



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

**ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΟΝ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΚΟΛΥΡΗ

(Α.Μ. 224215)

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Αικατερίνη Τυλιγάδα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών
Εργαστήριο Φαρμακολογίας

ΑΘΗΝΑ 2014



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

**ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΤΟΝ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΚΟΛΥΡΗ

(Α.Μ. 224215)

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας ΕΚΠΑ
Αικατερίνη Τυλιγάδα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής ΕΚΠΑ
Ιορδάνης Μουρούζης, Λέκτορας Ιατρικής ΕΚΠΑ

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών
Εργαστήριο Φαρμακολογίας

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Αικατερίνη Τυλιγάδα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών
Εργαστήριο Φαρμακολογίας

ΑΘΗΝΑ 2014

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από τον Σεπτέμβριο του 2013 μέχρι το Οκτώβριο του 2014 και χρηματοδοτήθηκε από τον προϋπολογισμό του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά που δέχτηκε να εκπονήσω την εργασία μου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας και με αγκάλιασε ως μέλος του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της Διπλωματικής μου Εργασίας Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αικατερίνη Τυλιγάδα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτό το σημαντικό κομμάτι της εκπαίδευσής μου υπό την επίβλεψή της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλον αυτό τον καιρό επιτρέποντάς μου να δοκιμάσω και να δοκιμαστώ και κάνοντάς με να αισθανθώ από την πρώτη στιγμή ως μέλος μιας μεγάλης οικογένειας. Την ευχαριστώ θερμά που ήταν δίπλα μου σε κάθε αισιόδοξο ή αβέβαιο βήμα αυτής της προσπάθειας, προσφέροντάς μου την καθοδήγηση, την ενθάρρυνση και τις πολύτιμες παρατηρήσεις της με μεγάλη προθυμία, και φυσικά για τις άκρως γόνιμες και εποικοδομητικές συζητήσεις μας πάνω σε θέματα επιστημονικά και μη, που αποτελούν πάντα τροφή για σκέψη και αναζητήσεις.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Αικατερίνη Μαργαρίτου για την καθοδήγηση στα πρώτα μου βήματα, τη συμπαράσταση και την άφογη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, που ακόμα αντέχουν και στηρίζουν με τη σύμπνοια ή τις αντιρρήσεις τους κάθε μου προσπάθεια.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Μαρία Κακολύρη
Ημερομηνία/τόπος γέννησης: 25/5/1981, Χολαργός Αττικής
Τηλέφωνα: 2105726608 – 6981454781
e-mail: mkakoliri@yahoo.com
Πτυχίο: Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής,
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Εκπαίδευση - Μετεκπαίδευση

1999 Απολυτήριο, 4^ο Λύκειο Περιστερίου
2011 Πτυχίο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ
2012 Θερινό Σχολείο 2012 του ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ"
2014 Σεμινάριο ΕΚΠΑ 'Χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS'

Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών

Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)

Αναρτημένες ανακοινώσεις (poster) σε συνέδρια

Kakolyri M, Delitheos B, Papamichael K, Tiligada E. Cellular stress response and ageing: the budding yeast as an experimental model. 8^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας, Αθήνα, 23-24/5/2014.

Kakolyri M, Margaritou A, Tiligada E. Dimethyl sulfoxide promotes phenotypic alterations indicative of ageing in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 65^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Θεσσαλονίκη 28-30/11/2014.

Margaritou A, **Kakolyri M**, Kyriakidis DA, Tiligada E. Dosage-related effects of tributyltin on eukaryotic growth and viability. 65^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Θεσσαλονίκη 28-30/11/2014.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	II
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	III
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	IV
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	VI
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A1. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ.....	1
A2. Ο <i>S. cerevisiae</i> ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	1
A2.1. Χαρακτηριστικά του <i>S. cerevisiae</i>	1
A2.2. Ο κυτταρικός κύκλος του <i>S. cerevisiae</i>	5
A2.3. Η μελέτη της γήρανσης στον <i>S. cerevisiae</i>	7
A2.4. Μοριακό υπόβαθρο της γήρανσης στον <i>S. cerevisiae</i>	12
A2.5. Παρεμβάσεις στη διάρκεια ζωής του σακχαρομύκητα	13
A2.6. Γήρανση και κυτταρικό stress.....	15
A3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΩΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	16
A3.1. Ισταμίνη	17
A3.2. Διμεθυλοσουλφοξείδιο	18
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
B1. ΥΛΙΚΑ	21
B1.1. Στέλεχος του σακχαρομύκητα.....	21
B1.2. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια.....	22
B1.3. Θρεπτικά μέσα – Διαλύματα	23
B2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
B2.1. Ανακαλλιέργεια του σακχαρομύκητα	25
B2.2. Επώαση και καλλιέργεια του σακχαρομύκητα	26
B2.3. Ελάχιστη ανασταλτική – ελάχιστη μυκητοκτόνος πυκνότητα	27
B2.4. Χρώση των κυττάρων και προσδιορισμός της επιβίωσης	28
B2.5. Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες	29
B2.6. Προσδιορισμός της ανάπτυξης.....	31
B2.7. Προσδιορισμός του χρόνου διπλασιασμού	32
B2.8. Χρόνια έκθεση στις προς μελέτη ουσίες	32
B2.9. Οξεία έκθεση στις προς μελέτη ουσίες.....	32
B2.10. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	33
B2.11. Στατιστική ανάλυση.....	34
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
Γ1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ <i>S. CEREVISIAE</i> ΥΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ.....	36
Γ1.1. Πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα	36
Γ1.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα.....	37
Γ1.3. Επιβίωση του σακχαρομύκητα	38
Γ1.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά	41
Γ1.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	43
Γ2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΟ DMSO ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ <i>S. CEREVISIAE</i> 47	
Γ2.1. Επίδραση του DMSO στον πολλαπλασιασμό	47
Γ2.2. Επίδραση του DMSO στον χρόνο διπλασιασμού.....	52
Γ2.3. Επίδραση του DMSO στην πολλαπλασιαστική ικανότητα	52
Γ2.4. Επίδραση του DMSO στην επιβίωση	54
Γ2.5. Επίδραση του DMSO στα μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	58
Γ2.6. Επίδραση του DMSO στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών.....	59

Γ3. ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ 15% DMSO ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ.....	62
Γ3.1. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων.....	62
Γ3.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα.....	64
Γ3.3. Επιβίωση.....	65
Γ3.4. Φαινότυπος γήρανσης.....	67
Γ3.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών.....	69
Γ4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ 15% DMSO ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΨΙΜΗ ΣΤΑΣΙΜΗ ΦΑΣΗ... ..	71
Γ4.1. Πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα	71
Γ4.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα.....	72
Γ4.3. Επιβίωση του σακχαρομύκητα	73
Γ4.4. Φαινότυπος γήρανσης.....	74
Γ4.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών.....	76
Γ5. ΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ <i>S. CEREVISIAE</i>	79
Γ5.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός.....	79
Γ5.2. Χρόνος διπλασιασμού	80
Γ5.3. Πολλαπλασιαστική ικανότητα.....	80
Γ5.4. Επιβίωση.....	81
Γ5.5. Φαινότυπος γήρανσης.....	81
Γ5.6. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών.....	82
Γ6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΛΟΓΑΡΙΘΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΤΑΣΙΜΗ ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.....	85
Γ6.1. Χορήγηση ισταμίνης στη λογαριθμική φάση.....	85
Γ6.2. Χορήγηση ισταμίνης κατά τη διαυξική μετατόπιση.....	87
Γ6.3. Χορήγηση ισταμίνης στην όψιμη στάσιμη φάση	88
Γ7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ DMSO ΚΑΙ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.....	92
Γ7.1. Χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε 15% DMSO και ισταμίνη.....	92
Γ7.2. Οξεία έκθεση του σακχαρομύκητα σε 15% DMSO και ισταμίνη κατά την όψιμη φάση της ανάπτυξης	96
Γ7.3. Οξεία χορήγηση ισταμίνης στην όψιμη φάση της ανάπτυξης πληθυσμών του σακχαρομύκητα υπό χρόνια έκθεση σε 15% DMSO	99
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	110
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	112
SUMMARY	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ANOVA	ANalysis Of VAriance
ATCC	American Type Culture Collection
BSL (BioSafety Level)	Επίπεδο βιοασφάλειας
CDC (Centers for Disease Control & prevention)	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης ασθενειών
CFU (Colony Forming Unit)	Μονάδα σχηματισμού αποικίας
CLS (Chronological Life Span)	Χρονολογική διάρκεια ζωής
DAO (DiAminOxidase)	Διαμινοοξειδάση
DMSO (DiMethylSulfOxide)	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
DNA (DeoxyriboNucleic Acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DR (Dietary Restriction)	Θερμιδικός περιορισμός
ED ₅₀ (median Effective Dose)	Μέση δραστική δόση
ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles)	Εξωχρωμοσωμικοί κύκλοι ριβοσωμικού DNA
ΕΑΠ	Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (MIC)
FKBP12 (FK506 Binding Protein)	Πρωτεΐνη που δεσμεύει το FK506
HDC (Histidine DeCarboxylase)	Αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης
HNMT (Histidine N-MethylTransferase)	N-μεθυλοτρανσφεράση της ισταμίνης
Hsp (Heat shock protein)	Πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας ή πρωτεΐνη θερμικού shock
ID ₅₀ (half maximal Inhibitory Dose)	Μέση ανασταλτική δόση
LD ₅₀ (median Lethal Dose)	Μέση θανατηφόρος δόση
MB (methylene blue)	Κυανούν του μεθυλενίου
MIC (Minimum Inhibitory Concentration)	Ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ)
mRNA (messenger RNA)	Αγγελιοφόρο RNA
mtDNA (mitochondrial DNA)	Μιτοχονδριακό DNA
mTOR (mammalian TOR)	TOR των θηλαστικών
MAO B (MonOaminOxidase B)	Μονοαμινοοξειδάση B
MO	Μέσος όρος
NAC (N-AcetylCysteine)	N-ακετυλοκυστεΐνη
NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)	Νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο
ORF (Open Reading Frame)	Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
PKC (Protein Kinase C)	Πρωτεϊνική κινάση C
PKA (Protein Kinase A)	Πρωτεϊνική κινάση A
RLS (Replicative Life Span)	Αναδιπλασιαστική διάρκεια ζωής
RNA (Ribonucleic Acid)	Ριβονουκλεϊκό οξύ
ROS (Reactive Oxygen Species)	Ενεργές μορφές οξυγόνου
rRNA (ribosomal RNA)	Ριβοσωμικό RNA
SEM (Standard Error of the Mean)	Τυπικό σφάλμα
TOR (Target Of Rapamycin)	Στόχος της ραπαμυκίνης
TORC (TOR Complex)	Σύμπλοκο TOR
YEDP (Yeast Extract Dextrose Peptone)	Υγρό θρεπτικό μέσο (YB)
YA (Yeast Agar)	Στερεό θρεπτικό μέσο
YB (Yeast Broth)	Υγρό θρεπτικό μέσο (YEDP)

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ

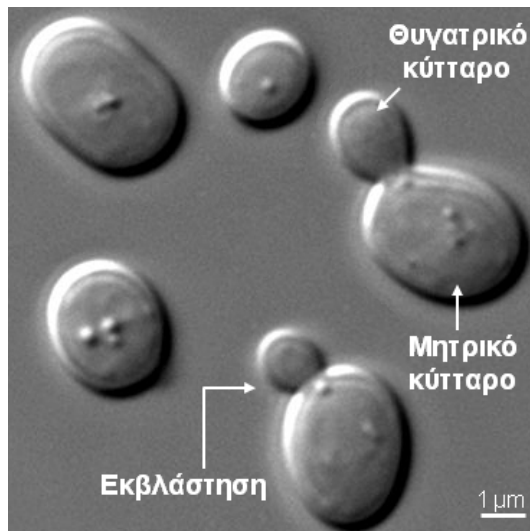
Η **γήρανση** είναι μία βιολογική διαδικασία με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της πολύπλοκης και ιδιαίτερης (παθο)φυσιολογίας της, καθώς οι μηχανισμοί που εμπλέκονται είναι ελάχιστα κατανοητοί και μελετημένοι. Επιπλέον, το κοινωνικό ενδιαφέρον γύρω από το φαινόμενο της γήρανσης αυξάνεται διαρκώς λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής και του ποσοστού των ηλικιωμένων στις αναπτυγμένες χώρες (Kirkwood, 2002). Είναι, επομένως, επιτακτική η ανάγκη να βρεθούν τρόποι ώστε οι άνθρωποι να έχουν καλή ποιότητα ζωής σε μεγάλες ηλικίες, απαλλαγμένοι από παθήσεις ‘του γήρατος’ όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, πολλές μορφές καρκίνου και άλλες.

Ο όρος γήρανση αναφέρεται στην προοδευτική έκπτωση των μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των ζωντανών οργανισμών που επέρχεται με την πάροδο της ηλικίας και έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του **ρυθμού αναπαραγωγής** και της **βιωσιμότητας** (Flatt and Schmidt, 2009 · Masoro, 2009). Οργανισμοί που χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τη μελέτη της γήρανσης είναι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans* και τα τρωκτικά (Wasko and Kaeberlein, 2013).

A2. Ο *S. CEREVISIAE* ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

A2.1. Χαρακτηριστικά του *S. cerevisiae*

Ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* είναι **ευκαρυωτικός μονοκύτταρος μικροοργανισμός** με σφαιρικό σχήμα, που ανήκει στο βασίλειο των Μυκήτων, οικογένεια Saccharomycetaceae (Εικόνα 1).



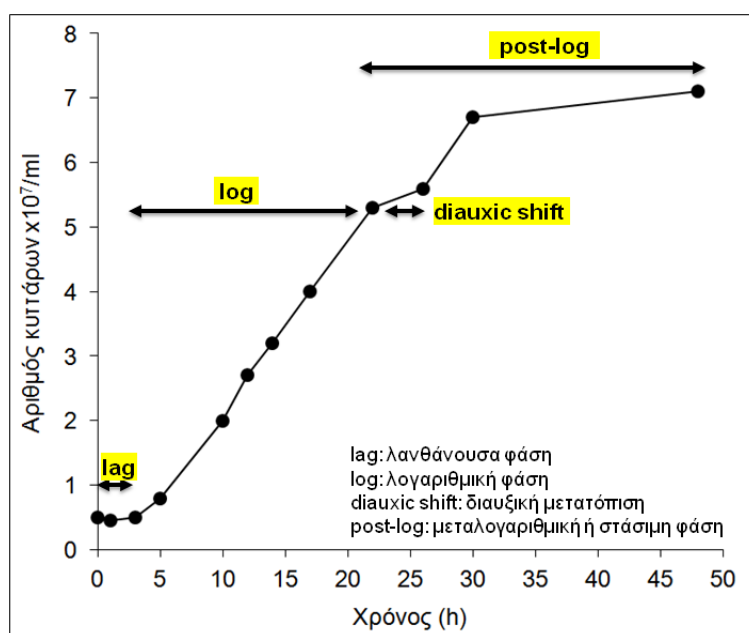
Εικόνα 1. Μικροσκοπική εικόνα του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ο σακχαρομύκητας είναι είδος ζύμης. Τα κύτταρα είναι στρογγυλά ή ωοειδή με διάμετρο 5-10 μm και διαιρούνται με εκβλάστηση (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae)

Στελέχη του σακχαρομύκητα βρίσκονται στην επιφάνεια φυτών, στο έδαφος, αλλά και στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων. Ο *S. cerevisiae* είναι ευρέως γνωστός για το ρόλο του στη διαδικασία της ζύμωσης, κατά τη μετατροπή σακχάρων σε αλκοόλη στην μπύρα, το κρασί και άλλα ποτά, καθώς και ως διογκωτικός παράγοντας που προσδίδει τη σπογγώδη υφή στο ψωμί λόγω της απελευθέρωσης αερίων (Pretorius et al., 2012).

Το στέλεχος EM93 απομονώθηκε αρχικά από σάπια σύκα το 1938 από τον Emil Mraκ στην Καλιφόρνια. Στις αρχές της δεκαετίας του 1950, ο Robert Mortimer δημιούργησε μετά από γενετικές διασταυρώσεις το νέο στέλεχος **S288C**, το οποίο περιέχει 85% του γονιδιώματος του EM93, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του **γονιδιώματος** του *S. cerevisiae* και αποτέλεσε τη βάση για την απομόνωση περισσότερων μεταλλαγμένων στελεχών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην έρευνα ως **πρότυποι** οργανισμοί (Mortimer, 2000).

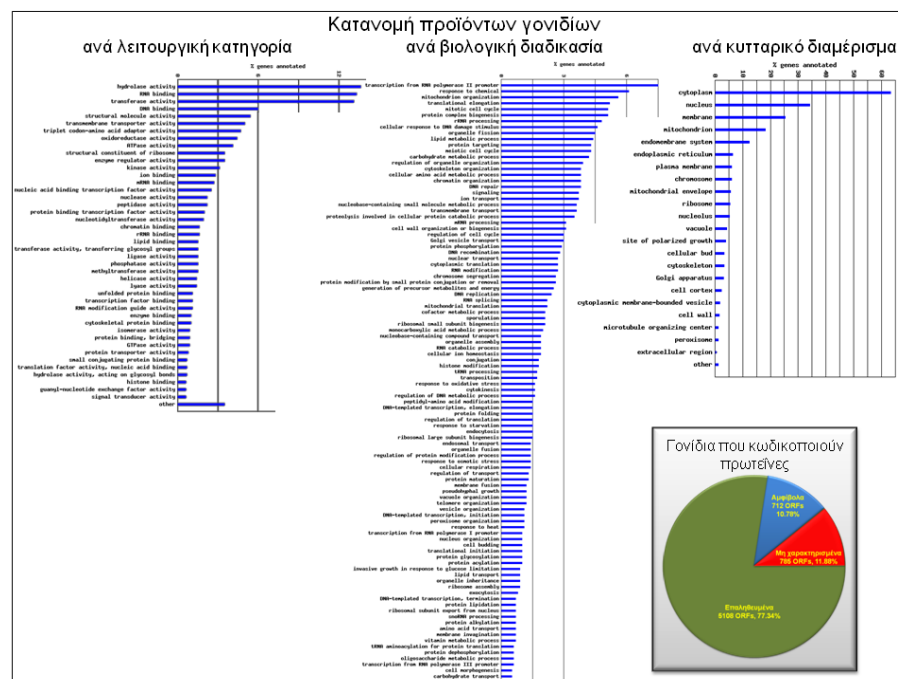
Ο *S. cerevisiae* αποτελεί εδώ και δεκαετίες ένα πολύτιμο και ελκυστικό πειραματικό πρότυπο για τη μελέτη πολλών βιολογικών διεργασιών, καθώς η διατήρησή του στο εργαστήριο είναι εύκολη και οικονομικά προσιτή και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα:

- Πρόκειται για μονοκύτταρο οργανισμό με σχετικά απλή οργάνωση, γρήγορη ανάπτυξη (χρόνος αναδιπλασιασμού 30-90 λεπτά σε θερμοκρασία 27 °C) και μικρή διάρκεια ζωής, ο οποίος σχηματίζει ευδιάκριτες αποικίες 2-3 ημέρες μετά την τοποθέτηση του σε στερεό θρεπτικό μέσο. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν εύκολη και αξιόπιστη την καλλιέργεια του και τους πειραματικούς χειρισμούς (Εικόνα 2 · Gershon and Gershon, 2000 · Ντεληθέος, 2011).



Εικόνα 2. Ενδεικτική καμπύλη ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Όταν ο μύκητας αναπτύσσεται σε εργαστηριακές συνθήκες σε πλήρες υπόστρωμα παρατηρούνται η λανθάνουσα φάση ή φάση προσαρμογής (lag) στην οποία τα κύτταρα προετοιμάζονται για την κυτταρική διαίρεση, η εκθετική ή λογαριθμική φάση ανάπτυξης (log) - όπου εκδηλώνεται μέγιστου ρυθμού κυτταρική διαίρεση με κατανάλωση γλυκόζης - ακολουθούμενη από τη διαυξική μετατόπιση (diauxic shift) και η μετεκθετική ή μεταλογαριθμική ή στάσιμη φάση (post-log ή post-diauxic ή stationary) όπου τα κύτταρα διαιρούνται με βραδύ ρυθμό καθώς αρχίζει η εξάντληση της γλυκόζης και στη συνέχεια εξαντλείται κάθε πηγή ενέργειας συμπεριλαμβανομένης της αιθανόλης που παρήχθη κατά τη μετεκθετική φάση και δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού κυττάρων (Σταυρινίδης, 1999).

