



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ : ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΔΟΝΤΙΚΑ

ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

ΑΝΔΡΙΚΟΥΛΑ ΘΕΟΦΑΝΗ

ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

Επιβλέπων Καθηγητής για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής

Εργασίας: κ. Κιτράκη Ευθυμία.

Τριμελής Επιτροπή για την αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

1. κ. Κιτράκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Βιολογίας
2. κ. Βασταρδή Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Στόματος
3. κ. Ουλής Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παιδοδοντιατρικής

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
I. ΟΔΟΝΤΙΚΟΣ ΠΟΛΦΟΣ.....	8
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ	8
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ	9
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ	15
II. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	17
ΠΡΟΩΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣ (STRESS-INDUCED PREMATURE SENESENCE, SIPS)	19
ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΚΛΙΝΙΚΑ	23
III. ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗ (TRX)	26
IV. ERdj5 (ENDOPLASMIC RETICULUM DNA J DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 5) ή DNAJC10	27
V. ΟΔΟΝΤΙΝΙΚΗ ΣΙΑΛΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (DSP)	29
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
I. ΣΚΟΠΟΣ	31
II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	32
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ	32
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	35
ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	36
ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΠΡΟΩΡΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣ	37
ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	38
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	40
ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)	42
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	52
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	54
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ TRX1, ERdj5 ΚΑΙ DSP ΣΕ ΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	55

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ..	60
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	61
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ TRX1, ERdj5 ΚΑΙ DSP ΣΤΑ ΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	62
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΩΝ	67
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	69
ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ DSP, ERdj5 ΚΑΙ TRX1	69
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	71
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ DSP, ERdj5 ΚΑΙ TRX1.....	72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	75
I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	76
II. SUMMARY	78
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα δόντια αποτελούν βασικό στοιχείο του στοματογναθικού συστήματος. Συμβάλλουν στη μάσηση, την ομιλία, την ανάπτυξη και το σχηματισμό των γνάθων, καθώς επίσης και στη γενικότερη μορφολογία και αισθητική του προσώπου.

Ο πολφός καταλαμβάνει τον εσωτερικό χώρο του δοντιού και έχει πολύ σημαντικό λειτουργικό ρόλο όσον αφορά την ανάπτυξη του δοντιού, την προστασία του από εξωγενή βλαπτικά ερεθίσματα, την επιδιόρθωση βλαβών που συμβαίνουν σε αυτό και τη θρέψη του. Η ικανότητα του πολφικού ιστού να επιτελεί αυτές τις λειτουργίες επηρεάζεται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται.

Η γήρανση είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που συμβαίνει στον πολφό, όπως και στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, με το πέρασ του χρόνου. Μπορεί όμως να συμβεί και υπό την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων. Η γήρανση, λοιπόν, έχει επιπτώσεις στη μορφολογία, το μέγεθος και τη σύσταση του πολφού, μεταβάλλοντας την ικανότητά του να επιτελεί τις λειτουργίες του.

Έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα διάφοροι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στη γήρανση των πολφικών κυττάρων, μαζί με τις επιπτώσεις τους σε κάποιες από τις λειτουργίες των κυττάρων αυτών. Σημαντικό είναι να διερευνηθούν οι μηχανισμοί πρόκλησης φαινοτυπικών και λειτουργικών μεταβολών στον πολφό κατά τη γήρανση για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε τη φυσιολογία του φαινομένου αλλά και να βρούμε τρόπους να το καθυστερήσουμε ή και να ελαχιστοποιήσουμε τις επιπτώσεις του.

Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί κυρίως σε παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν στρες στα πολφικά κύτταρα (όπως οι ακτινοβολίες, η δράση τοξικών ουσιών και διάφορα γενικά νοσήματα) και στο πώς αυτοί ρυθμίζουν τις βιοχημικές ισορροπίες του κυττάρου που εμπλέκονται με το οξειδωτικό στρες. Αναμένεται περαιτέρω μελέτη και σε άλλα κυτταρικά συστήματα, όπως σε αυτά που αφορούν την αντιμετώπιση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, για να διαλευκανθούν περισσότεροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στο πολύπλοκο φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθούν μόρια που συμμετέχουν στην απόκριση σε κυτταρικό στρες αλλά και στη δυνατότητα των πολφικών κυττάρων για ενασβεστίωση της οδοντίνης σε δύο διαφορετικά μοντέλα γήρανσης, αυτά της αναπαραγωγικής και της επαγόμενης από στρες πρόωρης γήρανσης.

Το σύγγραμμα αυτό αποτελείται από γενικό και ειδικό μέρος. Στο γενικό, αναφέρονται βασικές πληροφορίες για την εμβρυολογία, την ιστολογία και τις λειτουργίες του πολφού. Ακόμα, περιγράφεται η γήρανση σε κυτταρικό και κλινικό επίπεδο, όπως επίσης παρέχονται στοιχεία για τις υπό-μελέτη πρωτεΐνες θειορεδοξίνη, ERdj5 και οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη. Το ειδικό μέρος περιλαμβάνει το σκοπό της εργασίας, τη μεθοδολογία, τα αποτελέσματα, τη συζήτηση – συμπεράσματα, την ελληνική και αγγλική περίληψη και τέλος τη βιβλιογραφία.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος της Βιολογίας Στόματος και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγήτρια

Βιολογίας κ. Κιτράκη Ευθυμία, τόσο για την καθημερινή και ανελλιπή της καθοδήγηση σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο όσο και για τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Για τις γνώσεις και για τη συνεχή ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος της Βιολογίας Στόματος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Βασταρδή Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Στόματος.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ουλή Κωνσταντίνο, Καθηγητή Παιδοδοντιατρικής, για όλες τις γνώσεις που μου έχει προσφέρει και την υποστήριξή του αυτά τα χρόνια.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κυριακίδου Κυριακή και την κ. Διαμαντή Κέλλυ για την εκπαίδευση στις τεχνικές των κυτταροκαλλιιεργειών και τη συμβολή τους στην οργάνωση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Μαρκοπούλου-Παπαδοπούλου Κλεοπάτρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Περιοδοντολογίας, για την παραχώρηση του Εργαστηρίου Κυτταροκαλλιιεργειών για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οδοντίατρο κ. Ήντα Μαρία για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την εγκάρδια υποστήριξή της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στις συμφοιτήτριες μου για την καθημερινή αλληλοϋποστήριξη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την υποστήριξή τους σε κάθε επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΟΔΟΝΤΙΚΟΣ ΠΟΛΦΟΣ

«Οδοντικός πολφός ονομάζεται ο χαλαρός συνδετικός ιστός που καταλαμβάνει την πολφική κοιλότητα, δηλαδή τον εσωτερικό χώρο του δοντιού που αφορίζεται περιφερικά από την περιπολφική οδοντίνη και ακρορριζικά από το επίπεδο της οστεϊνοοδοντινικής σύναψης στην περιοχή του ακρορριζικού τρήματος. Αποτελεί τη λειτουργική συνέχεια της πολυδύναμης οδοντικής θηλής που από το στάδιο του κυπέλλου μέχρι το τέλος της διάπλασης της ρίζας έχει τον έλεγχο της βιολογικής διεργασίας της οδοντικής ανάπτυξης» (Συκαράς 2007).

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Η διάπλαση των δοντιών ξεκινά με τη μετανάστευση μεσεγγυματικών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας σε περιοχές της άνω και κάτω γνάθου. Κάποια από αυτά είναι εξειδικευμένα για το σχηματισμό των δοντιών. Συγκεκριμένα, η διάπλαση των δοντιών από την 6^η εμβρυϊκή εβδομάδα μέχρι την ολοκλήρωση του σχηματισμού τους καθορίζεται από αλληλεπιδράσεις αυτών των εξωμεσεγγυματικής προέλευσης κυττάρων με κύτταρα από το στοματικό εξώδερμα, τα οποία δημιουργούν μία πεταλοειδή πάχυνση, την οδοντική ταινία. Καθώς η οδοντική ταινία αναπτύσσεται μέσα στο μεσέγγυμα, αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν τα οδοντικά σπέρματα. Στη συνέχεια, το επιθηλιακής προέλευσης τμήμα σχηματίζει το όργανο της αδαμαντίνης, στην κοίλη επιφάνεια του οποίου βρίσκεται ένα σύνολο από μεσεγγυματικά κύτταρα (Carlson 1999). Αυτά μπορεί να μην προέρχονται μόνο από τη νευρική ακρολοφία, αλλά και από το παραξονικό μεσόδερμα ή να βρίσκονταν

εκεί προγενέστερα (Goldberg and Smith 2004). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν την οδοντική θηλή, από την οποία θα προέλθει ο πολφός (Yu and Abbott 2007), όταν θα εμφανιστεί η πρώτη ενασβεστωμένη μήτρα στην κορυφή του φύματος του οδοντικού σπέρματος κατά το στάδιο του κώδωνα (Nanci 2012). Τότε γίνεται και η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων που σχηματίζουν τα δόντια από τα προγονικά/βλαστικά κύτταρα (Larmas and Sandor 2014).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Ο οδοντικός πολφός αποτελείται από εξωκυττάρια μήτρα, νεύρα, αγγεία και διαφορετικούς τύπους κύτταρων.

Η **εξωκυττάρια μήτρα** του πολφού περιέχει κυρίως ίνες κολλαγόνου τύπου I και III (56% και 41% αντίστοιχα). Οι ίνες κολλαγόνου τύπου V και VI ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες (2% και 0,5% αντίστοιχα). Όσον αφορά τα μη κολλαγονούχα συστατικά, κυρίαρχη είναι η φμπρονεκτίνη. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες στον πολφό σχετίζονται με πρωτεΐνες, οπότε συναντώνται ως γλυκοπρωτεΐνες με βασικές τη δεκορίνη, τη βιογλυκάνη και τη βερσικάνη. Άλλα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας είναι η σιαλοπρωτεΐνη του οστού, η οστεοπροτεγερίνη, το υαλουρονικό οξύ και διάφορα φωσφολιπίδια. Στον πολφό επίσης ανευρίσκονται αυξητικοί παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι αυτοί που ανήκουν στην υπερικογένεια του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) (Goldberg and Smith 2004).

Τα **κύτταρα** του οδοντικού πολφού μπορεί να ανήκουν στα μόνιμα κυτταρικά στοιχεία ή να είναι μη μόνιμα αμυντικά κύτταρα.

1) Οι **οδοντινοβλάστες** αποτελούν τα υψηλότερης διαφοροποίησης κύτταρα του πολφικού ιστού και ανήκουν στα μόνιμα κυτταρικά στοιχεία. Δεν πολλαπλασιάζονται μετά τη διαφοροποίησή τους, γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως μετα-μιτωτικά κύτταρα. Η βασική τους λειτουργία έγκειται στην εναπόθεση προοδοντίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του δοντιού. Το σχήμα και το μέγεθος του κυτταρικού σώματός τους καθώς και ο προσανατολισμός των οργανιδίων τους βρίσκονται σε άμεση συνάρτηση με το βαθμό λειτουργικής διαφοροποίησης και συνθετικής δραστηριότητας (Coune 1986). Συγκεκριμένα, οι νεαρές οδοντινοβλάστες έχουν υψηλό κυλινδρικό σχήμα και πληθώρα οργανιδίων. Καθώς όμως ωριμάζουν, το ύψος τους μειώνεται και τα εναπομείναντα από την αυτοφαγική δραστηριότητα οργανίδια συγκεντρώνονται στη βάση του κυττάρου (Coune 1986). Αυτή η μετάβαση από το εκκριτικό στο ώριμο στάδιο θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα που παρατηρείται σε αυτά τα κύτταρα ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται, όπως είχαν παρατηρήσει οι Simon και συνεργάτες (2009) σε πολφό από βόειους τομείς.

2) Οι **ινοβλάστες** αποτελούν τα πολυπληθέστερα κύτταρα του πολφού και είναι μόνιμα κυτταρικά στοιχεία. Παρ' όλο που φαίνονται μορφολογικά παρόμοιες μεταξύ τους, αποτελούν ετερογενή πληθυσμό (Moule et al 1995, Tsukamoto et al 1992). Το σχήμα τους είναι επίμηκες και τα καλά

αναπτυγμένα οργανίδια τους υποδεικνύουν τη βιοσυνθετική ικανότητα τους. Περιέχουν επίσης λυσοσώματα, παρ' όλο που δεν είναι ακόμα γνωστό αν τα ίδια κύτταρα συμμετέχουν στη σύνθεση και τον καταβολισμό των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (Goldberg and Smith 2004). Το κύριο συστατικό της βιοσυνθετικής τους λειτουργίας είναι το κολλαγόνο τύπου III, όμως συμμετέχουν και στη σύνθεση γλυκοζαμινογλυκανών και γλυκοπρωτεϊνών. Διαφέρουν από τις ινοβλάστες άλλων τύπων συνδετικού ιστού από το γεγονός ότι παραμένουν για μακρά περίοδο της ζωής του δοντιού σε αδιαφοροποίητη μορφή (Συκαράς 2007).

- 3) Τα **ινοκύτταρα** αποτελούν ανενεργές μορφές ινοβλαστών. Η έλλειψη βιοσυνθετικής δραστηριότητας αντικατοπτρίζεται στα διαφορετικά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Συναντώνται κυρίως σε ώριμους πολφούς ως μόνιμα κυτταρικά στοιχεία (Συκαράς 2007).
- 4) Τα **αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα** ανευρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στον πολφό. Μοιάζουν με τις ινοβλάστες, αν και έχουν μικρότερο μέγεθος και οργανίδια. Ανήκουν στα μόνιμα κυτταρικά στοιχεία και η συνήθης εντόπισή τους είναι περιαγγειακή. Διατηρούν πολυδύναμη βιολογική συμπεριφορά όσο παραμένουν αδιαφοροποίητα και σε περιπτώσεις φλεγμονής ή επανόρθωσης διαιρούνται δίνοντας θυγατρικές μορφές, οι οποίες ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους τύπους κυττάρων του πολφικού ιστού (Συκαράς 2007, Larmas and Sandor 2014). Τα τελευταία χρόνια, έχει δειχθεί η ικανότητα αυτών των κυττάρων να διαφοροποιούνται in vitro και in vivo

σε οδοντινοβλάστες, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, ηπατοκύτταρα και κύτταρα του νευρικού ιστού (Gronthos et al 2000, Ulmer et al 2010, Ishkitiev et al 2010, d' Aquino et al 2009, Huang et al 2008).

- 5) Τα **ιστιοκύτταρα ή μακροφάγα των ιστών** έχουν προέλευση από την αιματική κυκλοφορία ή από τη διαφοροποίηση πολφικών κυττάρων και είναι επίσης μόνιμα κυτταρικά στοιχεία του πολφού. Έχουν ποικίλη μορφολογία, ενώ δεν εντοπίζονται συχνά σε υγιείς πολφούς δοντιών που δεν έχουν δεχθεί λειτουργικά ερεθίσματα, όπως είναι τα έγκλειστα (Συκαράς 2007).
- 6) Τα **περικύτταρα** συναντώνται στην εξωτερική επιφάνεια του αγγειακού τοιχώματος των προτριχοειδών και των μετααρτηριδίων. Έχει αναφερθεί η δυνατότητά τους να παράγουν συνδετικό ιστό γύρω από τα προτριχοειδή ή να διαφοροποιούνται σε οδοντινοβλάστες (Συκαράς 2007).
- 7) Τα **αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα** αποτελούν μόνιμα κυτταρικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος του πολφού και ανευρίσκονται κυρίως ανάμεσα στις οδοντινοβλάστες. Ο ρόλος τους σχετίζεται με την αναγνώριση αντιγονικών ερεθισμάτων και τη διέγερση παραγωγής ειδικών T λεμφοκυττάρων (Jontell et al 1998, Συκαράς 2007).
- 8) Τα **μη μόνιμα αμυντικά κύτταρα** που ανευρίσκονται στον πολφό των δοντιών περιλαμβάνουν μακροφάγα, πλασματοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και μαστοκύτταρα. Υπάρχει διαφωνία για το αν αυτά τα κύτταρα υπάρχουν σε πολφούς ακέραιων δοντιών που δεν έχουν

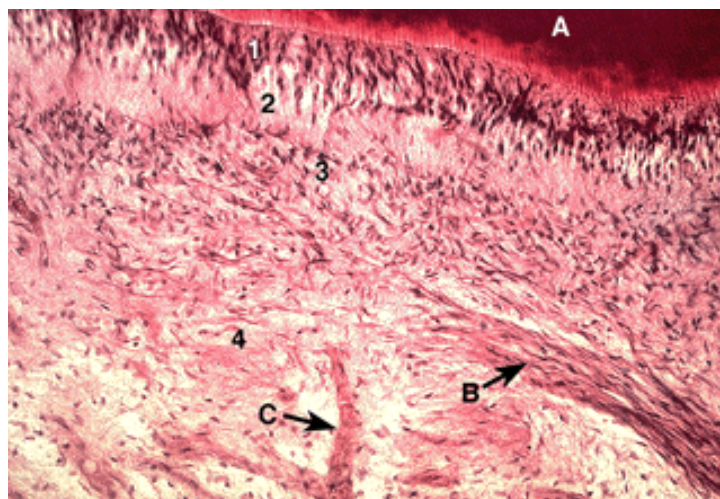
δεχθεί βλαπτικά ερεθίσματα, εκτός από τις μεταβατικές μορφές της λεμφοκυτταρικής σειράς. Η παρουσία τους συνδέεται κυρίως με αντιγονικής φύσης ερεθίσματα που δέχεται ο πολφός από το στοματικό περιβάλλον (Goldberg and Smith 2004, Συκαράς 2007).

