 Προέλευση των ΛΜΚ των αγγείων και ασθένειες	17
1.2. Αυτοφαγία	17
1.2.1. Μηχανισμός της αυτοφαγίας	18
1.2.2 Τύποι της αυτοφαγίας	21
1.2.3 Αυτοφαγία και απόπτωση	22
1.3. Αζιθρομυκίνη	23
1.3.1 Η αντιφλεγμονώδης δράση της αζιθρομυκίνης	23
1.3.2 Ο ρόλος της αζιθρομυκίνης σε χρόνιες παθήσεις	24
1.3.3 Ο ρόλος του <i>C. pneumoniae</i> στην αθηροσκλήρωση και στη στεφανιαία νόσο	25
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
2. Μεθοδολογία	29
2.1 Χειρισμός πειραματόζωων	29
2.2 Απομόνωση ΛΜΚ αορτής κουνελιού	29
2.3 Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων με τη χρωστική Trypan blue	30
2.4 Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων	30
2.5 Καλλιέργεια δακτυλίων αορτής- Δημιουργία τομών αορτής	32
2.6 Χρώση τομών με Cresyl violet	33
2.7 Χρώση με Toluidine Blue	33
2.8 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	34
2.9 Λύση κυττάρων	35
2.10 Μέθοδος Bradford	36

2.11 Μέθοδος Dot Blot	36
2.12 Στατιστική ανάλυση	39
3. Αποτελέσματα	40
3.1 Η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην μορφολογία των ΛΜΚ σε κυτταροκαλιέργειες	40
3.2 Η επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία του ιστού σε καλλιέργειες αορτικών δακτυλίων	41
3.3 Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αυτοφαγία	45
3.4 Μελέτη της έκφρασης της AMPK	49
4. Συζήτηση	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

1.1 Λείες μυϊκές ίνες

Οι λείες μυϊκές ίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας μιας ποικιλίας κοίλων οργάνων, όπως αγγείων, αεραγωγών, γαστρεντερικού σωλήνα, μήτρας και αναπαραγωγικής οδού, ουροδόχου κύστης και ουρήθρας και πολλών άλλων. Οι λείες μυϊκές ίνες έχουν δύο θεμελιώδεις ρόλους: 1) να αλλάζουν το σχήμα ενός οργάνου και 2) να αντέχουν τη δύναμη ενός εσωτερικού φορτίου που αναπτύσσεται σε αυτό το όργανο. Προκειμένου να επιτευχθούν αυτοί οι θεμελιώδεις στόχοι, οι λείες μυϊκές ίνες έχουν αναπτύξει μηχανισμούς σύζευξης διέγερσης-συστολής, οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη ισχυρών και συντονισμένων συσπάσεων με σχετικά χαμηλό ενεργειακό κόστος. Για παράδειγμα, οι λείες μυϊκές ίνες στη γαστρεντερική οδό πρέπει να υποστούν διαλείπουσες αλλά συντονισμένες φασικές συσπάσεις για να προωθήσουν τον όγκο της τροφής μέσω του πεπτικού σωλήνα, ενώ στους αεραγωγούς και στα αγγεία οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκεται πιο συχνά σε τονική σύσπαση και ρυθμίζονται δυναμικά ώστε να χαλαρώνουν ή να συσπώνται ως απόκριση σε συγκεκριμένα νευρικά ή/και ορμονικά σήματα. (1)

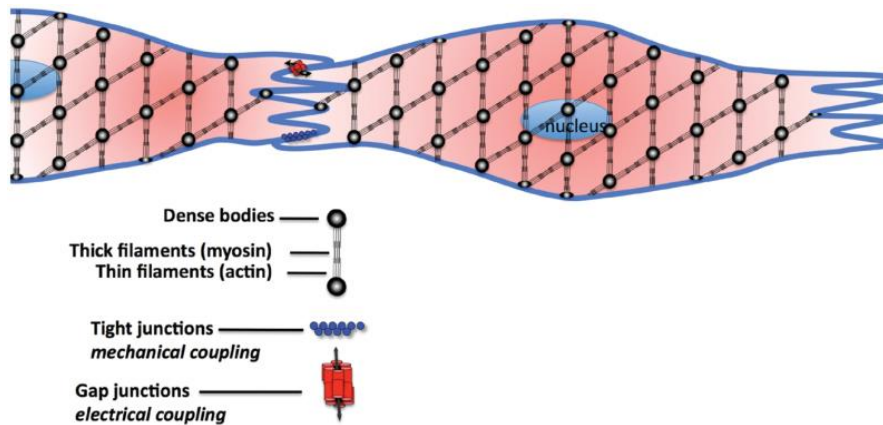
1.1.1 Λείες μυϊκές ίνες των αγγείων

Το λείο μυϊκό κύτταρο (ΛΜΚ) των αγγείων, σε ώριμα ζώα, είναι ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο κύτταρο με κύρια λειτουργία τη συστολή και ρύθμιση της διαμέτρου των αγγείων. Κατά συνέπεια τα ΛΜΚ ρυθμίζουν τον τόνο των αιμοφόρων αγγείων, την αρτηριακή πίεση και την κατανομή της ροής του αίματος. Στους ενήλικες, τα ΛΜΚ των αγγείων πολλαπλασιάζονται με εξαιρετικά χαμηλό ρυθμό, παρουσιάζουν πολύ χαμηλή συνθετική δραστηριότητα και εκφράζουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συστολή, διαύλους ιόντων και μόρια σηματοδότησης για τη συσταλτική λειτουργία του κυττάρου που είναι μοναδική σε σύγκριση με οποιονδήποτε άλλο κυτταρικό τύπο. (2)

Οι λείοι μύες αποτελούνται από ΛΜΚ τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μηχανικά με ισχυρούς δεσμούς και χασματικές συνδέσεις με μειωμένη αντίσταση. Το κυτταρόπλασμα των λείων μυών περιέχει μεγάλες ποσότητες ακτίνης και μυοσίνης, που αποτελούν και τις κύριες πρωτεΐνες της μυϊκής συστολής. Τα νήματα ακτίνης προσκολλώνται στα πυκνά σώματα που βρίσκονται σε όλο το κύτταρο. Τα πυκνά σώματα μπορούν να παρατηρηθούν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και φαίνονται σκοτεινά. (3)

1.1.2 Μορφολογία ΛΜΚ

Τα αγγειακά ΛΜΚ είναι ατρακτοειδή, με διαστάσεις περίπου $200 \times 5 \mu\text{m}$, με ένα μεγάλο κεντρικό πυρήνα που περιβάλλεται από άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή golgi, με το κυτταρόπλασμα και τη πλασματική μεμβράνη να λεπταίνουν προς τους πόλους. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι οι συνδέσεις μεταξύ των ΛΜΚ είναι πολύπλοκες και περιέχουν σημαντικό αριθμό μεμβρανικών εγκολώσεων για να παρέχουν αυξημένη επιφάνεια τόσο για μηχανικές σφιχτές συνδέσεις όσο και για ηλεκτρική σύζευξη μέσω χασμοσυνδέσμων (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Σύνδεση ΛΜΚ μεταξύ τους. Πηγή: Wilson DP, 2011.

Τα αγγειακά ΛΜΚ δεν περιέχουν το σύνθετο σύστημα t-σωληναρίου/σαρκοπλασματικού δικτύου που είναι κοινό για τους γραμμωτούς μύες, αλλά έναν σημαντικό αριθμό εγκολώσεων (caveolae) κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες εξυπηρετούν έναν παρόμοιο, αν και λιγότερο ανεπτυγμένο, ρόλο για την αύξηση της αναλογίας της επιφάνειας προς τον όγκο του κυττάρου. Αυτά τα εξειδικευμένα caveolae παρέχουν περαιτέρω ένα μοναδικό περιβάλλον κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο επιτρέπει τη ομαδοποίηση συγκεκριμένων ομάδων ιοντικών διαύλων και υποδοχέων σημαντικών για τη μεταγωγή του κυτταρικού σήματος. (1)

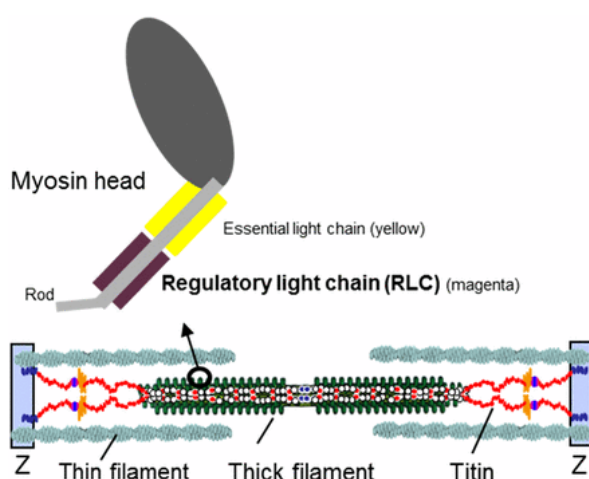
1.1.3 Συστολή ΛΜΚ

Το αρτηριακό τοίχωμα αποτελείται από το ενδοθήλιο (ένα ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων) και τρεις χιτώνες, τον έσω, μέσω και έξω χιτώνα. Ο μέσος χιτώνας περιλαμβάνει πολλαπλές στοιβάδες αγγειακών ΛΜΚ. Εκτός των ΛΜΚ, το αγγειακό τοίχωμα περιέχει ινοβλάστες, λιποκύτταρα, συνδετικό ιστό και εξοκυτταρική μήτρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αγγειοδραστικούς παράγοντες και ROS, που ρυθμίζουν τη διάμετρο και κατά συνέπεια τον τόνο του αγγείου. (4)

Τα αγγεία νευρώνονται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) και ο τόνος τους ρυθμίζεται, εκτός των νευροδιαβιβαστών του ΑΝΣ, από ορμόνες, αγγειοδραστικά πεπτίδια και ROS. Τα αγγειακά ΛΜΚ διαθέτουν σύνθετο κυτταροσκελετό, δομικές και λειτουργικές συσταλτές πρωτεΐνες και συναφή ρυθμιστικά μόρια. Μεμονωμένα ΛΜΚ συνδέονται με γειτονικά κύτταρα μέσω χασματοσυνδέσεων (gap junctions), οι οποίες ελέγχουν το συγχρονισμό στη συγκέντρωση ιόντων και το δυναμικό της μεμβράνης μεταξύ γειτονικών κυττάρων. (5,6)

Η συστολή των λείων μυών των αγγείων πυροδοτείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ελεύθερου ασβεστίου, προάγοντας τον σχηματισμό γέφυρας ακτίνης-μυοσίνης. Η συστολή ρυθμίζεται επίσης από μηχανισμούς ανεξάρτητους από το ασβέστιο που περιλαμβάνουν την κινάση RhoA-Rho, την πρωτεϊνική κινάση C και τη σηματοδότηση της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιημένη από μιτογόνο (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK), τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. (7)

Η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} μπορεί να γίνει από μηχανικά ερεθίσματα ή από διέγερση υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (G Protein-Coupled Receptors – GPCRs), όπως για παράδειγμα των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων των ΛΜΚ. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} από οποιοδήποτε ερέθισμα, στοχεύει την κινάση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (Myosin light-chain kinase – MLCK). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου, η MLCK είναι ανενεργή. Όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} αυξάνεται, τα ιόντα ασβεστίου συνδέονται με την καλμοδουλίνη η οποία ενεργοποιεί την MLCK, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής ελαφράς αλυσίδας (Regulatory light chain-RLC) (Εικόνα 1.2) και την αλληλεπίδραση της μυοσίνης με την ακτίνη.



Εικόνα 1.2: Δομή της ελαφριάς αλυσίδας (Regulatory light chain- RLC). Πηγή: Granzier HL et. al, 2015.

Αν και υπάρχουν πολλές ισομορφές της MLCK σε όλους τους τύπους κυττάρων, το μόνο γνωστό της υπόστρωμα της είναι η RLC. Η φωσφατάση της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης αποφωσφορυλιώνει την RLC, απενεργοποιώντας τον κύκλο της ΑΤΡάσης της μυοσίνης και τερματίζοντας έτσι τη μυϊκή συστολή. Η συντονισμένη συστολή ή χάλαση των λείων μυών μπορεί να συμβεί μέσω της ρύθμισης της φωσφορυλίωσης ή αποφωσφορυλίωσης της RLC από αυτά τα δύο ένζυμα. (8)

1.1.4 Φαινότυπος ΛΜΚ- ο ρόλος των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος (remodeling) των αγγείων

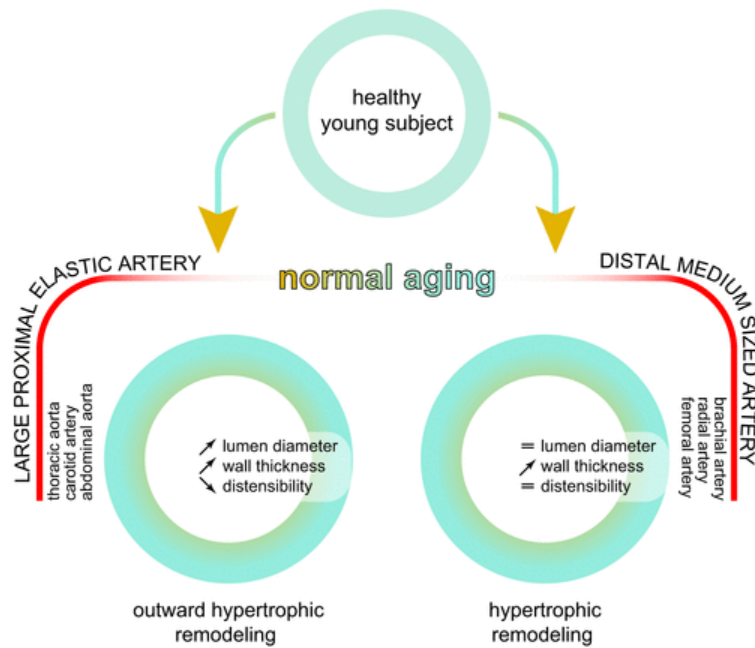
Αρχικά, η ανελαστικότητα (δυσκαμψία) των αρτηριών είχε αποδοθεί κυρίως στην εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix - ECM), η πρόσφατη όμως έρευνα ανέδειξε εκτός από τα κλασικά συστατικά της ECM (κυρίως ελαστίνη και κολλαγόνο) και άλλους παράγοντες να εμπλέκονται στην δυσκαμψία των αγγείων, όπως πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον τόνο των ΛΜΚ, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-ECM και την ανώμαλη κυκλοφορία του αίματος, που παρατηρείται για παράδειγμα στο διχασμό των μεγάλων και μικρών αρτηριών. (10)

Στους ενήλικες φυσιολογικά ο τόνος των αγγείων ρυθμίζεται μέσω σύσπασης/χάλασης των ΛΜΚ. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μετά από τραυματισμό ή παρουσία αυξητικών παραγόντων και μιτογόνων, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονωδών κυτταροκινών και των οξειδωμένων λιπιδίων, οι λείοι μύες των αγγείων μπορούν να υποστούν φαινοτυπική τροποποίηση και να μεταβούν από τον συσταλτό στον συνθετικό φαινότυπο. Η ρύθμιση του φαινότυπου των αγγειακών λείων μυών περιλαμβάνει μια μερική, προς τα κάτω, ρύθμιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύσπαση των ΛΜΚ προς όφελος της ικανότητας τους να συνθέτουν ουσίες και να πολλαπλασιάζονται. Όταν το κύτταρο εκφράζει τον συνθετικό φαινότυπο, αυξάνεται το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα ριβοσώματα για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τα ΛΜΚ με συνθετικό φαινότυπο μπορούν επομένως να συνθέτουν ενεργά πρωτεΐνες και DNA, εμφανίζουν κυτταρική διαίρεση και σε παθολογικά περιβάλλοντα είναι ικανά να προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων και μη οξειδωμένων λιπιδίων που μπορούν να συμβάλουν στο σχηματισμό των λεγόμενων αφρωδών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα. Τα συνθετικά αγγειακά ΛΜΚ εκκρίνουν επίσης μεγάλη ποσότητα συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως των πρωτεϊνών κολλαγόνο I, III, IV, και πρωτεογλυκάνες, περλικάνη, υαλουρονάνη, λαμινίνη. Τα συνθετικά ΛΜΚ εκκρίνουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix metalloproteinases- MMPs) της εξωκυττάριας ουσία και αναστολείς των MMPs του ιστού (tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)). Τα MMPs είναι μια οικογένεια ενδοπρωτεασών εξαρτώμενων από ψευδάργυρο με πολλαπλούς ρόλους στην αναδιαμόρφωση των ιστών και την αποικοδόμηση διαφόρων πρωτεϊνών στην ECM. Τα MMPs προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση

των κυττάρων και εμπλέκονται στην αγγειογένεση, την κυτταρική απόπτωση και την επιδιόρθωση των ιστών. (11) Στόχος της εκκριτικής αυτής λειτουργίας των συνθετικών κυττάρων είναι η σωστή επισκευή και αναδιαμόρφωση των αναπτυσσόμενων ή κατεστραμμένων αγγείων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει αύξηση τόσο των MMPs όσο και των TIMPs που μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή της αναδιαμόρφωσης των αγγείων. Η αναδιαμόρφωση των αγγείων παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αγγειακής στένωσης, την επαναστένωση των αγγείων μετά από αγγειοπλαστική (τοποθέτηση stent), την εξέλιξη ασταθούς αθηρωματικής πλάκας και την αντιμετώπιση ή/και ρήξη ανευρυσμάτων. (12,13)

Τα συνθετικά ΛΜΚ, ενώ εμφανίζουν εκκριτικές λειτουργίες και αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, έχουν μειωμένη απόκριση σε αγγειοσυσταλτικά και αγγειοδιασταλτικά ερεθίσματα, πιθανώς λόγω της ελαττωμένης έκφρασης των συσταλών πρωτεϊνών και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική συστολή. (1) Παράγοντες που προκαλούν αγγειοσυστολή, για παράδειγμα η νοραδρεναλίνη, η αγγειοτενσίνη II ή η ενδοθηλίνη, προάγουν επίσης τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ οδηγώντας σε υπερτροφία η/και υπερπλασία των ΛΜΚ. Ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor – PDGF), είναι ένα ισχυρό μιτογόνο και παράγοντας που προκαλεί συστολή των ΛΜΚ που φυσιολογικά συμβάλλει στη επισκευή των αγγείων. (14) Σε περιπτώσεις που υπάρχουν χρόνια αυξημένα επίπεδα PDGF, όπως για παράδειγμα σε ασταθή θρόμβο, συμβάλλουν σε ανομοιογενή πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ και στένωση των αγγείων μέσω μονοπατιού που επηρεάζεται από τις MMPs. (15,16) Επιπλέον, ενδιαφέρον είναι ότι το μονοξειδίο του αζώτου που απελευθερώνεται από το ενδοθήλιο, προκαλεί αγγειοδιαστολή και περιορίζει την υπερπλασία και την υπερτροφία των λείων μυών, πιθανώς περιορίζοντας τον Ca^{2+} - εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. (1)

Πλαστικότητα ονομάζεται η ικανότητα των ΛΜΚ να αλλάζουν από το συσταλό στον συνθετικό φαινότυπο, που εμφανίζει ικανότητα μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού, όπως και εκκριτικές λειτουργίες. Ο συνθετικός φαινότυπος, μαζί με την ECM, εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αγγείων και τη δυσκαμψία τους που παρουσιάζονται σε νόσους του καρδιαγγειακού συστήματος όπως και στο γήρας (Εικόνα 1.3). (17)



Εικόνα 1.3: Διαφορετικοί τύποι αρτηριακής αναδιαμόρφωσης στο γήρας, ανάλογα με τη θέση και το μέγεθος των μεγάλων αρτηριών. Μεγάλες εγγύς ελαστικές αρτηρίες, όπως η θωρακική αορτή, η καρωτίδα και η κοιλιακή αορτή, μεγαλώνονται (αναδιαμόρφωση προς τα έξω) και σκληραίνουν με τη γήρανση. Πηγή: Lacolley P. et. al, 2017.

1.1.5 Προέλευση των ΛΜΚ των αγγείων και ασθένειες

Τα ΛΜΚ των αγγείων έχουν πολλές προελεύσεις κατά την ανάπτυξη, και είναι πιθανόν η διαφορετική εμβρυολογική προέλευση τους να παίζει ρόλο στον εντοπισμό των αγγειακών παθήσεων σε συγκεκριμένα σημεία. Για παράδειγμα, η αθηροσκλήρωση και τα ανευρύσματα της αορτής εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε συγκεκριμένες θέσεις των αγγείων. Στο παρελθόν, αυτό φαινόταν να σχετίζεται με την αιμοδυναμική και τη δομή του αγγείου. Ωστόσο, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η εμβρυϊκή προέλευση των ΛΜΚ μπορεί να παίζει ρόλο στην εντόπιση των ασθενειών, όπως αθηροσκλήρωση και αορτικά ανευρύσματα. (19) Σύμφωνα με μελέτες, ο σχηματισμός ενδοθηλιακού δικτύου καθορίζεται ουσιαστικά από την εμβρυϊκή προέλευση των λείων μυϊκών κυττάρων. (20)

1.2. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια σημαντική διαδικασία στην εξισορρόπηση των πηγών ενέργειας σε κρίσιμες περιόδους ανάπτυξης και σε θρεπτικό στρες. Παίζει ρόλο στην απομάκρυνση των αναδιπλωμένων ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών, στον καθαρισμό των κατεστραμμένων οργανιδίων, όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και υπεροξυσώματα, καθώς και στην απομάκρυνση των ενδοκυττάρων παθογόνων. Θεωρείται ένας μηχανισμός επιβίωσης, αν και η απορρύθμισή της έχει συνδεθεί με μη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η αυτοφαγία μπορεί

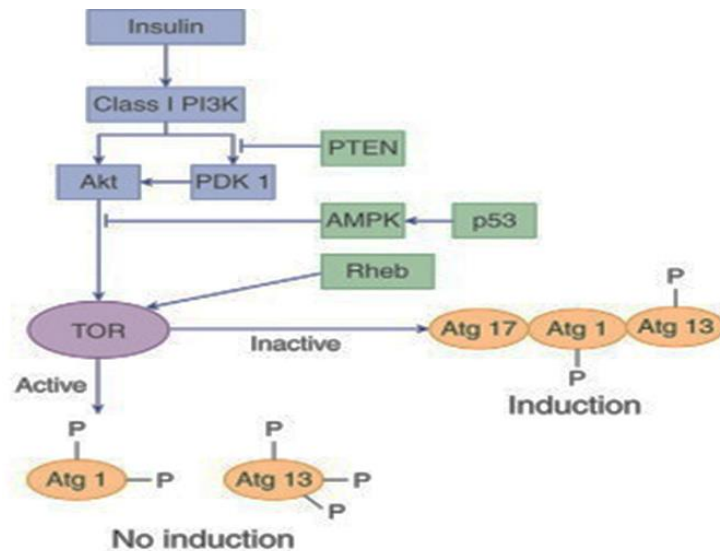
να είναι εκλεκτική ή μη στην απομάκρυνση συγκεκριμένων οργανιδίων, όπως ριβοσωμάτων και πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την εκλεκτική αυτοφαγία δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Εκτός από την απομάκρυνση των ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων και των κατεστραμμένων οργανιδίων, η αυτοφαγία έχει κι άλλες λειτουργίες όπως, να προάγει τη γήρανση των κυττάρων, να συμμετέχει στην παρουσίαση του αντιγόνου στην κυτταρική επιφάνεια, να παρέχει προστασία από την αστάθεια του γονιδιώματος και να αποτρέπει τη νέκρωση. Η αυτοφαγία φαίνεται πως παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση ασθενειών όπως ο καρκίνος, νευροεκφυλιστικές παθήσεις, μυοκαρδιοπάθεια, διαβήτη, ηπατική νόσος, διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις και λοιμώξεις. (21)

Ο όρος «αυτοφαγία», προέρχεται από το ελληνικό όρο που σημαίνει «τρώω τον εαυτό μου», επινοήθηκε για πρώτη φορά από τον Christian de Duve πριν από 40 χρόνια περίπου και βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό στην παρατηρούμενη αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων και άλλων ενδοκυτταρικών δομών στα λυσοσώματα του ήπατος αρουραίου, στα οποία έγινε έγχυση με την παγκρεατική ορμόνη γλυκαγόνη. (22) Ο μηχανισμός με τον οποίο η γλυκαγόνη προκαλεί αυτοφαγία στο ήπαρ δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός σε μοριακό επίπεδο, εκτός από το ότι απαιτεί, εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και είναι εξαιρετικά ειδική για το ήπαρ. (23)

Παρόλο που η σημασία της αυτοφαγίας είναι καλά αναγνωρισμένη στα συστήματα των θηλαστικών, πολλές από τις ανακαλύψεις στους μηχανισμούς της και στον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο ρυθμίζεται σε μοριακό επίπεδο έχουν γίνει στη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*). Επί του παρόντος, 32 διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία (autophagy-related genes - Atg) έχουν ταυτοποιηθεί με γενετικό έλεγχο σε ζύμες και πολλά από τα γονίδια αυτά διατηρούνται σε μούχλα λάσπης, φυτά, σκουλήκια, μύγες και θηλαστικά, τονίζοντας τη σημασία της αυτοφαγίας σε καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών συστατικών και στρες. (24)

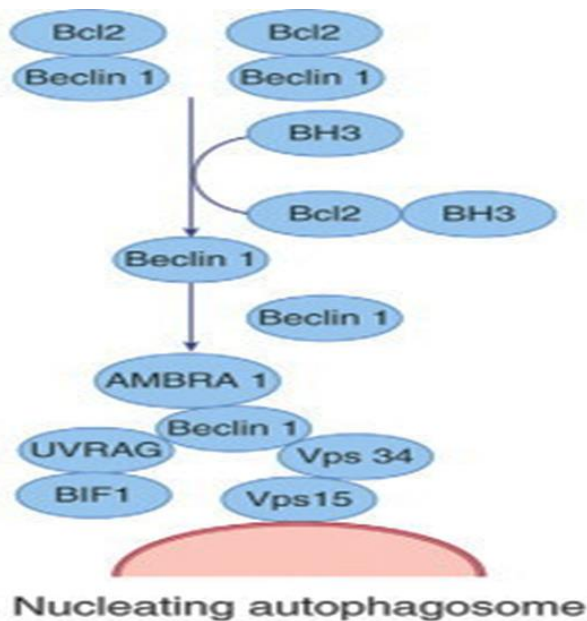
1.2.1. Μηχανισμός της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία διαμεσολαβείται από αρνητικούς ρυθμιστές (άμεσους/έμμεσους) της πρωτεΐνης-στόχο της ραπαμυκίνης (target of rapamycin -TOR) όπως τη φωσφατάση PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), τη 5'-AMP πρωτεϊνική κινάση, που ενεργοποιείται σε καταστάσεις χαμηλής ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, και τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης 2α (Εικόνα 1.4). Ο μηχανισμός σηματοδότησης της p53 έχει επίσης αποδειχθεί ότι αποτελεί μέρος της διαδικασίας ρύθμισης της αυτοφαγίας, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης που ενεργοποιείται από το AMP (AMP activated protein kinase – AMPK). Για να προαχθεί η αυτοφαγία στα κύτταρα πρέπει να ανασταλεί ο TOR (Εικόνα 1.4). (25)



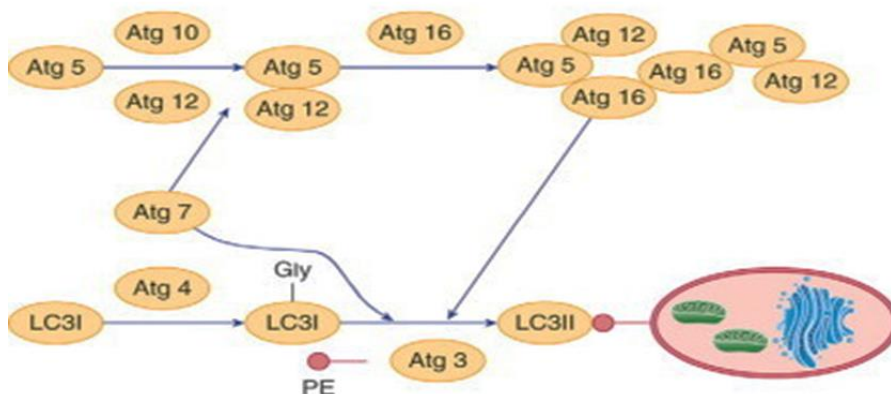
Εικόνα 1.4: Πρώτο στάδιο της αυτοφαγίας. Εικόνα προσαρμοσμένη από Kohli L & Roth KA, 2010.

Η εγκόλπωση των οργανιδίων είναι το επόμενο βήμα στην διαδικασία της αυτοφαγίας (Εικόνα 1.5). Προκειμένου να δημιουργηθούν τα αυτοφαγοςώματα πρέπει να δημιουργηθούν πλασματικές μεμβράνες και η διαδικασία αυτή απαιτεί την ενεργοποίηση των κλάσης III κινασών του μονοπατιού της 3-κινάσης της φωσφοϊνοσιτίνης κατηγορίας I (Phosphatidylinositol 3-kinase - PI3K), με σημαντικότερη από αυτές την πρωτεΐνη beclin-1 (ή Atg 6). Η beclin 1 στρατολογεί βασικές πρωτεΐνες της αυτοφαγίας σε μια προ-αυτοφαγωμική δομή, σχηματίζοντας έτσι το βασικό σύμπλεγμα που αποτελείται από την beclin 1, την vacuolar protein sorting 34 (Vps34) και την Vps15 (Εικόνα 1.5). Επιπλέον, η beclin 1 είναι ένας βασικός καθοριστικός παράγοντας για το αν τα κύτταρα θα οδηγηθούν σε αυτοφαγία ή σε απόπτωση. Η beclin 1 έχει αποδειχθεί ότι αλληλοεπιδρά μέσω μιας περιοχής του BH3 με τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να συμβεί αυτοφαγία και όχι απόπτωση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του Vps34 (ανήκει στην κατηγορία III PI3K), η οποία επιτυγχάνεται με τον σχηματισμό του συμπλέγματος Beclin 1, UVRAG (UV radiation resistance-associated gene protein), Ambra1 (μόριο ενεργοποίησης σε αυτοφαγία ρυθμιζόμενη από Beclin 1- Autophagy And Beclin 1 Regulator 1) και Vps15. (25,26)



Εικόνα 1.5: Δεύτερο στάδιο του μηχανισμού της αυτοφαγίας, εγκόλπωση των κυστιδίων. Εικόνα προσαρμοσμένη από Kohli L & Roth KA, 2010.

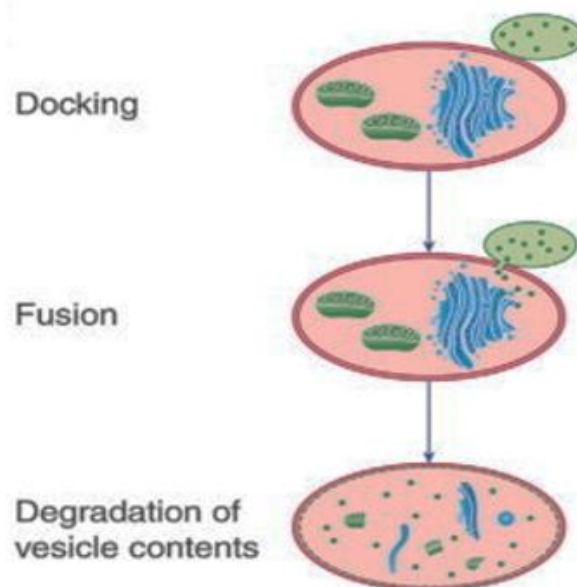
Το βήμα της επιμήκυνσης της μεμβράνης των κυστιδίων (Εικόνα 1.6) περιλαμβάνει δύο συστήματα σύζευξης που μοιάζουν με ουβικιτίνη. Το πρώτο περιλαμβάνει το σχηματισμό του συμπλέγματος Atg5 – Atg12 από τις δράσεις του ενζύμου Atg7, που μοιάζει με E1, και του ενζύμου Atg10, που μοιάζει με E2. Το ένζυμο Atg10 μετατρέπει τη διαλυτή μορφή του LC3/Atg8, επίσης γνωστού ως LC3-I, σε LC3-II που σχετίζεται με την μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος μετά τη σύζευξη της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (Phosphate ethylamide - PE) μέσω των ενεργειών της πρωτεάσης Atg4, του Atg7, και Atg3. (25)



Εικόνα 1.6: Τρίτο στάδιο του μηχανισμού της αυτοφαγίας, επιμήκυνση των κυστιδίων. Εικόνα προσαρμοσμένη από Kohli L & Roth KA, 2010.