- Το γονιδίωμα του χαρτογραφήθηκε πλήρως το 1996 (Goffeau et al., 1996). Η αλληλουχία 12.068 Kb ορίζει 5.885 γονίδια, που εν δυνάμει κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οργανωμένα σε 16 χρωμοσώματα. Μεταξύ των γονιδίων, περίπου 140 καθορίζουν μόρια rRNA, 40 μόρια μικρού πυρηνικού RNA και 275 μόρια tRNA (Goffeau et al., 1996 · www.yeastgenome.org). Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί τα πρωτεϊνικά προϊόντα για μεγάλο ποσοστό των γονιδίων αυτών (Εικόνα 3).



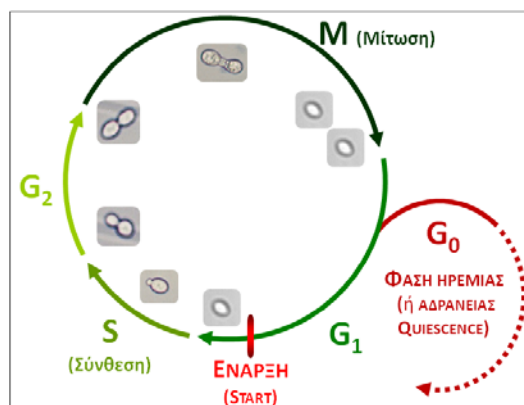
Εικόνα 3. Στοιχεία του γονιδιώματος του *S. cerevisiae* όπως καταγράφονται στη βάση δεδομένων www.yeastgenome.org (21.11.2014). ORF: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame).

- Ως ευκαρυωτικό κύτταρο, ο σακχαρομύκητας παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς πολλά από τα γονίδια του έχουν ορθόλογα γονίδια στον άνθρωπο (Gershon and Gershon, 2000).
- Έχει χρησιμοποιηθεί επί μακρόν και με επιτυχία για τη διερεύνηση πολλών βιολογικών διεργασιών, μεταξύ των οποίων η μεταγωγή του σήματος (Whitmarsh and Davis, 1998), ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου (Nasmyth, 1996), ο γενετικός ανασυνδυασμός (Stahl, 1996), η απόπτωση (Costa and Moradas-Ferreira, 2001) και η απόκριση

στο οξειδωτικό, θερμικό και φαρμακολογικό stress, καθώς και στη μελέτη των μηχανισμών δράσης πολλών κατηγοριών φαρμάκων (Delitheos et al., 1995 · Stavrinidis et al., 2002 · Vovou et al., 2004 · Papamichael et al., 2006 · Tiligada et al., 2006 · Yiannakopoulou and Tiligada, 2009 · Delitheos et al., 2010 · Papamichael et al., 2013).

A2.2. Ο κυτταρικός κύκλος του *S. cerevisiae*

Ο **κυτταρικός κύκλος** του σακχαρομύκητα παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτόν των ανώτερων θηλαστικών. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι, όπως και στα θηλαστικά, οι G_1 , S, G_2 και M (Pringle and Hartwell, 1981 · Εικόνα 4). Οι φάσεις G_1 και G_2 είναι εκείνες κατά τις οποίες το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος, ώστε να είναι έτοιμο να εισέλθει στη φάση S, οπότε λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού, και στη φάση της κυτταρικής διαίρεσης M αντίστοιχα (Futcher, 1996).



Εικόνα 4. Κυτταρικός κύκλος του *S. cerevisiae*.

Μια σημαντική διαφορά είναι ότι τα κύτταρα του σακχαρομύκητα δεν διαιρούνται συμμετρικά, όπως τα κύτταρα των θηλαστικών, αλλά σχηματίζουν μία **εκβλάστηση** ανά κυτταρική διαίρεση στην επιφάνειά τους (Εικόνα 1 · Hartwell et al., 1974 · Powell et al., 2000). Όταν η διαίρεση ολοκληρωθεί και τα δύο κύτταρα απομακρυνθούν μεταξύ τους παραμένει μια ‘ουλή εκβλάστησης’ στο σημείο του μητρικού κυττάρου

από το οποίο αναδύθηκε η εκβλάστηση (Barton, 1950 · Mortimer and Johnston, 1959 · Powell et al., 2003). Επομένως, ο αριθμός των 'ουλών εκβλάστησης' που παρατηρούνται σε ένα κύτταρο του σακχαρομύκητα, αντιστοιχεί στον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που έχει ολοκληρώσει το κύτταρο αυτό (Jazwinski, 1990 · Powell et al., 2003).

Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου ασκείται στη φάση G_1 , στο χρονικό σημείο που ονομάζεται ΕΝΑΡΞΗ (START). Όταν τα κύτταρα περάσουν επιτυχώς από το σημείο ελέγχου της ΕΝΑΡΞΗΣ, η είσοδος στη φάση S και ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζονται μη αντιστρεπτά (Lord and Wheals, 1981). Προς το τέλος της φάσης G_1 αρχίζει να σχηματίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ένας δακτύλιος χητινώδους σύστασης, ο οποίος αποτελεί το σημείο από το οποίο προβάλλει η εκβλάστηση. Η εμφάνιση της εκβλάστησης σηματοδοτεί την είσοδο του κυττάρου στη φάση S του κύκλου και όσο μεγαλώνει η εκβλάστηση, τόσο το κύτταρο πλησιάζει προς την ολοκλήρωσή της. Στη φάση G_2 ο πυρήνας τοποθετείται στον αυχένα της εκβλάστησης και στη συνέχεια το κύτταρο προχωρά στη φάση M της κυτταρικής διαίρεσης (Lord and Wheals, 1981 · Εικόνα 4). Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής ανάπτυξης, τα κύτταρα που έχουν περάσει το σημείο ΕΝΑΡΞΗΣ και διαιρούνται αποτελούν περίπου το 50% του συνολικού πληθυσμού (Lord and Wheals, 1981 · Futcher, 1993).

Όταν κάποιο κύτταρο δεν κατορθώσει να περάσει επιτυχώς το σημείο ΕΝΑΡΞΗΣ, η διαίρεση σταματά και το κύτταρο εισέρχεται στη φάση G_0 (Forsburg, 1994). Η τελευταία δεν ανήκει στον κανονικό κύκλο και δεν παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (Wei et al., 1993 · Εικόνα 4). Η είσοδος στη φάση G_0 παρατηρείται όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν ευνοούν την ανάπτυξη, όπως για παράδειγμα, όταν εξαντλούνται τα θρεπτικά συστατικά (Werner-Washburne et al., 1993). Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές για την ανάπτυξη, τα κύτταρα εξέρχονται της φάσης G_0 και εισέρχονται εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο. Κύτταρα που παραμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στη φάση G_0 χαρακτηρίζονται ως **γηρασμένα** (Powell et al., 2000).

A2.3. Η μελέτη της γήρανσης στον *S. cerevisiae*

Ο σακχαρομύκητας αποτελεί ένα πειραματικό πρότυπο που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τη μελέτη της γήρανσης. Αν και έχουν εκφραστεί αρκετές επιφυλάξεις για την καταλληλότητά του σε τέτοιου είδους μελέτες (Gershon and Gershon, 2000 · Bitterman et al., 2003), ωστόσο πολλές από τις σχετικές τρέχουσες γνώσεις έχουν προκύψει από τον απλό αυτό ευκαρυωτικό οργανισμό. Πολλά από τα μοριακά μονοπάτια που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης διατηρούνται εξελικτικά μεταξύ του σακχαρομύκητα και ανώτερων οργανισμών (Πίνακας 1 · Bitterman et al., 2003 · Wasko and Kaeberlein, 2013).

Πίνακας 1. Βασικές ομοιότητες και διαφορές των χαρακτηριστικών και των μηχανισμών γήρανσης μεταξύ του σακχαρομύκητα και των θηλαστικών.

<i>S. cerevisiae</i>	ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ
Ευκαρυωτικός οργανισμός	
Ναι	Ναι
Πολυκύτταρος οργανισμός	
Όχι	Ναι
Αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων	
Περιορισμένος (Mortimer and Johnston, 1959)	Περιορισμένος (Hayflick, 1965)
Γήρανση	
Ναι	Ναι
Θερμιδικός περιορισμός	
↑ διάρκειας ζωής (Kennedy et al., 2007)	± ↑ διάρκειας ζωής (McCay et al., 1935 · Omodei and Fontana, 2011)
Αποσιώπηση του γονιδίου Sch9/S6K1	
↑ διάρκειας ζωής (Kennedy et al., 2007 · Lu et al., 2011)	↑ διάρκειας ζωής και προστασία έναντι ηλικιο-εξαρτώμενων δυσλειτουργιών στους μυς (Selman et al., 2009)
Αρνητική ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού TOR/mTOR	
↑ διάρκειας ζωής (Kaeberlein et al., 2005)	↑ διάρκειας ζωής (Selman et al., 2009 · Lamming et al., 2012)
Υπερέκφραση του γονιδίου SIR2/SirT1	
↑ διάρκειας ζωής (Kaeberlein et al., 1999)	Καθυστέρηση έναρξης ηλικιο-εξαρτώμενων νόσων (Cohen et al., 2004 · Herranz et al., 2010)
Sch9/S6K1: πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης σε μύκητα/θηλαστικά, TOR/mTOR: στόχος ραπαμυκίνης (Target of Rapamycin) σε μύκητα/θηλαστικά	

Η μελέτη της γήρανσης στο σακχαρομύκητα βασίζεται σε δύο διακριτές προσεγγίσεις: την **αναδιπλασιαστική** διάρκεια ζωής και τη **χρονολογική** διάρκεια ζωής, σε αντιστοιχία με τη διάρκεια ζωής των διαιρούμενων και μεταμιτωτικών ανθρώπινων κυττάρων αντίστοιχα (Gershon and Gershon, 2000 · Bitterman et al., 2003).

Αναδιπλασιαστική διάρκεια ζωής

Η έννοια της αναδιπλασιαστικής διάρκειας ζωής (**RLS**, Replicative Life Span) εισήχθη αρχικά από τους Mortimer και Johnston το 1959 και αναφέρεται στον αριθμό των εκβλαστήσεων που δημιουργεί και, κατ' επέκταση, των διαιρέσεων που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός μεμονωμένου κυττάρου (Mortimer and Johnston, 1959 · Bartholomew and Mittwer, 1953 · Jazwinski, 1990). Οι βασικές παρατηρήσεις των Mortimer και Johnston ήταν οι εξής:

- Ο χρόνος διπλασιασμού αυξάνεται σε κάθε κυτταρική διαίρεση
- Το μέγεθος του μητρικού κυττάρου αυξάνεται σε κάθε κυτταρική διαίρεση
- Ο μύκητας παύει να διαιρείται μετά από 20-25 κυτταρικές διαιρέσεις

Οι αλλαγές που υφίσταται ο *S. cerevisiae* με την πάροδο του χρόνου και που αποτελούν δείκτες αξιολόγησης της γήρανσης, αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Τα αίτια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης στον μύκητα παραμένουν αδιευκρίνιστα. Πιστεύεται ότι η εμφάνιση του **γηρασμένου φαινότυπου** ίσως οφείλεται στην ύπαρξη κυτταροπλασματικού παράγοντα, ο οποίος κατανέμεται ασύμμετρα μεταξύ μητρικών και θυγατρικών κυττάρων (Egilmez and Jazwinski, 1989). Ο πρώτος τέτοιος παράγοντας που αναγνωρίστηκε ήταν οι εξωχρωμοσωμικοί κύκλοι ριβοσωμικού DNA (ERCs), σχηματισμοί που προκύπτουν κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων τμημάτων του ριβοσωμικού DNA (rDNA) (Sinclair and Guarente, 1997). Νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ERCs διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην προαγωγή της γήρανσης, αλλά είναι πιθανό η ίδια η αστάθεια του rDNA να προκαλεί αναδιπλασιαστική γήρανση (Ganley et al., 2009).

Πίνακας 2. Κυτταρικές μεταβολές που συνοδεύουν την αναδιπλασιαστική γήρανση.

Φαινοτυπικό χαρακτηριστικό	Βιβλιογραφική αναφορά
Αύξηση μεγέθους	Bartholomew and Mittwer, 1953
Αλλαγή σχήματος	Mortimer and Johnston, 1959
Κοκκώδης εμφάνιση	Mortimer and Johnston, 1959
Επιφανειακές ρυτίδες	Mortimer and Johnston, 1959
Αύξηση του αριθμού των ουλών	Barton, 1950 · Bartholomew and Mittwer, 1953
Απώλεια σπαργής	Muller, 1971
Αύξηση χητίνης κυτταρικού τοιχώματος	Egilmez et al., 1990
Αύξηση μεγέθους κενοτοπίων	Egilmez et al., 1990
Κυτταρική λύση	Mortimer and Johnston, 1959
Μειωμένη μεταλλαξιμότητα του mtDNA	James et al., 1975
Αύξηση των ERCs	Sinclair and Guarente, 1997
Μεταβολές στην ειδική έκφραση γονιδίων	Egilmez et al., 1989
Αύξηση των επιπέδων rRNA	Motizuki and Tsurugi, 1992
Ελάττωση της πρωτεϊνοσύνθεσης	Motizuki and Tsurugi, 1992
Ελάττωση της ριβοσωμικής δραστηριότητας	Motizuki and Tsurugi, 1992
Ελάττωση της απόκρισης σε φερομόνες (απλοειδή στελέχη)	Smeal et al., 1996
Ελάττωση της ικανότητας για ζευγάρωμα (απλοειδή στελέχη)	Muller, 1985
Αύξηση της ικανότητας σχηματισμού σπορίων (διπλοειδή στελέχη)	Sando et al., 1973
Παύση της διαίρεσης στη φάση G ₁ /S του κυτταρικού κύκλου	Egilmez and Jazwinski, 1989 · Werner-Washbourne et al., 1993
Αύξηση του χρόνου γενεάς	Mortimer and Johnston, 1959
Απώλεια ασυμμετρίας	Bitterman et al., 2003
Θρυμματισμός του πυρηνίσκου	Bitterman et al., 2003
ERCs: εξωχρωμοσωμικοί κύκλοι ριβοσωμικού DNA, mtDNA: μιτοχονδριακό DNA, rRNA: ριβοσωμικό RNA	

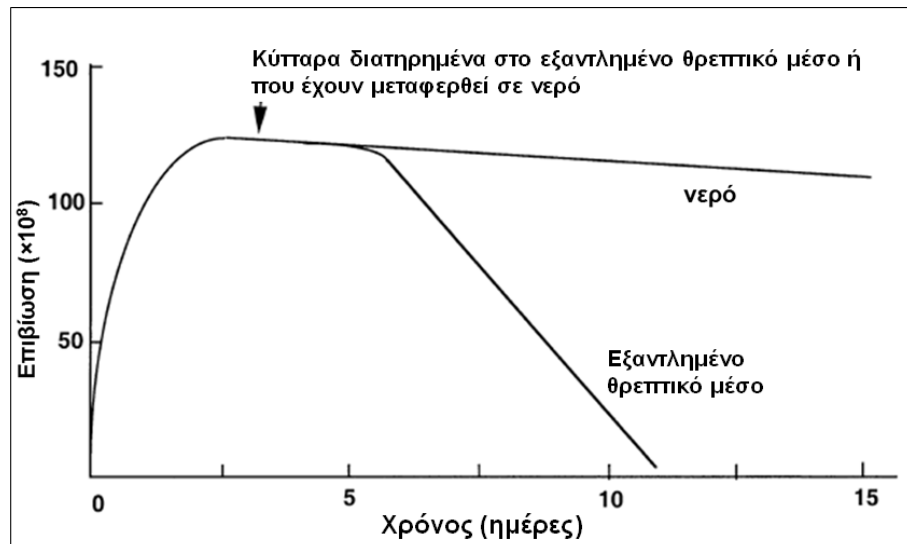
Άλλοι παράγοντες που έχει βρεθεί πως κατανέμονται ασύμμετρα μεταξύ μητρικού και θυγατρικού κυττάρου είναι τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, κυτταροπλασματικά συσσωματώματα πρωτεϊνών και οξειδωμένες πρωτεΐνες (Wasko and Kaerberlein, 2013). Μεταξύ αυτών περισσότερο μελετημένες είναι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες (Aguilaniu et al., 2003) που σχηματίζουν κυτταροτοξικά συσσωματώματα, τα οποία δεν μπορεί να αποδομήσει το πρωτεάσωμα, καθώς η λειτουργικότητά του μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας (Erjavec et al., 2007 · Longo et al., 2012).

Η ασύμμετρη κατανομή των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών βρέθηκε ότι οφείλεται σε έναν μηχανισμό, ο οποίος τις διατηρεί στο μητρικό κύτταρο, ενώ το θυγατρικό κύτταρο παραμένει ελεύθερο βλαβερών συστατικών. Στον μηχανισμό αυτόν εμπλέκεται η **ακτίνη** του κυτταροσκελετού, η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας ή πρωτεΐνη θερμικού shock (Hsp, Heat shock protein) **Hsp104** και η πρωτεΐνη **Sir2p**, μια NAD-εξαρτώμενη αποακετυλάση ιστονών, η οποία εμπλέκεται επίσης στη δημιουργία των ERCs (Erjavec et al., 2007). Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι σε κύτταρα που βρίσκονται στις τελευταίες 1-3 διαιρέσεις, η ασυμμετρία αυτή δεν ισχύει και τα μητρικά κύτταρα μεταφέρουν στους απογόνους το γηρασμένο φαινότυπο (Kennedy et al., 1994).

Χρονολογική διάρκεια ζωής

Η προσέγγιση της χρονολογικής διάρκειας ζωής (**CLS**, Chronological Life Span) εξετάζει το χρονικό διάστημα κατά το οποίο παραμένουν ζωντανά σε υγρή καλλιέργεια κύτταρα που έχουν σταματήσει να διαιρούνται (Fabrizio and Longo, 2003 · Logno et al., 2012). Η **βιωσιμότητα** των κυττάρων μπορεί να μετρηθεί με κριτήριο την ικανότητά τους να **σχηματίζουν αποικίες** όταν μεταφέρονται σε στερεό θρεπτικό υλικό και με άλλες τεχνικές οι οποίες αξιολογούν τη μεταβολική ενεργότητά τους (Longo, 1999).

Για την αξιολόγηση της χρονολογικής διάρκειας ζωής του σακχαρομύκητα οι καλλιέργειες διατηρούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο, πλούσιο σε γλυκόζη, όπου αναπτύσσονται έως ότου φτάσουν σε πυκνότητα $\sim 10^8/\text{ml}$ (Longo, 1999 · Longo and Fabrizio, 2012). Στη συνέχεια, τα κύτταρα διατηρούνται στο **εξαντλημένο υγρό θρεπτικό μέσο** ή εναλλακτικά μεταφέρονται σε αποσταγμένο νερό και μετράται η **βιωσιμότητά** τους σε τακτά χρονικά διαστήματα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Χρονολογική διάρκεια ζωής του σακχαρομύκητα. Τυπικές καμπύλες επιβίωσης στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης πληθυσμών που έχουν διατηρηθεί σε εξαντλημένο θρεπτικό μέσο ή σε νερό (τροποποίηση από Longo 1999).

Στις συνθήκες αυτές, η ποσότητα της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ελαττώνεται και τα κύτταρα υφίστανται μεταβολικές αλλαγές (Bitterman et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου, η ζύμωση αντικαθίσταται από τη μιτοχονδριακή αναπνοή, ο ρυθμός της πρωτεϊνσύνθεσης μειώνεται και αυξάνεται η ποσότητα γλυκογόνου και τρεαλόζης που συγκεντρώνεται στο εσωτερικό των κυττάρων (Longo, 1999 · Gershon and Gershon, 2000 · Bitterman et al., 2003). Κατά την παραμονή των κυττάρων στο εξαντλημένο θρεπτικό μέσο τα τελευταία δεν βρίσκονται σε συνθήκες ασιτίας, καθώς χρησιμοποιούν γλυκογόνο και άλλες αποθηκευμένες πηγές ενέργειας, σε αναλογία με τη χειμερία νάρκη των ζώων (Longo and Fabrizio, 2012).