Ο οδοντικός πολφός μπορεί να διαιρεθεί στις εξής **περιοχές** (εικόνα Α1):

- 1) Οδοντινοβλαστική στιβάδα. Βρίσκεται σε επαφή με την προοδοντίνη και περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των οδοντινοβλαστών. Ιστολογικά παρατηρείται πασσαλοειδής διάταξη στιβάδων βασεόφιλων κυττάρων υψηλού κυλινδρικού σχήματος. Κατά τη μετάβαση από το μυλικό στο ριζικό πολφό η στιβάδα αυτή λεπτύνεται, ενώ τα κύτταρα γίνονται περισσότερο κυβοειδή και κοντά στο ακρορριζικό τμήμα είναι αραιά και αποπλατυσμένα. Ανιχνεύονται ακόμη δενδριτικά κύτταρα ανάμεσα στις οδοντινοβλάστες.
- 2) Ακύτταρη ζώνη του Weil. Βρίσκεται κάτω από την οδοντινοβλαστική στιβάδα, στερείται κυττάρων και το εύρος της κυμαίνεται περί τα 40 μm . Περιλαμβάνει τριχοειδή από το υποοδοντινοβλαστικό αγγειακό πλέγμα, νευρικές ίνες του υποοδοντινοβλαστικού νευρικού πλέγματος και τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των ινοβλαστών της πολυκυτταρικής ζώνης. Η ακύτταρη ζώνη του Weil έχει την προαναφερθείσα εικόνα μόνο σε ακέραια δόντια μετά την ολοκλήρωση της ενεργητικής ανατολής. Αυτό συμβαίνει γιατί μετά την επίδραση βλαπτικών ερεθισμάτων διηθείται από αμυντικά κύτταρα.
- 3) Πολυκυτταρική ζώνη. Ανιχνεύεται κάτω από την ακύτταρη ζώνη μόνο στο μυλικό πολφό και όχι κοντά στο υποπολφικό τοίχωμα. Έχει μεγάλο αριθμό

κυττάρων σε σχέση με τον υπόλοιπο πολφό, κυρίως ινοβλάστες και αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, καθώς επίσης λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Εκτός από πολλά κύτταρα, περιλαμβάνει πολλά νεύρα και αγγεία. Χαρακτηριστικά κύτταρα που προέρχονται από τις προοδοντινοβλάστες (κύτταρα του Hohl) ανήκουν στη στιβάδα αυτή και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως κυτταρική εφεδρεία της οδοντινοβλαστικής στιβάδας. Ενδέχεται η έκθεση της μύλης στο στοματικό περιβάλλον να δρα ως ερέθισμα για τη δημιουργία της πολυκυτταρικής ζώνης με μετανάστευση κυττάρων από κεντρικότερα σημεία.

- 4) Κεντρική μοίρα του πολφικού ιστού. Χαρακτηρίζεται ως το παρέγχυμα του πολφικού ιστού. Είναι χαλαρός συνδετικός ιστός, αποτελούμενος από θεμέλια ουσία, κύτταρα και κολλαγόνες ίνες (Συκαράς 2007, Couve et al 2013).



Εικόνα Α1. Ιστολογική εικόνα που δείχνει τμήμα του οδοντικού πολφού. 1:Οδοντινοβλαστική στιβάδα, 2:Ακύτταρη ζώνη του Weil, 3:Πολυκυτταρική ζώνη, 4:Κεντρική μοίρα του πολφικού ιστού, A:Οδοντίνη, B:Νεύρο, C:Αιμοφόρο αγγείο.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Ο πολφός αποτελεί ένα εξειδικευμένο όργανο με σημαντική αποστολή κατά τη λειτουργική περίοδο του δοντιού. Ειδικότερα κατά τη μετα-αναπτυξιακή περίοδο, οι λειτουργίες του περιλαμβάνουν την παραγωγή και τροποποίηση της δομής της οδοντίνης, την αίσθηση, τη θρέψη και την άμυνα του ιστού, καθώς επίσης και την προστασία του δοντιού από τα φορτία που δέχεται κατά τη μάσηση (Συκαράς 2007, Yu and Abbott 2007).

Όσον αφορά στην **οδοντίνη**, παράγονται τρεις τύποι, που διαφέρουν μεταξύ τους μορφολογικά, βιολογικά και χρονολογικά. Η πρωτογενής οδοντίνη αποτελεί τον κύριο σκελετικό ιστό των δοντιών και παράγεται από τις οδοντινοβλάστες από τη αρχή της ανάπτυξης των δοντιών μέχρι την ανατολή τους σε θέση σύγκλεισης (Συκαράς 2007). Η δευτερογενής οδοντίνη εναποτίθεται επίσης από τις οδοντινοβλάστες περιφερειακά του πολφού με αργούς ρυθμούς καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός φυσιολογικού δοντιού (Yu and Abbott 2007). Η τριτογενής οδοντίνη παράγεται ως απάντηση σε βλαπτικά ή βιολογικά ερεθίσματα έναντι του συστήματος οδοντίνης-πολφού. Διακρίνεται σε αντιδραστική και επανορθωτική, ανάλογα με το είδος των κυττάρων από τα οποία παράγεται. Η πρώτη είναι προϊόν των οδοντινοβλαστών, ενώ η δεύτερη προκύπτει από κύτταρα που προσομοιάζουν με οδοντινοβλάστες και προέρχονται από αδιαφοροποίητα κύτταρα του πολφού (Συκαράς 2007, Yu and Abbott 2007).

Η **αισθητικότητα** του συστήματος οδοντίνης-πολφού προσφέρεται από ένα μεγάλο αριθμό εμμέλων και αμέλων νευρικών ινών που βρίσκονται στον πολφό και είναι κυρίως κλάδοι του τρίδυμου νεύρου (Συκαράς 2007). Ανεξάρτητα από τη φύση του

ερεθίσματος, ο πνεύμων τα μεταφράζει ως μια κοινή αίσθηση, τον πόνο. Αυτό συμβάλλει σημαντικά στον **αμυντικό μηχανισμό** του (Yu and Abbott 2007). Ανευρίσκονται επίσης λίγες προσαγωγές ίνες που ξεκινούν από το πρόσθιο αυχενικό γάγγλιο και συμβάλλουν στη ρύθμιση της πνευμονικής αιματικής κυκλοφορίας (Συκαράς 2007). Στον πνεύμό ακόμη βρίσκονται συμπαθητικές νευρικές ίνες που προέρχονται από το ανώτερο τραχηλικό συμπαθητικό γάγγλιο, ενώ οι μελέτες για την ύπαρξη παρασυμπαθητικών νεύρων έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι δύο τελευταίοι τύποι ινών ρυθμίζουν την αιματική κυκλοφορία στον πνεύμό και συμμετέχουν στη νευρογενή φλεγμονή (Κερεζούδης 1994).

Το αγγειακό πλέγμα του πνεύμου έχει πολύπλοκη οργάνωση και λειτουργία για να μπορεί να ανταποκρίνεται στις μεταβολικές ανάγκες του ιστού, εξυπηρετώντας την **παραγωγική, θρεπτική και αμυντική** λειτουργία του (Συκαράς 2007).

Ο πνεύμος παρουσιάζει και **ιδιοδεκτική** λειτουργία, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα φορτία που εφαρμόζονται στα δόντια από τους μασητήριους μύες και προστατεύοντάς τα από τραυματισμό (Yu and Abbott 2007).

II. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

Η κυτταρική γήρανση περιγράφηκε πριν από 50 χρόνια σαν μια διαδικασία που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε καλλιέργεια (Hayflick 1965). Ο όρος κυτταρική γήρανση αναφέρεται στη μη αντιστρεπτή αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης που συμβαίνει όταν τα φυσιολογικά κύτταρα με δυνατότητα πολλαπλασιασμού υπερβούν ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων (όριο Hayflick), με αποτέλεσμα να οδηγούνται σταδιακά σε γήρανση, εκφύλιση και θάνατο. Με εξαίρεση τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, τα περισσότερα κύτταρα με δυνατότητα διαίρεσης, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων στα πρώτα στάδια της εξαλλαγής τους, υφίστανται γήρανση (Miura et al 2004, Shay and Roninson 2004, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες. Γνωρίζουμε ότι η περιορισμένη ανάπτυξη των ανθρώπινων κυττάρων σε καλλιέργεια οφείλεται εν μέρει στην μείωση του μήκους των τελομερών, δηλαδή στη σταδιακή απώλεια DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων σε κάθε κύκλο αντιγραφής (Rodier and Campisi 2011). Επιπλέον τα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα δε διαθέτουν ενεργή τελομεράση, η οποία έχει τη δυνατότητα αποκατάστασης του μήκους των αλληλουχιών των τελομερών *de novo* (Harley et al 1990, Bodnar et al 1998). Αυτή η απώλεια, οδηγεί σε "απάντηση του κυττάρου σε βλάβη του DNA" (DNA damage response – DDR), η οποία με τη σειρά της ξεκινά και διατηρεί την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης (Rodier et al 2011). Η DDR επάγεται και από άλλου είδους βλάβες του DNA, καθώς επίσης και από έντονα μιτογόνα σήματα όπως αυτά που

προέρχονται από ενεργοποιημένα ογκογονίδια (Rodier and Campisi 2011, Matsumura 1980, Dumont et al 2000, Liu et al 1998).

Ο πιο φανερός δείκτης κυτταρικής γήρανσης είναι η αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Τα κύτταρα, δηλαδή, σταματούν να διαιρούνται. Ακόμα και οι έντονα αναπτυσσόμενες καλλιέργειες παρουσιάζουν ετερογένεια και περιέχουν ένα ποσοστό κυττάρων των οποίων η ανάπτυξη έχει ανασταλεί (Cristofalo and Sharf 1973). Αυτό το ποσοστό σταδιακά αυξάνεται έως ότου όλα τα κύτταρα μπαίνουν σε κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή σταματούν να διαιρούνται (Smith and Whitney 1980). Αυτή η παύση της διαίρεσης γίνεται κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και είναι μη αναστρέψιμη υπό την έννοια ότι οι αυξητικοί παράγοντες δε μπορούν να τη διεγείρουν (Sherwood et al 1988, Cristofalo and Pignolo 1993). Παρ' όλα αυτά, τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν μεταβολικά ενεργά για αρκετό διάστημα ακόμη (Goldstein 1990).

Ένας άλλος σημαντικός δείκτης κυτταρικής γήρανσης είναι η αλλαγή της κυτταρικής μορφολογίας και λειτουργίας. Καθώς τα κύτταρα γερνούν υπόκεινται σε διαδοχικές μορφολογικές μεταβολές (Bayreuther et al 1988). Συγκεκριμένα, αυξάνουν σε μέγεθος, αποκτούν ετερογένεια και γίνονται πιο ευαίσθητα στην "αναστολή εξ επαφής" με τα παρακείμενα κύτταρα. Επίσης υφίστανται αλλαγές στη δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων.

Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος σχετικός δείκτης είναι η σχετιζόμενη με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάση (SA β -gal). Το ένζυμο αυτό είναι μία λυσοσωμική υδρολάση, που είναι ενεργή στα νεαρά κύτταρα σε pH 4. Όμως στα γηρασμένα κύτταρα η υδρολάση αυτή είναι ενεργή και σε pH 6. Έτσι, μπορεί να αποτελέσει

δείκτη γηρασμένων κυττάρων και να ανιχνευθεί με μία βιοχημική δοκιμασία. Πράγματι, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, το ποσοστό των θετικών για τη SA β -gal κυττάρων αυξάνεται με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και την ηλικία, αντίστοιχα (Dimri et al 1995). Η SA β -gal φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αυξημένης λυσοσωμικής δραστηριότητας σε μη ιδανικό pH και γίνεται ανιχνεύσιμη στα γηρασμένα κύτταρα λόγω του αυξημένου λυσοσωμικού περιεχομένου τους (Kurz et al 2000). Άλλα αποτελέσματα υποδεικνύουν μάλιστα ότι η αύξηση της μάζας των λυσοσωμάτων και συνακόλουθα της σχετιζόμενης με τη γήρανση β -γαλακτοσιδάσης, συνδέονται με την αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα που υπάρχει κατά την γήρανση (Gerland et al 2003).

ΠΡΟΩΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣ (STRESS-INDUCED PREMATURE SENESCENCE, SIPS)

Πρόωρη κυτταρική γήρανση επαγόμενη από στρες (stress-induced premature senescence, SIPS) καλείται η πρώιμη εμφάνιση βιοδεικτών της αναπαραγωγικής γήρανσης μετά από έκθεση ανθρώπινων διπλοειδών κυττάρων σε υποκυτταροτοξικό στρες. Ετσι, η επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση έχει θεωρηθεί ως μία άλλη μορφή κυτταρικής γήρανσης κατά την οποία ένα υποτοξικό στρες μπορεί να επιταχύνει την εμφάνιση του γηρασμένου φαινότυπου (Brack et al 2000). Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επιταχύνουν ή και να πυροδοτήσουν την κυτταρική γήρανση, ένας εκ των οποίων είναι το οξειδωτικό στρες. Οι Horikoshi και συνεργάτες (1991) έδειξαν ότι το O_2 γίνεται κυτταροτοξικό όταν ξεπερνά τα επίπεδα του 50%.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ανάλογα με τη δόση του στρεσογόνου παράγοντα οι κυτταρικοί πληθυσμοί αντιδρούν με διαφορετικούς τρόπους. Για παράδειγμα, μία υψηλή -κυτταροτοξική- δοσολογία θα προκαλέσει τέτοια βλάβη, ώστε να μειωθούν οι κυτταρικές βιοχημικές δραστηριότητες οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Το επίπεδο της βλάβης καθορίζει το αν θα προκύψει κυτταρικός θάνατος, ενώ αν το ερέθισμα είναι ηπιότερο μπορεί να προκληθεί πρόωρη γήρανση. Καθώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί είναι ετερογενείς, η αυξανόμενη δόση του στρεσογόνου παράγοντα θα μεταβάλλει το ποσοστό των κυττάρων που θα αντιδράσουν με κάθε τρόπο, οδηγώντας αντίστοιχα σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γήρανση, απόπτωση ή νέκρωση (ανασκόπηση από Toussaint et al 2002α).

Η SIPS μπορεί να επαχθεί είτε από τη χρόνια έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες, είτε από μία μεμονωμένη ή από μικρές επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε αυτούς τους παράγοντες. Ακόμα και ογκογονίδια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως το *ras*, μπορούν να επάγουν την πρόωρη γήρανση (Serrano et al 1997). Στρεσογόνοι παράγοντες όπως η αιθανόλη, οι ιονίζουσες ακτινοβολίες η μυτομυκίνη-C , το O_2 και το H_2O_2 μπορούν να επάγουν SIPS σε πολλούς τύπους διαιρούμενων κυττάρων, όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, μελανοκύτταρα και οδοντικά πολφικά κύτταρα (Toussaint et al 2002β, Dierick et al 2003, Lee et al 2013).

Το H_2O_2 αποτελεί μία από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και συμμετέχει στο μηχανισμό πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προέρχονται είτε από φυσιολογικές μεταβολικές διαδικασίες του

ανθρώπινου οργανισμού, είτε από έκθεση σε ακτινοβολία, όζον, ατμοσφαιρικούς ρύπους, βιομηχανικά χημικά και κάπνισμα (Bagchi and Puri 1998). Η κυριότερη ενδογενής πηγή ROS για τον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια (Ebadi 2001). Στον οδοντικό πολφό, οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί επιπρόσθετα από κάποια οδοντιατρικά υλικά και μονομερή, από το μπλε φως του πολυμερισμού, από υποξία –π.χ. κατά την ορθοδοντική μετακίνηση- ή και λόγω ύπαρξης συστηματικών νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (Diamanti et al 2013, Yoshino et al 2012, Römer et al 2014, Leite et al 2008).

Το H_2O_2 είναι ένα ασθενές οξειδωτικό μέσο, όμως έχει τη δυνατότητα να οξειδώνει βιολογικά μόρια, με κύρια αυτά που διαθέτουν σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH), σύμπλοκα Fe-S, μόρια αίμης και χαλκού. Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι για το σχηματισμό του H_2O_2 . Ο πρώτος έχει ως αφετηρία το ανιόν του υπεροξειδίου, από το οποίο σχηματίζεται είτε απευθείας, είτε μέσω της δράσης του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Ο δεύτερος τρόπος αφορά στην άμεση μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μόριο του οξυγόνου, με τη μεσολάβηση ενζύμων των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και των υπεροξυσωμάτων. Το μόριο του H_2O_2 είναι σχετικά σταθερό και έχει τη δυνατότητα διάχυσης και δημιουργίας ριζών υδροξυλίου σε περιοχές όπου υπάρχουν ιόντα μετάλλων. Μπορεί ακόμα να διαπεράσει με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες, αφού στερείται ηλεκτρικού φορτίου, και να προκαλέσει καταστροφή σε οργανίδια του κυττάρου, αλλά και σε γειτονικά κύτταρα (Halliwell and Gutteridge 1985, Babior 1997, Fridovich 1999, Betteridge 2000).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου επιδρούν στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και κυρίως στο DNA των κυττάρων και προκαλούν βλάβες μέσω οξείδωσης με αποτέλεσμα δομικές και λειτουργικές διαταραχές. Ενδέχεται τα βιομόρια να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες οδηγώντας σε αλυσιδωτές αντιδράσεις που καταλήγουν στην πλήρη καταστροφή του κυττάρου (Halliwell and Gutteridge 1985, Martindale and Holbrook 2002).

Στο DNA, οι βλάβες που μπορεί να προκληθούν από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αφορούν στη διάσπαση μονών και διπλών αλυσίδων, αλλαγές στις νουκλεοτιδικές βάσεις, σύνδεση μορίων DNA ή DNA και πρωτεϊνών καθώς και στην ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων. Οι προαναφερθείσες βλάβες μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA ή ακόμα μεταλλάξεις που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (Marnett 2000).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών ανάλογα με την περιεκτικότητα της κάθε πρωτεΐνης σε αμινοξέα που αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες, με το πόσο κρίσιμα είναι αυτά τα αμινοξέα για τη λειτουργία της και με την ικανότητα που έχει το κύτταρο να επιδιορθώνει τις βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό ανενεργών συσσωματωμάτων πρωτεϊνών ή και σε καταστροφή τους. Βάσει του είδους της πρωτεΐνης που προσβάλλεται μπορεί να προκληθούν λειτουργικές μεταβολές στο κύτταρο ή και κυτταρικός θάνατος (Stadtman and Levine 2000, Gibson 2005).