Τέλος, τα αυτοφαγοσώματα συγχωνεύονται με λυσοσώματα και το περιεχόμενό τους αποικοδομείται από την πρωτεολυτική δραστηριότητα των λυσοσωμικών ενζύμων. Ο

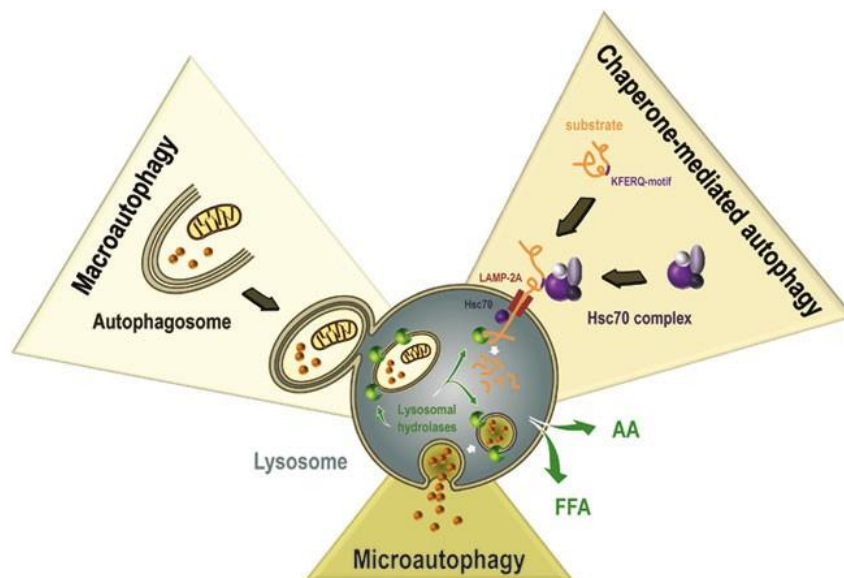
μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί και παραμένει το επίκεντρο ερευνών. (25)



Εικόνα 1.7: Αποικοδόμηση των μορίων μέσα στα αυτοφαγοσώματα. Εικόνα προσαρμοσμένη από Kohli L & Roth K A, 2010.

1.2.2 Τύποι της αυτοφαγίας

Σύμφωνα με τον τρόπο παράδοσης των οργανιδίων/πρωτεϊνών στο λυσόσωμα, η αυτοφαγία έχει κατηγοριοποιηθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους: μακροαυτοφαγία, μικροαυτοφαγία και αυτοφαγία που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες συνοδούς (Εικόνα 1.8).



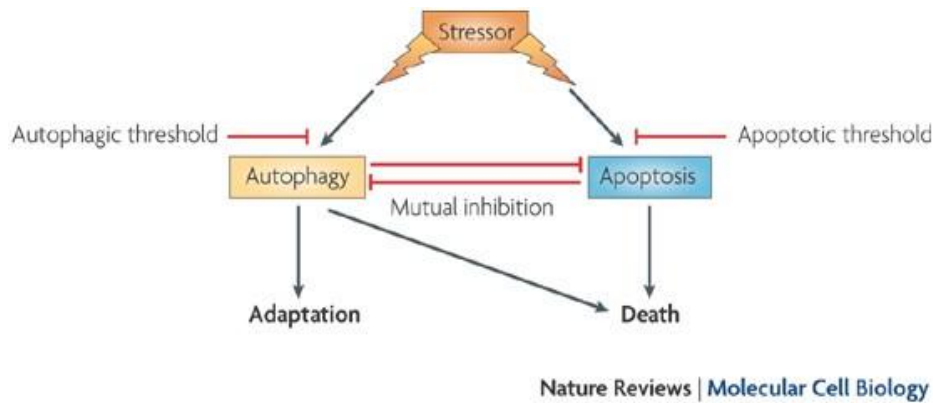
Εικόνα 1.8: Τύποι της αυτοφαγίας. Πηγή: Wirawan E, 2012.

Στη *μακροαυτοφαγία*, ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος, είναι το πρώτο βήμα. Το αυτοφαγόσωμα ταξιδεύει κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και εγκοιλώνει κατεστραμμένα οργανίδια και μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια γίνεται σύντηξη με το λυσόσωμα για να σχηματιστεί το αυτολυσόσωμα (ή αυτοφαγολυσόσωμα). Στα αυτολυσοσώματα, οι λυσοσωμικές υδρολάσες μετατρέπουν το περιεχόμενο των αυτοφαγολυσοσωμάτων σε ανακυκλώσιμο ATP, αμινοξέα και λιπαρά οξέα. Αυτή η διαδικασία μεσολαβείται από πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία (Atg), οι οποίες ρυθμίζουν τη βιογένεση του αυτοφαγοσώματος και την επακόλουθη σύντηξή του με το λυσόσωμα. Σε αντίθεση με τη μακροαυτοφαγία, η *μικροαυτοφαγία* περιλαμβάνει μη επιλεκτική εγκόλωση κυτταροπλασματικού περιεχομένου στα λυσοσώματα. Η *αυτοφαγία με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών-συνοδών* είναι μοναδική στα κύτταρα των θηλαστικών και απαιτεί οι πρωτεΐνες που είναι να αυτοφαγωθούν να έχουν το μοτίβο που αναγνωρίζουν οι πρωτεΐνες συνοδοί. Το μοτίβο αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa 8 (HSPA8/HSC70), η οποία προσκολλάται στο μοτίβο της πρωτεΐνης που είναι να αποδιαταχθεί και στη συνέχεια το σύμπλοκο μεταφέρεται και συνδέεται με τη λυσοσωμική πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου 2A, εισέρχεται στο λυσόσωμα και αποικοδομείται. (27)

1.2.3 Αυτοφαγία και απόπτωση

Παρόμοιοι στρεσογόνοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν είτε απόπτωση είτε αυτοφαγία, με τρόπο που εξαρτάται από το στρες που δέχεται το κύτταρο, από το είδος και τη διάρκεια του (Εικόνα 1.9). Είναι δυνατό τα διαφορετικά κατώφλια ευαισθησίας, η ακριβής φύση των οποίων μένει να προσδιοριστεί, να υπαγορεύουν εάν θα γίνει αυτοφαγία ή απόπτωση στο κύτταρο. Η επιλογή μεταξύ απόπτωσης και αυτοφαγίας επηρεάζεται από το γεγονός ότι οι δύο αυτές διεργασίες παρουσιάζουν κάποιο βαθμό αμοιβαίας αναστολής. Σε ορισμένες περιπτώσεις η σύγχρονη ύπαρξη απόπτωσης και αυτοφαγίας μπορεί να ανιχνευθεί στο ίδιο κύτταρο. Αν και η αυτοφαγία ως επί το πλείστο επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμοστούν στο στρες, η μαζική αυτοφαγία μπορεί επίσης να σκοτώσει τα κύτταρα.

Η αυτοφαγία εμφανίζει διακριτές διαφορές από την απόπτωση. Κατά την απόπτωση εμφανίζεται διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, κατακερματισμός του πυρήνα, συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστροφή του χρωμοσωμικού DNA. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε αποπτωτικό θάνατο, αν το ερέθισμα που δέχεται το κύτταρο θα το οδηγήσει σε αυτοφαγία, μέσω της οποίας θα επιβιώσει, ή σε απόπτωση και θάνατο εξαρτάται από τη φύση, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος, καθώς και από την ενεργειακή κατάσταση στην οποία βρισκόταν το κύτταρο όταν δέχτηκε το ερέθισμα. (29)



Εικόνα 1.9: Το στρες καθορίζει την πορεία του κυττάρου προς αυτοφαγία ή απόπτωση. Εικόνα προσαρμοσμένη από Maiuri M. et al., 2007.

1.3. Αζιθρομυκίνη

Η αζιθρομυκίνη ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών μακρολίδες. Οι μακρολίδες, στα βακτήρια αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση μέσω σύνδεσης (αντιστρεπτά) στην θέση P της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος. Η ερυθρομυκίνη ήταν η πρώτη μακρολίδη που ανακαλύφθηκε. Η δράση τους είναι κυρίως βακτηριοστατική, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να είναι και βακτηριοκτόνα. Η αζιθρομυκίνη είναι παράγωγο της ερυθρομυκίνης με πολύ ενισχυμένη δράση κατά των gram-αρνητικών βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένων των *Enterobacteriaceae*) και παρέχει κάλυψη έναντι πολλών θετικών κατά gram οργανισμών. Λειτουργεί ως αναστολέας της σύνθεσης βακτηριακής πρωτεΐνης (και όχι ως αναστολέας κυτταρικού τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης όπως οι παράγοντες βήτα-λακτάμης), έτσι η αζιθρομυκίνη είναι αποτελεσματική ενάντια σε πολλά «άτυπα» βακτήρια όπως τα χλαμύδια (π.χ., *Chlamydia trachomatis* και *Chlamydophila psittaci*), την *Legionella pneumophila*, το μυκόπλασμα (*Mycoplasma pneumoniae*) και μυκοβακτήρια (π.χ. *Mycobacterium avium*). (30)

1.3.1 Η αντιφλεγμονώδης δράση της αζιθρομυκίνης

Οι αντιβιοτικές δράσεις της αζιθρομυκίνης διευκολύνονται από τις ανοσοτροποποιητικές της δράσεις στις εγγενείς ανοσολογικές αποκρίσεις. Το φάρμακο φαίνεται να ασκεί μια διφασική δράση που μπορεί να χρησιμεύσει για την αρχική άμυνα του ξενιστή και αργότερα για τη μείωση του τραυματισμού του ιστού και την λύση της φλεγμονής. Ευεργετικές επιδράσεις που προκαλούνται από την ανοσορύθμιση παρατηρούνται επίσης σε μια ποικιλία χρόνιων φλεγμονωδών διαταραχών, όπως βρογχιολίτιδα, μετά από μεταμόσχευση (ιδιαίτερα σοβαρές φλεγμονώδεις μορφές) και τη ροδόχρου ακμής. (31)

Η ρύθμιση της άμυνας του ξενιστή από την αζιθρομυκίνη και άλλες μακρολίδες λαμβάνει χώρα μέσω αλληλεπίδρασης με επιθηλιακά ή ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα ή ινοβλάστες, καθώς και με λευκοκύτταρα (μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα

λευκοκύτταρα ή ουδετερόφιλα, μονοπύρρηνα ή μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα, T και δενδριτικά κύτταρα. (31) Αρχικές μελέτες έδειξαν ανασταλτικές επιδράσεις των μακρολιδών στα ουδετερόφιλα *in vitro*, σε φλεγμονή σε πειραματικά μοντέλα (32) και ιδιαίτερα την επίδραση τους στην απελευθέρωση κυτταροκινών. (33) Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, πειράματα σε αρουραίους με αρθρίτιδα έδειξαν ότι η αζιθρομυκίνη αναστέλλει τη φλεγμονή και την απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων, (34) ενώ μετέπειτα πειράματα με ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και ροξιθρομυκίνη, έδειξαν πως η αζιθρομυκίνη ήταν λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με την κλαριθρομυκίνη και τη ροξιθρομυκίνη. (35,36,37) Η αζιθρομυκίνη επίσης έχει δειχθεί, λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης της, ότι ελαχιστοποιεί την χορήγηση κορτικοστεροειδών για τη θεραπεία της φλεγμονής του αναπνευστικού. (38,39)

1.3.2 Ο ρόλος της αζιθρομυκίνης σε χρόνιες παθήσεις

Παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος

Η αζιθρομυκίνη επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών. Συγκεκριμένα, η αζιθρομυκίνη μειώνει, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ της τραχείας κουνελιού που καλλιεργούνται σε μέσο που περιέχει 10% FBS. Η αζιθρομυκίνη έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση μόνο σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η θεραπεία με αζιθρομυκίνη προκαλεί επίσης το σχηματισμό κυτταροπλασματικών κενοδοπιών και τη συρρίκνωση των πυρήνων ΛΜΚ. (40)

Οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της αζιθρομυκίνης, το ευρύ αντιβακτηριακό της φάσμα, η εξαιρετική της φαρμακοκινητική και η εκτεταμένη και παρατεταμένη διείσδυση της στους ιστούς, ευθύνονται για την επιτυχή αντιμετώπιση μολυσματικών ή μη λοιμωδών φλεγμονωδών νόσων του αναπνευστικού. Η αζιθρομυκίνη αλληλοεπιδρά με τις κεφαλές των φωσφολιπιδίων, μειώνοντας την κινητικότητά τους και τη ρευστότητα, ελαστικότητα της πλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να επιδρά στις κυτταρικές λειτουργίες. (41,42) Αυτές περιλαμβάνουν την λανθασμένη εισαγωγή μορίων σε μεμβράνες μακροφάγων και επιβράδυνση της διακίνησης τους στα λυσοσώματα, αναστολή της ενδοκυττάρωσης της υγρής φάσης, αλλά όχι της φαγοκυττάρωσης, των μακρομορίων, μείωση της ρύθμισης και καθυστερημένη ανακύκλωση υποδοχέων τρανσφερίνης επιφανείας, αλλά όχι υποδοχέων Fcγ. (36) Επομένως, οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των μακρολιδών στα μακροφάγα σχετίζονται με τις ιδιότητες δέσμευσης των φωσφολιπιδίων. (43)

Το ενδιαφέρον για τις μη αντιβιοτικές χρήσεις των μακρολιδίων ξεκίνησε με τη θεραπεία της διάχυτης πανβρογχιολίτιδας τη δεκαετία του 1980 και έκτοτε έχει αυξηθεί ώστε να περιλαμβάνει αρκετές χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις. Η αρχική παρατήρηση ήταν ότι η χρήση ερυθρομυκίνης στη διάχυτη πανβρογχιολίτιδα σχετίζεται με μειωμένες εκκρίσεις των αεραγωγών. (44)

Η *P. aeruginosa* είναι ένα κοινό παθογόνο που σε μεταγενέστερα στάδια της κυστικής ίνωσης ασκεί τη λοιμογόνο δράση του αλλάζοντας τη διαπερατότητα των κυττάρων και οδηγώντας σε έκκριση βλέννας και προφλεγμονωδών κυτταροκινών. (45) Η *P. aeruginosa* προσαρμόζεται στο σκληρό περιβάλλον της κυστικής ίνωσης μέσω ανάπτυξης μιας μορφής βιοφίλμ που είναι πολύ δύσκολο να εξαλειφθεί με αντιβιοτικά. (46) Οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της αζιθρομυκίνης την καθιστούν ως κύρια θεραπεία για την κυστική ίνωση. Στην περίπτωση της μόλυνσης από *P. aeruginosa*, η αζιθρομυκίνη μειώνει την έκκριση βλέννας και το σχηματισμό βιοφίλμ, και αυξάνει την ευαισθησία της *P. aeruginosa* σε άλλα αντιβιοτικά. (47,48) Σε ορισμένες περιπτώσεις επίσης διάχυτης πανβρογχιολίτιδας, που υπάρχει λοίμωξη από *P. aeruginosa*, οι μακρολίδες έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τη λειτουργία των πνευμόνων πιθανώς λόγω των ανοσοτροποποιητικών λειτουργιών τους (49).

Η βρογχεκτασία, είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πνευμονική πάθηση που χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη διάταση των βρόγχων και των βρογχιολίων λόγω επαναλαμβανόμενων ή παλαιών λοιμώξεων, ανοσοανεπάρκειας, αυτοάνοσων καταστάσεων, νόσου του συνδετικού ιστού και ιδιοπαθούς νόσου. (50) Οι μακρολίδες, έχουν δείξει ότι παρέχουν όφελος στην αντιμετώπιση βρογχεκτασιών, τόσο παρουσία όσο και απουσία κυστικής ίνωσης. (51,52)

Παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος

Τα προηγούμενα χρόνια, η αζιθρομυκίνη θεωρήθηκε σχετικά απαλλαγμένη από καρδιακές τοξικές επιδράσεις, (53) έκτοτε όμως έχει συσχετιστεί με θάνατο από καρδιαγγειακά προβλήματα. (54) Μετά από αυτές τις αναφορές, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) εξέδωσε ανακοίνωση για την ασφάλεια σχετικά με τον κίνδυνο χορήγησης αζιθρομυκίνης για δυνητικά θανατηφόρες αρρυθμίες. (55) Η χρήση μακρολιδίων συσχετίστηκε με μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση, κατά 15% στον κίνδυνο για έμφραγμα μυοκαρδίου. Σε μία μετα-ανάλυση, η ερυθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη κατατάχθηκαν στα αντιβιοτικά με τον υψηλότερο κίνδυνο για έμφραγμα μυοκαρδίου σε σύγκριση με την αζιθρομυκίνη και μη μακρολίδια. (56) Ο μηχανισμός πίσω από τη σύνδεση μεταξύ μακρολιδίων και έμφραγμα μυοκαρδίου είναι ασαφής. Μελέτες που αναφέρουν αυτή τη συσχέτιση έχουν προτείνει ότι τα μακρολίδια μπορεί να προκαλέσουν έμφραγμα μυοκαρδίου μέσω της ενεργοποίησης μακροφάγων. (57)

1.3.3 Ο ρόλος του *C. pneumoniae* στην αθηροσκλήρωση και στη στεφανιαία νόσο

Ο ρόλος του *C. pneumoniae* στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου ενισχύθηκε περαιτέρω από μελέτη σε ζώα στην οποία η ενδορινική μόλυνση κουνελιών με *C. pneumoniae* φάνηκε ότι

προκαλεί ή επιταχύνει την αθηροσκλήρωση. (58) Επόμενη μελέτη έδειξε ότι η αζιθρομυκίνη απέτρεψε την επιτάχυνση της αθηροσκλήρωσης που προκαλείται από το *C. pneumoniae* σε κουνέλια. (59)

Ένας αριθμός μολυσματικών παραγόντων έχει εμπλακεί στην αθηροσκλήρωση, όπως το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και ο κυτταρομεγαλοϊός, αλλά το *C. pneumoniae* είναι το μόνο παθογόνο που ανιχνεύεται στις αθηρωματικές πλάκες. (60) Το *C. pneumoniae*, μια κοινή αιτία λοιμώξεων του αναπνευστικού, θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, μέσω μακροφάγων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων που μεταναστεύουν στα τοιχώματα των αγγείων ή σε αγγεία προϋπαρχουσών αθηρωματικών βλαβών. (61,62) Οι κυτταρικοί παράγοντες που είναι γνωστοί για την αστάθεια της πλάκας είναι ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και ΛΜΚ με αυξημένο ρυθμό απόπτωσης. (63,64) Μολυσματικοί παράγοντες όπως το *C. pneumoniae* συσχετίζεται συχνά με ασταθή αθηρωματώδη πλάκα, προκαλώντας εντοπισμένη ανοσολογική απόκριση από T-λεμφοκύτταρα και αυξάνοντας την απόπτωση. (65,66) Αυτά τα κυτταρικά στοιχεία επάγουν την έκκριση παραγόντων αποδόμησης της ECM όπως MMPs, ή παράγοντα ιστού (tissue factor - TF). MMPs και TF παίζουν καθοριστικούς ρόλους στην ομοιόσταση, καθώς έχουν την ικανότητα αναδιαμόρφωσης του συνδετικού ιστού και σχετίζονται με την παθογένεση χρόνιων παθήσεων, όπως οστεοαρθρίτιδα και αθηροσκλήρωση. (67)

Η μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων με *C. pneumoniae* αυξάνει την έκφραση των μοριών προσκόλλησης, χημειοκινών και κυτταροκινών (IL-1, IL8, TNF- α) που οδηγεί σε προ-αθηροσκληρωτική κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από ενισχυμένη προσκόλληση και μετανάστευση λευκοκυττάρων. Η μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων με *C. pneumoniae* μπορεί επίσης να προκαλέσει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω επαγωγής ενδογενούς Hsp60 και του PDGF.

Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ότι το *C. pneumoniae* διαχέεται συστηματικά από τους πνεύμονες μέσω των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος και μολύνει τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος που εμπλέκονται στην αθηρογένεση. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το *C. pneumoniae* είναι σε θέση να προκαλέσει φλεγμονή και να ξεκινήσει ή να προάγει την ανάπτυξη βλαβών σε ζωικά μοντέλα. (68) Ακόμα, η λοίμωξη από *C. pneumoniae* συσχετίστηκε με την έκφραση TF μέσα στις αθηρωματικές πλάκες. Συγκεκριμένα υπήρχε αύξηση του TF στην περιοχή που εντοπίζονται οι αθηρωματικές αλλοιώσεις, αλλά δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στο εσωτερικό του *C. pneumoniae*. (69) Έχει αποδειχθεί ότι η απελευθέρωση πρωτεϊνών αποικοδόμησης μήτρας όπως οι MMPs (ειδικά MMP9) και TF μπορούν να προκληθούν από το *C. pneumoniae* (70) και η έκφραση των MMP9 και TF να είναι υψηλότερη στις μολυσμένες με *C. pneumoniae* καρωτιδικές αρτηρίες παρά στις μη μολυσμένες καρωτίδες. (71,72,73)

Το ερώτημα εάν οι λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν διάχυτες και χρόνιες αρτηριακές βλάβες έχει συζητηθεί εδώ και πολλά χρόνια. Μόνο πρόσφατα ωστόσο, έχουν προσδιοριστεί στοιχεία που να συσχετίζουν την αθηροσκλήρωση και βακτηριακούς παράγοντες, κυρίως το *Chlamydia pneumoniae*. Λόγω αυτής της συσχέτισης, αυτή έχει δημιουργηθεί το ερώτημα, εάν η αντιβιοτική θεραπεία μπορεί να είναι χρήσιμη στην πρόληψη ή τη βελτίωση της πορείας της αθηροσκλήρωσης. Μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με αζιθρομυκίνη έχει ευνοϊκή επίδραση στη λειτουργία του ενδοθηλίου σε ασθενείς με τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο και ενδείξεις λοίμωξης από *C. pneumoniae* ανεξάρτητα από τα επίπεδα των αντισωμάτων κατά του ξενιστή. (74) Επίσης υπήρξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της χορήγησης αζιθρομυκίνης και της πρόληψης της στεφανιαίας νόσου. (75)

Καθώς η χρονιότητα είναι χαρακτηριστικό της λοίμωξης από *C. pneumoniae* που είναι ευαίσθητο στις μακρολίδες, η βέλτιστη δόση χορήγησης τους εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο ερευνών, ειδικά όταν λαμβάνεται υπόψη η σημασία της στεφανιαίας νόσου για τη δημόσια υγεία. Έτσι, επιλέχθηκε η χορήγηση από του στόματος αζιθρομυκίνης, λόγω της αντιγλαμυδιακής της αποτελεσματικότητας, σε ένα εκτεταμένο δοσολογικό σχήμα. (76,77,78)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Μεθοδολογία

2.1 Χειρισμός πειραματόζωων

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα κουνέλια (New Zealand White rabbits), βάρους ~3Kg. Ο χειρισμός των ζώων έγινε σύμφωνα με τις ηθικές, συνταγματικές και ευρωπαϊκές οδηγίες (Directive 2010/63/EU). Τα ζώα θανατώθηκαν με ενδοφλέβια χορήγηση πεντοθάλης (Abbott, Illinois, USA).

2.2 Απομόνωση ΛΜΚ αορτής κουνελιού

Η θανάτωση των ζώων έγινε σε ασηπτικές συνθήκες και ακολούθησε η αφαίρεση της αορτής και η απομάκρυνση των ιστών που βρίσκονται στην περιοχή της. Στη συνέχεια, η αορτή τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου (Πίνακας 2.1), σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις του ιστού με διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου, ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατόν περισσότερο αίμα. Σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής, αφαιρέθηκαν τα υπολείμματα ιστών που περιέβαλαν την αορτή. Αμέσως μετά, η αορτή κόπηκε σε δακτύλιους πλάτους ~3 mm.

Πίνακας 2.1: Σύσταση διαλύματος Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου

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

Ακολούθησαν πλύσεις των δακτυλίων της αορτής με αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου (Πίνακας 2.1), μεταφέρθηκαν σε 2ml του πρώτου διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού (Πίνακας 2.2) και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Centurion Scientific Ltd). Ανάμεσα στις δύο φυγοκεντρήσεις το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε νέο διάλυμα Krebs χαμηλής περιεκτικότητας ασβεστίου.

Πίνακας 2.2: Σύσταση πρώτου και δεύτερου διαλύματος ενζυμικού διαχωρισμού

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

Μετά την δεύτερη φυγοκέντρηση, το εναιώρημα μεταφέρθηκε στο δεύτερο διάλυμα ενζυμικού διαχωρισμού (Πίνακας 2.2) και επώαστηκε για 60 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Έπειτα, το εναιώρημα των λείων μυϊκών ινών φυγοκεντρήθηκε εκ νέου 2 φορές στις 1200 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταξύ των φυγοκεντρήσεων, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12 (DMEM- 64 F12, GIBCO), το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη (διάλυμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης, PS). Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε με ελαφριά ανάδευση προκειμένου να αποκολληθούν τα χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών.

2.3 Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων με τη χρωστική Trypan blue

Μετά την απομόνωση, τα ζωντανά κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Nikon YS2T, (Nikon Inc., Melville New York, USA), με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) έπειτα από χρώση με Trypan blue. Η χρωστική Trypan blue (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα, καθώς εισέρχεται από τις κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες στο εσωτερικό του κυττάρου και χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα κυανά. Με αυτή την τεχνική μετρήθηκαν τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα και έγινε αναγωγή σε αριθμό κυττάρων ανά ml κυτταρικού αιωρήματος, χρησιμοποιώντας τον τύπο:

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

όπου a ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στα 8 τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου.

2.4 Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων

Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε φλάσκα των 75cm² (περίπου 5x10⁴ κύτταρα ανά 2 ml θρεπτικού υλικού), μαζί με θρεπτικό υλικό DMEM-F12, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επώαστηκαν σε

κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% διοξειδίου του άνθρακα (Carbondioxide, CO₂). Μετά την απομόνωση, εφόσον είχαν περάσει 24 με 48 ώρες, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με νέο. Στη συνέχεια η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες με περιοδική αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανά 2 ή 3 ημέρες.

Όταν τα κύτταρα δημιουργήσαν μονοστιβάδα και κάλυψαν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της φλάσκας χρησιμοποιήθηκε 0.2% θρυψίνη και 0.53 mM EDTA για να γίνει η αποκόλληση τους. Αρχικά αφαιρέθηκε το καλλιεργητικό μέσο με ορολογική πιπέτα και έγινε έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με αποστειρωμένο ισότονο διάλυμα phosphate buffer saline (PBS) 1x (Πίνακας 2.3).

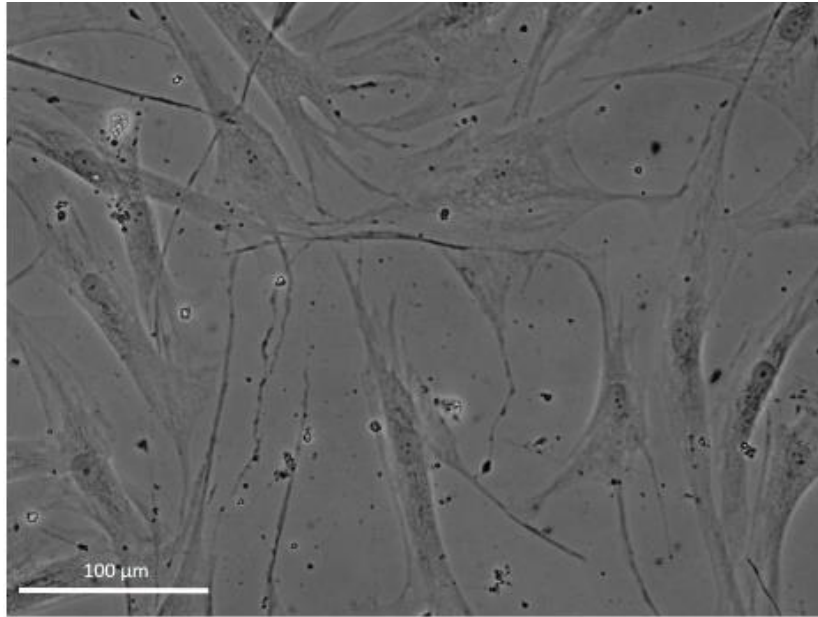
Πίνακας 2.3: Σύσταση Διαλύματος PBS

<u>Χημικές ουσίες</u>	<u>Συγκέντρωση (mM)</u>
NaCl	137
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄	8
KH ₂ PO ₄	1.46

Η έκπλυση με PBS απομάκρυνε εναπομείναντα ίχνη ορού που αναστέλλουν τη δράση της θρυψίνης. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος 0.2% θρυψίνης-0.53 mM EDTA και επώαση στο κλίβανο για 5 λεπτά. Με την ενζυμική δράση της θρυψίνης τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας. Κατόπιν, έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου (10 ml σε κάθε φλάσκα επιφάνειας 75 cm²), που περιείχε ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum-FBS), προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Έγινε επαναιώρηση των κυττάρων και τα κύτταρα μοιράστηκαν σε φλάσκες ή τρυβλία και προστέθηκε θρεπτικό μέσο. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, κάτω από άσηπτες συνθήκες. Τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην 3^η με 6^η ανακαλλιέργεια.

Τα κύτταρα προς αποθήκευση, ήταν προσκολλημένα ως μονοστιβάδα στην επιφάνεια της φλάσκας, ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1xPBS και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C.

Για την ανάπτυξη καλλιέργειας από τα αποθηκευμένα κύτταρα, οι μικροσωληνίσκοι μεταφέρθηκαν από τους -80°C σε υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης, τύπου falcon και έγινε προσθήκη με αργό ρυθμό προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου DMEM-F12 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1000 rpm για 3 min, Centurion, Scientific Ltd.), ώστε να απομακρυνθεί το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) από τα κύτταρα. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα.



Εικόνα 2.1: Καλλιέργεια AMK αορτής κουνελιού, για 72 ώρες απουσία ορού. Η φωτογραφία ελήφθη σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Nikon Diaphot 300) σε μεγέθυνση X40.

2.5 Καλλιέργεια δακτυλίων αορτής- Δημιουργία τομών αορτής

Δακτύλιοι αορτής, πλάτους ~3mm, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο ισότονο διάλυμα PBS 3 φορές, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, και αφαιρέθηκε το ενδοθήλιο με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό. Οι δακτύλιοι της αορτής χωρίστηκαν σε τέσσερα διαφορετικά τρυβλία.

- Στο πρώτο οι δακτύλιοι της αορτής επώαστηκαν χωρίς ορό και χωρίς αζιθρομυκίνη για 24 ώρες
- Στο δεύτερο οι δακτύλιοι της αορτής επώαστηκαν με ορό και χωρίς αζιθρομυκίνη για 24 ώρες
- Στο τρίτο οι δακτύλιοι της αορτής επώαστηκαν με ορό και με αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-7} M για 24 ώρες και
- Στο τέταρτο οι δακτύλιοι της αορτής επώαστηκαν με ορό και με αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-5} M για 24 ώρες.

Μετά από 24 ώρες, οι δακτύλιοι της αορτής τοποθετήθηκαν για 90 λεπτά με διάλυμα 4% w/v παραφορμαλδεΐδης (Paraformaldehyde – PFA) σε Phosphate Buffer σύστασης 0.2M NaH_2PO_4 και 0.2M K_2PO_4 και στη συνέχεια για όλο το βράδυ σε διάλυμα σακχαρόζης 30% w/v σε PBS στους 4°C. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε ταχεία ψύξη του ιστού με διάλυμα ισοπεντανίου θερμοκρασίας -45°C για 1 λεπτό και αποθήκευση στους -80°C μέχρι τη λήψη των τομών.

Οι τομές αορτής ελήφθησαν σε κρυστόμο (Leica CM1850) στους -20°C. Η κρυστόμος βρισκόταν ήδη σε λειτουργία για 30 με 60 λεπτά πιο πριν, ώστε να έχει θερμοκρασία -20°C

πριν τοποθετήσουμε τον ιστό όπως και κατά τη διάρκεια της λήψης των τομών. Ο ιστός τοποθετήθηκε στην τράπεζα της μικροτόμου με κατάλληλο προσανατολισμό, ώστε να κόβονται δακτύλιοι, καλύφθηκε με κρυοπροστατευτικό μέσο (Cryostat Matrix) και στη συνέχεια ελήφθησαν τομές πάχους 10 μm σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι τομές φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι την διεξαγωγή του πειράματος.

2.6 Χρώση τομών με Cresyl violet

Για την ιστοχημική χρώση με Cresyl violet εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο. Οι τομές της αορτής εμβυθίστηκαν για:

- 10 λεπτά σε διάλυμα αιθανόλης-χλωροφορμίου-οξικού οξέος σε αναλογία 3:2:1
- 3 λεπτά σε απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των τομών
- 5 λεπτά σε διάλυμα Cresyl violet (πίνακας 2.4)
- 2 λεπτά έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- Έπειτα, αφυδατώθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (50%, 75%, 95% και 100%) και τέλος εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη.

Πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας προστέθηκαν 20 μl καστορέλαιο, αρκετά για να καλυφτούν οι τομές που είχαμε σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Όλα τα παραπάνω βήματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε σφράγισμα των καλυπτρίδων με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Light Microscopy, Germany).

Πίνακας 2.4: Διάλυμα Cresyl violet pH 4.5

Διαλύματα	Συγκέντρωση
Οξικό νάτριο (NaCH ₂ COOH)	0.2 M
Cresyl violet (Sigma C1791)	0.5% w/v

2.7 Χρώση με Toluidine Blue

Οι τομές των ιστών μονιμοποιήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα σε 75% αιθανόλη και στη συνέχεια εμβυθίστηκαν σε απεσταγμένο νερό για άλλα 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, έγινε χρώση με διάλυμα 0.1% τολουιδίνης (Πίνακας 2.5) και ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό. Έγινε αφυδάτωση των τομών για 30 δευτερόλεπτα σε κάθε διάλυμα αιθανόλης με αυξανόμενη συγκεντρώση 70%, 95%, 100%. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβυθίστηκαν σε ξυλόλη για 5 λεπτά και παρέμειναν στον αέρα για 20 λεπτά ώστε να στεγνώσουν. Ακολούθησε σφράγισμα των καλυπτρίδων με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Light Microscopy, Germany).