Ως κύρια αιτία της χρονολογικής γήρανσης θεωρείται το οξειδωτικό stress, καθώς υπό αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα λόγω έλλειψης γλυκόζης μεταβολίζουν αιθανόλη προς το κυτταροτοξικό οξικό οξύ (Burtner et al., 2009 · Kaeberlein, 2010). Επίσης, όπως αναφέρεται παραπάνω, τα κύτταρα στις συνθήκες αυτές μεταβολίζουν και γλυκογόνο (Longo and Fabrizio, 2012).

A2.4. Μοριακό υπόβαθρο της γήρανσης στον *S. cerevisiae*

Έως σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 100 γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης (Longo et al., 2012). Από τα πιο μελετημένα είναι το γονίδιο **SIR2**, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Sir2p. Απαλοιφή του SIR2 έχει αναφερθεί ότι μειώνει την αναδιπλασιαστική διάρκεια ζωής, ενώ η υπερέκφρασή του την αυξάνει (Kaeberlein et al., 1999). Ένα ακόμα γονίδιο που φαίνεται ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αναδιπλασιαστική γήρανση του σακχαρομύκητα είναι το **FOB1**, που κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αντιγραφή. Η απαλοιφή του FOB1 μειώνει τον ανασυνδυασμό του rDNA και το σχηματισμό ERCs, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής του μύκητα (Longo et al., 2012).

Μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται στη χρονολογική γήρανση είναι τα γονίδια **SOD1** και **SOD2**, που κωδικοποιούν για την κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση, αντίστοιχα. Φαίνεται πως η βραχυπρόθεσμη επιβίωση στη στάσιμη φάση απαιτεί την έκφραση και των δύο αυτών γονιδίων. Η υπερέκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής των κυττάρων κατά 30%, υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η χρονολογική γήρανση οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress (Longo et al., 1996 · Longo et al., 1999). Δύο ακόμα γονίδια που εμπλέκονται στη χρονολογική γήρανση είναι τα **SCH9** και **CYR1**, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης και την αδενυλική κυκλάση, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν σε διαφορετικά αλλά παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται, μεταξύ άλλων, με τη γλυκόλυση, τη γλυκονεογένεση και την ανοχή στο stress (Lillie and Pringle, 1980 · Longo and Fabrizio, 2002).

Αν και η μέχρι τώρα μελέτη στο σακχαρομύκητα διαφέρει μεταξύ των δύο μορφών γήρανσης σε αρκετά σημεία, υπάρχουν πολλά σημεία στα οποία οι δύο μορφές συγκλίνουν και συνομιλούν. Για παράδειγμα, το μονοπάτι όπου εμπλέκεται ο στόχος της ραπαμυκίνης (**TOR**, Target of Rapamycin - mTOR: mammalian TOR), TOR/Sch9, καθώς και το

Ras-PKA έχουν αναφερθεί ότι συμμετέχουν τόσο στην αναδιπλασιαστική όσο και στη χρονολογική γήρανση (Fabrizio et al., 2004 · Fontana et al., 2010). Εξάλλου, έχει διαπιστωθεί ότι η χρονολογική γήρανση επιφέρει μείωση της αναδιπλασιαστικής διάρκειας ζωής του σακχαρομύκητα (Ashrafi et al., 1999). Είναι σαφές ότι οι μηχανισμοί που δρουν στη γήρανση του σακχαρομύκητα καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπικάλυψη χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

A2.5. Παρεμβάσεις στη διάρκεια ζωής του σακχαρομύκητα

Οι πιο διαδεδομένες παρεμβάσεις που γίνονται για να αυξηθεί η διάρκεια ζωής του σακχαρομύκητα είναι ο θερμιδικός περιορισμός και η έκθεση σε ραπαμυκίνη.

Θερμιδικός περιορισμός (DR)

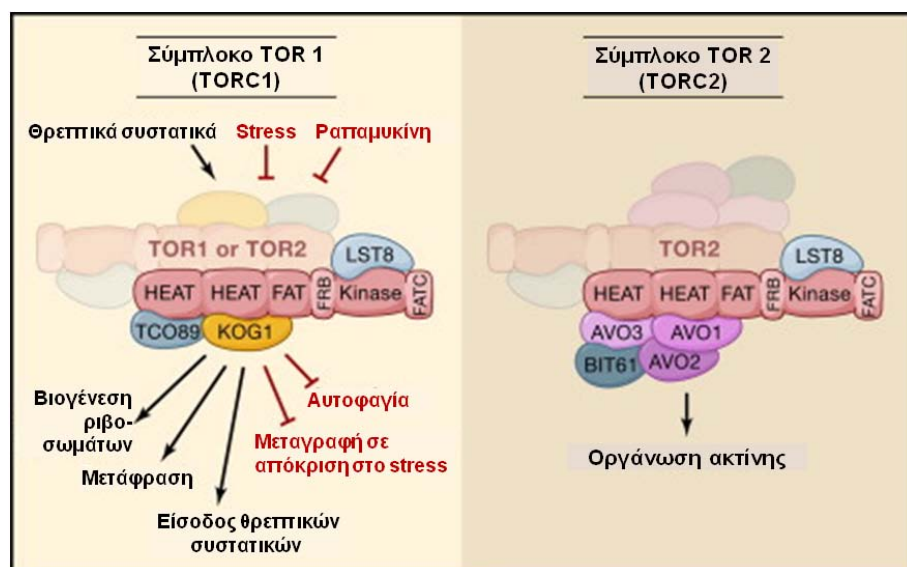
Ως **θερμιδικός περιορισμός** (DR, Dietary Restriction), σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής, από τη ζύμη έως τα θηλαστικά, ορίζεται η μείωση των προσλαμβανόμενων θρεπτικών συστατικών, χωρίς να υπάρχει υποσιτισμός, και η επακόλουθη αύξηση της διάρκειας ζωής (Masoro, 2005 · Kennedy et al., 2007). Μεταξύ των επιπτώσεων του θερμιδικού περιορισμού που σχετίζονται με την αύξηση της διάρκειας ζωής περιλαμβάνονται η ενίσχυση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, η αύξηση της αυτοφαγίας, η μείωση της μετάφρασης του mRNA και η αύξηση της αντίστασης σε διάφορες μορφές stress (Wasko and Kaeberlein, 2013). Ο μηχανισμός δράσης του θερμιδικού περιορισμού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Φαίνεται ότι περιλαμβάνει ενίσχυση της έκφρασης του **SIR2** και αναστολή του δικτύου του TOR/mTOR (Kaeberlein, 2010 · Wasko and Kaeberlein, 2013).

Το TOR και η ραπαμυκίνη

Η **ραπαμυκίνη** είναι μια λιπόφιλη μακρολίδη με αντιμυκητιασική δράση, η οποία απομονώθηκε αρχικά από τον οργανισμό *Streptomyces hygroscopicus* (Vézina et al., 1975). Στα θηλαστικά, η ραπαμυκίνη

αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο των T λεμφοκυττάρων στην φάση G₁ και χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο στα αυτοάνοσα νοσήματα και για την αποφυγή της απόρριψης μοσχευμάτων (Powell et al., 2012). Στους μύκητες, σταματά μη αντιστρεπτά τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G₁ και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Heitman et al., 1991 · Lamming et al., 2013).

Η ραπαμυκίνη δρα δεσμεύοντας την πρωτεΐνη FKBP12 (FK506 binding protein). Το σύμπλοκο **FKBP12-ραπαμυκίνη** δεσμεύει την ισομεράση της προλίνης του TOR, η οποία είναι μια εξελικτικώς διατηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, και αναστέλλει την δράση της. Η TOR συμμετέχει σε δύο διακριτά σύμπλοκα (TORC, TOR complex · Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Τα σύμπλοκα TOR Complex 1 (TORC1) και TOR Complex 2 (TORC2) στον *S. cerevisiae*. Απεικονίζονται οι σχετιζόμενες με την TOR πρωτεΐνες (KOG1, TCO89, LST8, AVO1-3, BIT61) και οι τομείς της TOR (HEAT, FAT, FRB, κινάση, FATC). Τα TORC1 και TORC2 είναι πολυμερή και πιθανόν διμερή. Το TORC1 μεσολαβεί στην ευαίσθητη στη ραπαμυκίνη σηματοδότηση που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και τη συσσώρευση μάζας. Η μη ευαίσθητη στη ραπαμυκίνη TORC2 απαιτείται για την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Οι ανοδικοί ρυθμιστές της TORC2 δεν είναι γνωστοί (ανατύπωση από Wullschleger et al., 2006).

Στον σακχαρομύκητα, το **TORC1** συμμετέχει στην ανάπτυξη υπό διάφορα περιβαλλοντικά στρεσογόνα ερεθίσματα και στα μετάζωα εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Η TOR στο

TORC1 προσδένεται και αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη (De Virgilio and Loewith, 2006 · Wullschleger et al., 2006). Το **TORC2** ελέγχει την πολικότητα του κυττάρου αλλά δεν επηρεάζεται από την ραπαμυκίνη (Lamming et al., 2013). Αναστολή της TOR από τη ραπαμυκίνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης, την μεταβολή των επιπέδων της μιτοχονδριακής αναπνοής και της αυτοφαγίας (Alvers et al., 2009 · Gelino and Hansen, 2013) και την ελάττωση των επιπέδων μεταγραφής γονιδίων που ενισχύουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία (Haigis and Yankner, 2010).

A2.6. Γήρανση και κυτταρικό stress

Ο όρος **κυτταρικό stress** αναφέρεται στις μεταβολές της κυτταρικής ομοιόστασης που προκαλούνται από οποιοδήποτε στρεσογόνο ερέθισμα, είτε ενδογενές, είτε εξωγενές από το περιβάλλον ή το μικροπεριβάλλον, καθώς και στις κυτταρικές διεργασίες που οδηγούν στην αποκατάσταση της διαταραχής (cf. Ντεληθέος, 2011). Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στο stress με ποικίλους μηχανισμούς που έχουν ως στόχο την προσαρμογή στις νέες –στρεσογόνες– συνθήκες. Αν οι μηχανισμοί αυτοί αποτύχουν, το κύτταρο θέτει σε λειτουργία μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία (Fulda et al., 2010).

Είναι σαφές ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μηχανισμών που διέπουν την απάντηση στο stress και αυτών που εμπλέκονται στη γήρανση. Για παράδειγμα, φαίνεται ότι το **γενotoξικό stress** και η γήρανση διεγείρουν παρόμοια μονοπάτια (Haigis and Yankner, 2010). Επίσης, στη διαδικασία της γήρανσης εμπλέκονται οι **Hsps**, οι οποίες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στο stress (Shama et al., 1998 · Akerfelt et al., 2010 · Delitheos et al., 2010 · Paramichael et al., 2013). Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι τα αποτελέσματα των ερευνών που αφορούν τη σχέση της γήρανσης με το οξειδωτικό stress είναι αντικρουόμενα. Σύμφωνα με τη ‘θεωρία των ελευθέρων ριζών στη γήρανση’ (Harman, 1956), η δημιουργία ενεργών

μορφών οξυγόνου (**ROS**, Reactive Oxygen Species) οδηγεί σε μακρομοριακές βλάβες που προάγουν τη γήρανση (Haigis and Yankner, 2010). Αν και υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό stress επάγει τη γήρανση, ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που οδήγησαν στα ακριβώς αντίθετα συμπεράσματα, δηλαδή ότι το οξειδωτικό stress και οι ROS αυξάνουν τη μακροβιότητα (Haigis and Yankner, 2010 · Ristow and Schmeisser, 2011).

A3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΩΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

Κυρίως λόγω του υψηλού κόστους πολλών πειραματικών προτύπων, χρησιμοποιούνται απλούστεροι οργανισμοί για την αναγνώριση ουσιών με αντιγηραντική δράση, όπως οι *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* και *Drosophila Melanogaster* (Lucanic et al., 2013).

Μια από τις πρώτες ουσίες που φάνηκε να αυξάνει τη διάρκεια ζωής χορηγούμενη με τη διατροφή στη *Drosophila* ήταν η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), η οποία αποτελεί πρόδρομη ουσία της γλουταθειόνης και έχει αντιοξειδωτική δράση (Brack et al., 1997). Άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και επίδραση στη διάρκεια ζωής των ασπόνδυλων είναι η βιταμίνη Ε (Harrington and Harley, 1988 · Zou et al., 2007), η τοκοτριενόλη (Adachi και Ishii, 2000), το συνένζυμο Q10 (Ishii et al., 2004) και η μελατονίνη (Thomas and Smith-Sonneborn, 1997 · Izmaylov and Obukhova, 1999).

Ένας πρόσθετος μηχανισμός με τον οποίο δρουν ουσίες που επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής είναι η ρύθμιση της πρωτεόστασης. Μια τέτοια ουσία είναι η σπερμιδίνη, η οποία εμφανίζει αντιγηραντική δράση στη ζύμη, στον *C. elegans* και στη *D. melanogaster* αυξάνοντας την αυτοφαγία (Eisenberg et al., 2009).

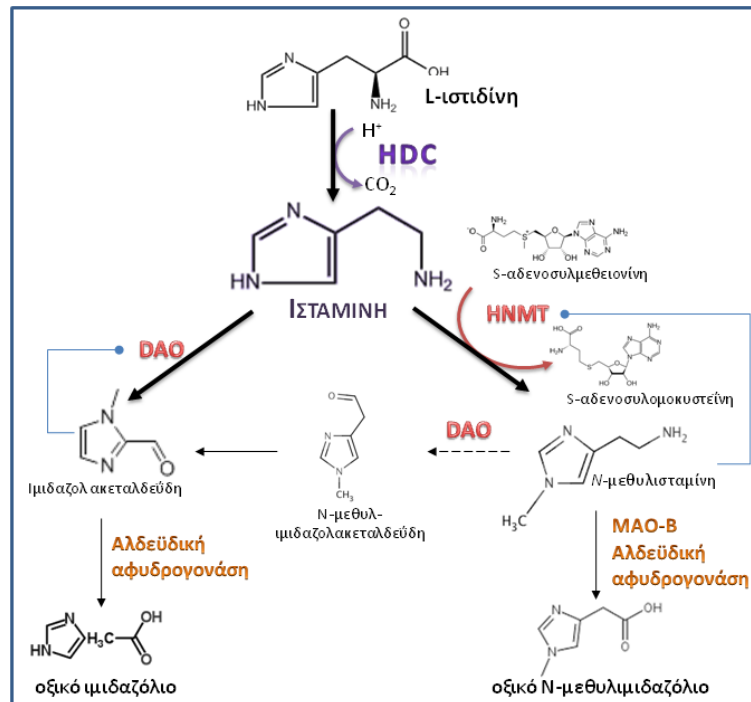
Μια ακόμη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για την ανακάλυψη ουσιών που δρουν αντιγηραντικά, είναι η παρέμβαση στο δίκτυο TOR και στο μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον θερμιδικό περιορισμό. Η πιο διαδεδομένη ουσία που χρησιμοποιείται για την αρνητική ρύθμιση του δικτύου TOR είναι η ραπαμυκίνη (Harrison et al., 2009), ενώ η

ρεσβερατρόλη είναι μία από τις λίγες χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι δρουν στο μονοπάτι που εμπλέκεται στην τροποποίηση της διάρκειας ζωής μέσω του θερμιδικού περιορισμού (Howitz et al., 2003).

A3.1. Ισταμίνη

Η **ισταμίνη** είναι μία βιογενής αμίνη που συντίθεται φυσιολογικά από την L-ιστιδίνη (Εικόνα 7) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, η ρύθμιση της έκκρισης του γαστρικού οξέος, η νευροδιαβίβαση και η ανοσορρύθμιση (Zampeli and Tiligada, 2009 · O'Mahony et al., 2011 · Tiligada, 2012). Η ισταμίνη ασκεί τη δράση της κυρίως μέσω τεσσάρων τύπων υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες, H_1 , H_2 , H_3 και H_4 (O'Mahony et al., 2011). Επιπρόσθετα, πρόσφατα βρέθηκε ότι η ισταμίνη μπορεί να προκαλέσει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις σε κατάλοιπα γλουταμίνης στο καταλυτικό κέντρο πρωτεϊνών G (Vowinckel et al., 2012).

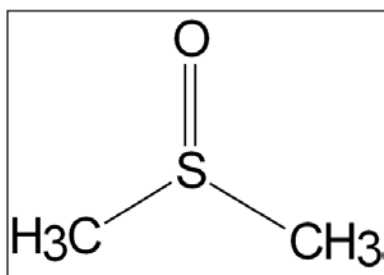
Εκτός από τον τεκμηριωμένο σημαντικό ρόλο της ισταμίνης στις ζωτικές διεργασίες των θηλαστικών, η δράση της στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα προκαρυωτικά κύτταρα είναι σε μεγάλο βαθμό αδιερεύνητη (Kyriakidis and Tiligada, 2013). Ο σακχαρομύκητας δεν διαθέτει γνωστά ομόλογα γονίδια που να κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα και υποδοχείς της ισταμίνης. Ωστόσο, η χορήγηση ισταμίνης σε καλλιέργειες του *S. cerevisiae* επάγει την προσαρμοστική απάντηση στο θερμικό shock και μεταβάλλει την έκφραση των Hsps και της τουμπουλίνης, υποδεικνύοντας την πιθανή δράση της μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων των υποδοχέων της (Delitheos et al., 2010 · Papamichael et al., 2013). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι, όμοια με την ραπαμυκίνη, η αντισταμινική ουσία λατρεπιρδίνη επάγει την αυτοφαγία στον σακχαρομύκητα (Bharadwaj et al., 2012).



Εικόνα 7. Μεταβολισμός της ισταμίνης. Η ισταμίνη συντίθεται με αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης που καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης (HDC). Καταβολίζεται είτε μέσω της διαμινοοξειδάσης (DAO) με εξωκυττάρια οξειδωτική απαμίνωση της πρωτοταγούς αμινοομάδας, είτε μέσω της N-μεθυλοτρανσφεράσης της ισταμίνης (HNMT) με ενδοκυττάρια μεθυλίωση του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Αμφότερα τα ένζυμα μπορούν να ανασταλούν με τα αντίστοιχα προϊόντα της αντίδρασης τους με αρνητική ανάδραση. Στη συνέχεια, η μονοαμινοοξειδάση B (MAO B) και η αλδεϋδική αφυδρογονάση καταλύουν τις αντιδράσεις προς τα τελικά μεταβολικά προϊόντα (Maintz and Novak, 2007).

A3.2. Διμεθυλοσουλφοξείδιο

Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) είναι ένα μικρό αμφίφιλο μόριο με ένα υδρόφιλο σουλφοξείδιο και δύο υδρόφοβα μεθύλια (Εικόνα 8). Αυτή η ιδιότητα φαίνεται να είναι σημαντική για τη δράση του στις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς αυξάνει τη διαπερατότητά τους τόσο για υδρόφιλα όσο και για υδρόφοβα μόρια (Sadowska-Bartosz et al., 2013). Το DMSO χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιφλεγμονώδες και ως κρυοπροστατευτικό κυττάρων και ιστών, καθώς επίσης και ως διαλύτης χημικών ουσιών (Kwak et al., 2010).



Εικόνα 8. Το μόριο του διμεθυλοσουλφοξειδίου.

Το DMSO έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τις ROS και εμφανίζει προστατευτική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα υπό οξειδωτικό stress (Sadowska-Bartosz et al., 2013). Στο σακχαρομύκητα, αντίθετα, ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο που οφείλεται σε οξειδωτικό stress. Πιο συγκεκριμένα, το DMSO αναστέλλει εκλεκτικά τη δράση του επιδιορθωτικού ενζύμου MsrA, ρόλος του οποίου είναι η επιδιόρθωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, καθιστώντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στις επιπτώσεις του οξειδωτικού stress (Kwak et al., 2010). Επιπλέον, το DMSO παρεμβαίνει στο σύστημα μεταφοράς μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi, καθώς μιμείται τις ιδιότητες των μοριακών συνοδών και θεωρείται πιθανό να επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης. Σε συγκέντρωση 1%, το DMSO μειώνει τη θερμοσταθερότητα της χρωματίνης και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλεί τη χαλάρωσή της (Gayán et al., 2013). Τέλος, αναφέρθηκε πρόσφατα η αλληλεπίδρασή του DMSO με το σύστημα mTOR και ιδιαιτέρως η ενίσχυση από τη ραπαμυκίνη της ανασταλτικής δόσοεξαρτώμενης δράσης του DMSO στον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων (Lalic et al., 2012).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη **συνδυασμού παραμέτρων** που χαρακτηρίζουν τη **φυσιολογική ανάπτυξη** και **γήρανση** των ευκαρυωτικών κυττάρων και η αξιολόγηση **φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών** που πιθανώς επηρεάζουν τις διαδικασίες αυτές, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό πρότυπο τον μύκητα ***S. cerevisiae***.