Η αντίδραση των ελευθέρων ριζών με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία, συνδεδεμένα στα φωσfolιπίδια, σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες ονομάζεται υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αρχικά, η ελεύθερη ρίζα αφαιρεί ένα άτομο

υδρογόνου από το λιπαρό οξύ και οι μεταβολές που προκαλούνται μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και θάνατο του κυττάρου. Πριν από αυτό όμως, τα προϊόντα αυτής της διαδικασίας εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταφορά ασβεστίου και η δράση ενζύμων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων ίσως έχει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης και της γήρανσης (Steinberg 1997, Nordberg and Arnér 2001, Catalá 2010).

ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΚΛΙΝΙΚΑ

Οι μεταβολές στην κυρίως δομή της πρωτογενούς οδοντίνης, η παραγωγή δευτερογενούς οδοντίνης, οι μεταβολές στην οργάνωση και λειτουργία των πολφικών νεύρων και στην αρχιτεκτονική κατασκευή του πολφού είναι οι πιο σημαντικές μεταβολές στη δομή και λειτουργία του συστήματος οδοντίνης-πολφού με την ηλικία.

Οι μεταβολές στην **πρωτογενή οδοντίνη** αφορούν στο σχηματισμό νεκρών ζωνών και σκληρωτικής οδοντίνης.

Ως **δευτερογενής οδοντίνη** χαρακτηρίζεται το λειτουργικό προϊόν των πρωτογενών οδοντινοβλαστών, που συντίθεται και εναποτίθεται κατά το λειτουργικό στάδιο της ζωής του δοντιού. Η συνεχής παραγωγή της δευτερογενούς οδοντίνης, και κατά συνέπεια η ελάττωση του διαθέσιμου χώρου για τον πολφικό ιστό, προκαλεί με την ηλικία αντιδραστικές μεταβολές στη δομή και λειτουργία του συστήματος πολφού-οδοντίνης (μείωση της λειτουργικής ικανότητας της οδοντινοβλαστικής στιβάδας, συμπίεση των ευένδοτων τοιχωμάτων των φλεβιδίων και των φλεβών).

Φαίνεται ότι σταδιακά μεταβάλλεται, εκτός από το ρυθμό, και η ποιότητα της βιοσυνθετικής δραστηριότητας των οδοντινοβλαστών. Η ανεύρεση κολλαγόνου τύπου III στη δευτερογενή δοντίνη αποτελεί έκφραση τροποποίησης του αρχικού λειτουργικού προγράμματος των οδοντινοβλαστών.

Οι τροποποιήσεις στην **αρχιτεκτονική κατασκευή** του πολφού που συμβαίνουν με την πάροδο της ηλικίας αφορούν σε ορισμένες δυστροφικής φύσεως μεταβολές που προκαλούν εκφύλιση στον πολφό και περιορισμό στις λειτουργίες του συστήματος οδοντίνης-πολφού.

Ινώδης και δικτυωτή εκφύλιση. Ο αριθμός των κυττάρων στο πολφικό παρέγχυμα μειώνεται με την πρόοδο της ηλικίας, ενώ αντίθετα αυξάνει ο αριθμός των ινώδων στοιχείων από τη συσσώρευση των προϊόντων της χρόνιας εκκριτικής λειτουργίας των ινοβλαστών στο κλειστό περιβάλλον της πολφικής κοιλότητας. Οι συνθήκες αυτές δημιουργούν μεταβολή της εικόνας του πολφού από ένα χαλαρό συνδετικό ιστό σε ένα πυκνό ινώδους σύστασης ιστό με λίγα λειτουργικά κυτταρικά στοιχεία και ελάχιστα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Η ακραία μορφή ινώδους εκφύλισης του πολφού χαρακτηρίζεται ως δικτυωτή ατροφία του πολφού (Συκαράς 2007). Συγκεκριμένα οι οδοντινοβλάστες μειώνονται περίπου κατά 16% στην μύλη και κατά 41% στην ρίζα με την αύξηση της ηλικίας (Murray et al 2002).

Λιπώδης εκφύλιση. Πολλές φορές η συγκέντρωση λιποσταγονιδίων στον πολφικό ιστό δίνει κενотоπιώδη εμφάνιση παρόμοια με αυτήν της δικτυωτής ατροφίας του πολφού.

Ενασβεστιώδης εκφύλιση. Η εμφάνιση πολλών ενασβεστιωμένων μαζών στην πολφική κοιλότητα, μεταβολή που συνήθως συνοδεύει την ινώδη εκφύλιση του

πολφού, χαρακτηρίζεται ως διάχυτη ενασβεστίωση του πολφού. Η έναρξη της διάχυτης ενασβεστίωσης παρατηρείται κυρίως γύρω από τα μεγάλα αγγεία και νεύρα του πολφού. Ο πιο χαρακτηριστικός τύπος ενασβεστιάδους εκφύλισης του πολφικού παρεγχύματος εμφανίζεται με τη μορφή των πολφόλιθων. Σχεδόν το σύνολο των δοντιών σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών περιέχουν έναν ή περισσότερους πολφόλιθους που όμως δεν έχουν μέγεθος τέτοιο ώστε να εντοπίζονται στο οπισθοφατνιακό ακτινογράφημα. Οι πολφόλιθοι αποτελούν περιοχές δημιουργίας τριτογενούς οδοντίνης είτε με τη μορφή επανορθωτικής είτε με τις άλλες μορφές ινοοδοντίνης ή οστεο-οδοντίνης.

Η κυρίως οργάνωση του **νευρικού πλέγματος** του πολφού αποκτάται μετά το τέλος της ανατολής των δοντιών. Σταδιακή εκφύλιση των νευρικών ινών συμβαίνει κατά την περαιτέρω ωρίμανση του οδοντικού πολφού, ενώ σε ηλικιωμένα δόντια βρίσκονται συνήθως 20% λιγότερες νευρικές ίνες (Συκαράς 2007).

Τα πολφικά **αρτηρίδια** παρουσιάζουν αρτηριοσκληρωτικές αλλαγές από την ηλικία των 40 ετών, όπως πάχυνση του έσω χιτώνα. Επιπλέον, εμφανίζεται ενασβεστίωση του αγγειακού τοιχώματος ως αποτέλεσμα της γενικότερης ενασβεστίωσης της πολφικής κοιλότητας, κυρίως ακρορριζικά. Το αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η μείωση της αιματικής ροής εντός του πολφικού ιστού (Espina et al 2003, Ikawa et al 2003).

III. ΘΕΙΟΡΕΔΟΞΙΝΗ (TRX)

Η θειορεδοξίνη, η αναγωγή της θειορεδοξίνης και το NADPH απαρτίζουν το σύστημα της θειορεδοξίνης και ανευρίσκονται από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τους ανθρώπους. Οι θειορεδοξίνες, με μία ενεργή περιοχή διθειόλης/δισουλφιδίου, αποτελούν τις κυριότερες κυτταρικές αναγωγάσες των δισουλφιδίων των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου δρουν και ως δότες ηλεκτρονίων για διάφορα ένζυμα, όπως οι αναγωγάσες των ριβονουκλεοτιδίων. Έχουν βρεθεί δύο ισομορφές της θειορεδοξίνης, η TRX1 στο κυτταρόπλασμα και η TRX2 στα μιτοχόνδρια. Είναι απαραίτητες για την οξειδοαναγωγική ρύθμιση της πρωτεϊνικής λειτουργίας και σηματοδότησης μέσω ελέγχου της οξειδοαναγωγής της θειόλης. Ακόμη, ένας αυξανόμενος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του NF-κΒ, απαιτούν αναγωγή από τη θειορεδοξίνη για να προσδεθούν στο DNA.

Η έλλειψη της TRX1 είναι ασύμβατη με τη ζωή από το στάδιο του εμβρύου ακόμα, καθώς επιτελεί πολλές και σημαντικές λειτουργίες. Εμπλέκεται στη σύνθεση του DNA, ανάγει δισουλφίδια πρωτεϊνών, ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου προλαμβάνοντας την πρόκληση οξειδωτικού στρες και την επαγωγή απόπτωσης. Επιπρόσθετα, επιδιορθώνει τις πρωτεΐνες μέσω αναγωγής του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης, ενεργοποιεί ή αναστέλλει μεταγραφικούς παράγοντες και συμμετέχει στην ανοσορύθμιση δρώντας ως εξωκυττάρια συν-κυτοκίνη και χημειοκίνη (ανασκόπηση από Arner και Holmgren 2000).

Η έκφραση της θειορεδοξίνης φαίνεται να επάγεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, τόσο σε ανθρώπους (Tanaka et al 1999) όσο και σε ζώα όπως οι αρουραίοι (Ohira et al 1994).

IV. ERdj5 (ENDOPLASMIC RETICULUM DNA J DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 5) ή DNAJC10

Η ERdj5 είναι μία οξειδοαναγωγή και συνοδός πρωτεΐνη του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο είναι το οργανίδιο όπου οι μεμβρανικές και εκκρινόμενες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται και σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Στο ΕΔ υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συνοδών-πρωτεϊνών και ενζύμων, όπως η προαναφερθείσα ERdj5, η PDI (Protein-Disulfide Isomerase), η BiP (immunoglobulin heavy chain-Binding Protein), η GRP94 και η καλνεξίνη, που βοηθούν σε αυτή τη διαδικασία (Fink 1999). Το ενδοπλασματικό δίκτυο ασκεί και ποιοτικό έλεγχο στα πρωτεϊνικά προϊόντα του, έτσι ώστε μόνο οι σωστά διαμορφωμένες και αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να οδηγηθούν στο σύμπλεγμα Golgi. Διαφορετικά, μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για πρωτεοσωμική αποδόμηση μέσω του συστήματος ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Xiong et al 1999). Η συσσώρευση μη ορθά αναδιπλωμένων ή μη αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων στον αυλό του ΕΔ, γνωστή **ως στρες του ΕΔ**, επάγει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-συνοδούς του ΕΔ και καταλύτες αναδίπλωσης, μία διαδικασία που ονομάζεται «απάντηση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (Unfolded Protein Response, UPR) (Travers et al 2000).

Η ERdj5 συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση και αποδόμηση των κακοδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Περιέχει στη δομή της έξι περιοχές θειορεδοξίνης, εκ των οποίων οι τέσσερις έχουν ενεργά CXXC μοτίβα. Αυτές οι περιοχές του μορίου της

συμμετέχουν στο σύστημα αποδόμησης ERAD, αφού αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη EDEM1 (ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein) (Hagiwara et al 2011). Η ERdj5 περιέχει επίσης μια DnaJ περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο, που λειτουργεί ως πλατφόρμα αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη BiP, ενισχύοντας τη δραστικότητα ATPάσης της τελευταίας και συμβάλλοντας έτσι στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Cunnea et al 2003). Ακόμη, περιλαμβάνει μία περιοχή που προσομοιάζει με την πρωτεΐνη PDI, προάγοντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της σωστής τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών (Ushioda and Nagata 2011).

Η έκφρασή της φαίνεται να επάγεται με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε καταστάσεις κυτταρικού στρες, όπως μετά από έκθεση πολφικών κυττάρων σε ρητινώδη μονομερή (Diamanti et al 2013).

V. ΟΔΟΝΤΙΝΙΚΗ ΣΙΑΛΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (DSP)

Η οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) αποτελεί προϊόν ωρίμανσης (αποκοπής) ενός μεγαλύτερου πρωτεϊνικού μορίου, της οδοντινικής σιαλοφωσφοπρωτεΐνης (DSPP).

Η οδοντινική σιαλοφωσφοπρωτεΐνη (DSPP) είναι η μόνη πρωτεΐνη που παράγεται κυρίως από τις οδοντινοβλάστες. Αμέσως μετά την παραγωγή της, αποκόπτεται σε τρεις λειτουργικές πρωτεΐνες: την οδοντινική φωσφοπρωτεΐνη (DPP) που προκύπτει από το καρβοξυτελικό άκρο της DSPP, την οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) από το αμινοτελικό άκρο της DSPP και την οδοντινική γλυκοπρωτεΐνη (DGP) από το μεσαίο τμήμα του μορίου (Nanci 2012).

Η DSP αποτελεί μία από τις κυρίαρχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας της οδοντίνης και έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενασβεστίωσής της. Συγκεκριμένα, προάγει την έναρξη του σχηματισμού κρυστάλλων υδροξυαπατίτη κατά μήκος ή μέσα στα ινίδια κολλαγόνου, οδηγώντας στη μετατροπή της προοδοντίνης σε οδοντίνη (Suzuki et al 2009).

Η έκφρασή της DSP δεν επηρεάζεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Diamanti et al 2013), ενώ η έκφραση της DSPP φαίνεται να μειώνεται κατά την κυτταρική γήρανση (Lee et al 2013).

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι.ΣΚΟΠΟΣ

Κατά τη λειτουργική περίοδο, τα δόντια δέχονται διάφορα ερεθίσματα από το περιβάλλον τους ικανά να τους προκαλέσουν φαινοτυπικές και λειτουργικές μεταβολές που προκαλούνται και με φυσιολογικό τρόπο κατά τη γήρανση. Τέτοια ερεθίσματα είναι και αυτά που επάγουν το οξειδωτικό στρες, όπως το H_2O_2 . Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη μορίων που συμμετέχουν στην απόκριση σε κυτταρικό στρες αλλά και στη δυνατότητα των πολφικών κυττάρων για ενασβεστίωση της οδοντίνης, σε διαφορετικά μοντέλα κυτταρικής γήρανσης. Τα μοντέλα αυτά είναι η αναπαραγωγική γήρανση και η πρόωρη γήρανση επαγόμενη από στρες (μέσω της επίδρασης του H_2O_2).

Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών θειορεδοξίνη (TRX1), ERdj5 και οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) σε ανθρώπινα πολφικά κύτταρα μετά από 20 διαδοχικές ανακαλλιέργειες ή επώαση με 150 μM H_2O_2 σε σύγκριση με τα επίπεδά τους σε νεαρά κύτταρα.

II.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ

Τα κύτταρα που χρησιμοποιηθήκαν προέκυψαν από πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων οδοντικών πολφικών κυττάρων που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κυτταρικών Καλλιεργειών, της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι καλλιέργειες αυτές αποκτήθηκαν από τον πολφό πλήρως εγκλείστων τρίτων γομφίων νεαρών ατόμων (ηλικίας 15-25 ετών) που προσήλθαν για θεραπεία στην Οδοντιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών (εικόνα Β1). Για τη συμμετοχή των ασθενών στη μελέτη υπήρξε γραπτή συγκατάθεση αυτών ή των κηδεμόνων τους στην περίπτωση των ανηλίκων.

Αμέσως μετά την εξαγωγή τα δόντια καθαρίστηκαν με αποστειρωμένη γάζα και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο (DMEM 1g/L D-Glucose χωρίς FBS ενισχυμένο x3 με αντιβιοτικό και αντιμυκητιασικό). Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν στα δύο με τη χρήση φρέζας σε χειρολαβή υψηλών ταχυτήτων υπό καταιονισμό νερού προς αποφυγή υπερθέρμανσης των πρωτεϊνών του πολφού και πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του πολφού με κοχλιάριο. Μέσα στην απαγωγό νηματικής ροής (aura mini, BIOAIR EuroClone), ο οδοντικός πολφός τεμαχίστηκε με νυστέρι και τοποθετήθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο (DMEM 1g/L D-Glucose ενισχυμένο με 10% FBS και x2 αντιβιοτικό και αντιμυκητιασικό). Το τρυβλίο επώαστηκε για περίπου μία εβδομάδα σε κλίβανο (Thermo Scientific™ Heracell™ 150i CO₂ Incubator) με συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία με αλλαγή του θρεπτικού μέσου ανά 2-3 ημέρες. Μετά την πρώτη εβδομάδα χρησιμοποιήθηκε το ανωτέρω θρεπτικό μέσο με x1 αντιβιοτικό και αντιμυκητιασικό (κανονικό θρεπτικό μέσο, βλ.

πίνακα Β1). Όταν τα κύτταρα κατέλαβαν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου, αποκολλήθηκαν με θρυψίνη και μετά από φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια σε νέα τρυβλία (1^η ανακαλλιέργεια, passage), ώστε να αραιωθούν. Η ίδια διαδικασία θρυψινοποίησης και αραιώσης των κυττάρων επαναλαμβανόταν κάθε φορά που τα κύτταρα κάλυπταν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα βρίσκονταν στη φάση της 3^{ης}, 8^{ης}, 12^{ης}, 16^{ης} και 20^{ης} ανακαλλιέργειας.



Εικόνα Β1. Πανοραμική ακτινογραφία στην οποία φαίνονται πλήρως έγκλειστοι τρίτοι γομφίοι.

Θρεπτικά μέσα	Σύσταση
Θρεπτικό μέσο μεταφοράς	• Βασικό θρεπτικό μέσο: DMEM 1g/L D-Glucose (Gibco) • Πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη: 3% Pen Strep (Gibco) • Αμφοτερικίνη B: 0.3% Fungizone (Gibco)
Θρεπτικό μέσο 1 ^{ης} εβδομάδας καλλιέργειας	• Βασικό θρεπτικό μέσο: DMEM 1g/L D-Glucose (Gibco) • Βόειος εμβρυϊκός ορός: 10% FBS (Gibco) • Πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη: 2% Pen Strep (Gibco) • Αμφοτερικίνη B: 0.2% Fungizone (Gibco)
Κανονικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας	• Βασικό θρεπτικό μέσο: DMEM 1g/L D-Glucose (Gibco) • Βόειος εμβρυϊκός ορός: 10% FBS (Gibco) • Πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη: 1% Pen Strep (Gibco) • Αμφοτερικίνη B: 0.1% Fungizone (Gibco)

Πίνακας Β1. Σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταρικές καλλιέργειες.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού τους με το αιματοκυτταρόμετρο. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες στην πλευρά που τοποθετείται η καλυπτρίδα. Οι επεξεργασμένες επιφάνειες αποτελούνται η καθεμία από 9 τετράγωνα εμβαδού 1mm^2 . Στην κοίλη επιφάνεια που σχηματίζεται μεταξύ της τετραγωνισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα με το λεπτό ρύγχος μιας μικροπιπέτας. Με τριχοειδικά φαινόμενα, το εναιώρημα απλώνεται σε όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια. Στο κυτταρικό εναιώρημα έχει προηγουμένως προστεθεί η χρωστική trypan blue (0,4%) (παράγωγο της τολουιδίνης, σε αναλογία 1:1), η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα μπλε, καθώς μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική τους μεμβράνη.

Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 10^{-4}ml . Συνεπώς η συγκέντρωση των κυττάρων στο κυτταρικό εναιώρημα από το οποίο προήλθε το δείγμα (κύτταρα/ml) ισούται με τον μέσο όρο του αριθμού των ζωντανών (μη χρωσμένων) κυττάρων ανά τετράγωνο $\times 10^4$.

Η μέτρηση με το αιμοκυτταρόμετρο έγινε στο μικροσκόπιο (Axiovert 40 CFL, ZEISS) με αντικειμενικό φακό 10x στα κύτταρα της 2^{ης} ανακαλλιέργειας έτσι ώστε να τοποθετηθεί ο σωστός αριθμός κυττάρων στα αντίστοιχα τρυβλία και βοθρία καλλιιεργειών για το πείραμα.

ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Για την επαγωγή της αναπαραγωγικής γήρανσης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ανακαλλιέργειες των πολφικών κυττάρων. Αρχικά, μετά από μέτρηση με το αιμοκυτταρόμετρο, τοποθετήθηκαν 1.500.000 κύτταρα σε κάθε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm. Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου (DMEM 1g/L D-Glucose με 10% FBS και x1 αντιβιοτικό και αντιμυκητιασικό) γινόταν κάθε 2-3 ημέρες. Όταν τα κύτταρα καταλάμβαναν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιούνταν 3 εκπλύσεις με 5 ml PBS χωρίς $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, προσθήκη 3 ml διαλύματος θρυψίνης [0,05% Trypsin-EDTA (1x)], τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο για 3 λεπτά και φυγοκέντρηση (σε φυγόκεντρο Labofuge 300, Heraeus) για 5 λεπτά σε 800 rpm μετά από προσθήκη 4 ml θρεπτικού μέσου και μεταφορά σε πλαστικούς σωλήνες Falcon χωρητικότητας 15ml. Στη συνέχεια γινόταν αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 4 ml κανονικού θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα μοιράζονταν σε νέα τρυβλία με αναλογία (split ratio) 1:4. Τέλος, τοποθετούνταν στον επωαστικό κλίβανο μετά από προσθήκη επιπλέον θρεπτικού μέσου μέχρι τελικού όγκου 10 ml. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι και την 20^η ανακαλλιέργεια. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από την 3^η ανακαλλιέργεια (νεαρά). Κύτταρα από την 3^η, 8^η, 12^η, 16^η και 20^η ανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της κυτταρικής γήρανσης με τη χρώση της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA β-gal), όπως περιγράφεται παρακάτω. Επίσης, κύτταρα των προαναφερθέντων φάσεων ανακαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης-δείκτη του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ERdj5),

του αντιοξειδωτικού παράγοντα θειορεδοξίνη (TRX) και της πρωτεΐνης-δείκτη οδοντινικής διαφοροποίησης οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) μέσω της ανοσοσύζευξης κατά Western.

ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΠΡΩΩΡΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣ

Η επαγωγή της πρόωρης γήρανσης επαγόμενης από στρες (SIPS) έγινε με την έκθεση των κυττάρων σε 150 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Lee και συνεργατών (2013). Για την επαγωγή της SIPS στα πολφικά κύτταρα, 6.000.000 κύτταρα από τη 2^η ανακαλλιέργεια μοιράστηκαν σε 4 τρυβλία διαμέτρου 60mm. Τα δύο προορίζονταν για επώαση με H_2O_2 (πειραματική ομάδα) ενώ τα άλλα δύο θα αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Μετά από δύο ημέρες τα κύτταρα της πειραματικής ομάδας επώαστηκαν για 2 ώρες με 150 μM H_2O_2 διαλυμένο σε κανονικό θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια το H_2O_2 αφαιρέθηκε και προστέθηκε σκέτο θρεπτικό μέσο. Στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου έγινε μόνο αλλαγή θρεπτικού μέσου. Μία ημέρα μετά, η οποία ορίστηκε και ως ημέρα 0 του πειράματος, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη και ένα μέρος αυτών συλλέχθηκε για ανάλυση με τις τεχνικές Western blot και MTT, ενώ τα υπόλοιπα επιστρώθηκαν σε καλλιεργητικές πλάκες 6 βοθρίων (6-well plates, Corning Costar), με σκοπό να συλλεχθούν για ανάλυση μετά από 1, 3, 7 και 12 ημέρες. Κάθε 6-well plate περιείχε κύτταρα που θα συλλέγονταν διαφορετική ημέρα. Στα 3 από τα 6 βοθρία των πλακών που θα συλλέγονταν σε 1 και 3 ημέρες τοποθετήθηκαν από 500.000 κύτταρα της πειραματικής ομάδας, ενώ στα υπόλοιπα 3 τοποθετήθηκαν 500.000 κύτταρα της ομάδας ελέγχου (που δεν είχαν εκτεθεί σε H_2O_2). Στα βοθρία

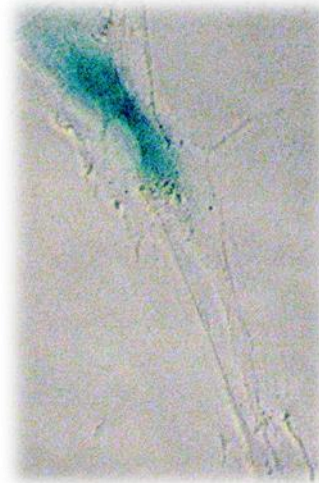
των πλακών καλλιέργειών που προορίζονταν για συλλογή σε 7 και 12 ημέρες τοποθετήθηκαν από 300.000 κύτταρα κατά τον ίδιο τρόπο. Σε κάθε βοθρίο πλάκας καλλιέργειών προστίθεντο 3 ml θρεπτικού μέσου, το οποίο αλλάζονταν κάθε 2-3 ημέρες.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Για την επιβεβαίωση της γήρανσης του κυτταρικού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε η χρώση της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (Senescence-Associated β-galactosidase, SA β-gal) κατά την 3η, 8η, 12η, 16η και 20η ανακαλλιέργεια. Η SA β-gal είναι ένα ένζυμο (υδρολάση) που καταλύει την υδρόλυση των γαλακτοσιδίων σε μονοσακχαρίτες μόνο σε γηρασμένα κύτταρα σε pH=6.0. Η δοκιμασία βασίζεται στην παραγωγή μπλε ιζήματος, λόγω διάσπασης του χρωμογόνου υποστρώματος της X-gal. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Σε κάθε βοθρίο πλάκας καλλιέργειών 24 βοθρίων (24-well plate) τοποθετήθηκαν 37.500 κύτταρα με 0,5 ml κανονικού θρεπτικού μέσου.
- Το 24-well plate τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο κλίβανο με συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία για 48 ώρες .
- Έγινε αναρρόφηση του DMEM και 2 εκπλύσεις με 0,5 ml PBS χωρίς Ca-Mg/βοθρίο πλάκας καλλιέργειών.
- Προστέθηκαν 0,25 ml 4% παραφολμαλδεϋδης (PFA) ανά βοθρίο πλάκας καλλιέργειών και έγινε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολούθησαν 2 εκπλύσεις με 0,5 ml PBS ανά βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών σε θερμοκρασία δωματίου συνοδευόμενες από ελαφρά ανάδευση για 5 λεπτά η κάθε μία.
- Προστέθηκαν 0,25 ml διαλύματος χρώσης SA β-gal ανά βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών. Το διάλυμα χρώσης αποτελούνταν από 0,1% X-gal, 5 μM potassium ferrocyanide, 5 μM potassium ferricyanide, 150 μM Sodium Chloride και 2 μM Magnesium Chloride σε διάλυμα 40 μM Citric Acid/Sodium Phosphate, pH 6.0.
- Το 24-well plate τοποθετήθηκε σε κλίβανο σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασίας 37°C.
- 22 ώρες μετά πραγματοποιήθηκαν 2 εκπλύσεις με 0,5 ml απεσταγμένο νερό/βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών.
- Τοποθετήθηκε 0,5 ml απεσταγμένου νερού ανά βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών και έγινε παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (Axiovert 40 CFL, ZEISS) με αντικειμενικό φακό 10x.
- Έγινε λήψη φωτογραφιών από αντιπροσωπευτικές περιοχές σε κάθε βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών με αντικειμενικό φακό 10x και μεγέθυνση φωτογραφικής μηχανής [Power Shot A640 (A1AF), Canon] 10x.
- Υπολογίστηκε ο λόγος των γηρασμένων [αυτών που είχαν προσλάβει τη μπλε χρωστική (εικόνα B2)] στο σύνολο των κυττάρων καθώς και ο μέσος όρος των λόγων για κάθε ανακαλλιέργεια.



Εικόνα B2. Κύτταρο του οδοντικού πολφού θετικό για τη χρώση της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA β-gal).

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στο MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Το MTT ανάγεται σε ένα μπλε προϊόν αδιάλυτων κρυστάλλων φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων. Η ένταση του μπλε χρώματος μετά από τη διάλυση των κρυστάλλων αυτών αντικατοπτρίζει την ποσότητα των ζωντανών κυττάρων, δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή δραστηριότητα παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου. Τα βήματα της μεθόδου ήταν τα εξής: Σε 1, 3, 7 και 12 ημέρες μετά την ανακαλλιέργεια που ακολούθησε την επώαση των κυττάρων με H_2O_2 έγινε:

- Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από τα βοηθία της πλάκας καλλιέργειών.
- Προσθήκη 3 ml διαλύματος MTT τελικής συγκέντρωσης 0,5 mg/ml DMEM (χωρίς phenol red) σε κάθε βοηθίο. Αρχικά παρασκευάστηκε μητρικό

διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg/ml και διηθήθηκε από διηθητικό χαρτί με μέγεθος πόρων 0,2 μm. Στα βοθρία τοποθετήθηκαν 0,3 ml από το stock διάλυμα και 2,7 ml DMEM χωρίς phenol red.

- Επώαση σε κλίβανο με συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία για 3 ώρες.
- Αναρρόφηση του διαλύματος MTT και προσθήκη 2ml διαλύματος HCl 0,33% κατ' όγκο σε ισοπροπανόλη σε κάθε βοθρίο πλάκας καλλιιεργειών για διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης.
- Συλλογή του περιεχομένου των βοθρίων σε πλαστικούς σωλήνες Falcon χωρητικότητας 15 ml τυλιγμένους με αλουμινόχαρτο.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε κυβέτες (εικόνα B3) και φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (LKB, BIOCHROM, ULTROSPEC II) στα 570 nm (μέγιστη τιμή απορρόφησης της φορμαζάνης) και στα 690 nm (μήκος κύματος απορρόφησης των προσμίξεων που υπάρχουν στο διάλυμα). Ο ορισμός της μηδενικής απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο γινόταν με κυβέτα που περιείχε διάλυμα HCl 0,33% κατ' όγκο σε ισοπροπανόλη.
- Υπολογισμός της επί τοις εκατό ζωτικότητας των κυττάρων που είχαν επωαστεί με H₂O₂ σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Ζωτικότητα\%} = \frac{(\text{απορρόφηση στα } 570 \text{ nm} - \text{απορρόφηση στα } 690 \text{ nm})}{(\text{απορρόφηση κυττάρων ελέγχου στα } 570 \text{ nm} - \text{απορρόφηση κυττάρων ελέγχου στα } 690 \text{ nm})} * 100\%$$



Εικόνα Β3. Πλαστική κυβέτα που τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της έντασης του μπλε χρώματος στη χρωματομετρική μέθοδο MTT.

ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Για την εξέταση των επιπέδων της πρωτεΐνης-δείκτη του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ERdj5), του αντιοξειδωτικού παράγοντα θειορεδοξίνη (TRX1) και του δείκτη οδοντινικής διαφοροποίησης οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) στις κυτταροκαλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Western blot. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει τα επίπεδα των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφορήσή τους με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

1. Συλλογή των κυττάρων

Τα κύτταρα συλλέγονταν με την εξής διαδικασία:

- Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία ή τα βοθρία καλλιιεργειών.
- 2 εκπλύσεις με PBS που δεν περιείχε $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

- Αποκόλληση των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος θρυψίνης (trypsin/EDTA) (1 ml/βοθρίο, 3ml/τρυβλίο) και τοποθέτηση στον κλίβανο για 3 λεπτά.
- Προσθήκη κανονικού θρεπτικού μέσου (1,5 ml/βοθρίο, 4ml/τρυβλίο) και μεταφορά σε πλαστικά φιαλίδια τύπου errendorf.
- Φυγοκέντρηση (σε φυγόκεντρο HERMLE Z223 MK-2) για 4 λεπτά σε 3.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και φύλαξη του κυτταρικού ιζήματος στους -80°C.
- Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 100 μl διαλύματος λύσης των κυττάρων (lysis buffer). Η σύσταση του διαλύματος λύσης ήταν: HEPES 10mM, NaCl 200mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 2 mM, EDTA 5 mM και Triton X-100 1,5 % (pH 7,4).
- Ομογενοποίηση στα φιαλίδια τύπου errendorf με ειδικό έμβολο από τεφλόν και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις 10.000 rpm, στους 4°C, για 5 λεπτά.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου (κυτταρικό εκχύλισμα) και αποθηκευσή του στους -80°C σε πλαστικά φιαλίδια τύπου errendorf.

2. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε γέλη

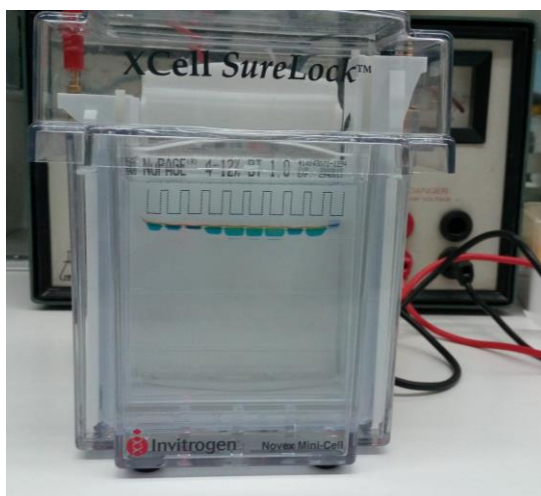
πολυακρυλαμιδίου

- Προσδιορισμός της περιεχομένης συνολικής πρωτεΐνης στο κυτταρικό εκχύλισμα φωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 και 280 nm, σύμφωνα με τον τύπο: Συγκέντρωση πρωτεΐνης (μg/5 μl) = Απορρόφηση στα 280 nm x factor x 1000. Στα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση, τοποθετήθηκε ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης περίπου 50 μg, με μέγιστο όγκο δείγματος 20 μl.
- Προσθήκη σε πλαστικά φιαλίδια τύπου errendorf 20 μl (μέγιστο) δείγματος από το κυτταρικό εκχύλισμα, 7,5 μl Sample Loading Buffer 4x (LDS), 3 μl 1M διθειοθρεϊτόλη (DTT).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων για αποδιάταξη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 70 °C για 20 λεπτά.

3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

- Χρησιμοποιήθηκε έτοιμη γέλη πολυακρυλαμιδίου 10 θέσεων, διαβαθμισμένης συγκέντρωσης 4-12% (SDS-polyacrylamide Bis-Tris Mini Gels, NuPAGE, Invitrogen) για την ηλεκτροφόρηση.
- Στα 9 από τα πηγάδια της γέλης πολυακρυλαμιδίου φορτώθηκαν τα δείγματα και στη 10η θέση φορτώθηκε δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (prestained protein ladder, Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στην συσκευή Xcell SureLock™ Mini-Cell CE mark (Invitrogen) (εικόνα B4) μέσα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) [50 mM Tris Base, 50

mM 3-(N- μορφολινο)-προπανο-θειικό οξύ, 0, 1 % θειικό δωδεκυλικό νάτριο και 1 mM αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ], για 1 ώρα στα 60 mA.



Εικόνα B4. Η συσκευή Xcell SureLock™ Mini-Cell CE mark (Invitrogen) που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση και την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

4. Στύπωση

- Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman, Potran 85) μέσα σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) [5 % Transfer buffer NuPage 20 x (Invitrogen), 0,1 % NuPage Antioxidant (Invitrogen), 10% Methanol, 84,9 % απεσταγμένο νερό], με τη χρήση της συσκευής Xcell SureLock™ Mini-Cell CE mark (Invitrogen Co., Carlsbad, CA). Η διαδικασία αυτή περιλάμβανε την τοποθέτηση της γέλης σε επαφή με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και 2 κομμάτια χαρτιού χρωματογραφίας 3M. Η ρύθμιση της συσκευής μεταφοράς των πρωτεϊνών έγινε στα 150 mA για 2,5 ώρες.
- Για την επιβεβαίωση της πλήρους και επιτυχούς πρωτεϊνικής μεταφοράς, μετά το περας της ηλεκτρομεταφοράς, πραγματοποιήθηκε στη μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης χρώση Ponceau. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα Ponceau που αποτελούνταν από 0,1 % σκόνης Ponceau S (Biomedicals) σε 5% οξικό οξύ για ένα λεπτό, ώστε να χρωσθεί το σύνολο των πρωτεϊνών που μεταφέρθηκε σε κάθε θέση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό για να μειωθεί η χρώση του υποστρώματος, τοποθετήθηκε σε διαφανές πλαστικό και σαρώθηκε με την συσκευή σάρωσης HP Scanjet G3010. Η χρώση Ponceau απομακρύνθηκε με πλύσεις με απεσταγμένο νερό και η μεμβράνη στεγνώσε σε θερμοκρασία περιβαλλοντος και φυλάχθηκε μέχρι τη χρήση της.