Πίνακας 2.5 Διάλυμα *Toluidine Blue* pH 5.5

Διαλύματα	Συγκέντρωση
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH ₂ PO ₄)	0.2 M
Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na ₂ HPO ₄)	0.2 M
Τολουιδίνη	0.1% w/v

2.8 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

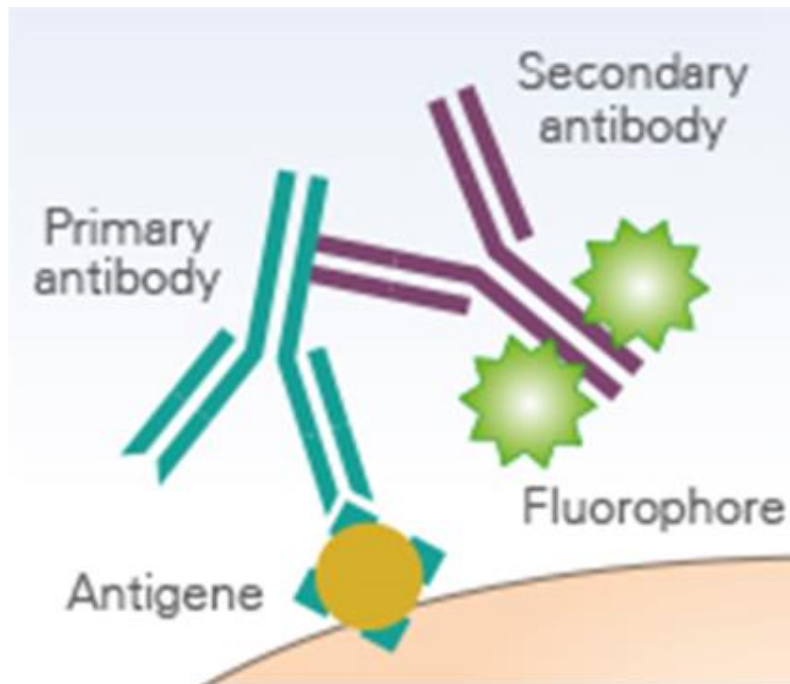
Αρχικά, οι τομές (αντικειμενοφόροι) ξεπλύθηκαν με διάλυμα 1xPBS και οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 1xPBS-3% φορμαλδεΰδη για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1xPBS και επώαση των ιστών με διάλυμα 5% BSA-1xPBS-0.3% Triton X-100 για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές και οι μη ειδικές θέσεις στις οποίες θα μπορούσε να συνδεθεί το αντίσωμα να δεσμευτούν.

Οι ιστοί στη συνέχεια επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1xPBS-0.3% Triton X-100 5%BSA, για 24 ώρες, σε 4°C. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1xPBS. Ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με την φθορίζουσα ουσία σε διάλυμα 1xPBS Triton X-100, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε πάλι με 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 1xPBS. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε πάνω στην επιφάνειά των αντικειμενοφόρων πλακών 2μl Vectashield (Vector laboratories) που περιείχε χρωστική DAPI για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό φαίνονται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό

1^ο αντίσωμα	Αραίωση	2^ο αντίσωμα	Αραίωση
anti-LC3 rabbit polyclonal antibody <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:1000	anti-rabbit IgG <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:3000
anti-beclin 1 rabbit polyclonal antibody <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:1000	anti-rabbit IgG <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:3000
anti-smooth muscle α-actin mouse monoclonal antibody <i>Sigma-Aldrich Chemie</i>	1:1000	anti-mouse IgG <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:3000

Ακολούθησε σφράγισμα των καλυπτρίδων με διάφανο βερνίκι και τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA) και φωτογράφηση του παρασκευάσματος με ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany).



Εικόνα 2.2: Εντοπισμός πρωτεϊνών επιφανείας με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Πηγή: www.ibidi.com.

2.9 Λύση κυττάρων

Τα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm για 24 ώρες με ορό, χωρίς ορό και παρουσία ή απουσία αζιθρομυκίνης. Στη συνέχεια έγινε πλύση του τρυβλίου με διάλυμα 1xPBS, που περιείχε 100 µg/ml PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 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 2.8).

Πίνακας 2.8: Διάλυμα λύσης κυττάρων και εκχύλισης κυτταρικών πρωτεϊνών

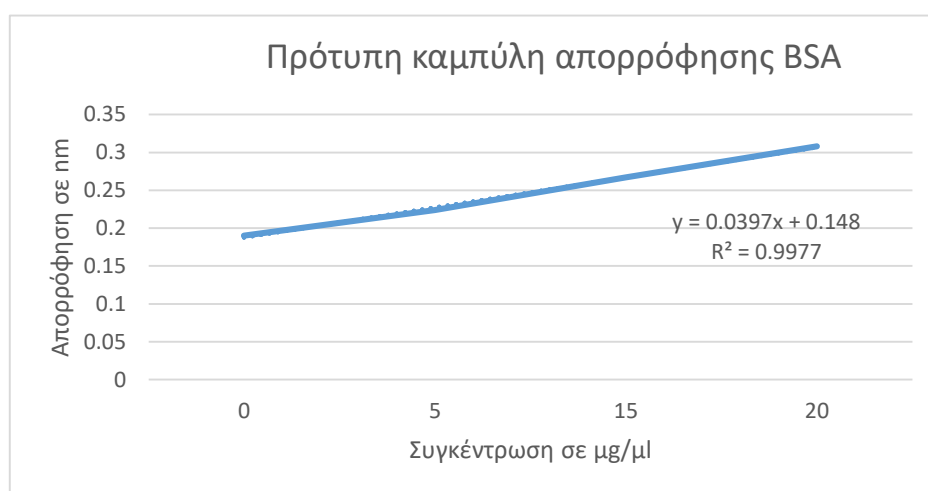
Ουσία	Τελική συγκέντρωση
Tris-Cl pH 8.0	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
PMSF	100 µg/ml
DTT(Dithiothreitol)	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
β-glycerolphosphate	10 mM

Το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου erpendorf, και αφού επώαστηκε για 10 λεπτά στους 4°C (σε πάγο), φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, 5µl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, με τη μέθοδο Bradford, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο Dot Blot.

2.10 Μέθοδος Bradford

Η μέτρηση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον.

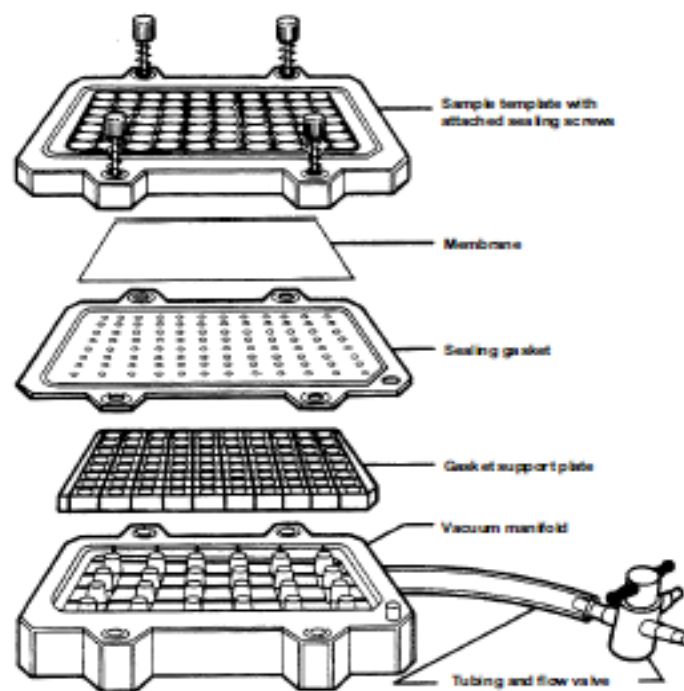
Τα 5 μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του πρωτεϊνικού λύματος αναμίχθηκαν με 795 μl απεσταγμένο νερό και 200μl από το αντιδραστήριο και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 595 nm. Οι τιμές της απορρόφησης από το φωτόμετρο μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης με αλβουμίνη (Bovine serum albumin - BSA) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

2.11 Μέθοδος Dot Blot

Η συσκευή του dot blot (Bio Dot, Microfiltration Apparatus, Biorad) (Εικόνα 2.4) και ιδίως το ελαστικό τμήμα αυτής διαποτίστηκε με απεσταγμένο νερό. Μembrάνη νιτροκυτταρίνης, στο αντίστοιχο μέγεθος της συσκευής (11.5x8 εκατοστά), τοποθετήθηκε για 20-30 λεπτά σε TBS και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στη συσκευή του dot blot όπως φαίνεται στην εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4: Συσκευή για τη μέθοδο Dot Blot

Ακολούθως, σε κάθε πηγαδάκι της συσκευής τοποθετήθηκε 100μl TBS, για ενυδάτωση με τη βοήθεια αντλίας κενού αέρος. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της αντλίας κενού αέρος τοποθετήθηκαν 50μl πρωτεΐνης από το δείγμα μας και 100μl TBS σε κάθε πηγαδάκι και αφήσαμε να προσροφηθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη αφαιρέθηκε από τη συσκευή και ακολούθησε η χρώση των πρωτεϊνών με 3-hydroxy - 4 - (2 - sulfo - 4 - [4-sulforphenylazo]phenylazo) -2,7- naphthalenedisulfonic acid sodium salt (Ponceau S) για 5 λεπτά και φωτογράφιση.

Ακολούθησαν πλύσεις υπό ανάδευση με TBS για να φύγει εντελώς η χρωστική και οι μεμβράνες επώστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα blocking solution (Πίνακας 2.8). Μετά την επώση ακολούθησαν 2 πλύσεις με TBS-Tween 20 των 10 λεπτών υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και επώση με το πρώτο αντίσωμα (Πίνακας 2.10) στους 4°C όλο το βράδυ.

Την επόμενη ημέρα, κάναμε 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBS-T (Πίνακας 2.8) υπό ανάδευση. Προσθέσαμε ακολούθως το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος (Πίνακας 2.10) και ακολούθησε επώση για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Κάναμε 3 πλύσεις ως ακολούθως: 1^η των 15 λεπτών με TBS-Tween, 2^η των 5 λεπτών με TBS- Tween και η 3^η των 5 λεπτών με TBS. Με την έναρξη των πλύσεων βγάλαμε από το ψυγείο τη λουμινόλη και το κουμαρικό. Τη λουμινόλη την τοποθετήσαμε σε ποτήρι ζέσεως με νερό για να ξεπαγώσει πιο γρήγορα, ενώ το κουμαρικό ξεπαγώνει εύκολα σε θερμοκρασία δωματίου. Εμφανίσαμε τη μεμβράνη σε μηχανήμα imager (UVITEC, Cambridge), προσθέτοντας διάλυμα λουμινόλης

(10ml λουμινόλη + 100μl κουμαρικό+ 50μl H₂O₂) στο δοχείο. Αφήσαμε 2-5 λεπτά το δοχείο με το διάλυμα λουμινόλης στο σκοτάδι και μετά εμφανίσαμε στο μηχάνημα.

Πίνακας 2.8: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Dot Blot

TBS 0.1 M, pH 7.4	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
TBS-T	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0.05%
Blocking Solution	
BSA σε TBS-T	5%
BSA/TBS-T (Ab-I solution)	
BSA σε TBS-T	0.1%

Για την επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε Stripping Buffer (Πίνακας 2.9) για 20 λεπτά ως εξής: α) προσθήκη του stripping buffer για 10 λεπτά β) αφαίρεση γ) προσθήκη stripping buffer, εκ νέου, για άλλα 10 λεπτά. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών με TBS υπό ανάδευση και 2 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με TBS-Tween 20 υπό ανάδευση. Στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε Blocking Solution ως εξής: α) 30 λεπτά με BSA/TBS-Tween 20 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και β) 30 λεπτά με γάλα/ TBS-Tween 20 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T υπό ανάδευση και προσθήκη αντισώματος σε διάλυμα Ab-I solution (Πίνακας 2.8) και επώαση για 24 ώρες υπό ανάδευση στην τραμπάλα στους 4°C.

Πίνακας 2.9: Stripping Buffer, pH 2.2

Χημικές Ουσίες	Συγκέντρωση
Γλυκίνη	1.5% (w/v)
SDS	0.1-1% (w/v)
Tween 20 σε απεσταγμένο νερό	1% (w/v)

Πίνακας 2.10: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Dot Blot

1^ο αντίσωμα	Αραίωση	2^ο αντίσωμα	Αραίωση
anti-AMPK rabbit polyclonal antibody <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:1000	anti-rabbit IgG <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:3000
anti-smooth muscle b-actin mouse monoclonal antibody <i>Sigma-Aldrich Chemie</i>	1:3000	anti-mouse IgG <i>Cell Signaling Technology Inc.</i>	1:2000

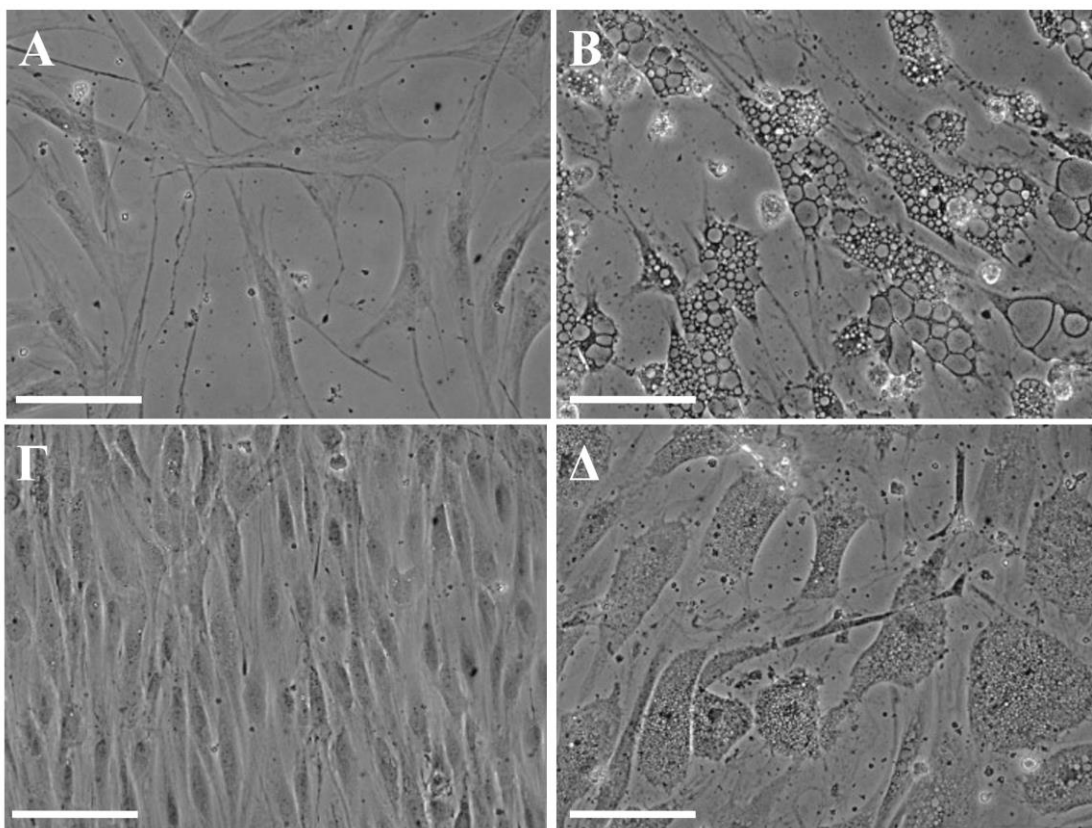
2.12 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των εικόνων του ανοσοφθορισμού και του Dot Blot έγινε με το σύστημα ανάλυσης εικόνας ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των μετρήσεων. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων όρων αναλύθηκαν με one-way ANOVA που ακολουθείται από τη δοκιμασία Bonferonni ή με Unpaired t test. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το $P < 0.05$.

3. Αποτελέσματα

3.1 Η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην μορφολογία των ΛΜΚ σε κυτταροκαλιέργειες

Η επώαση των ΛΜΚ με αζιθρομυκίνη 10^{-5} M για 72 ώρες παρουσία ή απουσία 10% FBS είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό, κυτταροπλασματικών κυστιδίων που θυμίζουν αυτοφαγία (Εικόνα 3.1). Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού και επώαστηκαν παρουσία αζιθρομυκίνης εμφανίζουν περισσότερα και πιο εμφανή κυστίδια (Εικόνα 3.1B) σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% FBS και αζιθρομυκίνης (Εικόνα 3.1Δ).