Με βάση την τρέχουσα αντίληψη της (παθο)φυσιολογίας της γήρανσης και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των επιπτώσεων του **DMSO** και της **ισταμίνης** στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη και τη γήρανση, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Πιο αναλυτικά μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν:

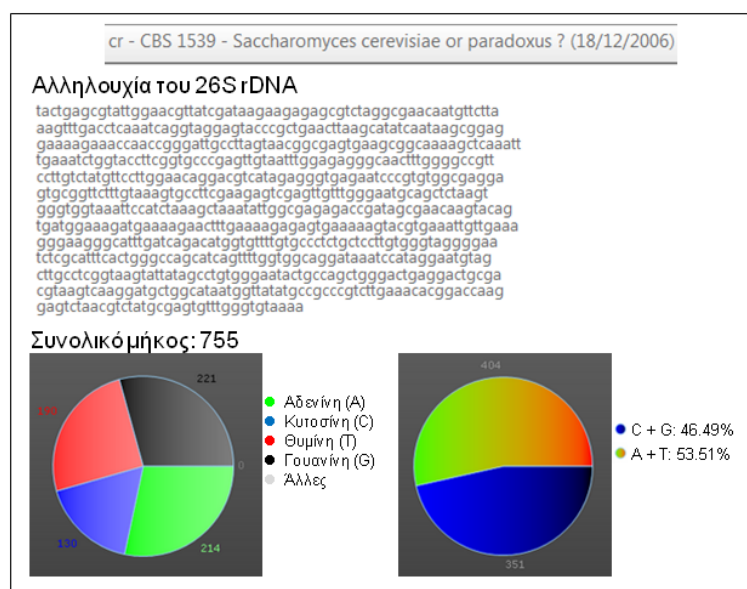
- η φυσιολογική ανάπτυξη του *S. cerevisiae* με τις ελάχιστες δυνατές παρεμβάσεις, ώστε να προσδιοριστούν οι παράμετροι που παραπέμπουν σε γήρανση, όπως η ανάπτυξη των κυττάρων, η βιωσιμότητά τους, η ικανότητα πολλαπλασιασμού και δημιουργίας αποικιών, καθώς και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που συνάδουν με το γηρασμένο φαινότυπο και ο χρόνος εμφάνισής τους
- οι παράμετροι που αναφέρονται παραπάνω μετά από χορήγηση DMSO σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης και συγκεκριμένα, στην αρχή και στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης
- η επίδραση της ισταμίνης στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα και που παραπέμπουν σε γήρανση, όταν αυτή χορηγείται στην αρχή της ανάπτυξης, στην έναρξη της λογαριθμικής και της στάσιμης φάσης (διαυξική μετατόπιση) ή στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης, όταν τα κύτταρα βρίσκονται ήδη υπό stress λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών
- η επίδραση της συγχορήγησης ισταμίνης και DMSO στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα, με σκοπό την αξιολόγηση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ τους και τη διερεύνηση κοινών μηχανισμών δράσης των δύο ουσιών σε ό,τι αφορά τη διαδικασία της γήρανσης

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B1.1. Στέλεχος του σακχαρομύκητα

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 2366™ (σύμφωνα με την αλληλουχία του 26S rDNA, CBS 1539/18.12.2006, Εικόνα 9), το οποίο από το 1995 αναφέρεται και ως *S. pastorianus* ATCC 2366. Συνώνυμα του στελέχους είναι: *S. pastorianus* Reess ex Hansen, *S. carlsbergensis* Hansen και *S. pasteurianus* E. C. Hansen. Το στέλεχος του σακχαρομύκητα αγοράστηκε από την American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) και διατηρήθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία 4 °C έως τη χρήση του.



Εικόνα 9. Χαρακτηριστικά του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 2366™ σύμφωνα με την βάση του CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (Netherlands, www.cbs.knaw.nl/Collections/6.9.2014)

Ως προς τη Βιοασφάλεια, το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη κατατάσσεται στο Επίπεδο 1 (**BSL-1**). Σύμφωνα με τα κριτήρια του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC, Centers for

Disease Control and Prevention, USA), το BSL-1 (www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl5_sect_iv.pdf/6.9.2014) είναι κατάλληλο για εργασία που περιλαμβάνει καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες, οι οποίοι δεν προκαλούν ασθένεια σε ανοσοεπαρκείς ενήλικες και παρουσιάζουν ελάχιστο εν δυνάμει κίνδυνο για το προσωπικό των εργαστηρίων και για το περιβάλλον.

Όπως αναφέρεται στο www.straininfo.net/6.9.2014, το στέλεχος έχει κατατεθεί ως τελική, αναπαραγωγική μορφή (teleomorph) του *Saccharomyces pastorianus* subsp. *arbigenensis* Steiner με αριθμό 52 [CBS 1539, CCRC 20579, CCY 21461, DSM 2548, NRRL Y139]. Προέρχεται από σταφύλια ικανά προς ζύμωση και είναι θετικό στη ζύμωση υποστρωμάτων D-γλυκόζης και σουκρόζης. Αναπτύσσεται παρουσία αιθανόλης, αλλά όχι μεθανόλης.

Σημειώνεται ότι το συγκεκριμένο στέλεχος έχει χρησιμοποιηθεί επί μακρόν για τη διερεύνηση των μηχανισμών του κυτταρικού stress και της επίδρασης φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών στην απάντηση των ευκαρυωτικών κυττάρων σε περιβαλλοντικά στρεσογόνα ερεθίσματα (Tiligada et al., 1999 · Miligkos et al., 2000 · Vovou et al., 2004 · Tiligada, 2006 · Tiligada et al., 2006 · Delitheos et al., 2010 · Paramichael et al., 2013). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για τον φαρμακολογικό έλεγχο (screening) ουσιών με αντινεοπλασματική δράση (Tiligada and Delitheos, 1993 · Delitheos et al., 1995 · Stavrinidis et al., 2002), καθώς και σε δοκιμασίες που αφορούν στην κυκλοεξιμίδη, στη ναραμυκίνη A, στη σινεφουγκίνη A και σε τοξικές και καρκινογόνες χημικές ουσίες (Boeck et al., 1973 · Wang, 1981).

B1.2. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Οι χημικές ουσίες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Υλικά	Προέλευση
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	Oxoid Ltd, Basingstoke, UK
Πεπτόνη (mycological peptone)	Oxoid Ltd, Basingstoke, UK
Δεξτρόζη	Merck, Darmstadt, Germany
Άγαρ (agar bacteriological)	Oxoid Ltd, Basingstoke, UK
Κυανούν του μεθυλενίου (methylene blue)	Merck, Darmstadt, Germany
Ισταμίνη·2HCl	Serva, USA
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Ferak, Berlin, Germany
Γλυκόζη (USP anhydrous)	Mallinckrodt®, USA
NaCl	Mallinckrodt®, USA
CaCl ₂	Sds, Peypin, France
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Germany
KCl	Merck, Darmstadt, Germany
Αιθυλική αλκοόλη (100% v/v)	Riedel-de Haën AG, Seelze, Germany

B1.3. Θρεπτικά μέσα – Διαλύματα

Υγρό θρεπτικό μέσο (YEDP, YB, yeast broth)

Το **YEDP** είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο ανάπτυξης μυκήτων σε συνθήκες εργαστηρίου. Πρόκειται για ‘σύνθετο’ και ‘πλήρες’ μέσο που περιέχει όλα τα συστατικά της ζύμης, με άγνωστη όμως χημική σύνθεση καθώς αποτελείται από φυσικά υλικά (Sherman, 2002 · Dymond, 2013).

Η παρασκευή του YEDP έγινε με ανάμιξη εκχυλίσματος ζύμης [yeast extract, τελική συγκέντρωση 0.3% (w/v)], πεπτόνης [mycological peptone, τελική συγκέντρωση 0.5% (w/v)] και άνυδρης δεξτρόζης [τελική συγκέντρωση 1% (w/v)]. Τα υλικά διαλύθηκαν σε 1000 ml απιονισμένου ύδατος και θερμάνθηκαν ώσπου να φτάσουν σε βρασμό. Το YEDP αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο, Π. Καϊμακέλης, Περιστέρι, Αθήνα) στους 120 °C και 1.5 atm για 20 min. Στη συνέχεια, επωάστηκε σε επωαστικό κλίβανο (Astell Hearson, Kent, UK) στους 27 °C για 48 h, ώστε να ελεχθεί για τυχόν

επιμολύνσεις και κατόπιν διατηρήθηκε στους 4 °C για μελλοντική χρήση. Το τελικό pH του YEDP ήταν 5.2-5.3.

Στερεό θρεπτικό μέσο (yeast agar, ΥΑ)

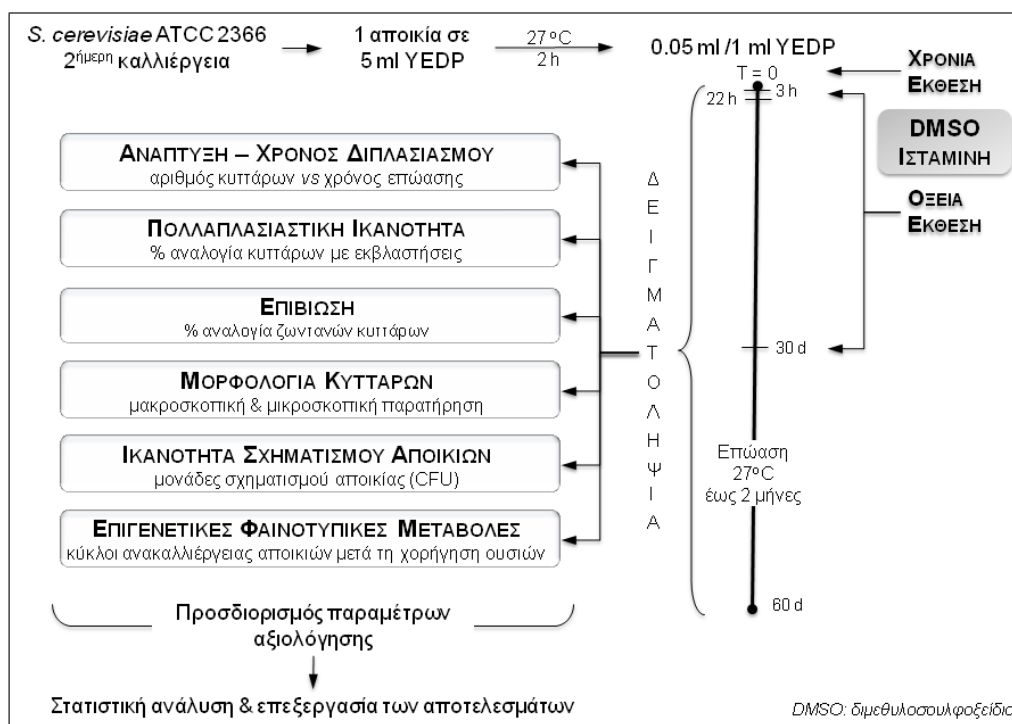
Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκε YEDP στο οποίο προτέθηκε άγαρ σε τελική συγκέντρωση 1.5% (w/v). Όπως και κατά την παρασκευή του YEDP, τα υλικά διαλύθηκαν και αναμίχθηκαν σε 1000 ml απιονισμένου ύδατος και θερμάνθηκαν μέχρι βρασμού. Το διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 120 °C και 1.5 atm για 20 min. Μετά την αποστείρωση, το θρεπτικό υλικό μοιράστηκε σε τρυβλία Petri Ø 9.0 cm (Thermo Scientific™ Sterilin™, Newport, UK) και αφέθηκε στον θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Holten HV 2460, βιοασφάλειας II με φίλτρο HEPA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) για να πήξει. Στη συνέχεια, τα τρυβλία με το άγαρ επωάστηκαν στους 27 °C για 48 h, ώστε να διαπιστωθεί η απουσία επιμόλυνσης. Κατόπιν μεταφέρθηκαν στους 4 °C όπου διατηρήθηκαν για μελλοντική χρήση.

Ρυθμιστικό διάλυμα Ringer (Ringer's Buffer)

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος Ringer σε τελικό όγκο 1000 ml απιονισμένου ύδατος χρησιμοποιήθηκαν: 116 mM NaCl, 1.2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2.7 mM NaHCO₃, 5.6 mM γλυκόζη. Το τελικό pH του διαλύματος ήταν 7.3 – 7.4.

B2. ΜΕΘΟΔΟΙ

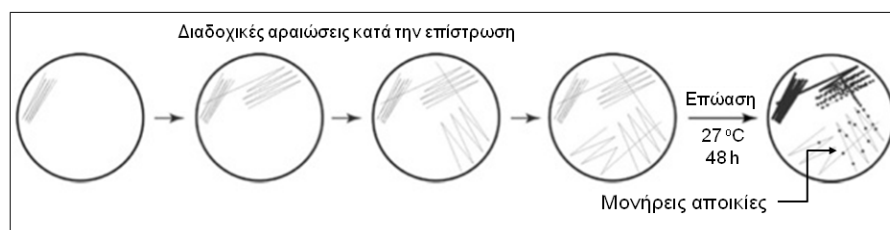
Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 10 και λεπτομερώς στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 10. Σχηματική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας. Μια 2ήμερη αποικία του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366 διαλυόταν σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου (YEDP) και επωαζόταν στους 27 °C για 2 h. Δείγμα της καλλιέργειας εμβολιαζόταν σε YEDP και ακολουθούσε επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 27 °C έως 2 μήνες. Διάφορες συγκεντρώσεις των προς μελέτη ουσιών χορηγούνταν κατά την έναρξη (T = 0), τη λογαριθμική (T = 3 h) ή τη μεταλογαριθμική φάση (T = 22 h, 30 d) της ανάπτυξης. Σε διάφορους χρόνους γινόταν δειγματοληψία και προσδιορισμός των παραμέτρων αξιολόγησης που είχαν οριστεί με βάση τους στόχους της μελέτης. Τα χαρακτηριστικά που καθόριζαν τις παραμέτρους καταγράφονταν άμεσα μετά τη χορήγηση των ουσιών (οξεία έκθεση) και καθόλη τη διάρκεια της 2μηνιας επώασης (χρόνια έκθεση). Τα δεδομένα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν με στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

B2.1. Ανακαλλιέργεια του σακχαρομύκητα

Κατά την εκπόνηση της εργασίας γινόταν **ανακαλλιέργεια** του σακχαρομύκητα στους 27 °C σε νέο στερεό θρεπτικό μέσο ανά 2-4 ημέρες ανάλογα με τις ανάγκες του πειραματικού πρωτοκόλλου. Από τη διήμερη καλλιέργεια λαμβανόταν μια μονήρης αποικία για να χρησιμοποιηθεί στο κάθε πείραμα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανακαλλιέργειας. Οι διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων υγρής καλλιέργειας κατά την επίστρωση τους στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου στα τρυβλία Petri γίνονταν με αποστειρωμένο μεταλλικό μικροβιολογικό κρίκο.

B2.2. Επώαση και καλλιέργεια του σακχαρομύκητα

Η επώαση του σακχαρομύκητα γινόταν στους 27 °C σε ψυχώμενο και σκοτεινό επωαστικό κλίβανο. Οι υγρές καλλιέργειες γίνονταν υπό συνεχή ανάδευση σε αποστειρωμένα υάλινα σωληνάρια (10 ml) με κωνικό πυθμένα ή σε στείρα βαθμονομημένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου (10 ml) με στρογγυλό πυθμένα και πώμα 2 θέσεων (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Η επώαση σε στερεό μέσο γινόταν σε στείρα πλαστικά τρυβλία Petri με το καπάκι προς τα επάνω, μετά από επίστρωση δείγματος καλλιέργειας στο άγαρ.

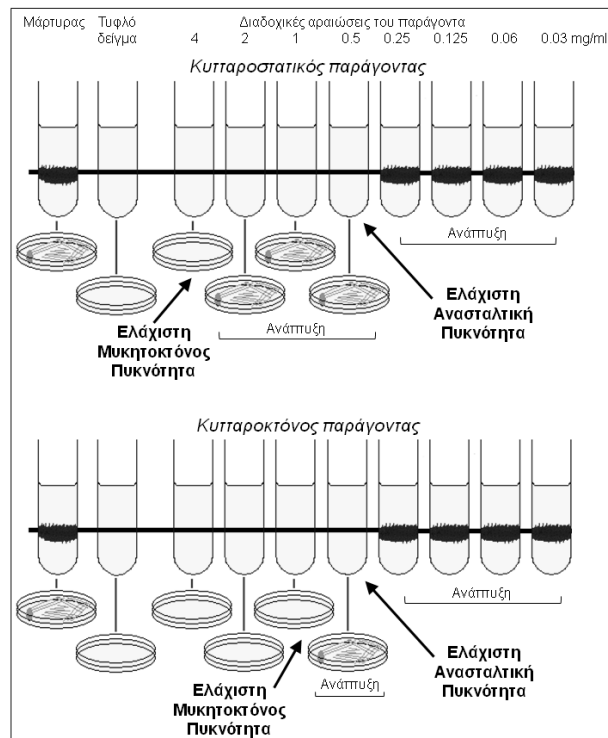
Η μεταφορά των αποικιών και η επίστρωση των δειγμάτων γινόταν με μεταλλικό μικροβιολογικό κρίκο, στυλεό εμβολιασμού ή τριγωνική ράβδο που είχε διαβραχεί με 70% (v/v) αιθυλική αλκοόλη. Τα εργαλεία αυτά αποστειρώνονταν αμέσως πριν τη χρήση τους με ερυθροπυράκτωση σε γυμνή οξειδωτική φλόγα (γαλάζια στη βάση και κίτρινη στην κορυφή) λύχνου Bunsen και ψύχονταν με εμβύθιση σε αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα Ringer ή σε YEDP.

Η αποστείρωση των υάλινων και μεταλλικών ειδών γινόταν σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 160 °C για 2 h. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες, εκτός από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες στον θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής.

B2.3. Ελάχιστη ανασταλτική – ελάχιστη μυκητοκτόνος πυκνότητα

Για το προσδιορισμό της **ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας** (ΕΑΠ, MIC: Minimum Inhibitory Concentration) των προς μελέτη ουσιών μια διήμερη αποικία του σακχαρομύκητα διαλύθηκε σε 5 ml YEDP και επωάστηκε στους 27 °C για 2 h ($10^5 - 10^6$ κύτταρα ανά ml). Μετά από σχολαστική ανάδευση, 100 μl της καλλιέργειας αραιώθηκαν σε 1.9 ml YEDP. Στη συνέχεια, 100 μl από το δείγμα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις της προς μελέτη ουσίας, σε τελικό όγκο 2 ml (τελική αραιώση 1:200). Οκτώ υποδιπλάσιες αραιώσεις των ουσιών, από 4 έως 0.03 mg/ml, έγιναν διαδοχικά σε υάλινα σωληνάρια (Εικόνα 12). Για τις ουσίες σε υγρή μορφή, οι αραιώσεις ήταν υποδεκαπλάσιες (100% έως 0.001%). Στους προσδιορισμούς περιελήφθη δείγμα χωρίς ουσία (μάρτυρας) και τυφλό δείγμα χωρίς ενοφθάλμιση (inoculum). Όλα τα δείγματα επωάστηκαν στους 27 °C για 48 h και εξετάστηκαν με γυμνό οφθαλμό σε φυσικό φωτισμό για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη. Τα σωληνάρια στα οποία δεν παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη (διαυγές υγρό) αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις των ουσιών οι οποίες προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης. Ως ΕΑΠ ορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας που ανέστειλε την ανάπτυξη (Εικόνα 12).