5. Ανοσολογική ανίχνευση των πρωτεϊνών στις μεμβράνες

- Αρχικά έγινε επώαση των μεμβρανών για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση με διάλυμα παρεμπόδισης [ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1x (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.154 mM NaCl) που περιείχε 0,05% Tween 20x και 5% άπαχο γάλα σε σκόνη], σε θερμοκρασία δωματίου. Σκοπός της επώασης αυτής ήταν να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του δευτερογενούς αντισώματος.
- Ακολούθησε επώαση των μεμβρανών με τα πρωτογενή αντισώματα. Η επώαση ήταν ολονύκτια, στο ψυγείο (4°C) υπό συνεχή ανακίνηση. Το διάλυμα που περιείχε τα πρωτογενή αντισώματα ήταν ίδιο με το διάλυμα παρεμπόδισης, αλλά περιείχε επιπλέον τα ειδικά αντισώματα. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες αναφέρονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας B2):

Αντίσωμα	Είδος	Ζώο παρασκευής	Εταιρεία	Συγκέντρωση	Μέγεθος πρωτεΐνης
ERdj5 13101-1-AP	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	Proteintech Group, Inc., Chicago, USA	1:500	94 kDa
TRX ab16835	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	Abcam Inc, Camcridge, UK	1:2000	12 kDa
DSP H-300 sc-33586	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA	1:250	89 kDa
GAPDH MAB374	Μονοκλωνικό	Ποντίκι	Millipore, Billerica, MA, USA	1:500	49 kDa

Πίνακας Β2. Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο Western blot. Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των συγκεντρώσεων της ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, καθώς η έκφρασή της δε μεταβάλλεται στα υπο μελέτη συστήματα (housekeeping gene).

- Ακολούθησε η απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος και η επώαση των μεμβρανών με τα δευτερογενή αντισώματα.
- Έγιναν 2 εκπλύσεις x 10 λεπτά σε διάλυμα TBS 1x και Tween 20x υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 έκπλυση x 10 λεπτά σε διάλυμα TBS 1x υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθήκη του ενδεδειγμένου δευτερογενούς αντισώματος (όπως φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα Β3) και ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Αντίσωμα	Ζώο παρασκευής	Εταιρεία	Συγκέντρωση
anti-mouse IgG-HRP AP124P	Κατσίκια	Millipore, Billerica, MA, USA	1:100.000
anti-mouse IgG-HRP sc-2005	Κατσίκια	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA	1:10.000
anti-rabbit IgG-HRP AP132P	Κατσίκια	Millipore, Billerica, MA, USA	1:100.000
anti-rabbit IgG-HRP sc-2004	Κατσίκια	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA	1:600
anti-mouse IgG-biotin AP124B	Κατσίκια	Millipore, Billerica, MA, USA	1:50.000
anti-rabbit IgG-biotin sc-2040	Κατσίκια	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA	1:400
anti-rabbit IgG-biotin E0432	Κατσίκια	Dako Denmark	1:2000

Πίνακας Β3. Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο Western blot.

6. Ανίχνευση του σήματος της ανοσοοστώπωσης

Για τα αντισώματα ERdj5, TRX1 και GAPDH χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL για την ανίχνευση του σήματος. Με το σύστημα αυτό, πραγματοποιείται οξείδωση της λουμινόλης από το συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Η αντίδραση αυτή οδηγεί στη δημιουργία προϊόντων που παράγουν παροδικά φωταύγεια υψηλής έντασης που ανιχνεύεται με αμαύρωση του ακτινογραφικού φιλμ, προσδιορίζοντας έτσι την ύπαρξη, τη θέση και την ποσότητα της υπό ανίχνευση πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκαν:

- 3 εκπλύσεις x 10 λεπτά με διάλυμα TBS 1x.
- Επώαση με το σύστημα λουμινόλης-ενισχυτή χρησιμοποιώντας ίσο όγκο από τα δυο συστατικά του συστήματος (Reagent A και Reagent B) (Thermo Scientific).
- Καταγραφή του φωτεινού σήματος σε ακτινογραφικά φιλμ (Fuji).
- 1 έκπλυση των μεμβρανών x 10 λεπτά με TBS 1x και Tween 20x.
- Διατήρηση των μεμβρανών σε TBS 1x και Tween 20x στους 4°C για νέα επώαση με διαφορετικά αντισώματα.

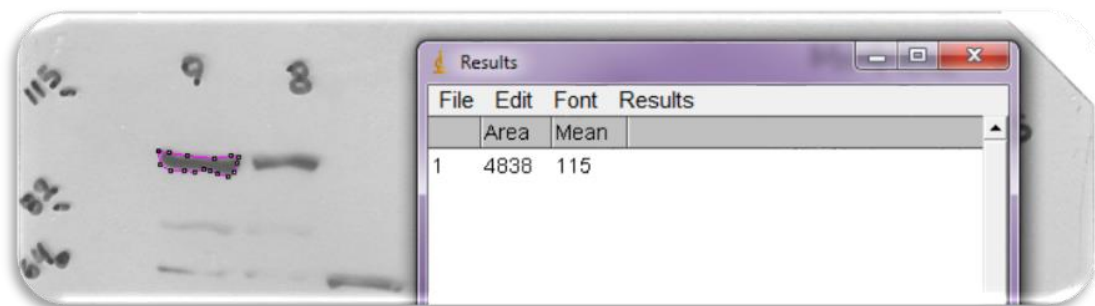
Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης DSP χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό σύστημα αβιδίνης/βιοτίνης/υπεροξειδάσης με υπόστρωμα τη διαμινοβενζιδίνη (DAB). Οι νέες επώσεις των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές και το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με αυτά που έχουν

αναφερθεί παραπάνω, με την διαφορά ότι το δευτερογενές αντίσωμα ήταν βιοτινυλιωμένο. Για την τεχνική πραγματοποιήθηκαν:

- Επώαση των μεμβρανών για 1 ώρα στο σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης (AB complex, Vector) σε αραιώση 1:50 σε TBS 1x.
- 1 έκπλυση x 10 λεπτά σε διάλυμα TBS 1x
- Τοποθέτηση σε 0,1% χρωμογόνου υποστρώματος DAB σε TBS 1x, με 0,05% υπεροξείδιο του υδρογόνου, για την εμφάνιση των ζωνών. Εδώ, οι ζώνες εμφανίζονται πάνω στην μεμβράνη και έχουν καφέ χρώμα.

7. Ποσοτικοποίηση του σήματος της ανοσοσύπωσης

Τα φιλμ και οι μεμβράνες (εφόσον είχαν χρωσθεί με DAB) σαρώθηκαν με την χρήση συσκευής Hewlett-Packard Scanjet G3010. Η οπτική πυκνότητα και η επιφάνεια της ζώνης της κάθε πρωτεΐνης ποσοτικοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού Image J (εικόνα B5). Η ποσότητα του σήματος για κάθε δείγμα προέκυψε από τον τύπο $(255 - \text{Mean}) \times \text{Area}$. Για να διορθωθούν τυχόν λάθη στην συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης που φορτώθηκε, έγινε ομαλοποίηση μέσω της διαίρεσης της ποσότητας του σήματος της ζώνης των εξεταζόμενων πρωτεϊνών με την ποσότητα του σήματος της ζώνης της GAPDH που προέρχονταν από το ίδιο δείγμα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιείται για «διόρθωση» της ποσότητας της συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα διότι εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και η έκφρασή της δεν επηρεάζεται από τα υπό μελέτη συστήματα.



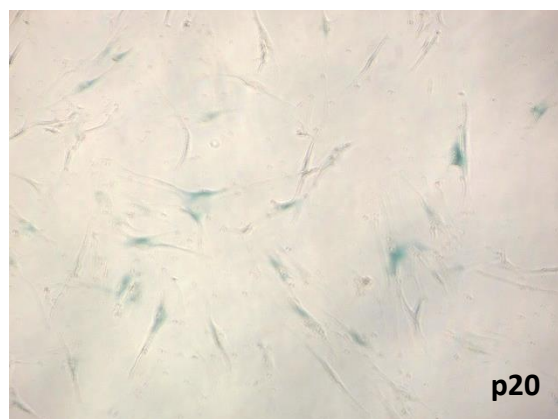
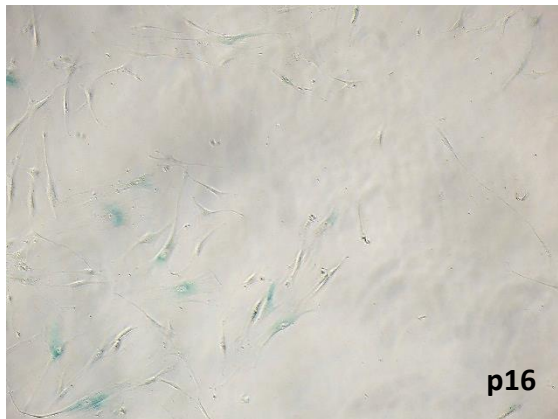
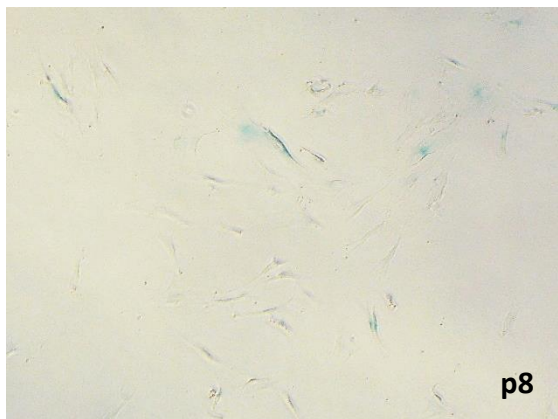
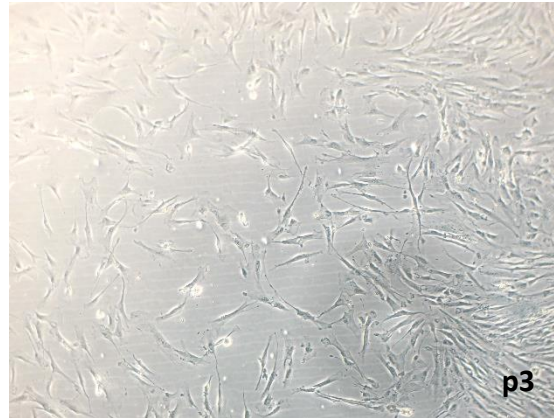
Εικόνα B5. Εικόνα που δείχνει τον τρόπο με τον οποίο έγινε η μέτρηση της ποσότητας της κάθε πρωτεΐνης με το πρόγραμμα Image J.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ

ΚΥΤΤΑΡΩΝ

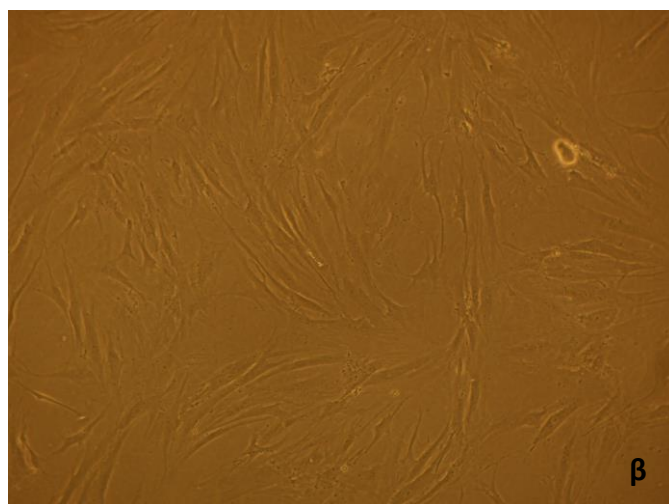
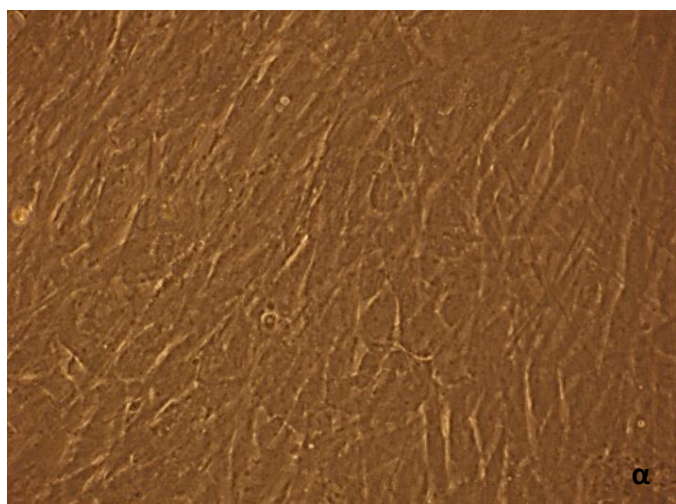
Η δοκιμασία της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA β-gal) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της κυτταρικής γήρανσης. Η καταμέτρηση έδειξε ότι το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά για τη χρώση της SA β-gal αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των ανακαλλιέργειών. Συγκεκριμένα, στην 3^η ανακαλλιέργεια (p3) δεν εντοπίστηκαν χρωσμένα κύτταρα, ενώ στην 8^η (p8) το 14% των κυττάρων ήταν χρωσμένο κατά μέσο όρο. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τη 12^η (p12), 16^η (p16), και 20^η (p20) ανακαλλιέργεια ήταν 20%, 26% και 35% (κατά μέσο όρο). Αυτό υποδεικνύει ότι οι ανακαλλιέργειες επάγουν την κυτταρική γήρανση (αναπαραγωγική γήρανση) στα οδοντικά πολφικά κύτταρα. Ενδεικτικές εικόνες κυττάρων με τη χρώση SA β-gal από το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο φαίνονται στην εικόνα B6.



Εικόνα Β6. Φωτογραφίες από το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο που δείχνουν ότι το ποσοστό των χρωσμένων κυττάρων (γηρασμένα) στη δοκιμασία της SA β -gal αυξάνεται σταδιακά από την 3^η ανακαλλιέργεια (p3) έως την 20^η (p20). Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με αντικειμενικό φακό 10x και zoom 4x.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ
ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Στην εικόνα B7α φαίνεται καλλιέργεια πολφικών κυττάρων τρεις ημέρες μετά την 3^η ανακαλλιέργεια (νεαρά κύτταρα) και στην εικόνα B7β απεικονίζεται η ίδια καλλιέργεια τρεις ημέρες μετά την 20^η ανακαλλιέργεια (γηρασμένα κύτταρα). Τα κύτταρα της 3^{ης} ανακαλλιέργειας έχουν την τυπική μορφολογία του μικτού πληθυσμού του πολφικού ιστού. Αντίθετα, στην 20^η ανακαλλιέργεια φαίνεται να έχουν επιλεχθεί κάποιοι κυτταρικοί τύποι σε σχέση με το συνολικό αρχικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, τα μακρόστενα κύτταρα που προσομοιάζουν με ινοβλάστες είναι περισσότερα σε σχέση με τα αστεροειδή κύτταρα του μεσεγχύματος, κάτι που είναι αναμενόμενο με την κυτταρική γήρανση. Επιπλέον, γίνεται φανερή και η μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων που επέρχεται με τη γήρανση, καθώς τρεις ημέρες μετά την 3^η ανακαλλιέργεια η καλλιέργεια είναι σε υπερπληρότητα, ενώ τρεις ημέρες μετά την 20^η ανακαλλιέργεια η καλλιέργεια εμφανίζει πληρότητα 40-50%.

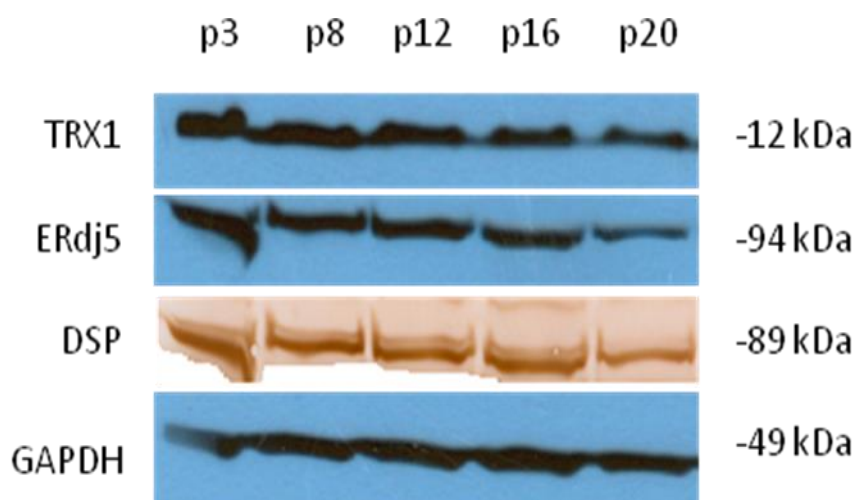


Εικόνα B7. Φωτογραφίες από το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο που δείχνουν πολφικά κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας (α) τρεις ημέρες μετά την 3^η ανακαλλιέργεια -p3- και (β) τρεις ημέρες μετά την 20^η ανακαλλιέργεια -p20. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με αντικειμενικό φακό 10x και zoom 7,4x.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ TRX1,

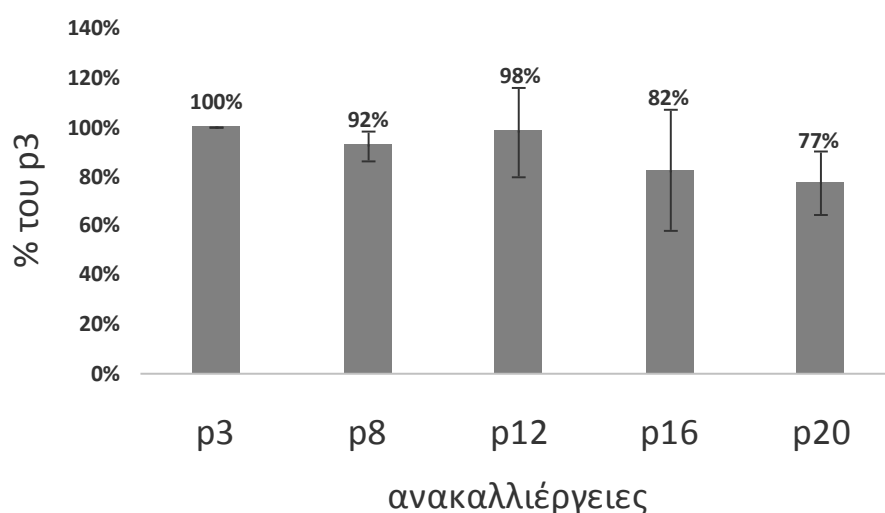
ERdj5 ΚΑΙ DSP ΣΕ ΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών TRX1, ERdj5 και DSP μετρήθηκαν με ανοσοστύπωση κατά Western (Western blot) (εικόνα B8) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κατά την 3^η (ομάδα ελέγχου, νεαρά κύτταρα), 8^η, 12^η, 16^η και 20^η (γηρασμένα κύτταρα) ανακαλλιέργεια (p3, p8, p12, p16 και p20 αντίστοιχα).