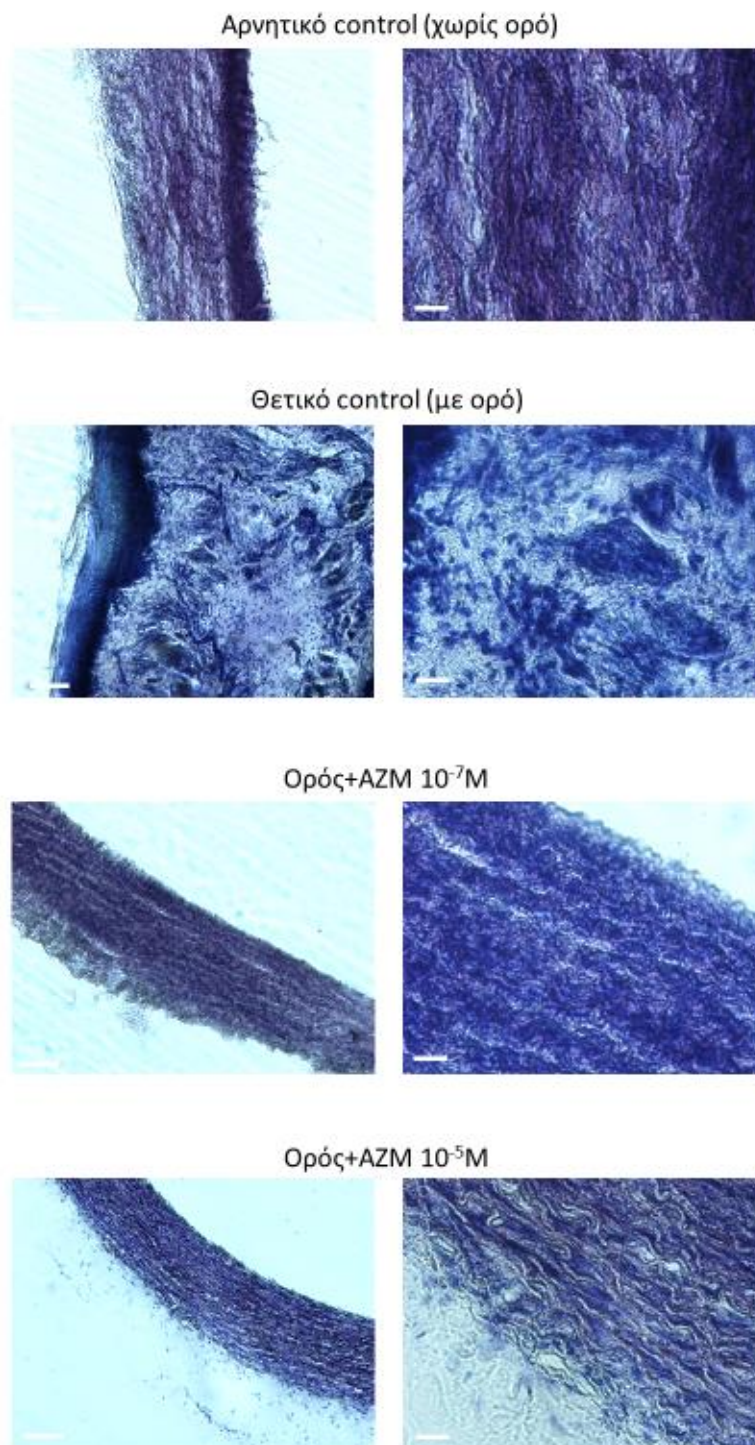


Εικόνα 3.1: Επίδραση της αζιθρομυκίνης σε συγκέντρωση 10^{-5} M για 72 ώρες στη μορφολογία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. Κύτταρα που στερούνται ορού επώαστηκαν απουσία (A) ή παρουσία αζιθρομυκίνης (B) ή κύτταρα που επώαστηκαν σε 10% FBS μόνο (Γ) και 10% FBS με αζιθρομυκίνη (Δ). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με ανεστραμμένο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40x, ράβδος κλίμακας=100μm.

3.2 Η επίδραση της αζιθρομυκίνης στη μορφολογία του ιστού σε καλλιέργειες αορτικών δακτυλίων

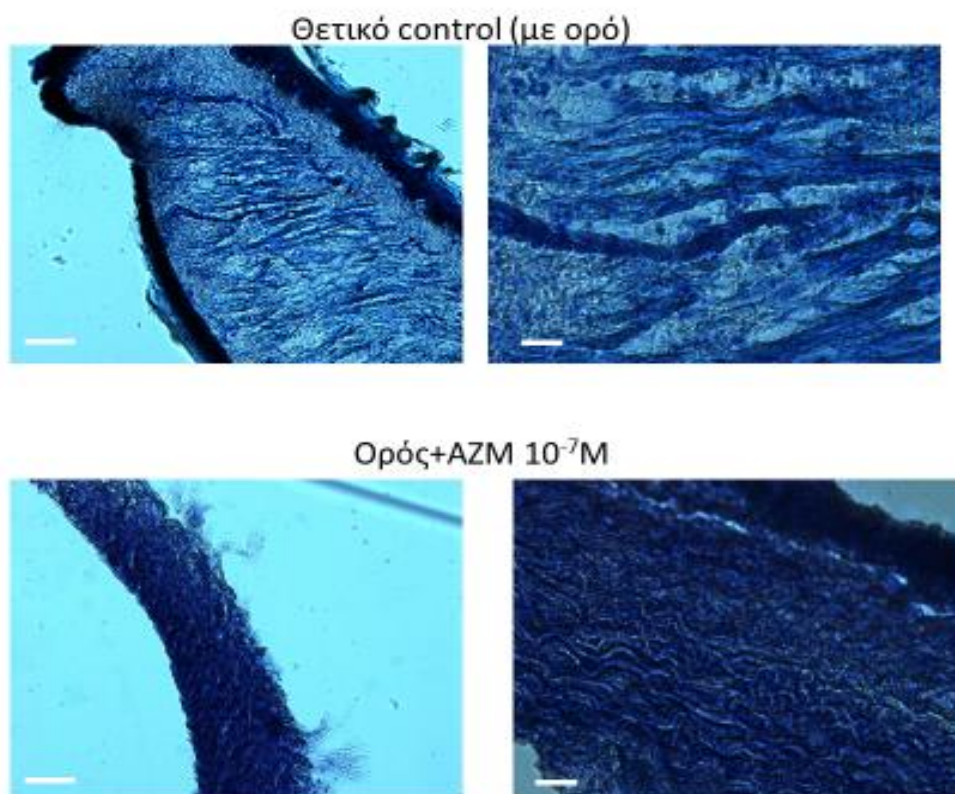
Για να διαπιστωθεί αν η αζιθρομυκίνη επηρεάζει τη μορφολογία των ΛΜΚ σε επίπεδο ιστού, δακτύλιοι αορτής κουνελιού επωάστηκαν για 24 ώρες με αζιθρομυκίνη και στη συνέχεια έγινε χρώση τομών των ιστών αυτών με χρώση Cresyl Violet, τολουδίνη και ανοσοφθορισμό έναντι της α ακτίνης των ΛΜΚ (Εικόνες 3.2, 3.3, 3.4).

Η χρώση Cresyl Violet χρησιμοποιεί βασική βαφή ανιλίνης για να χρωματίσει μπλε το RNA και DNA των κυττάρων και χρησιμοποιείται κυρίως σε ιστολογικές μελέτες του νευρικού ιστού. Η μορφολογία των λείων μυϊκών ινών που επωάστηκαν παρουσία 10% FBS και αζιθρομυκίνης και στις δύο συγκεντρώσεις (10^{-7} M ή 10^{-5} M) ήταν κυματοειδής σε σύγκριση με την ιστολογική εικόνα των λείων μυϊκών ινών στις τομές που επωάστηκαν απουσία του φαρμάκου (Εικόνα 3.2). Δεν παρατηρήθηκαν εμφανή κυστίδια στα ΛΜΚ.



Εικόνα 3.2: Ιστοχημική χρώση τομών αγγείων κουνελιού με *cresyl violet*. Οι τομές επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού ή σε 10% FBS απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκεντρώσεις $10^{-7}M$ ή $10^{-5} M$. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 20 μ m).

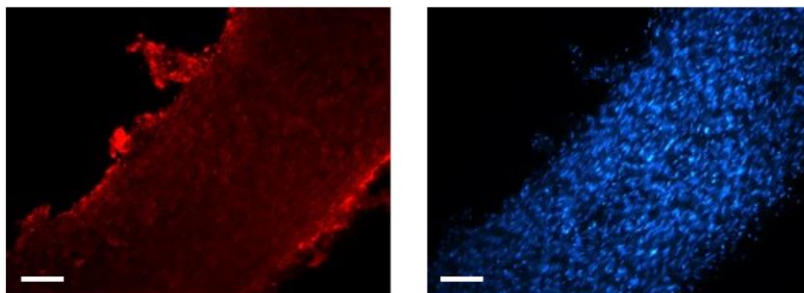
Το μπλε της τολουιδίνης είναι μια χρωστική θειαζίνης με υψηλή συγγένεια για όξινα συστατικά των ιστών, χρωματίζοντας έτσι ιστούς πλούσιους σε DNA και RNA. Παρόμοια με τη χρώση Cressyl violet, η μορφολογία των λείων μυϊκών ινών που επώαστηκαν παρουσία 10% FBS και αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση $10^{-7}M$ ήταν κυματοειδής σε σύγκριση με την ιστολογική εικόνα των λείων μυϊκών ινών στις τομές που επώαστηκαν απουσία του φαρμάκου (Εικόνα 3.3). Δεν παρατηρήθηκαν εμφανή κυστίδια στα ΛΜΚ.



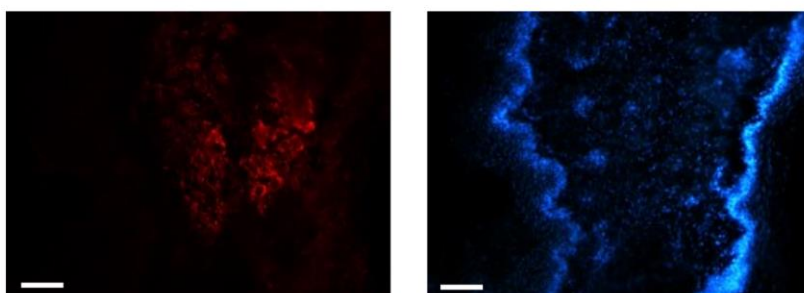
Εικόνα 3.3: Χρώση τομών αρτηρίας που επώαστηκαν για 24 ώρες σε 10% FBS παρουσία ή απουσία αζιθρομυκίνης ($10^{-7}M$) με toluidine blue. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = $100\mu m$) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = $20\mu m$).

Στη συνέχεια με έμμεσο ανοσοφθορισμό μελετήθηκε η έκφραση της α -ακτίνης του κυτταροσκελετού. Στα κύτταρα εντοπίστηκε α -ακτίνη λείου μυός, με την χαρακτηριστική για ΛΜΚ κατανομή της στον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίστηκαν με χρωστική DAPI ειδική για πυρηνική χρώση (Εικόνα 3.4). Δεν παρατηρήθηκε η κυματοειδής μορφή όπως στις χρώσεις Cresyl Violet και Toluidine Blue, ούτε κυστίδια.

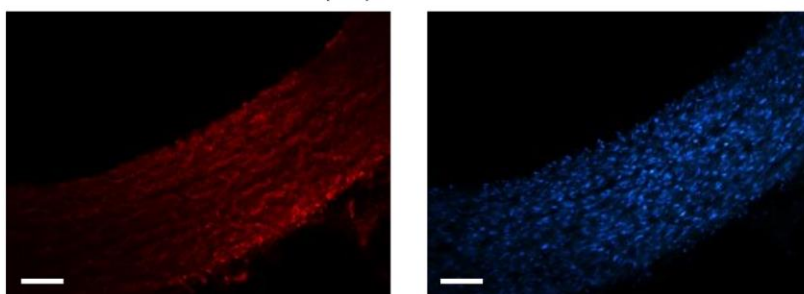
Αρνητικό control (χωρίς ορό)



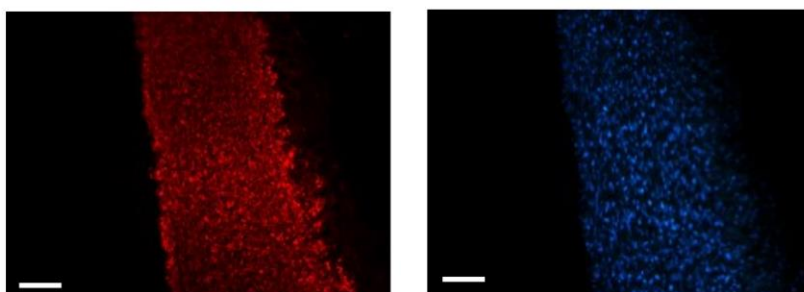
Θετικό control (με ορό)



Ορός+AZM 10^{-7} M



Ορός+AZM 10^{-5} M



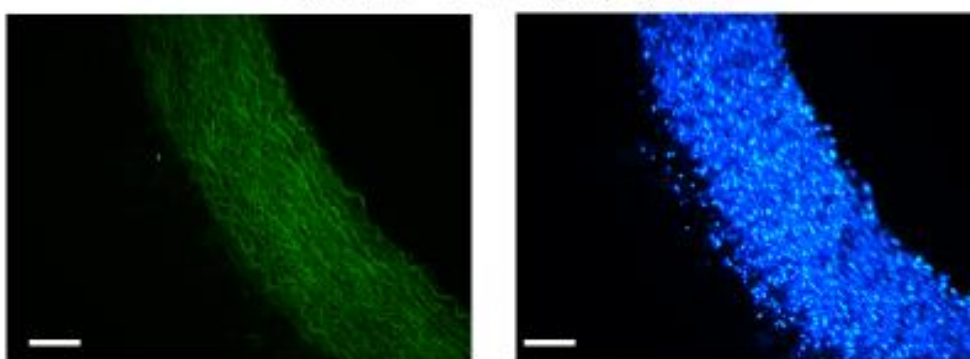
Εικόνα 3.4: Έκφραση της α -ακτίνης σε τομές αορτής που επώαστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού ή σε 10% FBS απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκεντρώσεις 10^{-7} M ή 10^{-5} M. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m).

3.3 Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αυτοφαγία

Διερευνήθηκε, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, η επίδραση της αζιθρομυκίνης στην έκφραση των πρωτεϊνών Beclin και LC3, που εμπλέκονται στην αυτοφαγία, σε τομές από δακτύλιους αορτής. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η παρουσία της αζιθρομυκίνης και στις δύο συγκεντρώσεις ($10^{-7}M$ και $10^{-5}M$) αυξάνει την έκφραση τόσο της Beclin (Εικόνα 3.7), όσο και της LC3 (Εικόνα 3.8).

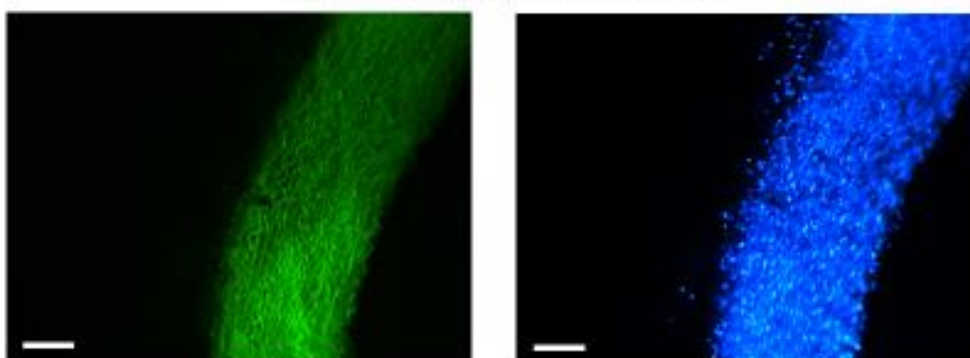
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η ένταση του σήματος αυξήθηκε και για τις δύο πρωτεΐνες (Beclin και LC3) στις τομές που επωάστηκαν απουσία ορού και αζιθρομυκίνης για 24 ώρες (αρνητικό control, εικόνα 3.5 και εικόνα 3.6).

Αρνητικό control (χωρίς ορό)



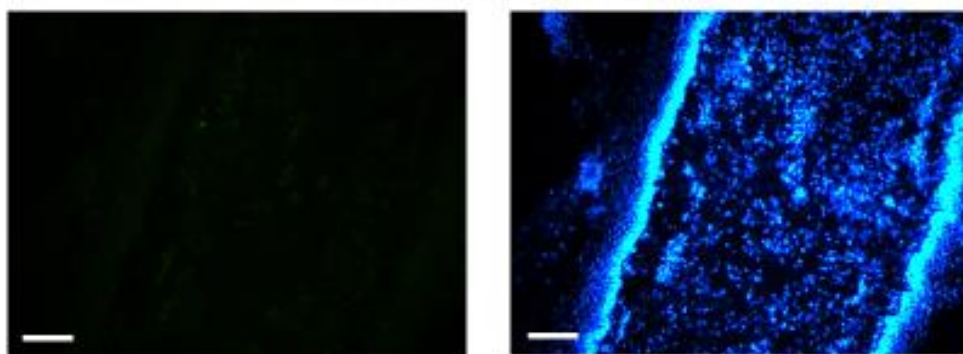
Εικόνα 3.5: Ανοσοφθορισμός τομών αγγείων κουνελιού με αντίσωμα για την Beclin. Οι τομές επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού και αζιθρομυκίνης. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m).