Από τα σωληνάρια στα οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη και από τον μάρτυρα ελήφθη δείγμα με κρίκο εμβολιασμού, εμβολιάστηκε σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό και επωάστηκε στους 27 °C για 48 h. Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες ελέγχθηκαν με γυμνό οφθαλμό για την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα. Ως ελάχιστη μυκητοκτόνος πυκνότητα ορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας που δεν επέτρεψε τον σχηματισμό αποικιών στο στερεό θρεπτικό υλικό (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής και της ελάχιστης μυκητοκτόνου πυκνότητας. Ένας παράγοντας θεωρείται κυταροκτόνος όταν η ελάχιστη μυκητοκτόνος πυκνότητα είναι λιγότερο από τέσσερις φορές μεγαλύτερη της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας.

B2.4. Χρώση των κυττάρων και προσδιορισμός της επιβίωσης

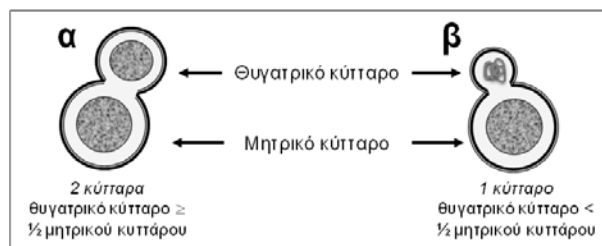
Η χρώση των κυττάρων έγινε με τη χρωστική κυανού του μεθυλενίου (methylene blue, MB) σε τελική συγκέντρωση 1‰ (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Ringer. Πριν την προσθήκη στα δείγματα, η χρωστική αποστειρωνόταν μέσω διηθητικού ηθμού 0.22 μm (Millex®-OR, Merck Millipore Ltd, Cork, Ireland).

Η χρώση με MB δίνει πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων. Η χρωστική εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων και τα χρωματίζει όταν αυτά είναι **νεκρά**. Αντίθετα, τα **ζωντανά** κύτταρα δεν χρωματίζονται και παραμένουν διαφανή στο οπτικό μικροσκόπιο, καθώς διαθέτουν μηχανισμούς και αναγωγικές ενώσεις (NADH/NADPH) για τον ταχύ καταβολισμό της χρωστικής (Painting and Kirsop, 1990 · Sevcik and Dunford, 1991). Σημειώνεται ότι

η κατακράτηση της χρωστικής από τις πολύ μικρές εκβλαστήσεις και η μικρότερη ακρίβεια των μετρήσεων σε χαμηλή εκατοστιαία αναλογία ζωντανών κυττάρων αποτελούν περιορισμούς της μεθόδου. Σε όλες τις μετρήσεις που έγιναν στη διάρκεια της μελέτης, η κατακράτηση της χρωστικής από τις πολύ μικρές εκβλαστήσεις ήταν $< 1\%$ των χρωματισμένων κυττάρων και συνεπώς δεν αποτελέσε περιορισμό στη μελέτη. Ως επιβίωση (Εικόνα 10) ορίστηκε η εκατοστιαία αναλογία του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε κάθε δείγμα καλλιέργειας.

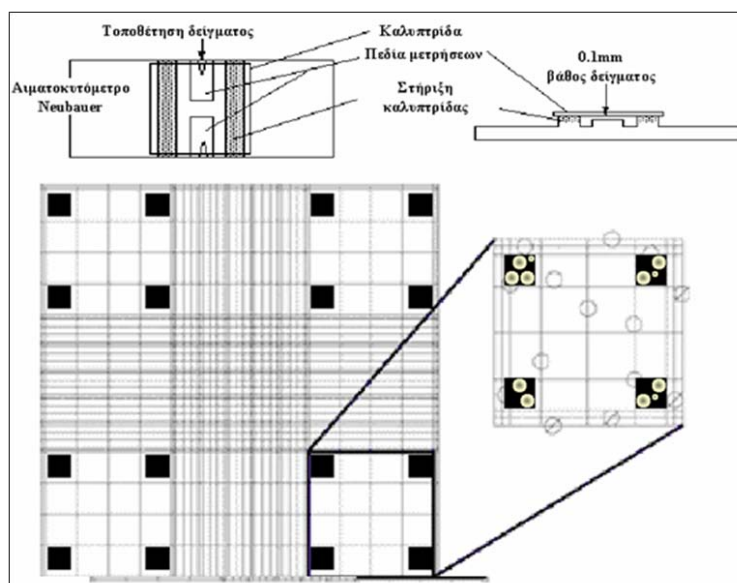
B2.5. Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες

Η μέτρηση του **αριθμού των κυττάρων** στις καλλιέργειες, καθώς και η καταγραφή της **μορφολογίας** τους έγινε με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου Neubauer σε **οπτικό μικροσκόπιο** (BH, Olympus, Japan) και μεγέθυνση $\times 400$ (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, $100 \mu\text{L}$ δείγματος καλλιέργειας, αραιωνόταν κατάλληλα σε ρυθμιστικό διάλυμα Ringer και γινόταν προσθήκη MB. Μετά από σχολαστική ανάδευση, $10 \mu\text{L}$ από το δείγμα τοποθετούνταν στο **αιματοκυτόμετρο**. Η αραιώση των δειγμάτων ήταν τέτοια ώστε τα κύτταρα να μην αλληλοεπικαλύπτονται και να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στον θάλαμο του αιματοκυτόμετρου, καθώς ο συνολικός όγκος που τοποθετείται στο αιματοκυτόμετρο αντιπροσωπεύει ένα τυχαίο δείγμα του πληθυσμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα στην υπό μελέτη καλλιέργεια. Σε κάθε περίπτωση, η απαιτούμενη αραιώση δεν ήταν μεγαλύτερη από 1:200. Ακολουθούσε καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων, του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, καθώς και αυτών με εκβλαστήσεις και χωρίς εκβλαστήσεις (Εικόνα 13). Επιπλέον γινόταν καταγραφή της μορφολογίας τους, ιδιαιτέρως του μεγέθους τους και της μορφολογίας του κυτταρικού τοιχώματος και του κυτταροπλάσματος.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της διαίρεσης των κυττάρων του σακχαρομύκητα. (α) Όταν το θυγατρικό κύτταρο ήταν ίσο ή μεγαλύτερο από το μισό του μεγέθους του μητρικού, θεωρούνταν ως 2 διαφορετικά κύτταρα χωρίς εκβλαστήσεις. (β) Όταν το θυγατρικό κύτταρο ήταν μικρότερο από το μισό του μεγέθους του μητρικού θεωρούνταν ως 1 κύτταρο με εκβλάστηση.

Οι μετρήσεις γίνονταν με την καταγραφή του αριθμού κάθε κατηγορίας κυττάρων (ζωντανών, νεκρών, με και χωρίς εκβλαστήσεις) στα 4 γωνιακά μικρά τετράγωνα των άνω και κάτω αριστερά και δεξιά μεγάλων τετραγώνων του θαλάμου του αιματοκυτόμετρου, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14. Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με την τοποθέτηση δείγματος καλλιέργειας σε αιματοκυτόμετρο Neubauer και καταγραφή του αριθμού των κυττάρων στα 16 (μαύρα) τετράγωνα του θαλάμου.

Κάθε δείγμα εμετρείτο εις διπλούν, ενώ σε κάθε δείγμα εμετρούντο τουλάχιστον 100 κύτταρα. Τα κύτταρα που άγγιζαν τα άνω και αριστερά

όρια κάθε μικρού τετραγώνου υπολογίζονταν στην καταμέτρηση, ενώ αυτά που άγγιζαν τα κάτω και δεξιά όρια δεν λαμβάνονταν υπόψη στη μέτρηση. Σύμφωνα με τον όγκο του θαλάμου του αιματοκυτόμετρου, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στα δείγματα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων/ml καλλιέργειας} = \\ \text{αριθμός κυττάρων στα 16 τετράγωνα} \times 10^4 \times \text{συντελεστής αραιώσης}$$

B2.6. Προσδιορισμός της ανάπτυξης

Για κάθε πείραμα ελήφθη μια **μονήρης αποικία** από διήμερη καλλιέργεια, η οποία διαλύθηκε σε 5 ml YEDP και επωάστηκε στους 27 °C για 2 h μέχρι πυκνότητας $1.8 \pm 0.1 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Κατόπιν, 0.1 ή 0.5 ml της καλλιέργειας αυτής εμβολιάστηκε υπό άσηπτες συνθήκες σε τελικό όγκο 2 ή 10 ml YEDP αντίστοιχα, ανάλογα με τις ανάγκες του πειραματικού πρωτοκόλλου. Η χρονική αυτή στιγμή θεωρήθηκε ως έναρξη ($T = 0$) της ανάπτυξης. Ακολούθησε αερόβια επώαση σε σκοτεινό επωαστικό κλίβανο στους 27 °C για χρονικό διάστημα έως 2 μήνες, είτε απουσία είτε με χρόνια ή οξεία έκθεση στις φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες (Εικόνα 10).

Κατά την ανάπτυξη, σε διάφορα χρονικά σημεία που αντιστοιχούσαν στη λανθάνουσα ($T = 2, 3$ h), τη λογαριθμική ($T = 4, 5, 6$ h) και τη μεταλογαριθμική/στάσιμη ($T = 22, 24, 26, 48, 72, 240, 480, 720, 1440$ h) φάση της ανάπτυξης γινόνταν δειγματοληψία με την παραλαβή ποσότητας 30 – 100 μl της καλλιέργειας και προσδιοριζόταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, καθώς και η αναλογία των ζωντανών, νεκρών, με και χωρίς εκβλαστήσεις κυττάρων, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 13. Οι **καμπύλες ανάπτυξης** του σακχαρομύκητα προέκυψαν απεικονίζοντας σε γραφικές παραστάσεις τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που καταγράφηκε στις καλλιέργειες σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel.

B2.7. Προσδιορισμός του χρόνου διπλασιασμού

Ο **χρόνος διπλασιασμού** του συγκεκριμένου στελέχους, υπό τις εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης που περιγράφονται στην § B2.5, υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν ανά ώρα κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης.

B2.8. Χρόνια έκθεση στις προς μελέτη ουσίες

Ως **χρόνια** θεωρήθηκε η έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις ισταμίνης ή/και DMSO στην έναρξη ($T = 0$) της επώασης μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων και ακόλουθη επώαση των καλλιέργειών στους 27 °C για χρονικό διάστημα 72 h ή 2 μηνών (Εικόνα 10).

Σε καθορισμένα χρονικά σημεία της λανθάνουσας ($T = 2, 3$ h), της λογαριθμικής ($T = 4, 5, 6$ h) και της μεταλογαριθμικής/στάσιμης ($T = 22, 24, 26, 48, 72, 240, 480, 720, 1440$ h) φάσης γινόταν δειγματοληψία με παραλαβή ποσότητας 30 – 100 μl της υγρής καλλιέργειας, στην οποία, αφού αραιωνόταν κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα Ringer, προστίθονταν 1-2 σταγόνες χρωστικής MB με υάλινη πιπέτα Pasteur. Το δείγμα τοποθετούνταν στο αιματοκυτόμετρο Neubauer και καταγραφόταν ο αριθμός και η μορφολογία των κυττάρων. Σε κάθε ομάδα πειραμάτων συμπεριλαμβανόταν η ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων στην οποία ακολουθούνταν οι ίδιες πειραματικές παρεμβάσεις και προσθήκη του διαλύτη, χωρίς όμως χορήγηση της υπό μελέτη ουσίας.

B2.9. Οξεία έκθεση στις προς μελέτη ουσίες

Κατά την **οξεία** έκθεση στις προς μελέτη ουσίες ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιγράφεται για τη χρόνια έκθεση (§ B2.8), με τη διαφορά ότι οι ουσίες προστέθηκαν στις καλλιέργειες στα χρονικά σημεία $T = 3$ h, 22 h ή 30 d (Εικ. 10), με βάση τα ερωτήματα, τα αποτελέσματα και την πρόοδο της μελέτης.

Οι καλλιέργειες του μάρτυρα που αφέθηκαν να επωαστούν για 30 ημέρες, μοιράστηκαν σε δύο ή περισσότερα δείγματα ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Σε ένα δείγμα προστέθηκε η προς μελέτη ουσία. Σε αυτήν την περίπτωση, ως έναρξη του χρόνου επώασης ($T' = 0$) θεωρήθηκε η στιγμή κατά την οποία προστέθηκε η ουσία στα δείγματα.

Η δειγματοληψία και η καταγραφή των παραμέτρων αξιολόγησης γινόταν 3-48 h μετά τη χορήγηση της ουσίας, προκειμένου να διερευνηθεί η οξεία επίδραση των ουσιών στους κυτταρικούς πληθυσμούς. Σε κάθε ομάδα πειραμάτων συμπεριλαμβανόταν δείγμα **φυσιολογικών μαρτύρων** στο οποίο δεν είχε χορηγηθεί ουσία.

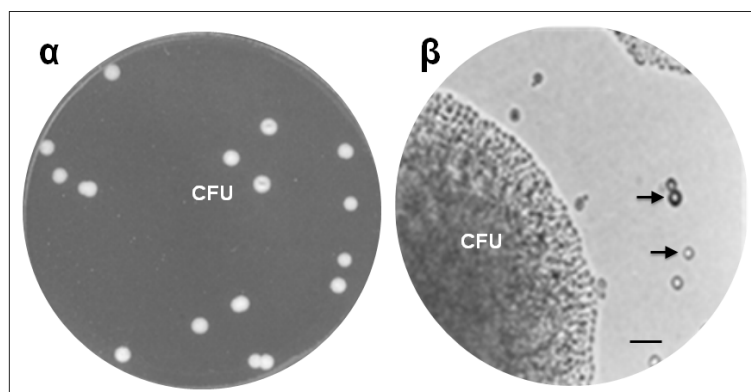
B2.10. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Κάθε ζωντανό κύτταρο πολλαπλασιάζεται με μίτωση στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου, σχηματίζει μια αποικία μερικών χιλιοστών (Εικόνα 15) και αναφέρεται ως μονάδα σχηματισμού αποικίας (**CFU**, Colony Forming Unit). Ο αριθμός των CFUs που μετρώνται στην επιφάνεια του YEDP σε κάθε τρυβλίο υποδηλώνει τον αριθμό των βιώσιμων προγονικών κυττάρων του σακχαρομύκητα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν στο δείγμα που επιστρώθηκε στο YEDP.

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας των κυττάρων του σακχαρομύκητα να σχηματίζουν αποικίες (Εικόνα 10) έγινε ήπια και σχολαστική ανάδευση των καλλιεργειών έτσι ώστε να μην παραμείνουν συσσωματώματα και να ληφθεί δείγμα ομοιογενούς εναιωρήματος κυττάρων. Ακολούθησε κατάλληλη αραίωση με YEDP σε τελική πυκνότητα ~200 κύτταρα ανά 0.1 ml καλλιέργειας.

Δείγμα 0.1 ml των υγρών καλλιεργειών ελήφθη σε διάφορα χρονικά σημεία της ανάπτυξης, επιστρώθηκε σε τρυβλία που περιείχαν στείρο ΥΑ με τη χρήση κεκαμμένης τριγωνικής ράβδου και επωάστηκε στους 27 °C για 48 h. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα, έγινε μακροσκοπική (Εικόνα 15α) παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών, του

χρώματος και της υφής των αποικιών και μέτρηση του αριθμού τους με γυμνό οφθαλμό σε φωτισμό δωματίου. Επίσης, το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να καταγραφεί η μικροσκοπική εικόνα των αποικιών που σχηματίστηκαν στο άγαρ και να εντοπιστούν τυχόν μεμονωμένα κύτταρα στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου, τα οποία δεν είχαν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 15β).



Εικόνα 15. (α) Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα μονάδων σχηματισμού αποικίας (CFU) του *S. cerevisiae*, όπως αυτές αναπτύσσονται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου με στερεό θρεπτικό μέσο μετά από επώαση στους 27 °C για 48 h. (β) Ενδεικτική εικόνα CFU όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται μεμονωμένα κύτταρα (βέλη) στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου, τα οποία δεν σχημάτισαν αποικία μετά από επώαση στους 27 °C για 48 h. x400, –10μm.

Με σκοπό τη διερεύνηση όποιας **ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ** επίδρασης των ουσιών στον φαινότυπο των αποικιών (Εικόνα 10), γίνονταν περαιτέρω κύκλοι ανακαλλιέργειας μιας CFU σε νέο στερεό θρεπτικό υλικό, επώαση στους 27 °C για 48 h και εκ νέου μακροσκοπική και μικροσκοπική καταγραφή και σύγκριση των χαρακτηριστικών των CFU.

B2.11. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος **IBM® SPSS® Statistics έκδοση 22**.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα (MO ± SEM). Η στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων

πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διασποράς (**ANOVA**) που ακολουθήθηκε από τις **post hoc** δοκιμασίες Scheffé ή Dunett για πολλαπλές συγκρίσεις.

Η σύγκριση μεταξύ 2 μεταβλητών έγινε με τις δοκιμασίες **Wilcoxon W - Mann-Whitney U** ή **Student's t-test**. Η στατιστική εξάρτηση (συσχέτιση) μεταξύ δύο μεταβλητών για τις οποίες δεν απαιτείται κοινή κατανομή πιθανότητας εκτιμήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης ρ της μη-παραμετρικής δοκιμασίας του **Spearman**. Η συσχέτιση μεταξύ δύο μεταβλητών οι τιμές των οποίων ακολουθούσαν κανονική κατανομή (σύμφωνα με τις δοκιμασίες **Kolmogorov-Smirnov** ή **Shapiro-Wilk**, ανάλογα με τον αριθμό των παρατηρήσεων για κάθε μεταβλητή) εκτιμήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης r της δοκιμασίας του **Pearson**. Η θετική τιμή των συντελεστών αντιστοιχεί σε αύξουσα μονότονη τάση μεταξύ των δύο μεταβλητών, ενώ αρνητική τιμή αντιστοιχεί σε φθίνουσα μονότονη τάση μεταξύ τους. Για τη σύγκριση περισσότερων από 2 πληθυσμών ή μη κανονικών δεδομένων από ανεξάρτητα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία **Kruskal-Wallis**.

Ο υπολογισμός της **μέσης δραστηκής δόσης** (ED_{50}), η οποία στην περίπτωση ανασταλτικής δράσης των ουσιών αντιστοιχούσε στη **μέση ανασταλτική δόση** (ID_{50}), καθώς και της **μέσης θανατηφόρου δόσης** (LD_{50}) έγινε με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) λογιστικής παλινδρόμησης (regression).

Σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις σημαντική θεωρήθηκε τιμή του **$P < 0.05$** , με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

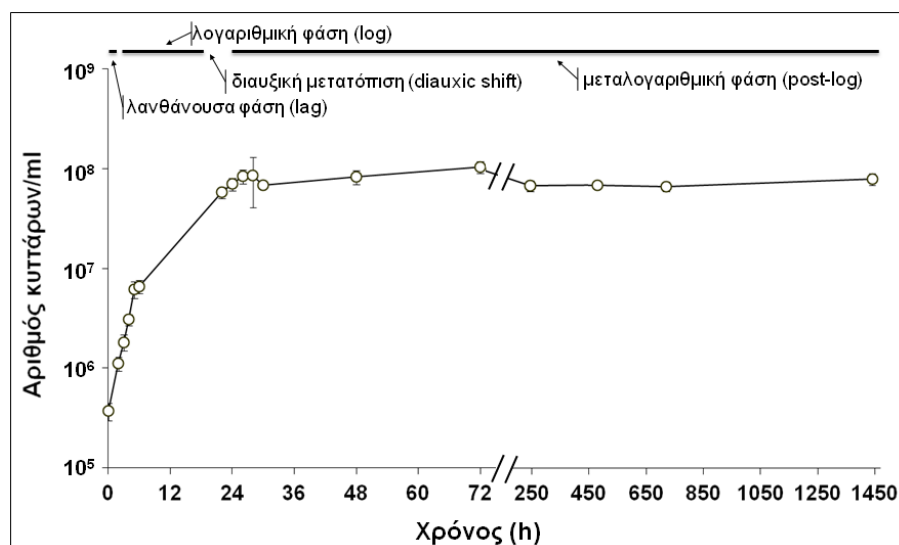
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ερώτημα 1: Ποιά είναι τα χαρακτηριστικά της φυσιολογικής ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε συνάρτηση με το χρόνο;

Γ1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ *S. CEREVISIAE* ΥΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

Γ1.1. Πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα

Η ανάπτυξη του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 στη φυσιολογική θερμοκρασία επώασης (27 °C), η οποία προσδιορίστηκε επί **2 μήνες** με την καταγραφή του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες, ήταν χρονοεξαρτώμενη (Spearman's $\rho = 0.832$, $P < 0.001$) σύμφωνα με τις υπάρχουσες αναφορές (Σταυρινίδης 1999). Συγκεκριμένα, κατά τις πρώτες 2 h περίπου τα κύτταρα βρίσκονταν στη λανθάνουσα (lag) φάση και ακολούθησε η λογαριθμική ή εκθετική (log) φάση της ανάπτυξης (Spearman's $\rho = 0.804$, $P < 0.001$) (Εικόνα 16).