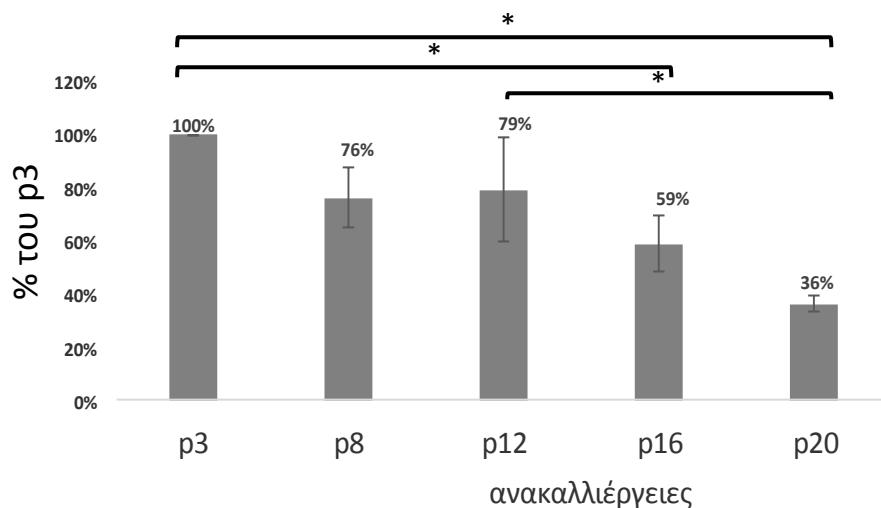
Εικόνα B8. Χαρακτηριστικές εικόνες από τα φιλμ και τη μεμβράνη (για την DSP, ανίχνευση με DAB) από την ανάλυση με Western blot στις διαφορετικές ανακαλλιέργειες (p3-p20). Απεικονίζονται κατά σειρά τα αποτελέσματα για την TRX1, την ERdj5, τη DSP και τη GAPDH, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου (housekeeping). Στα δεξιά αναγράφονται τα μοριακά βάρη της κάθε πρωτεΐνης.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων [one-way ANOVA, $F_{(4,9)}=0,426$, $p=0,786$] έδειξε ότι η έκφραση της θειορεδοξίνης (**TRX1**) δεν παρουσίασε κάποια αξιόλογη μεταβολή με την αύξηση του αριθμού των ανακαλλιέργειών. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβολές της **TRX1** κατά τη γήρανση κυμάνθηκαν από 77% έως 98% των επιπέδων στα νεαρά κύτταρα (της τρίτης ανακαλλιέργειας) και δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές (εικόνα B9).



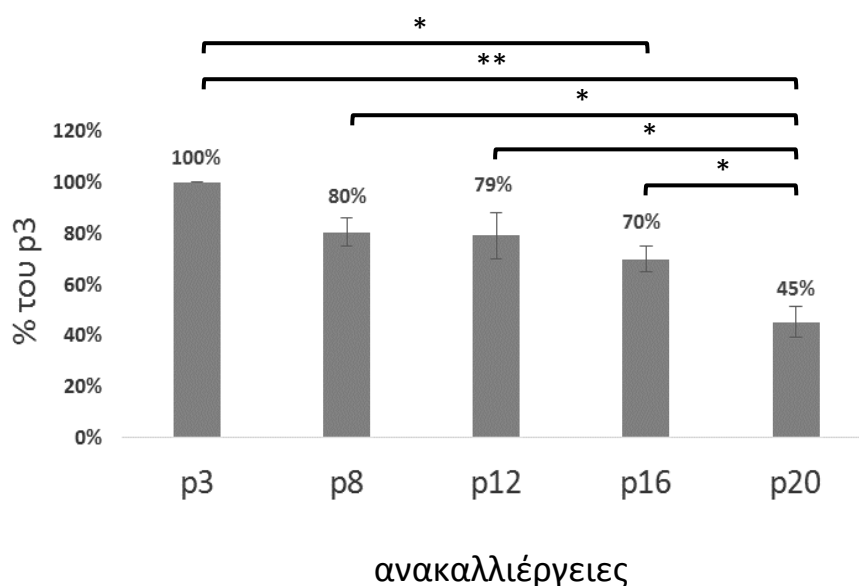
Εικόνα B9. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των Western blot σχετικά με τις μεταβολές της θειορεδοξίνης (**TRX1**) κατά την αναπαραγωγική γήρανση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της TRX1 προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (p3) $\pm$ SE.

Αντίθετα, τα επίπεδα της **ERdj5** φάνηκε να μειώνονται κατά τη γήρανση σε οριακά σημαντικό βαθμό [η στατιστική επεξεργασία έγινε με one-way ANOVA, $F_{(4,9)}=4,592$, $p=0,063$]. Η μετα-ανάλυση έδειξε ότι παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ERdj5 στα κύτταρα, ανάμεσα στις ανακαλλιέργειες p3 και p16 ($p=0,048$), p3 και p20 ($p=0,01$) και p12 και p20 ($p=0,041$), (εικόνα B10).



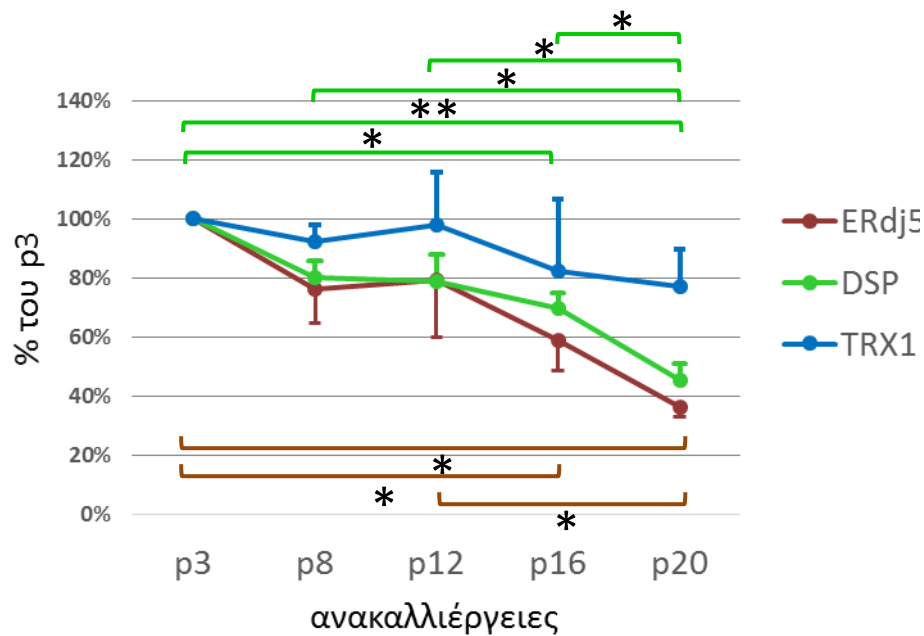
Εικόνα B10. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των Western blot σχετικά με τις μεταβολές της **ERdj5** κατά την αναπαραγωγική γήρανση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της ERdj5 προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (p3) $\pm$ SE. Το * δηλώνει $p<0,05$.

Η **DSP** εμφάνισε επίσης πτωτική πορεία από την 3^η έως την 20^η ανακαλλιέργεια (η στατιστική επεξεργασία έγινε με one-way ANOVA, $F_{(4,9)}=11,583$, $p=0,01$). Όπως παρατηρείται και στη εικόνα B11, η μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μείωση στα επίπεδα της DSP ανάμεσα στα κύτταρα των ανακαλλιιεργειών p3 και p16 ($p=0,015$) , p3 και p20 ($p=0,001$), p8 και p20 ($p=0,008$), p12 και p20 ($p=0,09$), καθώς και p16 και p20 ($p=0,03$). Αξιοσημείωτη είναι η μείωση στην έκφραση της DSP μεταξύ των νεαρών (3^η ανακαλλιέργεια) και των γηρασμένων (20^η ανακαλλιέργεια) κυττάρων ($p<0,001$).



Εικόνα B11. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των Western blot σχετικά με τις μεταβολές της οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (**DSP**) κατά την αναπαραγωγική γήρανση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της DSP προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (p3) $\pm$ SE. Το * δηλώνει $p<0,05$, ενώ το ** $p<0,001$.

Συνολικά, όπως φαίνεται και στο συγκεντρωτικό διάγραμμα των μεταβολών στις πρωτεΐνες ERdj5, DSP και TRX1 με την αναπαραγωγική γήρανση, παρατηρήθηκε μείωση της Erdj5 και της DSP, ενώ τα επίπεδα της TRX1 δε μεταβλήθηκαν σημαντικά (εικόνα B12).

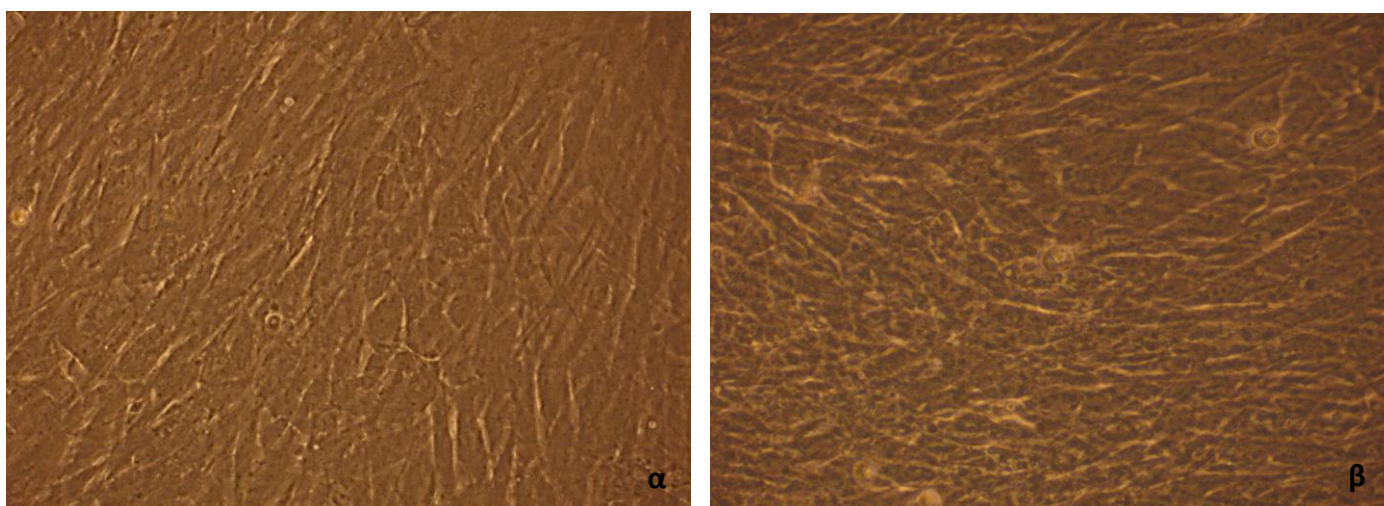


Εικόνα B12. Συγκεντρωτικό διάγραμμα των αποτελέσμάτων των Western blot σχετικά με τις μεταβολές των ERdj5, DSP και TRX1 κατά τη αναπαραγωγική γήρανση. Παρατηρείται μείωση της Erdj5 και της DSP, ενώ η TRX1 δε μεταβάλλεται σημαντικά. Ως ομάδα ελέγχου θεωρήθηκαν τα νεαρά κύτταρα της 3^{ης} ανακαλλιέργειας (p3). Το * δηλώνει $p < 0,05$, ενώ το ** $p < 0,001$.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H_2O_2 ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ

ΚΥΤΤΑΡΩΝ

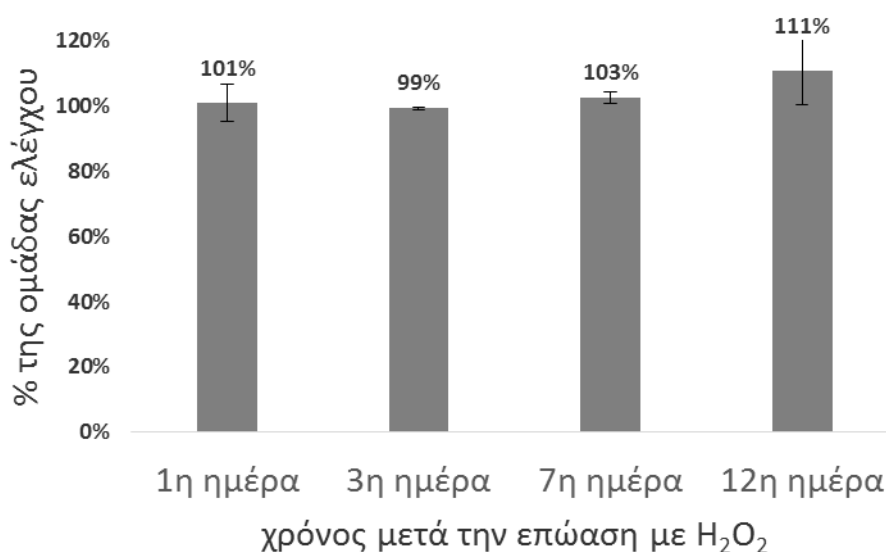
Στην εικόνα B13α απεικονίζεται καλλιέργεια νεαρών πολφικών κυττάρων (3 ημέρες μετά την 3^η ανακαλλιέργεια, ομάδα ελέγχου) και στην εικόνα B13β φαίνεται ίδια καλλιέργεια 24 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων για 2 ώρες με 150 μM H_2O_2 . Τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία του μικτού πληθυσμού του πολφικού ιστού. Η μορφολογία των κυττάρων που έχουν επωαστεί με H_2O_2 εμφανίζει αλλαγές (όπως αποπτωτικά κυστίδια που παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση), οι οποίες υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα αυτά δεν είναι υγιή. Ωστόσο τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά και οι συνέπειες από την επίδραση αυτής της υπο-τοξικής δόσης του H_2O_2 δεν είναι καταστρεπτικές.



Εικόνα B13. Φωτογραφίες από το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο που δείχνουν πολφικά κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας (α) χωρίς την επίδραση του H_2O_2 και (β) 24 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων για 2 ώρες με 150 μM H_2O_2 . Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με αντικειμενικό φακό 10x και zoom 7,4x.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την 1η, 3η, 7η και 12η ημέρα από την επώαση τους με 150 μ M H₂O₂ για 2 ώρες, αξιολογήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT. Όπως φαίνεται και στην εικόνα B14 δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων που επωάστηκαν με H₂O₂ και αυτών της ομάδας ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει ότι η δόση του H₂O₂ που χρησιμοποιήθηκε για την επώαση των κυττάρων δεν ήταν τοξική.

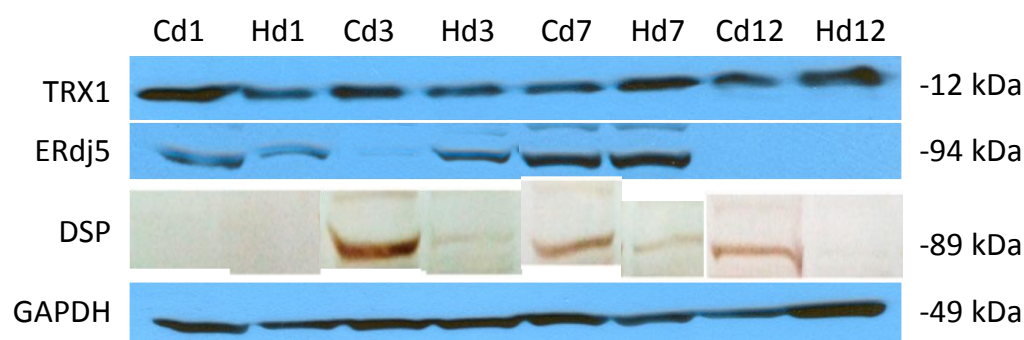


Εικόνα B14. Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά απο επώση με H₂O₂. Στο ιστόγραμμα φαίνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων 1, 3, 7 και 12 ημέρες μετά την επώαση τους με 150 μ M H₂O₂ για 2 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % της βιωσιμότητας τους προς τη βιωσιμότητα της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου κατά την ίδια ημέρα.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ TRX1, ERdj5 ΚΑΙ DSP ΣΤΑ

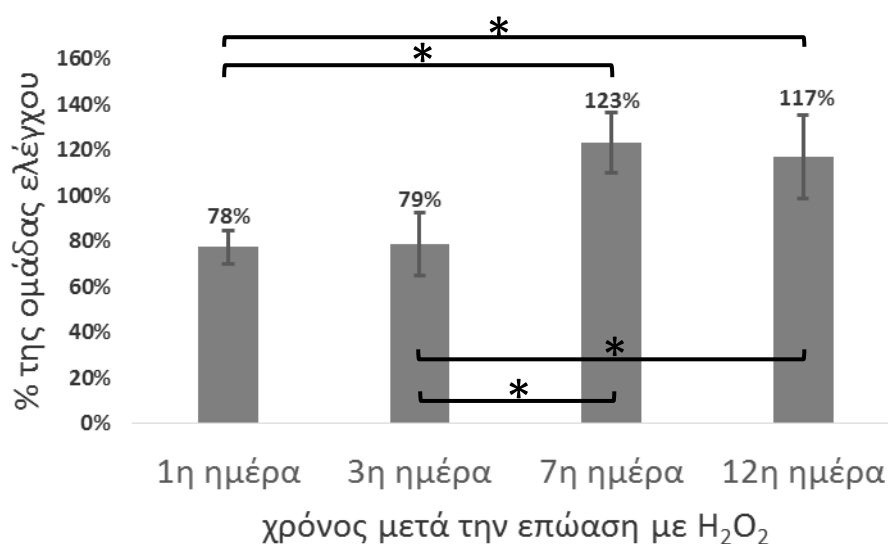
ΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΟΛΦΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών TRX1, ERdj5 και DSP μετρήθηκαν με ανοσοστυψωση κατά Western (Western blot) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από καλλιέργειες πολφικών κυττάρων που είχαν επωαστεί για 2 ώρες με 150 μ M H₂O₂ και τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου (κύτταρα από την ίδια καλλιέργεια χωρίς την επίδραση του H₂O₂) (εικόνα B15). Η συλλογή των κυττάρων έγινε 1, 3, 7 και 12 ημέρες μετά την ανακαλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά την επώαση με H₂O₂.