Αρνητικό control (χωρίς ορό)

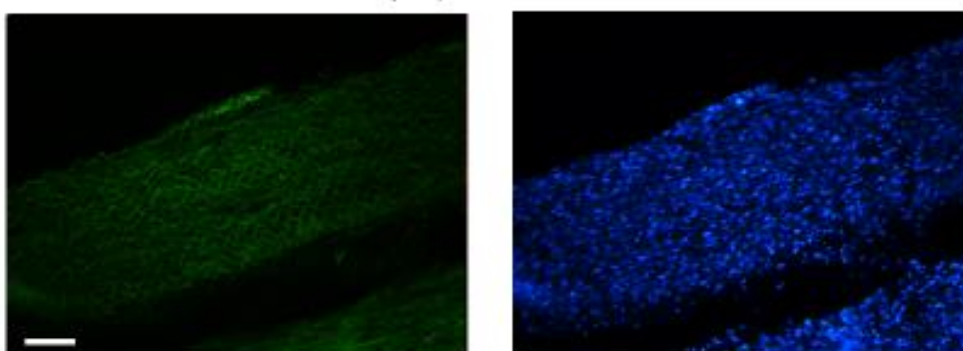


Εικόνα 3.6: Ανοσοφθορισμός τομών αγγείων κουνελιού με αντίσωμα για την LC3. Οι τομές επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού και αζιθρομυκίνης. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m).

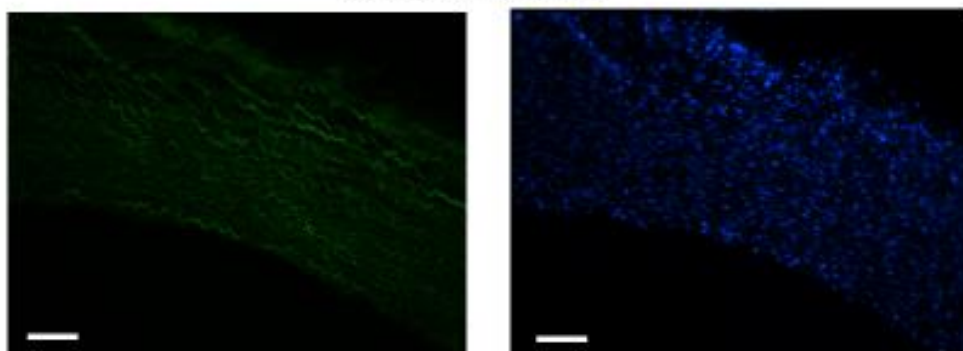
Θετικό control (με ορό)



Ορός+AZM $10^{-7}M$



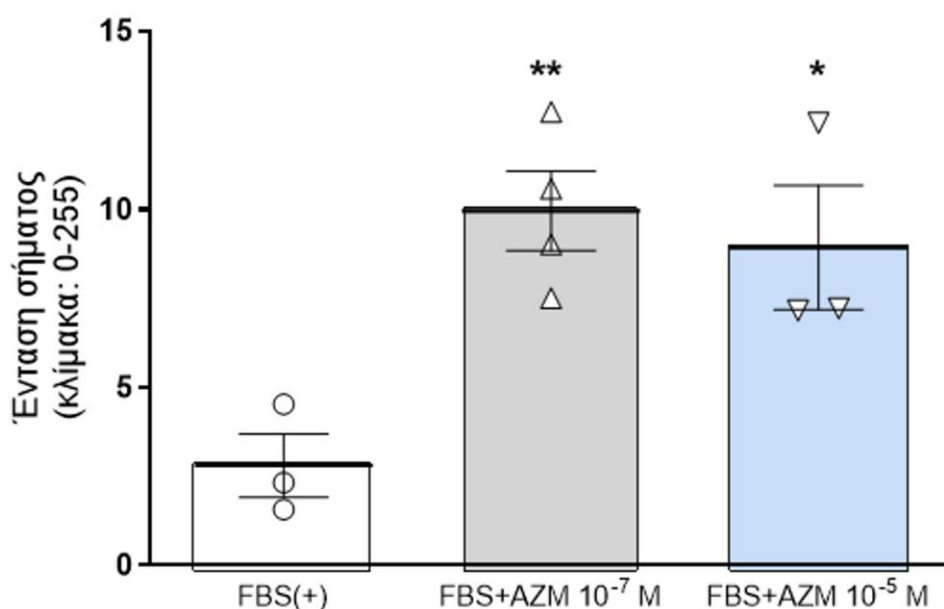
Ορός+AZM $10^{-5}M$



Εικόνα 3.7: Ανοσοφθορισμός τομών αγγείων κουνελιού με αντίσωμα για την Beclin. Οι τομές επωάστηκαν για 24 ώρες σε 10% FBS απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκεντρώσεις $10^{-7}M$ ή $10^{-5} M$. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m).

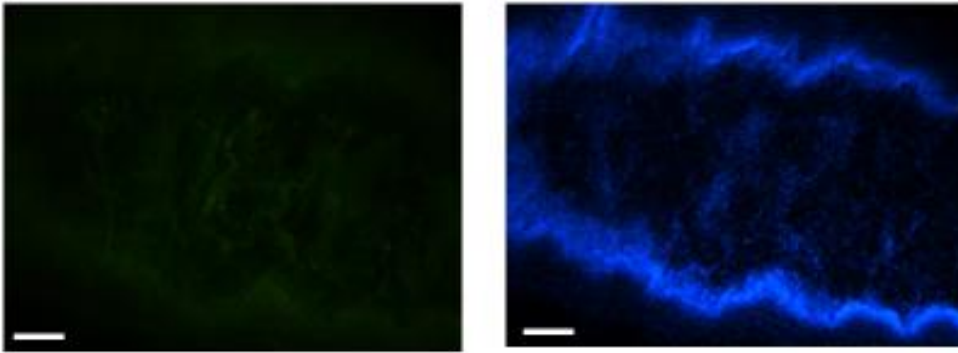
Η ποσοτικοποίηση των παραπάνω αποτελεσμάτων με τη χρήση του προγράμματος ImageJ Graphpad Prism έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση ($P<0.05$) στην έκφραση της Beclin (Διάγραμμα 1) και της LC3 (Διάγραμμα 2) στις τομές που επώαστηκαν με αζιθρομυκίνη 10^{-7} M ή 10^{-5} M για 24 ώρες σε σύγκριση με τις τομές που επώαστηκαν παρουσία ορού και απουσία αζιθρομυκίνης. Η ένταση του σήματος ήταν:

- 18.5 ± 4 μονάδες για τα ΛΜΚ που επώαστηκαν απουσία ορού
- 2.8 ± 0.89 μονάδες για τα ΛΜΚ που επώαστηκαν μόνο με ορό
- 10 ± 1.1 για τα ΛΜΚ που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-7} M
- 8.9 ± 1.7 για τα ΛΜΚ που επώαστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-5} M

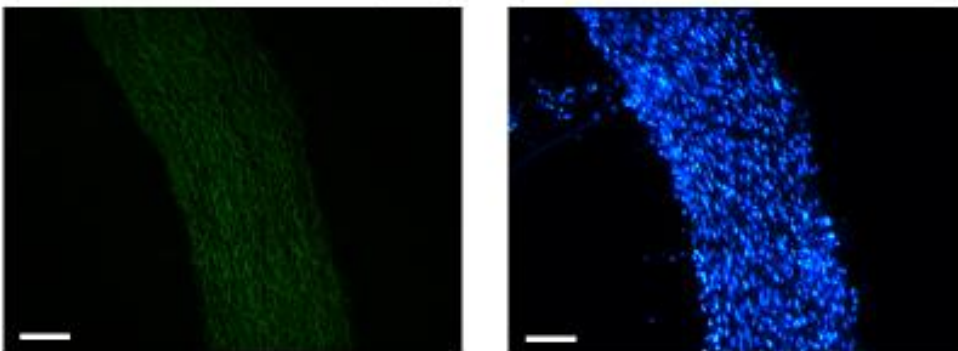


Διάγραμμα 1: Ένταση σήματος της Beclin σε τομές που επώαστηκαν παρουσία ορού (FBS+) απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκέντρωση 10^{-7} M (FBS+AZM 10^{-7} M) και 10^{-5} M (FBS+AZM 10^{-5} M). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MO \pm SEM από ένα πείραμα και μετρήσεις σε 3-4 τομές. * $p<0.05$ και ** $p<0.01$ σε σύγκριση με FBS(+).

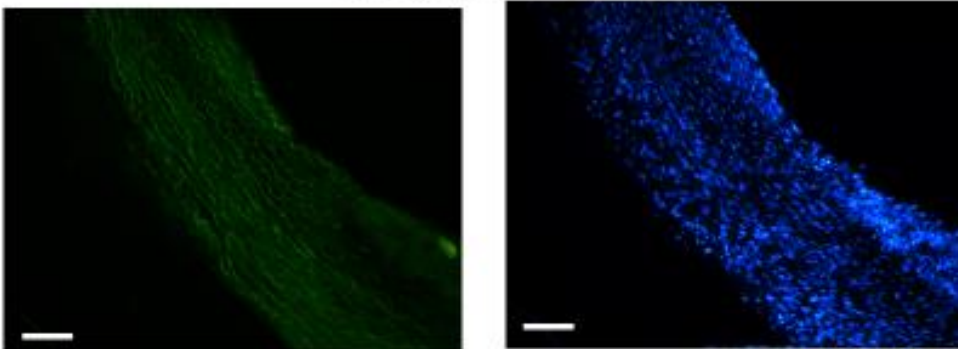
Θετικό control (με ορό)



Ορός+AZM 10^{-7} M



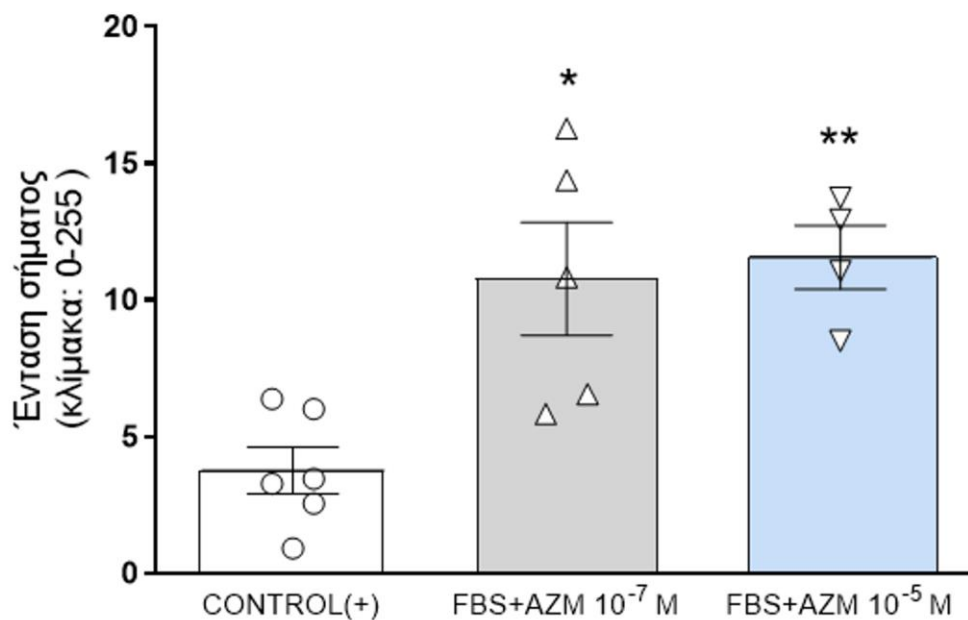
Ορός+AZM 10^{-5} M



Εικόνα 3.8: Ανοσοφθορισμός τομών αγγείων κουνελιού με αντίσωμα για την LC3. Οι τομές επωάστηκαν για 24 ώρες σε 10% FBS απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκεντρώσεις 10^{-7} M ή 10^{-5} M. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (αριστερά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m) και 40x (δεξιά, ράβδος κλίμακας = 100 μ m).

Η ένταση του σήματος ήταν:

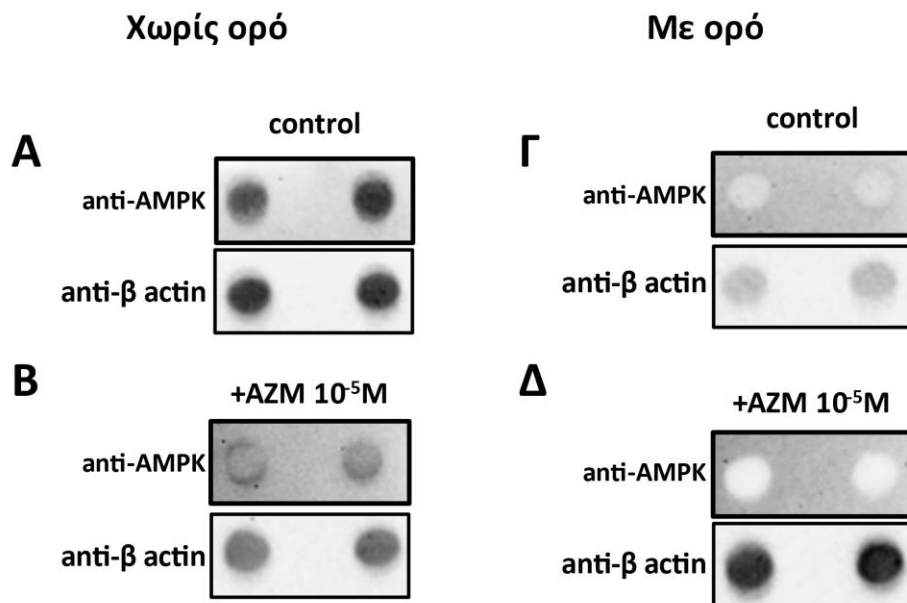
- 17.6 \pm 1.1 μονάδες για τα ΛΜΚ που επωάστηκαν απουσία ορού
- 3.8 \pm 0.9 μονάδες για τα ΛΜΚ που επωάστηκαν μόνο με ορό
- 10.8 \pm 2.1 για τα ΛΜΚ που επωάστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-7} M
- 11.6 \pm 1.2 για τα ΛΜΚ που επωάστηκαν με ορό και αζιθρομυκίνη σε συγκέντρωση 10^{-5} M



Διάγραμμα 2: Ένταση σήματος της LC3 σε τομές που επώαστηκαν παρουσία ορού (FBS+) απουσία ή παρουσία αζιθρομυκίνης σε συγκέντρωση 10^{-7} M (FBS+AZM 10^{-7} M) και 10^{-5} M (FBS+AZM 10^{-5} M). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως MO \pm SEM από ένα πείραμα και μετρήσεις σε 3-4 τομές. * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με FBS(+).

3.4 Μελέτη της έκφρασης της AMPK

Σε ομογενοποιημένα κυττάρων που επώαστηκαν χωρίς ορό ή παρουσία 10% FBS και με ή χωρίς αζιθρομυκίνη διερευνήθηκε με ανοσοαποτύπωση η έκφραση της AMPK. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9, η AMPK επάγεται απουσία αζιθρομυκίνης (Εικόνα 3.9A και Γ) και η έκφραση της είναι πιο έντονη απουσία ορού (Εικόνα 3.9A και Β). Η παρουσία της αζιθρομυκίνης στο υλικό καλλιέργειας του ιστού ελάττωσε την έκφραση του AMPK, τόσο απουσία (Εικόνα 3.9B) όσο και παρουσία ορού (Εικόνα 3.9Δ).