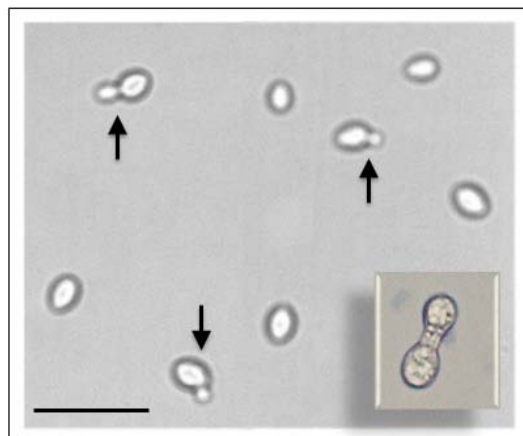
Εικόνα 16. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 έπειτα από επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Διακρίνονται η λανθάνουσα και η λογαριθμική φάση, η διαυξική μετατόπιση και η μεταλογαριθμική ή στάσιμη φάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας ($n = 5-9$).

Μετά από 22–26 h επώασης, τα κύτταρα εισήλθαν στη μεταλογαριθμική ή στάσιμη φάση της ανάπτυξης (Spearman's $\rho = 0.228$, $P > 0.05$). Η φάση που εντοπίζεται μετά το πέρας της λογαριθμικής και πριν την έναρξη της στάσιμης φάσης αντιστοιχεί στη διαυξική μετατόπιση (diauxic shift).

Ο χρόνος διπλασιασμού του σακχαρομύκητα που υπολογίστηκε κατά την λογαριθμική φάση ήταν 73 ± 11 min.

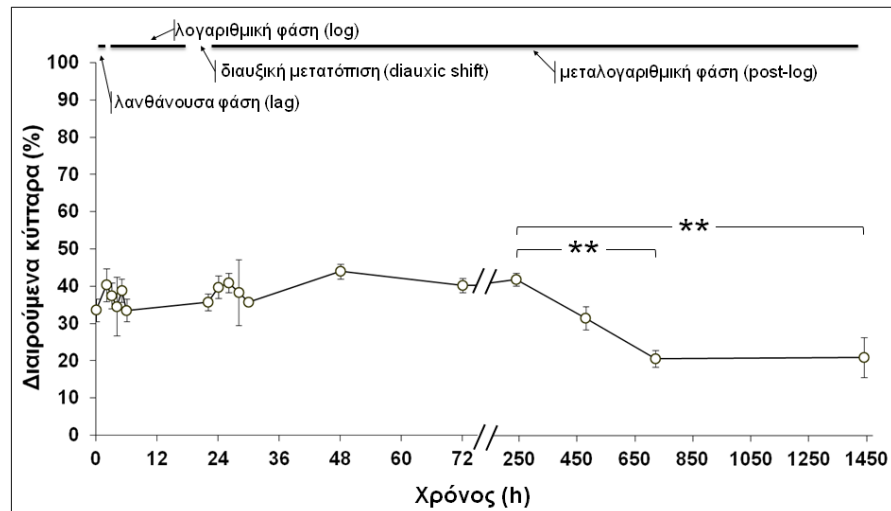
Γ1.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των κυττάρων με εκβλαστήσεις (Εικόνα 17) επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες.



Εικόνα 17. Ενδεικτική εικόνα κυττάρων του *S. cerevisiae* κατά την καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C για 22 h, όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται διαιρούμενα κύτταρα (με εκβλαστήσεις, βέλη). Στην ένθετη εικόνα διακρίνεται διαιρούμενο κύτταρο. $\times 400$, $-10\mu\text{m}$.

Οι τιμές της αναλογίας των **διαιρούμενων κυττάρων** κατά τη διάρκεια της 2μηνης επώασης ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η πολλαπλασιαστική ικανότητα εμφάνισε θετική συσχέτιση με τον αριθμό των κυττάρων στις καλλιέργειες (Pearson $r = 0.335$, $P < 0.001$) και αρνητική συσχέτιση με τον χρόνο επώασης (Pearson $r = -0.482$, $P < 0.001$). Η **πολλαπλασιαστική ικανότητα** των κυττάρων άρχισε να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 18).

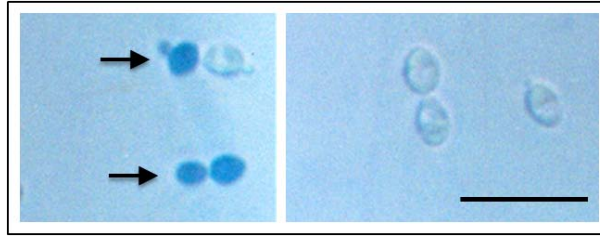


Εικόνα 18. Πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 μετά από επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Η πολλαπλασιαστική ικανότητα προσδιορίστηκε με βάση την εκατοστιαία αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων (με εκβλαστήσεις) σε δείγματα καλλιιεργειών του σακχαρομύκητα που λαμβάνονταν σε διάφορα χρονικά σημεία κατά την επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-9$). $**P < 0.01$, ANOVA μεταξύ των τιμών της αναλογίας των διαιρούμενων κυττάρων που ελήφθησαν σε όλες τις δειγματοληψίες κατά τις χρονικές στιγμές από 240 έως 1440 h επώασης.

Μέχρι τις 72 h, η αναλογία των **διαιρούμενων κυττάρων** ήταν ανάλογη του αριθμού τους (Pearson $r = 0.287$, $P < 0.01$) και του χρόνου επώασης (Pearson $r = 0.225$, $P < 0.05$). Στη συνέχεια, η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογη του χρόνου επώασης (Pearson $r = -0.567$, $P < 0.01$), ενώ σχετιζόταν σημαντικά με τον αριθμό των κυττάρων (Pearson $r = -0.194$, $P > 0.05$).

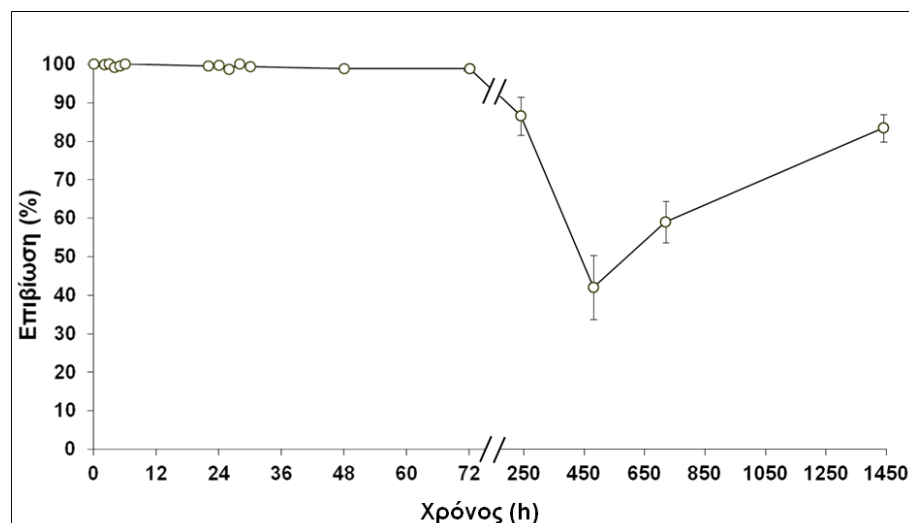
Γ1.3. Επιβίωση του σακχαρομύκητα

Η **επιβίωση** του σακχαρομύκητα εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 19) επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες.



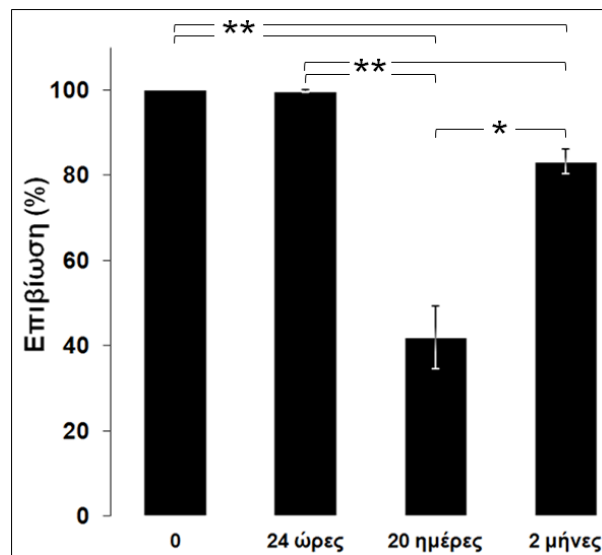
Εικόνα 19. Ενδεικτική εικόνα κυττάρων του *S. cerevisiae*, που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C, όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση με κυανούν του μεθυλενίου. Διακρίνονται χρωματισμένα νεκρά (βέλη) και διαυγή ζωντανά κύτταρα. Μεγέθυνση x400, –10 μm.

Η **επιβίωση** των κυττάρων παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το χρόνο επώασης (Spearman's $\rho = -0.738$, $P < 0.001$) και με τον αριθμό των κυττάρων (Spearman's $\rho = -0.534$, $P < 0.001$). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 20, αρχικά η επιβίωση των κυττάρων παρέμεινε σταθερή, στη συνέχεια μειώθηκε ενώ αυξήθηκε μετά τις 20 ημέρες (480 h) επώασης. Πιο αναλυτικά, στις πρώτες 24 h της επώασης η επιβίωση των κυττάρων ήταν ανεξάρτητη του χρόνου επώασης (Spearman's $\rho = -0.162$, $P > 0.05$) και οριακά ανεξάρτητη του αριθμού τους (Spearman's $\rho = -0.236$, $P = 0.051$).



Εικόνα 20. Επιβίωση των κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Η επιβίωση εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων σε δείγματα καλλιέργειών του σακχαρομύκητα που λαμβάνονταν σε διάφορα χρονικά σημεία κατά την επώαση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-9$).

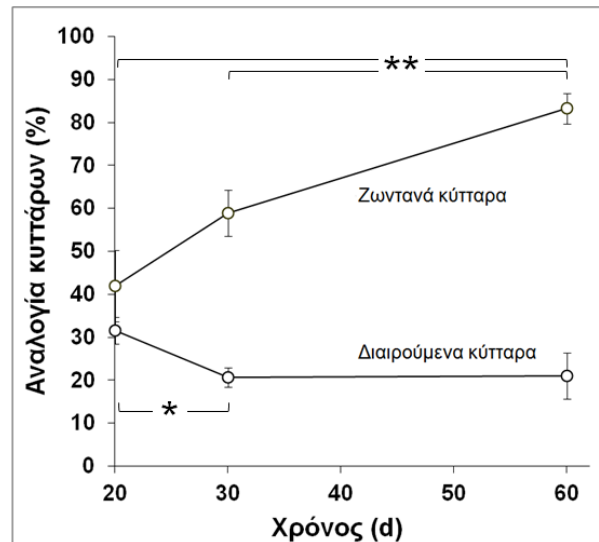
Από την αρχή της στάσιμης φάσης (24 h) μέχρι τις 20 ημέρες (480 h), η επιβίωση των κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογη του χρόνου επώασης (Spearman's $\rho = -0.617$, $P < 0.001$) και ανεξάρτητη του αριθμού τους (Spearman's $\rho = 0.028$, $P > 0.08$), ενώ μετά τις 20 ημέρες επώασης παρέμεινε ανεξάρτητη του αριθμού των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.345$, $P > 0.05$) και αυξήθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο (Spearman's $\rho = 0.859$, $P < 0.001$), παραμένοντας ωστόσο χαμηλότερη σε σχέση με την επιβίωση των κυττάρων στις 24 h επώασης ($P < 0.05$, ANOVA, Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 σε διάφορα χρονικά σημεία της επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO $\pm$ SEM ($n = 5-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ANOVA.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι μετά τις 20 ημέρες της επώασης, ενώ ο **αριθμός των κυττάρων** παρέμεινε σταθερός (Εικόνα 16), η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογη της επιβίωσης (Spearman's $\rho = -0.546$, $P < 0.05$, Εικόνα 22). Η μείωση της **βιωσιμότητας** των κυττάρων κατά το χρονικό διάστημα των 10-20 ημερών επώασης, χωρίς παράλληλη μείωση του συνολικού αριθμού τους (Εικόνα 16) είναι ενδεικτικά του θανάτου έως και 60% των κυττάρων (Εικόνα 20) υπό τις στρεσογόνες συνθήκες της στέρησης

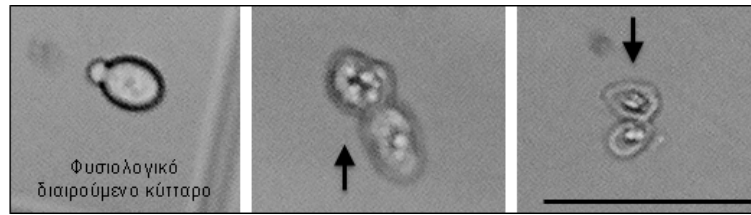
θρεπτικών υλικών. Ωστόσο, οι καλλιέργειες δεν φαίνεται να οδηγούνται στην έξοδο από την αδράνεια (Gray et al. 2004), αφού δεν αυξάνεται η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Αναλογία (%) των διαιρούμενων και των ζωντανών κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 μετά τις 20 ημέρες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ANOVA.

Γ1.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

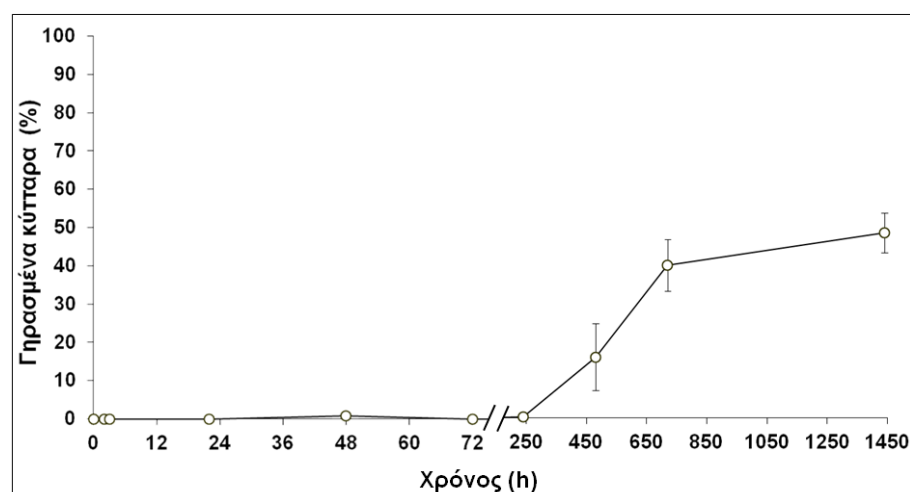
Κατά τις πρώτες 72 h της ανάπτυξης τόσο τα μη διαιρούμενα όσο και τα διαιρούμενα κύτταρα του σακχαρομύκητα είχαν ωοειδές σχήμα με ευδιάκριτο κυτταρικό τοίχωμα, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 17. Μετά από 10 ημέρες (240 h) επώασης εμφανίστηκαν 'άτυπα' κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε γήρανση (Εικόνα 23), όπως έντονα κοκκώδες κυτταρόπλασμα ή/και αχνό περίβλημα ακανόνιστου σχήματος (Mortimer and Johnston, 1959), καθώς και υπερμεγέθη κενोटόπια, περισσότερα του ενός ανά κύτταρο (Egilmez et al., 1990).



Εικόνα 23. Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων με μορφολογικά χαρακτηριστικά γήρανσης (βέλη). Διακρίνονται το στικτό κυτταρόπλασμα με τα ευμεγέθη κενोटόπια και το ακανόνιστου σχήματος περίβλημα, χαρακτηριστικά που απουσιάζουν από τα φυσιολογικά διαιρούμενα κύτταρα. Μεγέθυνση $\times 400$, $-10\ \mu\text{m}$.

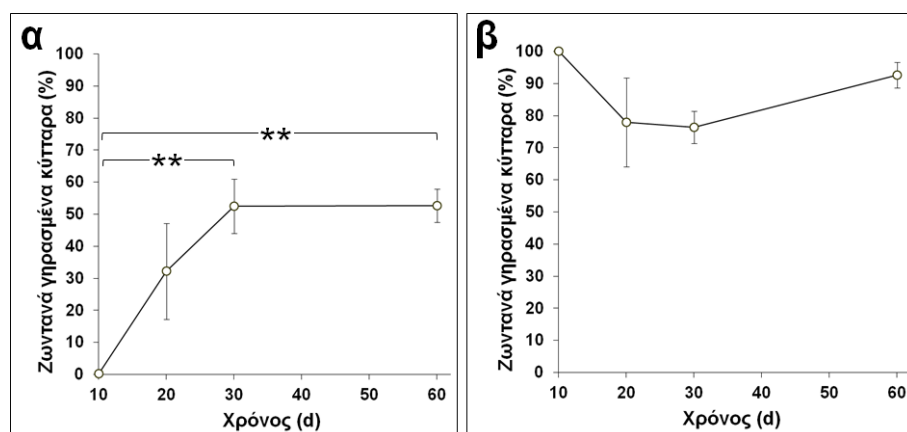
Σημειώνεται ότι, επειδή τα κύτταρα αυτά ήταν χωρίς εκβλαστήσεις σε ποσοστό $> 95\%$, δεν έγινε διαχωρισμός μεταξύ διαιρούμενων και μη κυττάρων. Το γεγονός ότι τα κύτταρα που εμφάνισαν μορφολογικά χαρακτηριστικά γήρανσης ήταν στην πλειονότητα τους μη διαιρούμενα συνάδει με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, σύμφωνα με τα οποία, τα γηρασμένα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού (Mortimer and Johnston, 1959). Για τους λόγους αυτούς, τα **άτυπα** κύτταρα που περιγράφονται παραπάνω χαρακτηρίστηκαν ως **‘γηρασμένα’**.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, η αναλογία των ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου και εμφάνισε θετική συσχέτιση με τον χρόνο επώασης (Spearman’s $\rho = 0.818$, $P < 0.001$).



Εικόνα 24. Εκατοστιαία αναλογία των ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό στους $27\ ^\circ\text{C}$ επί 2 μήνες (1440 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{MO} \pm \text{SEM}$ ($n = 3-6$).

Η αναλογία των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνολικού αριθμού των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες (Εικόνα 25α) εμφάνισε επίσης θετική συσχέτιση με τον χρόνο επώασης (Spearman’s $\rho = 0.613$, $P < 0.01$) και παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά τον 1 μήνα ($P < 0.01$, ANOVA). Η αναλογία των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των ‘γηρασμένων’ κυττάρων (Εικόνα 25β) ήταν ανεξάρτητη του χρόνου επώασης (Spearman’s $\rho = 0.392$, $P > 0.05$) και κυμάνθηκε από ~80-95%. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι όσο περνά ο χρόνος αυξάνεται το ποσοστό των κυττάρων που αποκτούν τον γηρασμένο φαινότυπο (Εικόνα 24), καθώς και ότι τα ‘γηρασμένα’ κύτταρα στην πλειοψηφία τους διατηρούν την βιωσιμότητά τους (Εικόνα 25β) και αποτελούν περίπου το 50% των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες μετά από 1 μήνα επώασης (Εικόνα 25α).

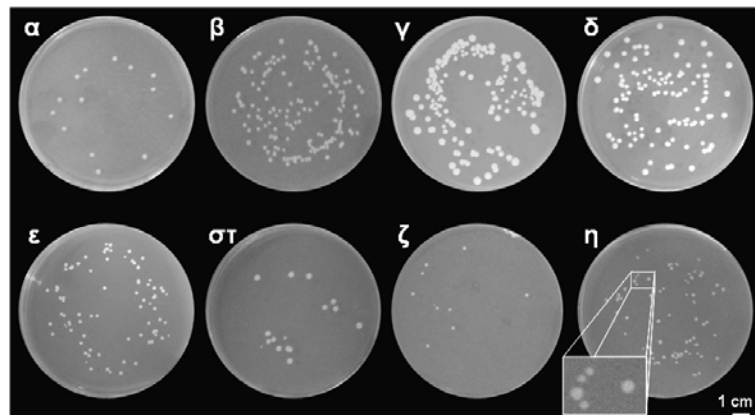


Εικόνα 25. Εκατοστιαία αναλογία (%) ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου (α) των ζωντανών κυττάρων και (β) των ‘γηρασμένων’ κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 4-6$), ** $P < 0.01$, ANOVA.