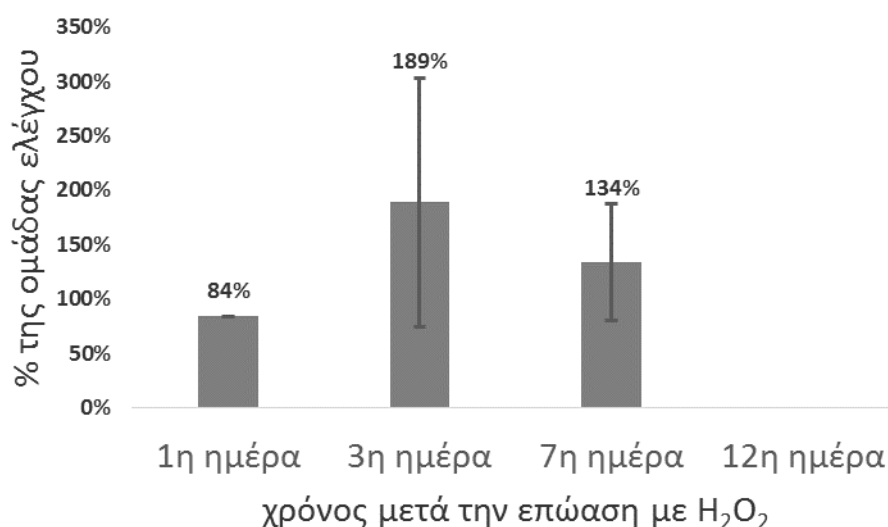
Εικόνα B15. Εικόνες από χαρακτηριστικά φιλμ και μεμβράνες που προέκυψαν κατά τη Western blot. Απεικονίζονται κατά σειρά τα αποτελέσματα για την TRX1, την ERdj5, τη DSP και τη GAPDH, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου (housekeeping). Στα δεξιά αναγράφονται τα μοριακά βάρη της κάθε πρωτεΐνης. Με C συμβολίζεται η ομάδα ελέγχου, ενώ με H η πειραματική ομάδα. Τα d1, d3, d7 και d12 αντιστοιχούν στην 1^η, 3^η, 7^η και 12^η ημέρα.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (two-way ANOVA) έδειξε ότι τα επίπεδα της θειορεδοξίνης (**TRX1**) μεταβλήθηκαν σημαντικά από την επίδραση του H_2O_2 , σε συνάρτηση και με το χρόνο [$F_{(3,33)}=3,207$, $p=0,04$] που μεσολάβησε από την δράση του (εικόνα B16). Ακόμα, φάνηκε ότι ο χρόνος που ακολούθησε την επώαση προκάλεσε επίσης σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεΐνης ($F_{(3,33)}=3,207$, $p=0,04$). Η μετα-ανάλυση που ακολούθησε έδειξε ότι η TRX1 μειώθηκε στα κύτταρα που επωάστηκαν με H_2O_2 κατά την 1^η και την 3^η ημέρα ενώ αυξήθηκε κατά την 7^η και τη 12^η ημέρα. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρξαν μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης των κυττάρων της 1^{ης} και της 7^{ης} ημέρας ($p=0,002$), της 1^{ης} και της 12^{ης} ημέρας ($p=0,01$), της 3^{ης} και της 7^{ης} ημέρας ($p=0,003$) και αυτών της 3^{ης} και της 12^{ης} ημέρας ($p=0,012$).



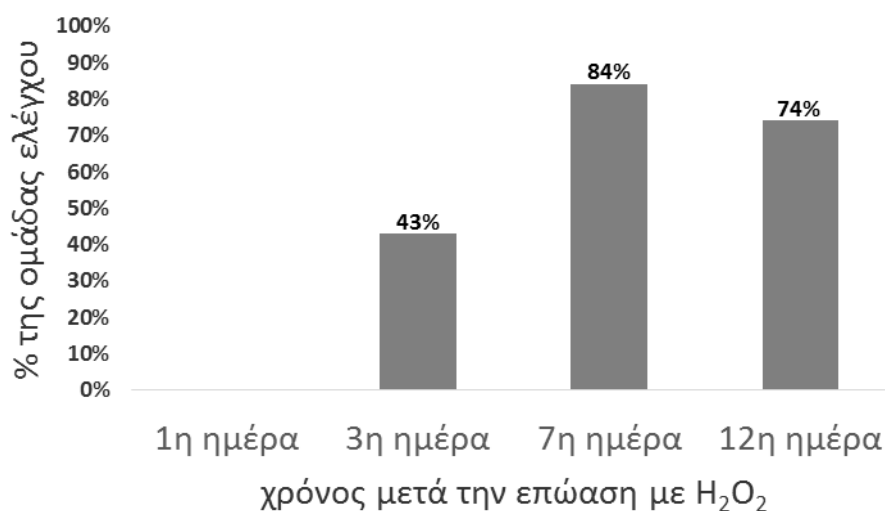
Εικόνα B16. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των Western blot σχετικά με τις μεταβολές της θειορεδοξίνης (**TRX1**) ανάμεσα σε πολφικά κύτταρα που έχουν επωαστεί με H_2O_2 , σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επώαση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της TRX1 προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου της ίδιας ημέρας $\pm$ SE. Το * δηλώνει $p<0,05$.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (two-way ANOVA), έδειξε ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της **ERdj5** από την επίδραση του H_2O_2 , σε συνάρτηση και με το χρόνο που μεσολάβησε από την δράση του (εικόνα B17). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ERdj5 φάνηκε να μη μεταβάλλονται την 1^η ημέρα συγκριτικά με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, την 3^η και την 7^η ημέρα από την έκθεση στο H_2O_2 , παρουσιάστηκε τάση αύξησης της ERdj5 στην πειραματική ομάδα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (189% και 134%, αντίστοιχα), χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Για τη 12^η ημέρα δεν έχουμε αποτελέσματα καθώς υπήρξαν προβλήματα στην ανοσοσύτρωση κατά Western.



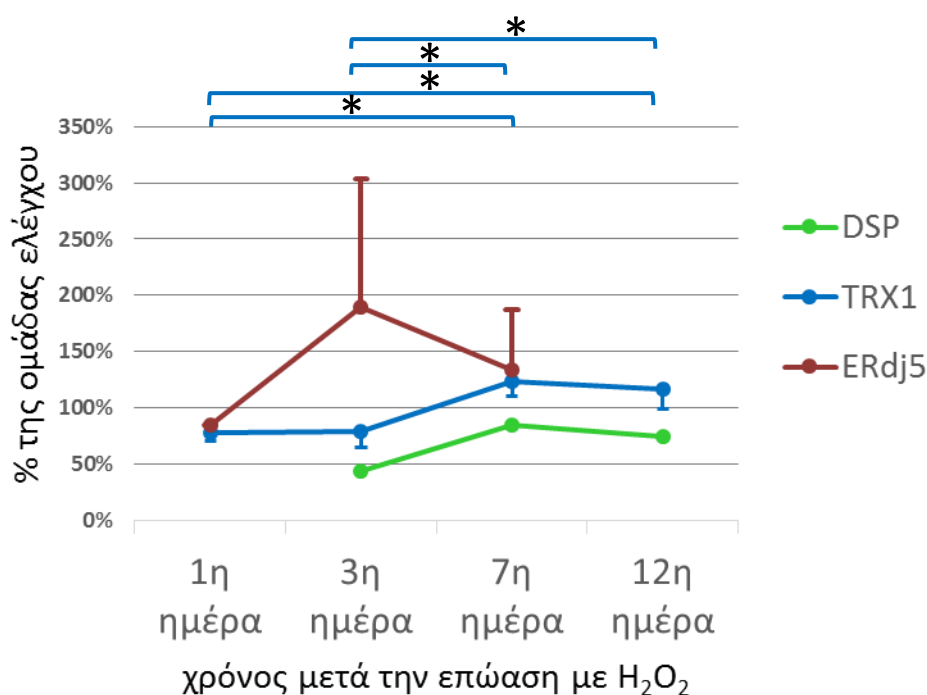
Εικόνα B17. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των Western blot σχετικά με τις μεταβολές της **ERdj5** ανάμεσα σε πολφικά κύτταρα που έχουν επωαστεί με H_2O_2 , σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επώαση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της ERdj5 προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου της ίδιας ημέρας $\pm$ SE.

Δεν ήταν εφικτή η πραγματοποίηση στατιστικής ανάλυσης για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τα επίπεδα της οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (**DSP**), λόγω έλλειψης αρκετών δειγμάτων. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μια τάση μείωσης των επιπέδων της DSP από την επίδραση του H_2O_2 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (εικόνα B18).



Εικόνα B18. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τις μεταβολές της οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (**DSP**) ανάμεσα σε πολφικά κύτταρα που έχουν επωαστεί με H_2O_2 , σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επώαση. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας της DSP προς τη GAPDH) εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου της ίδιας ημέρας.

Συνολικά, όπως φαίνεται και στο συγκεντρωτικό διάγραμμα των μεταβολών στις πρωτεΐνες ERdj5, DSP και TRX1 με την επίδραση του H_2O_2 στη διάρκεια του χρόνου, παρατηρήθηκε αύξηση της TRX1 από την 7^η ημέρα, τάση αύξησης της ERdj5 από την 3^η ημέρα μετά την επώαση με H_2O_2 , ενώ η DSP έδειξε μια τάση μείωσης στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικόνα B19).



Εικόνα B19. Συγκεντρωτικό διάγραμμα των αποτελεσμάτων των Western blot σχετικά με τις μεταβολές των ERdj5, DSP και TRX1 ανάμεσα σε πολφικά κύτταρα που έχουν επωαστεί με H_2O_2 , σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επώαση. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της TRX1 από την 7^η ημέρα, τάση αύξησης της ERdj5 από την 3^η ημέρα μετά την επώαση με H_2O_2 , και τάση μείωσης της DSP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το * δηλώνει $p < 0,05$. Η στατιστική ανάλυση αφορά μόνο στα επίπεδα της TRX1.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη γήρανση του οδοντικού πολφού συμβαίνουν πολλές μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του δοντιού στο στοματογναθικό σύστημα. Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται μείωση της αγγείωσης και της νεύρωσης του πολφού, ελάττωση του μεγέθους του, μείωση της αναλογίας των κυττάρων προς την εξωκυττάρια μήτρα, καθώς και εκφυλιστικές αλλοιώσεις.

Τα κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν σε γήρανση είτε φυσιολογικά με την πάροδο της ηλικίας -φτάνοντας σε ένα συγκεκριμένο όριο αριθμού διαιρέσεων, το όριο Hayflick-, είτε λόγω της επίδρασης τοξικών ή και στρεσογόνων ερεθισμάτων σε αυτά. Στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε αναπαραγωγική γήρανση, ενώ στη δεύτερη σε πρόωρη γήρανση επαγόμενη από στρες (SIPS).

ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Για την εργασία αυτή αναπτύχθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων οδοντικών πολφικών κυττάρων στις οποίες εφαρμόστηκαν δύο μοντέλα γήρανσης (αναπαραγωγικής και επαγόμενης από στρες). Σκοπός ήταν να διερευνηθούν στα ανωτέρω μοντέλα οι μεταβολές που προκαλούνται στην έκφραση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα (θειορεδοξίνη, TRX1), μίας πρωτεΐνης σχετιζόμενης με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ERdj5) και ενός δείκτη οδοντικής διαφοροποίησης (οδοντική σιαλοπρωτεΐνη, DSP). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα in vitro μοντέλα δεν αντιστοιχούν πλήρως στην in vivo κατάσταση

και γι' αυτό θα πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην αναγωγή κλινικών συμπερασμάτων.

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από πολφά αδιάπλαστων έγκλειστων τρίτων γομφίων. Επιλέχθηκαν αδιάπλαστα δόντια, για να είναι νεαρά τα αρχικά κύτταρα που θα χρησιμοποιούνταν για τα πειράματα. Επιπλέον, έπρεπε να είναι έγκλειστα για να μην έχει υπάρξει επαφή τους με το στοματικό περιβάλλον και πιθανή δράση στρεσογόνων ερεθισμάτων σε αυτά. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, καθώς έχει αναφερθεί μείωση της διαίρεσης και διαφοροποίησης, ελάττωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ή/και πρόκληση στρες σε πολφικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (Oancea et al 2013).

Η παραγωγή των μοντέλων της κυτταρικής γήρανσης έγινε μέσω 20 διαδοχικών ανακαλλιιεργειών, διάστημα που επιλέχθηκε βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Lee et al 2013, Li et al 2012), και μέσω έκθεσης των κυττάρων σε υπο-τοξική συγκέντρωση H_2O_2 , η οποία είναι ικανή να προκαλέσει πρόωρη γήρανση οφειλόμενη σε στρες (Lee et al 2013).

Η χρώση SA β-gal που χρησιμοποιήθηκε για την πιστοποίηση της γήρανσης του κυτταρικού πληθυσμού, είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης γι' αυτό το σκοπό.

Η τεχνική Western blot, παρόλο που δίνει μια στατική εικόνα των επιπέδων μιας πρωτεΐνης, βοηθά στην αξιολόγηση των μεταβολών που συμβαίνουν σε αυτή, αν

εφαρμοστεί σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα και σε κύτταρα που έχουν δεχθεί διαφορετική μεταχείριση.

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΛΦΙΚΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι διαδοχικές ανακαλλιέργειες προκάλεσαν γήρανση στα πολφικά κύτταρα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τη δοκιμασία της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης. Διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των χρωσμένων κυττάρων στη δοκιμασία αυτή αυξάνονταν ανάλογα με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι Lee και συνεργάτες (2013) βρήκαν ότι το ποσοστό των χρωσμένων πολφικών κυττάρων της 25^{ης} ανακαλλιέργειας ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερο από αυτό των κυττάρων της 5^{ης} ανακαλλιέργειας. Ακόμα μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό των γηρασμένων κυττάρων αναφέρεται από τους Li και συνεργάτες (2012), με τα γηρασμένα κύτταρα της 11^{ης} ανακαλλιέργειας να είναι 4,8 φορές περισσότερα από αυτά της 2^{ης}.

ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ DSP,

ERdj5 ΚΑΙ TRX1

Η αναπαραγωγική γήρανση οδήγησε σε σταδιακή μείωση των επιπέδων της οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (**DSP**), με την αύξηση του αριθμού των ανακαλλιεργειών. Η DSP είναι ένας οδοντινογενετικός δείκτης που έχει συνδεθεί με

την ενασβεσίωση της οδοντίνης και αποτελεί προϊόν ωρίμανσης της οδοντινικής σιαλοφωσφοπρωτεΐνης (DSPP). Οι αλλαγές στα επίπεδα της DSP δεν έχουν μελετηθεί προηγουμένως σε αντίστοιχα κυτταρικά μοντέλα. Ωστόσο, οι Lee και συνεργάτες (2013) έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της DSPP, του πρόδρομου μορίου της DSP, μειώνονται από την 5^η στην 25^η ανακαλλιέργεια πολφικών κυτταρων, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Επιπλέον, σε μελέτη των Mehrazarin και συνεργατών (2011) διαπιστώθηκε πτώση των επιπέδων mRNA της DSPP σε καλλιέργεια βλαστοκυττάρων του οδοντικού πολφού μετά από αναπαραγωγική γήρανση. Η παρατηρηθείσα μείωση των επιπέδων της DSP υποδηλώνει μείωση της ικανότητας των γηρασμένων κυττάρων για μεταλλικοποίηση της οδοντίνης και κατ' επέκταση μικρότερη δυνατότητα του γηρασμένου πολφού να αντιδρά στα ερεθίσματα που δέχεται από το περιβάλλον του.

Τα επίπεδα της **ERdj5** παρουσίασαν επίσης πτωτική πορεία κατά την αναπαραγωγική γήρανση. Σημειώνεται ότι για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (δείκτη στρες του ενδοπλασματικού δικτύου), αλλά και γενικότερα για τη σχέση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου με τη γήρανση του οδοντικού πολφού, δεν έχουν πραγματοποιηθεί άλλες έρευνες. Η μείωση των επιπέδων της ERdj5 υποδηλώνει ότι τουλάχιστον το συγκεκριμένο μονοπάτι απόκρισης στο στρες του ΕΔ υπολειτουργεί κατά τη γήρανση του οδοντικού πολφού, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε γενικότερη ελάττωση του ρυθμού της πρωτεϊνσύνθεσης κατά τη γήρανση. Όπως ανέφεραν οι Murray και συνεργάτες (2002), η σύνθεση πρωτεϊνών και η εκκριτική δραστηριότητα των οδοντινοβλαστών, που αποτελούν υποπληθυσμό του πολφικού ιστού, μειώνεται με την ηλικία.