Εικόνα 3.9 : Επαγωγή της σηματοδότησης AMPK. Ανοσοαποτύπωση της ποσότητας της πρωτεΐνης με αντίσωμα για την ακτίνη και με αντίσωμα για την AMPK σε ΛΜΚ αορτής κουνελιού. Ανοσοαποτύπωση με Dot Blot σε (Α) ΛΜΚ χωρίς ορό και χωρίς αζιθρομικίνη, (Β) χωρίς ορό παρουσία αζιθρομικίνης (Γ) με ορό απουσία αζιθρομικίνης και (Δ) με ορό παρουσία αζιθρομικίνης

4. Συζήτηση

Η αζιθρομυκίνη, μία από τις σημαντικότερες μακρολίδες, είναι σημαντική για μακροχρόνια χορήγηση σε χρόνιες παθήσεις τόσο του αναπνευστικού (πανβρογχολίτιδας, βρογχοεκτασία) (49,51,52), όσο και του καρδιαγγειακού (αθηροσκλήρωση, στεφανιαία νόσος) συστήματος(74,74). Πέραν της αντιμικροβιακής της δράσης η αζιθρομυκίνη έχει βρεθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση (31), επηρεάζει τον τόνο των ΛΜΚ και προκαλεί αυτοφαγία και αναστολή του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ του αναπνευστικού. (40)

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε κατά πόσον η αζιθρομυκίνη επηρεάζει την μορφολογία των ΛΜΚ των αγγείων τόσο σε επίπεδο καλλιέργειας όσο και σε επίπεδο ιστού. Στις καλλιέργειες των ΛΜΚ, η αζιθρομυκίνη προκάλεσε τον σχηματισμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων, χαρακτηριστικό της αυτοφαγίας. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με παρόμοια ευρήματα σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού (40,79) και ανθρώπου (80), όπως και σε ΛΜΚ αγγείων κουνελιού [Σταματίου μη δημοσιευμένα αποτελέσματα]. Παρόμοια σε επίπεδο ιστού, η αζιθρομυκίνη επάγει τις πρωτεΐνες Becl1n και LC3 που εμπλέκονται στην αυτοφαγία. Οι πρωτεΐνες LC3 και Becl1n συμμετέχουν στο σχηματισμό κυστιδίων που παρατηρούνται κατά την αυτοφαγία.

Σε επίπεδο ιστού επίσης, στις χρώσεις Cresyl Violet και Toluidine Blue διαπιστώσαμε ότι η αζιθρομυκίνη άλλαξε τη μορφολογία των λείων μυϊκών ινών καθώς απέκτησαν μια κυματοειδής μορφή. Η κυματοειδής αυτή μορφή των λείων μυϊκών ινών μπορεί να αποδοθεί ή στη μεταβολή του τόνου των ΛΜΚ (79) ή σε μεταβολές της εξωκυττάριας ουσίας (81). Μελέτες σύσπασης σε παρασκευάσματα ιστών από κουνέλια έδειξαν ότι η αζιθρομυκίνη επηρεάζει τον τόνο των ΛΜΚ. Ειδικότερα προκαλεί χάλαση των ΛΜΚ της τραχείας (79) και σύσπαση σε ΛΜΚ δωδεκαδακτύλου (82) Φαίνεται να υπάρχει μια αλληλοεπίδραση μεταξύ ECM και αυτοφαγίας καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία ρυθμίζεται από πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνα και τα πρωτεολυτικά επεξεργασμένα θραύσματά τους (81,83). Άλλος ένας λόγος που η μορφολογία των λείων μυϊκών ινών μεταβάλλεται σε αλλαγές της ECM είναι πως τα ΛΜΚ δείχνουν υψηλότερο επίπεδο αυτοφαγίας σε άκαμπτο υπόστρωμα (83), το οποίο προκαλεί τη μετάβαση των κυττάρων από τον συσταλτό στον συνθετικό φαινότυπο. Κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, τα αγγεία γίνονται δύσκαμπτα, ενώ τα υγιή αιμοφόρα αγγεία είναι μαλακά και τα αγγειακά ΛΜΚ εκτελούν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση, μετατοπίζοντας τα στον φλεγμονώδη/συνθετικό φαινότυπο και αυξάνοντας αντίστοιχα τη σύνθεση της ECM (83). Στον ανοσοφθορισμό δε φάνηκε τόσο έντονα αυτή η κυματοειδής μορφή των ΛΜΚ. Ο αρχικός χαρακτηρισμός των κυττάρων έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό και χρησιμοποιήθηκαν με αντισώματα κατά της α-ακτίνης, επιβεβαιώνοντας τον κυτταρικό τύπο τους. Τα ΛΜΚ εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή

στον κυτταροσκελετό τους σε συγκεκριμένους σχηματισμούς, που δημιουργούν ένα πρότυπο αποκλειστικά για τα ΛΜΚ.

Τέλος διερευνήσαμε κατά πόσο το μονοπάτι της AMPK εμπλέκεται στην επαγόμενη από την αζιθρομυκίνη αυτοφαγία. Η ανοσοαποτύπωση Dot Blot έδειξε ότι η έκφραση της AMPK απουσιάζει παρουσία της αζιθρομυκίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK/mTOR δεν εμπλέκεται στη δράση της αζιθρομυκίνης. Ένα άλλο πιθανό μονοπάτι το οποίο μπορεί να εμπλέκεται είναι το μονοπάτι του NF-κB. Ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συμμετέχει και αυτός στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. (84)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη φάνηκε επαγωγή της αυτοφαγίας σε ΛΜΚ που επώαστηκαν χωρίς ορό και χωρίς αζιθρομυκίνη, καθώς αυξήθηκαν οι πρωτεΐνες LC3 και Beclin. Επίσης η AMPK εκφράζεται σε ιστούς απουσία αζιθρομυκίνης και μάλιστα η έκφραση της ήταν αυξημένη σε ιστούς που επώαστηκαν απουσία ορού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι απουσία ορού στα ΛΜΚ επάγεται αυτοφαγία μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού AMPK/mTOR. (85)

Συμπερασματικά, η αζιθρομυκίνη στα αγγεία επάγει την αυτοφαγία σε ΛΜΚ τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο ιστού και αλλάζει την μορφολογία των λείων μυϊκών ινών. Η πρόκληση της αυτοφαγίας δεν μεσολαβείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της AMPK. Αντίθετα το μονοπάτι αυτό φαίνεται πως εμπλέκεται στην αυτοφαγία που προκαλείται σε ΛΜΚ απουσία αζιθρομυκίνης και ορού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilson DP. Vascular Smooth Muscle Structure and Function. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534250/>
2. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):767-801. doi: 10.1152/physrev.00041.2003. PMID: 15269336
3. Hafen BB, Burns B. Physiology, Smooth Muscle. [Updated 2021 Aug 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526125/>
4. Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL.. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:E481–E495
5. Wede OK, Löfgren M, Li Z, Paulin D, Arner A.. Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice. *J Physiol* 2002; 540:941–949.
6. Fisher SA. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics* 2010; 42A:169–187.
7. Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular research*, 114(4), 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
8. Sweeney, H. L., & Hammers, D. W. (2018). Muscle Contraction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(2), a023200. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>
9. Granzier HL, de Tombe PP. Myosin light chain phosphorylation to the rescue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jul 28;112(30):9148-9. doi: 10.1073/pnas.1511455112. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26157138; PMCID: PMC4522798.
10. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 46: 200–204, 2005. doi:10.1161/01.HYP.0000168052.00426.65.)
11. Wang, X., & Khalil, R. A. (2018). Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.), 81, 241–330. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>
12. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:121–131
13. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology.* 2005;56:173–189.
14. Cui Y, Takamatsu H, Kakiuchi T, Ohba H, Kataoka Y, Yokoyama C, Onoe H, Watanabe Y, Hosoya T, Suzuki M, Noyori R, Tsukada H. Neuroprotection by a central nervous system-type prostacyclin receptor ligand demonstrated in monkeys subjected to middle cerebral artery occlusion and reperfusion: a positron emission tomography study. *Stroke.* 2006;37:2830–2836.
15. Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res.* 2004;94:68–76.

16. Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S, Matrougui K. Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation*. 2004;110:3587–3593
17. Sorokin, V., Vickneson, K., Kofidis, T., Woo, C. C., Lin, X. Y., Foo, R., & Shanahan, C. M. (2020). Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Frontiers in immunology*, 11, 599415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599415>
18. Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev*. 2017 Oct 1;97(4):1555-1617. doi: 10.1152/physrev.00003.2017. PMID: 28954852.
19. Sinha S, Iyer D, Granata A. Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Jun;71(12):2271-88.]
20. Bargehr J, Low L, Cheung C, Bernard WG, Iyer D, Bennett MR, Gambardella L, Sinha S. Embryological Origin of Human Smooth Muscle Cells Influences Their Ability to Support Endothelial Network Formation. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jul;5(7):946-59.
21. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
22. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*. 1967;33:437–449.
23. Yin XM, Ding WX, Gao W. Autophagy in the liver. *Hepatology*. 2008;47:1773–1785.
24. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:458–467.
25. Kohli, L., & Roth, K. A. (2010). Autophagy: cerebral home cooking. *The American journal of pathology*, 176(3), 1065–1071. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090850>
26. Marquez, R. T., & Xu, L. (2012). Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *American journal of cancer research*, 2(2), 214–221.
27. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
28. Wirawan, E., Berghe, T., Lippens, S. et al. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 22, 43–61 (2012). <https://doi.org/10.1038/cr.2011.152>
29. Maiuri, M., Zalckvar, E., Kimchi, A. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741–752 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
30. Sandman Z, Iqbal OA. Azithromycin. [Updated 2021 Oct 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557766/>
31. Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014 Aug;143(2):225-45.
32. Culic, O., Erakovic, V., Cepelak, I., Barisic, K., Brajsa, K., Ferencic, Z., et al. (2002). Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol* 450, 277–289.

33. Bartold, P. M., du Bois, A. H., Gannon, S., Haynes, D. R., & Hirsch, R. S. (2013). Antibacterial and immunomodulatory properties of azithromycin treatment implications for periodontitis. *Inflammopharmacology* 21, 321–338
34. Carevic, O., & Djokic, S. (1988). Comparative studies on the effects of erythromycin A and azithromycin upon extracellular release of lysosomal enzymes in inflammatory processes. *Agents Actions* 25, 124–131.
35. Ianaro, A., Ialenti, A., Maffia, P., Sautebin, L., Rombola, L., Carnuccio, R., et al. (2000). Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 156–163
36. Ivetic Tkalcovic, V., Cuzic, S., Kramaric, M. D., Parnham, M. J., & Erakovic Haber, V. (2012). Topical azithromycin and clarithromycin inhibit acute and chronic skin inflammation in sensitized mice, with apparent selectivity for Th2-mediated processes in delayed type hypersensitivity. *Inflammation* 35, 192–205.
37. Culic, O., Erakovic, V., & Parnham, M. J. (2001). Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 429, 209–229.
38. Spagnolo, P., Fabbri, L. M., & Bush, A. (2013). Long-term macrolide treatment for chronic respiratory disease. *Eur Respir J* 42, 239–251.
39. Suresh Babu, K., Kastelik, J., & Morjaria, J. B. (2013). Role of long term antibiotics in chronic respiratory diseases. *Respir Med* 107, 800–815.
40. Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2009 Sep;34(3):721-30. doi: 10.1183/09031936.00089407. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19386688.
41. Fa, N., Lins, L., Courtoy, P. J., Dufrene, Y., Van Der Smissen, P., Brasseur, R., et al. (2007). Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1830–1838.
42. Tyteca, D., Van Der Smissen, P., Van Bambeke, F., Leys, K., Tulkens, P. M., Courtoy, P. J., et al. (2001). Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, impairs fluid-phase pinocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 80, 466–478.
43. Munic, V., Banjanac, M., Kostrun, S., Nujic, K., Bosnar, M., Marjanovic, N., et al. (2011). Intensity of macrolide anti-inflammatory activity in J774A.1 cells positively correlates with cellular accumulation and phospholipidosis. *Pharmacol Res* 64, 298–307.
44. Tamaoki J, Takeyama K, Tagaya E, et al. Effect of clarithromycin on sputum production and its rheological properties in chronic respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1688–1690.
45. Imperi F, Leoni L, Visca P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2014;5:178.
46. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PO, et al. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;404(14):282–288
47. Parnham M, Haber VE, Giamarellos-Bourboilis EJ, et al. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014;143:225–245.
48. Principi N, Blasi F, Esposito S. Azithromycin use in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1071–1079.
49. Yanagihara K, Kadoto J, Kohno S. Diffuse panbronchiolitis—pathophysiology and treatment mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:S83–S87.

50. Haworth CS, Bilton DB, Elborn JS. Long-term macrolide maintenance therapy in non-CF bronchiectasis: evidence and questions. *Respir Med.* 2014;108:1397–1408
51. McShane PJ, Naureckas ET, Tino G, et al. Non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(6):647–656.
52. Cramer et al. Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician. *Postgrad Med.* 2017;129(5):493-499.
53. Owens RC, Nolin TD. 2006. Antimicrobial-associated QT interval prolongation: points of interest. *Clin Infect Dis* 43:1603–1611. doi:10.1086/508873.
54. Ray WA, Murray KT, Hall K, Arbogast PG, Stein CM. 2012. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. *N Engl J Med* 366:1881–1890. doi:10.1056/NEJMoa1003833
55. US Food and Drug Administration (FDA). 2013. FDA drug safety communication: azithromycin (zithromax or zmax) and the risk of potentially fatal heart rhythms. US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD.
56. Gorelik et al. Systematic Review, Meta-analysis, and Network Meta-analysis of the Cardiovascular Safety of Macrolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(6):e00438-
57. Schembri S, Williamson PA, Short PM, Singanayagam A, Akram A, Taylor J, Singanayagam A, Hill AT, Chalmers JD. 2013. Cardiovascular events after clarithromycin use in lower respiratory tract infections: analysis of two prospective cohort studies. *BMJ* 346:f1235. doi:10.1136/bmj.f1235.
58. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):48–52.
59. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation.* 1998;97(7):633–636.
60. Boman J, Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:1-20.
61. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* 1998; 177:1322-5.
62. Yamaguchi H, Haranaga S, Widen R, Friedman H, Yamamoto Y. *Chlamydia pneumoniae* infection induces differentiation of monocytes into macrophages. *Infect Immun* 2002~ 70:2392-8
63. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874. 3.
64. Kockx MM, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 2000;190:267-280.
65. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *J A M A* 2002;288:2724-2731.
66. Neureiter D, Heuschmann P, Stintzing S, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not of *Helicobacter pylori* in symptomatic atherosclerotic carotids associated with enhanced serum antibodies, inflammation and apoptosis rate. *Atherosclerosis* 2003;168:153-162.
67. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
68. Sessa et al. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: current state and future prospectives. *Int J ImmunopatholPharmacol.* 2009;22(1):9-14.
69. Stintzing et al. Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with *Chlamydia pneumoniae*, inflammation, and apoptosis. *Ann Vasc Surg.* 2005;19(3):310-319

70. Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiol Rev* 2000;8:31-39.
71. Jander S, Sitzer M, Wendt A, et al. Expression of tissue factor in high-grade carotid artery stenosis: association with plaque destabilization. *Stroke* 2001;32:850-854.
72. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503.
73. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000;31:40-47.
74. Muhlestein JB. Antibiotic treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(6):605-614.
75. Dogra J. Oral azithromycin in extended dosage schedule for chronic, subclinical *Chlamydia pneumoniae* infection causing coronary artery disease: a probable cure in sight? Results of a controlled preliminary trial. *Int J Gen Med.* 2012;5:505-509.
76. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel T, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomized trial. *Thorax.* 2002;57(3):212–216.
77. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290(13):1749–1756.
78. Oldfield EC, 3rd, Fessel WJ, Dunne MW, et al. Once weekly azithromycin therapy for prevention of *Mycobacterium avium* complex infection in patients with AIDS: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *Clin Infect Dis.* 1998;26(3):611–619.
79. Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulis KI, Molyvdas PA. Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2006 Dec 28;553(1-3):280-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.09.041. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17070799.
80. Tagaya, E., Tamaoki, J., Konno, K., 1994. Erythromycin inhibits cholinergic neuro-effector transmission in canine airway smooth muscle. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85, 181–192.
81. Schaefer L, Dikic I. Autophagy: Instructions from the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 2021 Jun;100-101:1-8. doi: 10.1016/j.matbio.2021.06.002. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34217800.
82. Faisal R, Nabi M, Ali N, Ali Shah SW, Shakirullah . Azithromycin induced contractile responses of intestinal smooth muscles: A mechanistic approach. *Pak J Pharm Sci.* 2020 Sep;33(5(Special)):2385-2392.].
83. Hu, M., Jia, F., Huang, W. P., Li, X., Hu, D. F., Wang, J., Ren, K. F., Fu, G. S., Wang, Y. B., & Ji, J. (2020). Substrate stiffness differentially impacts autophagy of endothelial cells and smooth muscle cells. *Bioactive materials*, 6(5), 1413–1422. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.10.013>
84. Ying Y, Sun CB, Zhang SQ, Chen BJ, Yu JZ, Liu FY, Wen J, Hou J, Han SS, Yan JY, Yang ZS, Xiong L. Induction of autophagy via the TLR4/NF-κB signaling pathway by astragaloside IV contributes to the amelioration of inflammation in RAW264.7 cells. *Biomed Pharmacother.* 2021 May;137:111271. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111271. Epub 2021 Feb 6. PMID: 33561643.
85. Holczer, M., Hajdú, B., Lőrincz, T. *et al.* Fine-tuning of AMPK–ULK1–mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Sci Rep* **10**, 17803 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75030-8>