Γ1.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

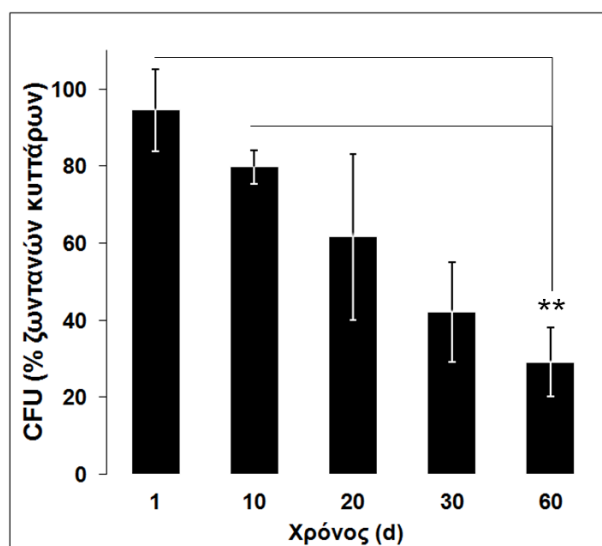
Η **μακροσκοπική** εικόνα των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε στερεό υλικό μετά την επίστρωση δειγμάτων που ελήφθησαν κατά τις

πρώτες 72 h της ανάπτυξης ήταν φυσιολογική, χωρίς εμφανείς αλλοιώσεις (Εικόνα 26α-δ). Ωστόσο, μετά τις 10 ημέρες εμφανίστηκαν αποικίες **δύο διαφορετικών μεγεθών** (Εικόνα 26ε-η). Όταν οι αποικίες αυτές ανακαλλιιεργήθηκαν δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεγέθους στις θυγατρικές τους αποικίες. Σημειώνεται ότι η πιθανότητα επιμόλυνσης ελέγχθηκε διεξοδικά και αποκλείστηκε.



Εικόνα 26. Μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά την επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό δειγμάτων των καλλιιεργειών του *S. cerevisiae* που ελήφθησαν (α) κατά την έναρξη της επώασης ($T = 0$) και στις (β) 25 h (αραίωση 1:50000), (γ) 48 h (αραίωση 1:70000), (δ) 72 h (αραίωση 1:90000, (ε) 10 ημέρες (αραίωση 1:60000), (στ) 20 ημέρες (αραίωση 1:60000), (ζ) 30 ημέρες (αραίωση 1:60000) και (η) 60 ημέρες (αραίωση 1:70000) επώασης. Στο ένθετο τετράγωνο διακρίνονται τα δύο διαφορετικά μεγέθη αποικιών.

Η **ικανότητα σχηματισμού αποικιών** εκφράστηκε ως εκατοστιαία (%) αναλογία των CFUs στο στερεό θρεπτικό υλικό επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στις αντίστοιχες καλλιέργειες. Σημειώνεται ότι ως σημείο αναφοράς θεωρήθηκε η έναρξη της στάσιμης φάσης (24 h), όπου τα κύτταρα διατηρούσαν στο σύνολό τους την ικανότητα σχηματισμού αποικιών. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων που είχαν επωαστεί για 2 μήνες μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με την έναρξη της στάσιμης φάσης (Εικόνα 27) ($P < 0.05$, ANOVA) και παρουσίασε αρνητική συσχέτιση (Spearman's $\rho = -0.442$, $P < 0.05$) με τον αριθμό των ζωντανών 'γηρασμένων' κυττάρων.



Εικόνα 27. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων του *S. cerevisiae* σε διάφορα χρονικά σημεία της στάσιμης φάσης της ανάπτυξης. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα αντίστοιχα δείγματα και παρουσιάζεται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-9$), ** $P < 0.01$, ANOVA.

Συμπέρασμα

Υπό **φυσιολογικές συνθήκες** επώασης, η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* ATCC 2366 ακολουθούσε διακριτές φάσεις και ήταν χρονοεξαρτώμενη. Κατά τις πρώτες 72 h, τα κύτταρα διατήρησαν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και είχαν φυσιολογικά μικροσκοπικά και μακροσκοπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Στο επόμενο διάστημα των 10 – 20 ημερών, η βιωσιμότητα και η πολλαπλασιαστική ικανότητα μειώθηκαν και άρχισαν να εμφανίζονται ‘άτυπα’ κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε γηρασμένα κύτταρα. Μετά από 2 μήνες επώασης, ενώ ο συνολικός αριθμός των κυττάρων παρέμεινε σταθερός, η ικανότητα διαίρεσης και σχηματισμού αποικιών μειώθηκε σημαντικά. Τα δεδομένα υποστηρίζουν την **εμφάνιση γηρασμένου αλλά βιώσιμου φαινότυπου κατά την είσοδο των κυττάρων στην κατάσταση αδράνειας**, χωρίς δυνατότητα εξόδου από την κατάσταση αυτή ακόμη και μετά από ανακαλλιέργεια σε νέο πλήρες θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των φυσιολογικών ασύγχρονων πληθυσμών του *S. cerevisiae* ATCC 2366 στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης

Χαρακτηριστικό πληθυσμού	Λανθάνουσα	Φάση ανάπτυξης Λογαριθμική	Στάσιμη	
			Πρώιμη	Όψιμη
Κυτταρική ανάπτυξη	↔	↑↑	↔	↔
Επιβίωση	↔	↔	↔	↓↓↑
Πολλαπλασιαστική ικανότητα	↔	↑	↑*	↓↓
Φαινότυπος γήρανσης	—	—	—	↑
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	↔	↔	↔	↓↓

— απουσία, ↔ αμετάβλητο χαρακτηριστικό, ↓ μείωση, ↑ αύξηση, † αυξομειώσεις, * παρατήρηση κατά τη διαυξική μετατόπιση

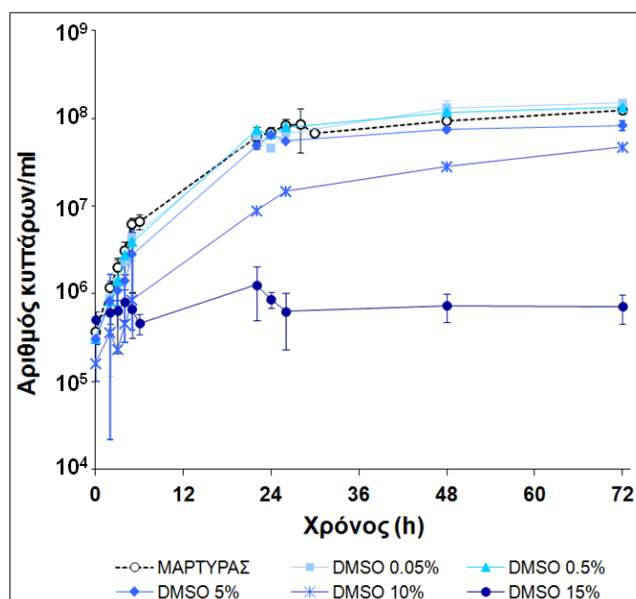
Ερώτημα 2: Ποια είναι τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα υπό την επίδραση DMSO; Ποιές παράμετροι επηρεάζονται από τη χρόνια έκθεση των κυττάρων στο DMSO και πώς;

Γ2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΟ DMSO ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ *S. CEREVISIAE*

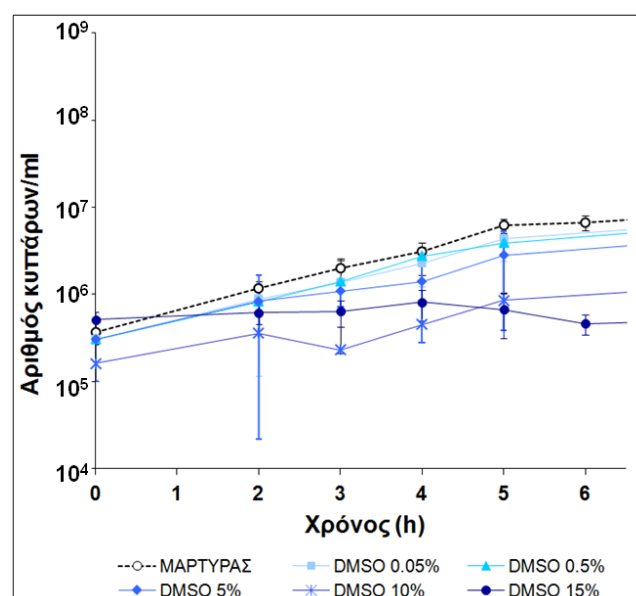
Γ2.1. Επίδραση του DMSO στον πολλαπλασιασμό

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις του DMSO που πιθανώς επιδρούν στην ανάπτυξη του σακχαρομύκητα, πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα με χρόνια έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις DMSO. Η ελάχιστη ανασταλτική και μυκητοκτόνος πυκνότητα ήταν $> 20\%$. Κατά τη χρόνια επώαση του σακχαρομύκητα παρουσία $0.05\text{-}15\%$ DMSO για 72 h από την έναρξη της καλλιέργειας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0.001$, Kruskal–Wallis test) διαφορά στην ανάπτυξη μεταξύ των πληθυσμών που έλαβαν διάφορες συγκεντρώσεις DMSO (Εικόνα 28). Η συσχέτιση του αριθμού των κυττάρων και του χρόνου επώασης ήταν στατιστικά σημαντική στις καλλιέργειες του μάρτυρα που δεν έλαβε DMSO (Spearman's $\rho = 0.927$, $P < 0.001$), καθώς και σε αυτές που έλαβαν DMSO σε δόσεις 0.05% (Spearman's $\rho = 0.966$, $P < 0.001$), 0.5% (Spearman's $\rho = 0.959$, $P < 0.001$), 5% (Spearman's $\rho = 0.941$, $P < 0.001$) και 10% (Spearman's $\rho = 0.983$, $P < 0.001$), υποδηλώνοντας την χρονοεξαρτώμενη ανάπτυξη του μύκητα για 72 h υπό αυτές τις συνθήκες (Εικόνα 28).

Αντίθετα, χορήγηση 15% DMSO προκάλεσε μη χρονοεξαρτώμενη (Spearman's $\rho = 0.435$, $P > 0.05$) ανάπτυξη του *S. cerevisiae* και διατήρησε σταθερό τον αριθμό των κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια των 72 h (Εικόνα 28). Στη δόση 15% , το DMSO φαίνεται ότι παρενέβη στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των καλλιεργειών του μύκητα και δεν τους επέτρεψε να εισέλθουν στη λογαριθμική φάση (Εικόνα 29).

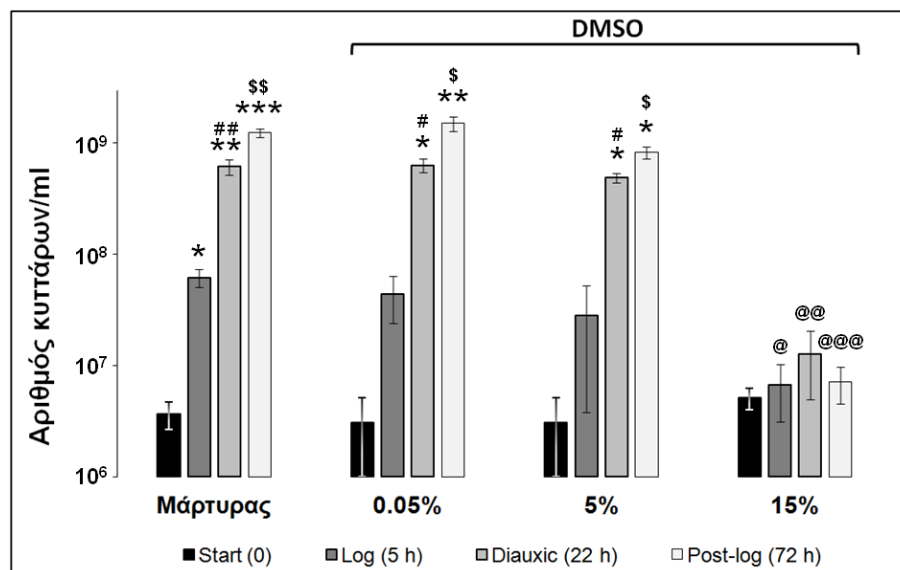


Εικόνα 28. Καμπύλες ανάπτυξης του *S. cerevisiae* που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 72 h παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Διακρίνεται η διατήρηση του αριθμού κυττάρων σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης κατά τη χρόνια έκθεση σε 15% DMSO σε αντίθεση με τη χρονοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων παρουσία μικρότερων συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$) του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας.



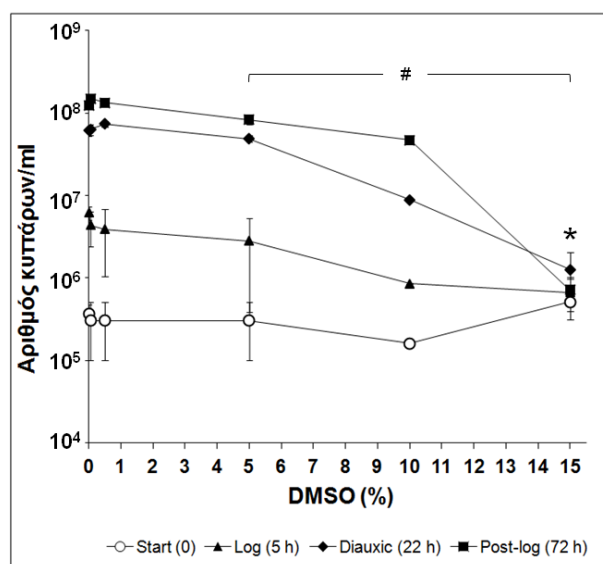
Εικόνα 29. Καμπύλες ανάπτυξης του *S. cerevisiae* κατά τις πρώτες 6 h της επώασης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Διακρίνεται η διατήρηση του αρχικού αριθμού κυττάρων κατά τη χορήγηση 15% DMSO. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$) του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δράση του DMSO, έγινε στατιστική αξιολόγηση της ανάπτυξης των πληθυσμών του σακχαρομύκητα παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων DMSO στα χρονικά σημεία 0, 5, 22 και 72 h που αντιστοιχούν στην έναρξη, τη λογαριθμική φάση, τη διαυξική μετατόπιση και τη στάσιμη φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 30). Η επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι ο αριθμός των κυττάρων στις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί σε 0.05 και 5% DMSO δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές ($P > 0.05$, ANOVA) διαφορές σε σύγκριση με αυτές που δεν εκτέθηκαν στην ουσία, ακολουθώντας το προφίλ της ανάπτυξης του μάρτυρα (Εικόνα 30). Αντίθετα, η παρουσία 15% DMSO ανέστειλε στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) την ανάπτυξη του σακχαρομύκητα κατά τη λογαριθμική φάση. Η αναστολή αυτή ήταν εμφανής σε όλες τις επόμενες φάσεις και ο αριθμός των κυττάρων δεν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$, ANOVA) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης παρουσία 15% DMSO (Εικόνα 30).



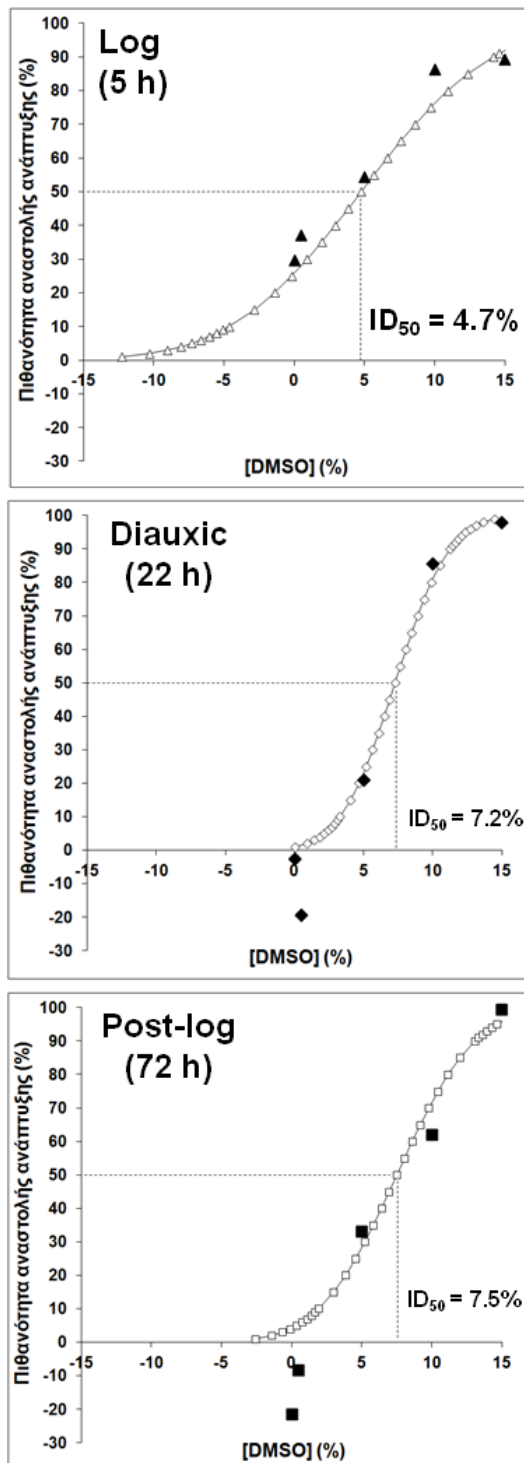
Εικόνα 30. Ανάπτυξη του *S. cerevisiae* στην έναρξη της επώασης (0) και κατά τη λογαριθμική (Log) φάση, τη διαυξική (Diauxic) μετατόπιση και την στάσιμη (Post-log) φάση, απουσία (Μάρτυρας) ή παρουσία 0.05, 5 και 15% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$) του αριθμού των κυττάρων/ml καλλιέργειας. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs αριθμός κυττάρων στην αντίστοιχη έναρξη (0). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs αντίστοιχη Log (5 h). \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ vs αντίστοιχη Diauxic (22 h). @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$ vs αντίστοιχη φάση στον Μάρτυρα.

Όσον αφορά στη σχέση δόσης-αποτελέσματος, εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της δόσης του DMSO και του αριθμού των κυττάρων στην λογαριθμική φάση (Spearman's $\rho = -0.966$, $P < 0.001$), κατά τη διαυξική μετατόπιση (Spearman's $\rho = -0.592$, $P < 0.01$) καθώς και στην στάσιμη φάση (Spearman's $\rho = -0.592$, $P < 0.01$) της ανάπτυξης (Εικόνα 31). Όπως ήταν αναμενόμενο, η αντίστοιχη συσχέτιση κατά την έναρξη της επώασης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Spearman's $\rho = 0.195$, $P > 0.05$) ενώ η χορήγηση 15% DMSO μείωσε στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) τον αριθμό των κυττάρων σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Καμπύλες δόσης-αποτελέσματος που απεικονίζουν τη δοσοεξαρτώμενη ανάπτυξη του *S. cerevisiae* κατά τη χρόνια έκθεση στο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Start: έναρξη της επώασης, Diauxic: διαυξική μετατόπιση, Log: λογαριθμική φάση, Post-log: στάσιμη φάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$). του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας. * $P < 0.05$ vs αριθμός κυττάρων απουσία DMSO (0) σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης εκτός από την έναρξη. # $P < 0.05$ στην στάσιμη φάση.

Ακολούθως, έγινε εκτίμηση της ED_{50} , η οποία στην περίπτωση της ανασταλτικής δράσης του DMSO (Εικόνα 32) αντιστοιχεί στη μέση ανασταλτική δόση ID_{50} .



Εικόνα 32. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς αναστολής της ανάπτυξης του *S. cerevisiae* σε διάφορες δόσεις διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) (△, ◇, □) και υπολογισμός της μέσης ανασταλτικής δόσης (ID_{50}) στην λογαριθμική (Log), διαυξική (Diauxic) και στάσιμη (Post-log) φάση της ανάπτυξης. Τα σύμβολα ▲, ◆, ■ δείχνουν τα πειραματικά δεδομένα σε κάθε φάση.