Τα επίπεδα της **TRX1** (θειορεδοξίνη) παρουσίασαν μία τάση ελάττωσης κατά την αναπαραγωγική γήρανση των πολφικών κυττάρων, η οποία όμως δε μπόρεσε να επιβεβαιωθεί στατιστικά και είναι αμφίβολη. Δεν έχει μελετηθεί η επίπτωση της αναπαραγωγικής γήρανσης στα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης σε αντίστοιχα κύτταρα. Παρ' όλα αυτά έχει αναφερθεί ότι η ανεπάρκεια του αντιοξειδωτικού συστήματος, μέρος του οποίου είναι η θειορεδοξίνη, οδηγεί σε γήρανση (Lee et al 2013). Μια παρατήρηση, που θα μπορούσε να συνδεθεί σε ένα γενικότερο πλαίσιο με τα αποτελέσματά μας, είναι ότι διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την TRX1 είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Mitsui et al 2002, Nakamura et al 2002).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΛΦΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα αποτελέσματά μας σχετικά με την επίδραση του H₂O₂ στη βιωσιμότητα των κυττάρων του πολφού, έδειξαν ότι η συγκέντρωση των 150μM H₂O₂ που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κυτταροτοξική, αν επιδράσει στα κύτταρα για 2 ώρες. Αυτό αποδείχθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT, που δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων που είχαν επωαστεί με H₂O₂, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματά μας έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Zhu και συνεργατών (2012), που χρησιμοποίησαν λίγο μικρότερη συγκέντρωση H₂O₂ (100μM) για πολύ μεγαλύτερο όμως χρονικό διάστημα (24 ώρες), διαπιστώνοντας μια ελάχιστη μείωση της τάξεως του 5% στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με H₂O₂, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ακόμη, οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν ότι συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 500 μM H₂O₂ για 24 ώρες ήταν θανατηφόρες για τα πολφικά κύτταρα, καθώς η βιωσιμότητά τους

έπεσε στο 0% (Zhu et al 2012). Συνεπώς, η βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του H_2O_2 και το χρόνο επώασης. Η συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης που επιλέξαμε για αυτή τη μελέτη δεν είναι κυτταροτοξικά. Σε αντίθετη περίπτωση, δε θα μπορούσαν να επάγουν ένα φαινότυπο που να προσομοιάζει με το γηρασμένο.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H_2O_2 ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ DSP, ERdj5 ΚΑΙ TRX1

Η επίδραση του H_2O_2 φάνηκε να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της οδοντινικής σιαλοπρωτεΐνης (**DSP**), ειδικά στα πρώτα 24-ωρα (έως και 3 ημέρες) από την επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δε μπόρεσαν να επιβεβαιωθούν στατιστικά, λόγω έλλειψης επαρκούς αριθμού δειγμάτων. Οι Lee και συνεργάτες (2013), κάτω από τις ίδιες συνθήκες H_2O_2 , βρήκαν επίσης μειωμένο το mRNA της DSPP, η οποία είναι πρόδρομο μόριο της DSP. Η διαφορά με τα δικά μας αποτελέσματα ήταν ότι η μείωση αυτή ήταν σταδιακή από την 1^η έως τη 12^η ημέρα. Διαφορετικά ευρήματα είχαν οι Min και συνεργάτες (2008), οι οποίοι έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της DSPP αυξάνονται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο μέχρι τη συγκέντρωση των 500 μM H_2O_2 . Αυτή η διαφορά ίσως να οφείλεται στο διαφορετικό χρόνο επώασης, που ήταν 24 ώρες. Έχει αναφερθεί ότι η DSP μπορεί να έχει κάποιο προστατευτικό ρόλο έναντι της δράσης κυτταροτοξικών παραγόντων (Goldberg and Smith 2004), γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματα των Min και συνεργατών (Min et al 2008). Ίσως λοιπόν αυτή η αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα να οφείλεται στο ότι ο μικρός χρόνος επώασης δεν προκάλεσε κυτταροτοξικότητα, ώστε να επαχθεί η DSP.

Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα της **ERdj5** δε φάνηκε να μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά μετά την επώαση με το H_2O_2 . Μια διαφαινόμενη τάση αύξησής τους θα μπορούσε να υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μηχανισμού για την αντιμετώπιση του στρες του ΕΔ. Σύμφωνα με τον Watson (2014), αν υπάρχουν πολλά αντιοξειδωτικά, όπως υπάρχουν στην περίπτωση μας για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, μπορεί να προκύψει αδυναμία σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και άρα στρες του ΕΔ. Αυτό συμβαίνει επειδή το οξειδοαναγωγικό δυναμικό μπορεί να είναι πολύ χαμηλό για να μπορέσουν να σχηματιστούν σωστά οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Συνεπώς, μία τάση αύξησης της έκφρασης της ERdj5 είναι αναμενόμενη και εξηγήσιμη στην παρούσα μελέτη, αν και πρέπει να αποδειχθεί και στατιστικά με περαιτέρω πειράματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη και το στρες του ΕΔ δεν έχουν μελετηθεί σε παρόμοιο κυτταρικό μοντέλο. Σημειώνεται ότι άλλα ευρήματα από το Εργαστήριό μας (Diamanti et al 2013) έδειξαν πως η ERdj5 αυξάνει μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες σε οδοντικά πολφικά κύτταρα που έχουν επωαστεί με το ρητινώδες μονομερές HEMA.

Η **TRX1** εμφανίζεται μειωμένη 1 και 3 ημέρες μετά την επώαση με το H_2O_2 , ενώ τα επίπεδά της αυξάνουν στις 7 και 12 ημέρες, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα για την ERdj5, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στο μοντέλο γήρανσης επαγώμενης από κυτταρικό στρες, ενεργοποιείται κυρίως ο μηχανισμός αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες. Οι μεταβολές που προκαλούνται στα κύτταρα λόγω της δράσης του H_2O_2 είναι προσωρινές, καθώς τα κύτταρα είναι ικανά να ανακάμπτουν με την πάροδο του χρόνου (Hampton and Orrenius 1997). Αυτό επιβεβαιώνεται εν μέρει και από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα οδοντικά πολφικά κύτταρα μετά από αναπαραγωγική γήρανση εμφανίζουν μια γενικότερη αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης, χωρίς την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που ανήκουν στα συστήματα αντιμετώπισης του στρες του ΕΔ και του οξειδωτικού στρες (ERdj5 και TRX1). Αντίθετα, η επίδραση της μη-κυτταροτοξικής συγκέντρωσης H_2O_2 στα κύτταρα του πολφού, η οποία μπορεί δυνητικά να προκαλέσει πρόωρη γήρανση επαγόμενη από στρες, ενεργοποιεί το μηχανισμό αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες και ίσως και του στρες του ΕΔ. Βεβαίως δε θα πρέπει να γίνονται γενικεύσεις, καθώς μελετήθηκε μόνο μία πρωτεΐνη από το κάθε σύστημα και όχι το σύνολό τους. Βλέπουμε λοιπόν ότι τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία επιβεβαιώνουν τη διαπίστωση των Dierick και συνεργατών (2002), σύμφωνα με την οποία η αναπαραγωγική γήρανση και η πρόωρη γήρανση επαγόμενη από στρες είναι διαφορετικές σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης, παρότι μοιράζονται παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελέτησε τις μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες και την ενασβεστίωση της οδοντίνης σε δύο μοντέλα κυτταρικής γήρανσης των οδοντικών πολφικών κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες πολφικών κυττάρων που προέρχονταν από ανθρώπινους έγκλειστους τρίτους γομφίους. Η επαγωγή της αναπαραγωγικής γήρανσης πραγματοποιήθηκε με 20 διαδοχικές ανακαλλιέργειες και η επιβεβαίωση της γήρανσης των κυττάρων έγινε με την ανίχνευση της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης. Η πρόκληση της επαγόμενης από στρες πρόωρης γήρανσης έγινε με έκθεση των κυττάρων σε 150 μM H_2O_2 για 2 ώρες, ενώ ο έλεγχος της υπο-κυτταροτοξικής επίδρασης του H_2O_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο MTT. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών θειορεδοξίνη (TRX1), ERdj5 και οδοντινική σιαλοπρωτεΐνη (DSP) μετρήθηκαν με ανοσοσύτρωση κατά Western στις διαφορετικές ανακαλλιέργειες (μοντέλο αναπαραγωγικής γήρανσης) και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επώαση με το H_2O_2 (μοντέλο επαγόμενης από στρες πρόωρης γήρανσης) και συγκρίθηκαν με τα επίπεδα των πρωτεϊνών σε νεαρά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια γενικότερη μείωση στα επίπεδα όλων των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν κατά την αναπαραγωγική γήρανση. Στην επαγόμενη από στρες (H_2O_2) πρόωρη γήρανση, διαπιστώθηκε κυρίως αύξηση των επιπέδων της TRX1 σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την έκθεση στο H_2O_2 .

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη παρέχει ενδείξεις ότι η αναπαραγωγική γήρανση και η επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση των κυττάρων του πνεύμονα εμφανίζουν διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

II. SUMMARY

This study examined the changes in the levels of proteins associated with cellular stress and calcification of dentine, in two models of cellular senescence of dental pulp cells. For this purpose we used primary cultures of dental pulp cells derived from human impacted third molars. The induction of replicative senescence was achieved upon 20 successive passages and the confirmation of cellular aging was done by detecting the senescence associated β -galactosidase (SA β -gal)-positive cells. The induction of stress-induced premature senescence was performed by exposing the cells to 150 μ M H_2O_2 for 2 hours. The sub-cytotoxic effect of H_2O_2 on cell viability was evaluated by using the MTT method. Protein levels of thioredoxin (TRX1), ERdj5 and dentin sialoprotein (DSP) were determined by Western blot at different passages (model of replicative senescence) and at different time intervals following H_2O_2 treatment (model of stress-induced premature senescence) and were compared with respective protein levels in young cells.

Our results showed that replicative senescence led to a general reduction in the levels of all proteins studied. On the other hand, the stress-induced premature senescence resulted in a time-dependent increase of TRX1 levels upon exposure to H_2O_2 .

In conclusion, this study provides some evidence that replicative senescence and stress-induced premature senescence of dental pulp cells exhibit different cellular responses at the protein level.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arner ES, Holmgren A (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000 Oct;267(20):6102-9.

Babior BM (1997). Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Feb;30(2):141-55.

Bagchi K, Puri S (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr.* 1998;4:350–60.

Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Francz PI (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5112-6.

Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):349-52.

Brack C, Lithgow G, Osiewacz H, Toussaint O (2000). EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):1929-34.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Sep;8(9):729-40.

Carlson B (1999). *HUMAN EMBRYOLOGY & DEVELOPMENTAL BIOLOGY.* Second Edition, Mosby Inc.

Catalá A (2010). A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Aug 27;399(3):318-23.

Couve E (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*. 1986;31(10):643-51.

Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O (2013). The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res*. 2013 Sep;92(9):765-72.

Cristofalo VJ, Pignolo RJ (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev*. 1993 Jul;73(3):617-38.

Cristofalo VJ, Sharf BB (1973). Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Exp Cell Res*. 1973 Feb;76(2):419-27.

Cunnea PM, Miranda-Vizuet A, Bertoli G, Simmen T, Damdimopoulos AE, Hermann S, Leinonen S, Huikko MP, Gustafsson JA, Sitia R, Spyrou G (2003). ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):1059-66.

d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*. 2009 Nov 12;18:75-83.

Diamanti E, Mathieu S, Jeanneau C, Kitraki E, Panopoulos P, Spyrou G, About I (2013). Endoplasmic reticulum stress and mineralization inhibition mechanism by the resinous monomer HEMA. *Int Endod J*. 2013 Feb;46(2):160-8.

Dierick JF, Eliaers F, Remacle J, Raes M, Fey SJ, Larsen PM, Toussaint O (2002). Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):1011-7.

Dierick JF, Fripiat C, Salmon, Chainiaux F, Toussaint O (2003). Cells, stress and tissue ageing. *Biology of Aging and its Modulation*, Rattan, S. I. S. (ed.). Kluwer, Amsterdam, 101-125.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9363-7.

Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 1;28(3):361-73.

Ebadi M (2001). Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. Arizona: Prominent Press; 2001.

Espina AI, Castellanos AV, Fereira JL (2003). Age-related changes in blood capillary endothelium of human dental pulp: an ultrastructural study. *Int Endod J*. 2003 Jun;36(6):395-403.

Fink AL (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 1999 Apr;79(2):425-49.

Fridovich I (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*. 1999;893:13-8.

Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol*. 2003 Aug;38(8):887-95.

Gibson BW (2005). The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 May;37(5):927-34.

Goldberg M, Smith AJ (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(1):13-27.

Goldstein S (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. 1990 Sep 7;249(4973):1129-33.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Hagiwara M, Maegawa K, Suzuki M, Ushioda R, Araki K, Matsumoto Y, Hoseki J, Nagata K, Inaba K (2011). Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol Cell*. 2011 Feb 18;41(4):432-44.

Halliwell B, Gutteridge JM (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*. 1985;8(2):89-193.

Hampton MB, Orrenius S (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*. 1997 Sep 15;414(3):552-6.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):458-60.

Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965 Mar;37:614-36.

Horikoshi T, Balin AK, Carter DM (1991). Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1991 Jun;96(6):841-4.

Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW (2008). Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2654-63.

Ikawa M, Komatsu H, Ikawa K, Mayanagi H, Shimauchi H (2003). Age-related changes in the human pulpal blood flow measured by laser Doppler flowmetry. *Dent Traumatol*. 2003 Feb;19(1):36-40.

Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, Haapasalo M (2010). Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod* 2010; 36(3): 469-74.

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G (1998). Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):179-200.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 (Pt 20):3613-22.

Larmas M, Sándor GK (2014). Enzymes, dentinogenesis and dental caries: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2014 Dec 29;5(4):e3.

Lee YH, Kim GE, Cho HJ, Yu MK, Bhattarai G, Lee NH, Yi HK (2013). Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):340-5.

Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J (2008). Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod*. 2008 Oct;34(10):1211-4.

Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W (2012). Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2012 Dec;45(12):1074-9

Liu VW, Zhang C, Nagley P (1998). Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res*. 1998 Mar 1;26(5):1268-75.

Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):361-70.

Martindale JL, Holbrook NJ (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002 Jul;192(1):1-15.

Matsumura T (1980). Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture. *Adv Exp Med Biol*. 1980;129:31-8.

Mehrazarin S, Oh JE, Chung CL, Chen W, Kim RH, Shi S, Park NH, Kang MK (2011). Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1 expression. *J Endod*. 2011 May;37(5):662-6.

Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, Chung HT, Shin HI, Lee SK, Kim EC(2008). Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):983-9.

Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J (2002). Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Aug;4(4):693-6.

Miura T, Mattson MP, Rao MS (2004). Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell*. 2004 Dec;3(6):333-43.

Moule AJ, Li H, Barthold PM (1995). Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J*. 1995 Apr;40(2):110-4.

Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ (2002). Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Apr;93(4):474-82.

Nakamura H, Mitsui A, Yodoi J (2002). Thioredoxin overexpression in transgenic mice. *Methods Enzymol.* 2002;347:436-40.

Nanci A (2012). *Ten Cate's Oral Histology.* 8th Edition

Nordberg J, Arnér ES (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11):1287-312.

Oancea R, Deaka E, Popovici RA, Iliutab I, Sava-Rosianu R (2013). Behavioural changes and plastic potential alteration of dental pulp stem cells exposed to high glucose concentrations. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* Vol. 8, No. 1, January - March 2013, p. 313 - 321.

Ohira A, Honda O, Gauntt CD, Yamamoto M, Hori K, Masutani H, Yodoi J, Honda Y (1994). Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Lab Invest.* 1994 Feb;70(2):279-85.

Rodier F, Campisi J (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011 Feb 21;192(4):547-56.

Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppé JP, Campeau E, Beauséjour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci.* 2011 Jan 1;124(Pt 1):68-81.

Römer P, Wolf M, Fanghänel J, Reicheneder C, Proff P (2014). Cellular response to orthodontically-induced short-term hypoxia in dental pulp cells. *Cell Tissue Res.* 2014 Jan;355(1):173-80.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593-602.

Shay JW, Roninson IB (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2919-33.

Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9086-90.

Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, Cooper PR (2009). Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone.* 2009 Oct;45(4):693-703.

Smith JR, Whitney RG (1980). Intracloal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science.* 1980 Jan 4;207(4426):82-4.

Stadtman ER, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.

Steinberg D (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):20963-6.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):221-9.

Tanaka H, Makino Y, Okamoto K (1999). Thioredoxin in the endocrine response to stress. *Vitam Horm.* 1999;57:153-75.

Toussaint O, Dumont P, Remacle J, Dierick JF, Pascal T, Frippiat C, Magalhaes JP, Zdanov S, Chainiaux F (2002). Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *ScientificWorldJournal.* 2002 Jan 29;2:230-47. (α)

Toussaint O, Remacle J, Dierick JF, Pascal T, Frippiat C, Zdanov S, Magalhaes JP, Royer V, Chainiaux F (2002). From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Nov;34(11):1415-29. (β)

Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 2000 Apr 28;101(3):249-58.

Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992 Dec;37(12):1045-55.

Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M (2010). Stem cells—prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2010;120(10): 860-83.

Ushioda R and Nagata K (2011). The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5. *Methods Enzymol.* 2011;490:235-58.

Watson JD (2014). Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet.* 2014 Mar 1;383(9919):841-3.

Xiong X, Chong E, Skach WR (1999). Evidence that endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J Biol Chem.* 1999 Jan 29;274(5):2616-24.

Yoshino F, Yoshida A, Okada E, Okada Y, Maehata Y, Miyamoto C, Kishimoto S, Otsuka T, Nishimura T, Lee MC (2012). Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *J Photochem Photobiol B.* 2012 Sep 3;114:73-8.

Yu C, Abbott PV (2007). An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007 Mar;52(1 Suppl):S4-16.

Zhu T, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC (2012). Effects of the iron-chelating agent deferoxamine on triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Jan;100(1):197-205.

Κερεζούδης ΝΠ (1994). Ρυθμιστικοί μηχανισμοί της αιματικής κυκλοφορίας του οδοντικού πολφού. Μέρος 1. Αυτόνομο νευρικό σύστημα. Οδοντοστοματολογική πρόοδος. 1994;48: 310-322.

Συκαράς Σ (2007). ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑ. Γ' Έκδοση, Τόμος Ι, Εκδόσεις «Ζήτα»