Οι καμπύλες πιθανότητας επιτυχούς αναστολής της ανάπτυξης στις διάφορες δόσεις του DMSO που προέκυψαν μετά από ανάλυση με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) λογιστικής παλινδρόμησης (regression) του IBM® SPSS® (Chen et al., 2006) ήταν σιγμοειδείς (Εικόνα 32). Τα πειραματικά δεδομένα ακολουθούσαν την ανάλυση που προέκυψε κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξης, από την οποία υπολογίστηκε ότι η ID_{50} ήταν 4.7% με 95% διάστημα εμπιστοσύνης από -1.9 έως 8.8 (Εικόνα 32).

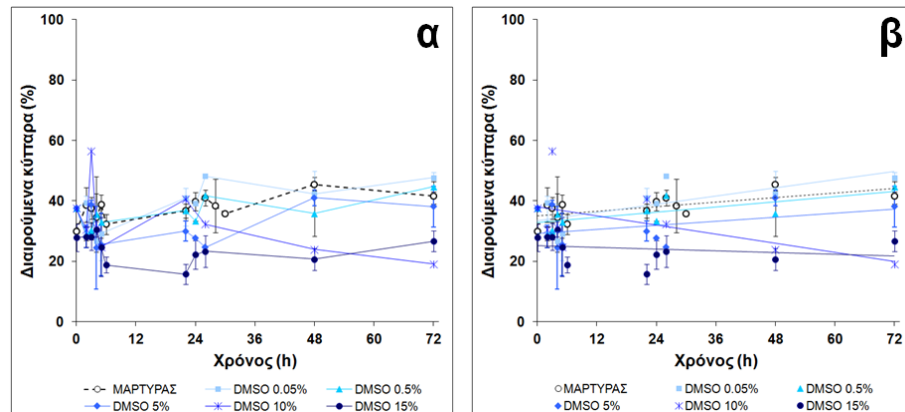
Γ2.2. Επίδραση του DMSO στον χρόνο διπλασιασμού

Τα κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία 0.05%, 0.5% και 5% DMSO είχαν χρόνο διπλασιασμού 76.7 ± 41.4 , 75.6 ± 18.3 και 81.0 ± 1.3 αντίστοιχα που δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων του μάρτυρα ($P > 0.05$, ANOVA).

Γ2.3. Επίδραση του DMSO στην πολλαπλασιαστική ικανότητα

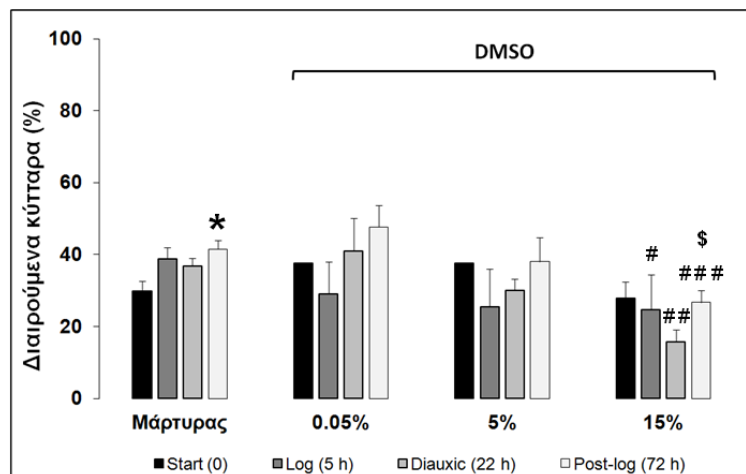
Κατά τη χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε 0.05-15% DMSO για 72 h από την έναρξη της καλλιέργειας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0.001$, Kruskal–Wallis test) διαφορά στην αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών που έλαβαν διάφορες συγκεντρώσεις DMSO (Εικόνα 33α). Η αύξηση των κυττάρων με εκβλαστήσεις ήταν χρονοεξαρτώμενη στον μάρτυρα (Spearman's $\rho = 0.328$, $P < 0.01$) και στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0.05% DMSO (Spearman's $\rho = 0.487$, $P < 0.05$). Στη δόση 0.5%, η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήταν οριακά (Spearman's $\rho = 0.451$, $P = 0.06$) χρονοεξαρτώμενη, ενώ παρέμεινε σταθερή παρουσία 5% της ουσίας (Spearman's $\rho = 0.130$, $P > 0.05$). Στατιστικά μη σημαντική αρνητική συσχέτιση της αναλογίας διαιρούμενων κυττάρων και του χρόνου επώασης παρατηρήθηκε με 10% (Spearman's $\rho = -0.550$, $P > 0.05$) και οριακά σημαντική με 15% DMSO (Spearman's $\rho = -0.267$, $P =$

0.06). Όπως υποδηλώνουν και οι γραμμές τάσης (Εικόνα 33β), τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της ανασταλτικής δράσης του DMSO στον κυτταρικό κύκλο του *S. cerevisiae*.



Εικόνα 33. Πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* (α) εκφρασμένη ως η εκατοστιαία αναλογία (%) του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων με εκβλαστήσεις στις καλλιέργειες που επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 72 h παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και (β) οι αντίστοιχες γραμμές τάσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO ± SEM (n = 2-9).

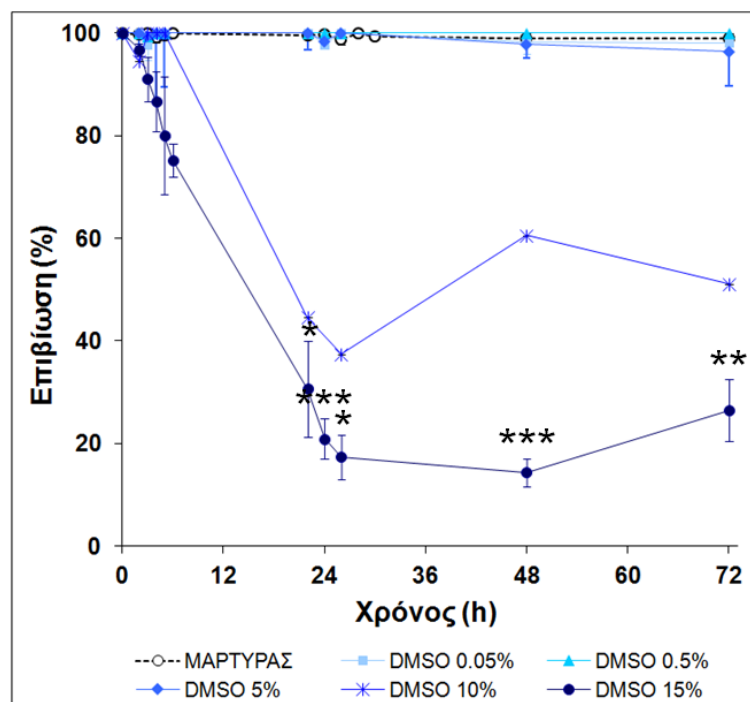
Η στατιστική ανάλυση εντόπισε σημαντική ($P < 0.05$, ANOVA) μείωση της αναλογίας των διαιρούμενων κυττάρων παρουσία 15% DMSO σε όλες τις φάσεις της ανάπτυξης συγκριτικά με τις καλλιέργειες του μάρτυρα όπου δεν χορηγήθηκε η ουσία (Εικόνα 34).



Εικόνα 34. Πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* στην έναρξη της επώασης (0) και κατά τη λογαριθμική (Log) φάση, τη διαυξική (Diauxic) μετατόπιση και την στάσιμη (Post-log) φάση, απουσία (Μάρτυρας) ή παρουσία 0.05, 5 και 15% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$) της εκατοστιαίας αναλογίας (%) των διαιρούμενων κυττάρων με εκβλαστήσεις στις καλλιέργειες. * $P < 0.05$ vs έναρξη (0) στο μάρτυρα. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs αντίστοιχη φάση στο μάρτυρα. \$ $P < 0.05$ vs αντίστοιχη στάσιμη φάση με 5% DMSO.

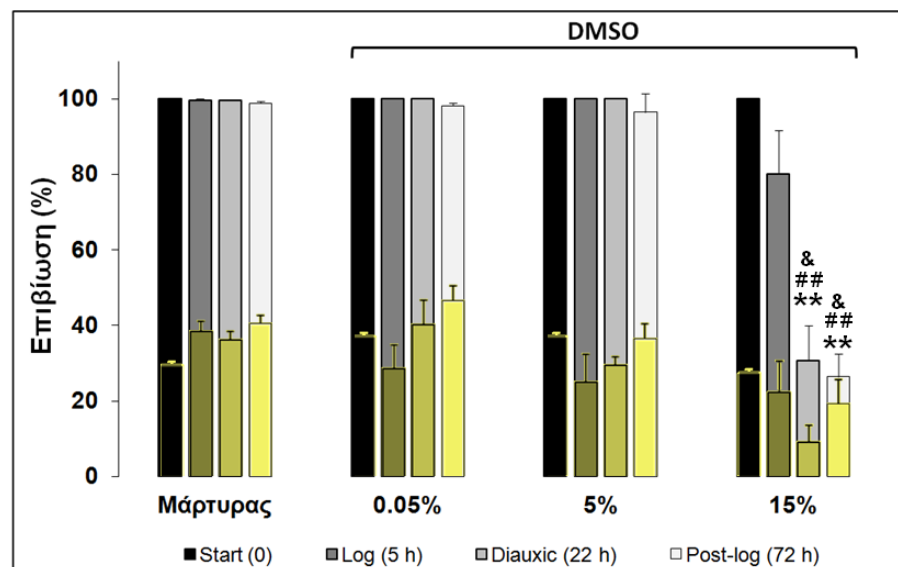
Γ2.4. Επίδραση του DMSO στην επιβίωση

Κατά τη χρόνια επώαση του σακχαρομύκητα παρουσία 0.05-15% DMSO για 72 h από την έναρξη της καλλιέργειας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0.001$, Kruskal–Wallis test) διαφορά στην αναλογία των ζωντανών κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών που έλαβαν διάφορες δόσεις DMSO (Εικόνα 35). Οι συγκεντρώσεις 0.05-5% δεν επηρέασαν σημαντικά τη βιωσιμότητα και τα κύτταρα παρέμειναν ζωντανά στο σύνολο τους σε όλη τη διάρκεια των 72h. Αντίθετα, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων και του χρόνου επώασης στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 10 (Spearman's $\rho = -0.688$, $P < 0.05$) και 15% (Spearman's $\rho = -0.888$, $P < 0.001$) DMSO. Επίσης, εντοπίστηκε σημαντική συσχέτιση (Spearman's $\rho = 0.318$, $P < 0.05$) μεταξύ της βιωσιμότητας των διαιρούμενων κυττάρων και της αναλογίας τους κατά την έκθεση σε 15% της ουσίας.



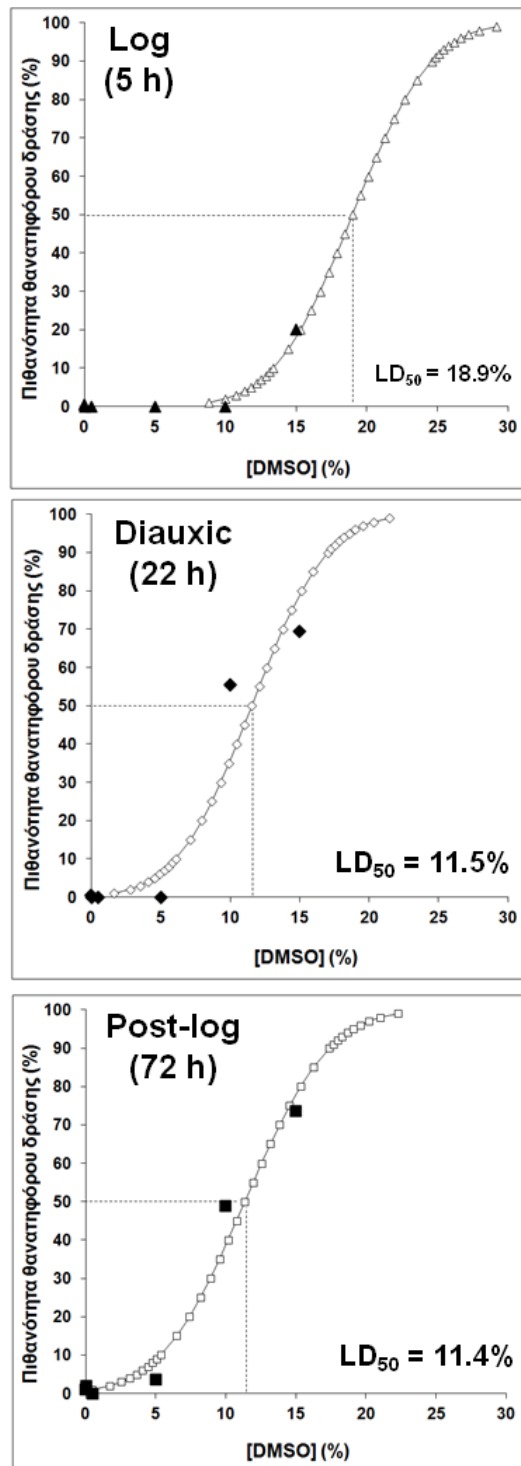
Εικόνα 35. Επιβίωση των κυττάρων του *S. cerevisiae* εκφρασμένη ως εκατοστιαία αναλογία (%) του αριθμού των ζωντανών κυττάρων επί του συνολικού αριθμού στις καλλιέργειες που επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C για 72 h παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs επώαση από 0 έως 6 h.

Όπως και στην περίπτωση των διαιρούμενων κυττάρων (Εικόνα 34), εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$, ANOVA) μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων παρουσία 15% DMSO στη διαυξική μετατόπιση και στη στάσιμη φάση συγκριτικά με τις καλλιέργειες του μάρτυρα όπου δεν χορηγήθηκε η ουσία (Εικόνα 36). Σε αυτές τις φάσεις της ανάπτυξης, το DMSO σε δόση 15% προκάλεσε επίσης στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$, ANOVA) μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με αυτήν που παρατηρήθηκε όχι μόνο κατά την έναρξη αλλά και στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης των ίδιων πληθυσμών (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Επιβίωση των κυττάρων του *S. cerevisiae* στην έναρξη της επώασης (0) και κατά τη λογαριθμική (Log) φάση, τη διαυξική (Diauxic) μετατόπιση και την στάσιμη (Post-log) φάση, απουσία (Μάρτυρας) ή παρουσία 0.05, 5 και 15% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$) της εκατοστιαίας αναλογίας (%) των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες. Οι ένθετες κολώνες απεικονίζουν την εκατοστιαία αναλογία των ζωντανών διαιρούμενων κυττάρων. $**P < 0.01$ vs έναρξη (0) στο μάρτυρα και στις δόσεις 0.05 και 5%. $##P < 0.01$ vs αντίστοιχη φάση στο μάρτυρα και στις δόσεις 0.05 και 5%. $&P < 0.05$ vs λογαριθμική φάση με 15% DMSO

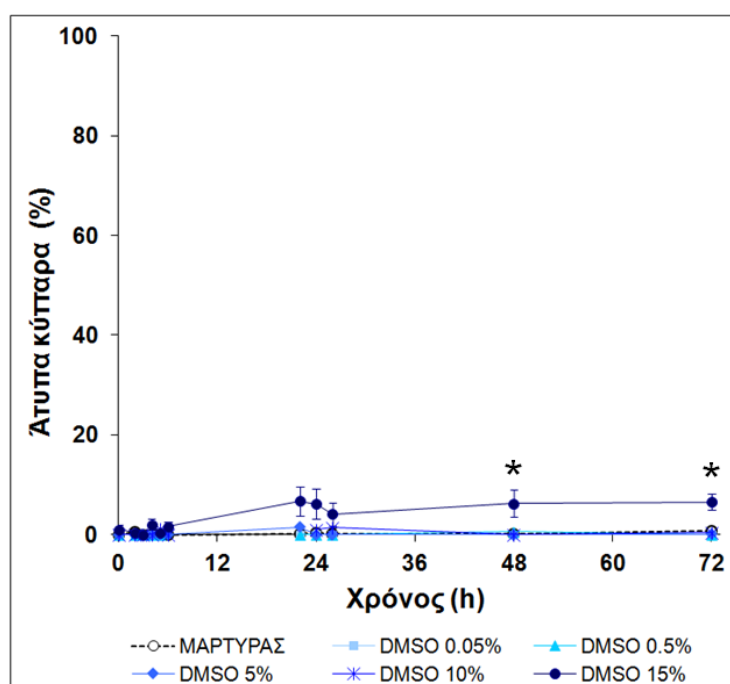
Στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση θανατηφόρος δόση (LD_{50}) με το μοντέλο αντίστροφης probit λογιστικής παλινδρόμησης του IBM[®] SPSS[®] (Chen et al., 2006). Οι καμπύλες πιθανότητας θανατηφόρου δράσης του DMSO ήταν σιγμοειδείς (Εικόνα 37). Τα πειραματικά δεδομένα ακολουθούσαν την ανάλυση που προέκυψε κατά τη διαυξική και την στάσιμη φάση της ανάπτυξης. Στη χρόνια έκθεση, η LD_{50} ήταν ~11.5%, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης από 8.7 έως 15.8 (Εικόνα 37), ενώ η LD_{99} ήταν ~22%. Συνεπώς, η ανασταλτική δράση του DMSO φαίνεται να έχει **στενό εύρος**, όπως προκύπτει από τον λόγο $ID_{50}/LD_{50} = 0.4$.



Εικόνα 37. Γραφική απεικόνιση λογιστικής παλινδρόμησης με το μοντέλο αντίστροφης κανονικής συνάρτησης (probit) της πιθανότητας επιτυχούς θανατηφόρας δράσης διαφόρων δόσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ($\triangle$, $\diamond$, $\square$) έναντι του *S. cerevisiae* και υπολογισμός της μέσης θανατηφόρου δόσης (LD_{50}) και της δόσης με 99% πιθανότητα να προκαλέσει το θάνατο του μύκητα (LD_{99}) στην λογαριθμική (Log), διαυξική (Diauxic) και στάσιμη (Post-log) φάση της ανάπτυξης. Τα σύμβολα $\blacktriangle$, $\blacklozenge$, $\blacksquare$ δείχνουν τα πειραματικά δεδομένα σε κάθε φάση.

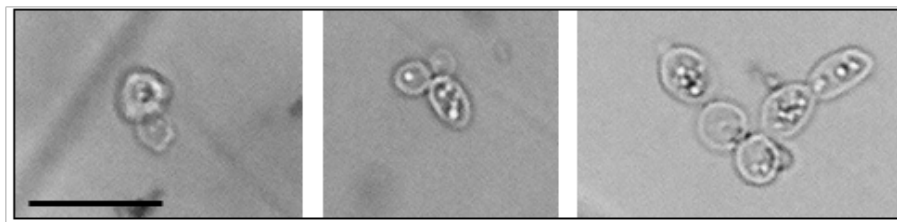
Γ2.5. Επίδραση του DMSO στα μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η εμφάνιση άτυπων μορφών κυττάρων μετά το πέρας της λογαριθμικής φάσης στις καλλιέργειες που επωάστηκαν με 15% DMSO (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Ποσοστό (%) άτυπων κυττάρων στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae* που επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C για 72 h παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-9$). * $P < 0.05$ vs αναλογία άτυπων κυττάρων απουσία 15% DMSO.

Τόσο στον μάρτυρα όσο και στις μικρότερες συγκεντρώσεις του DMSO η εμφάνιση άτυπων μορφών κατά τις 72 h της επώασης ήταν σποραδική και αμελητέα. Η μικροσκοπική εξέταση έδειξε ότι τα άτυπα κύτταρα εμφάνισαν έντονα κοκκώδες κυτταρόπλασμα και/ή αχνό περίβλημα με ακανόνιστο σχήμα όπως περιγράφονται στην § Γ1.4. (Εικόνα 39). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις καλλιέργειες του μάρτυρα τα κύτταρα αυτής της μορφολογίας εμφανίστηκαν μετά τις 10 ημέρες επώασης, ενώ στην περίπτωση του DMSO ήταν παρόντα πολύ νωρίτερα, από την έναρξη της στάσιμης φάσης.

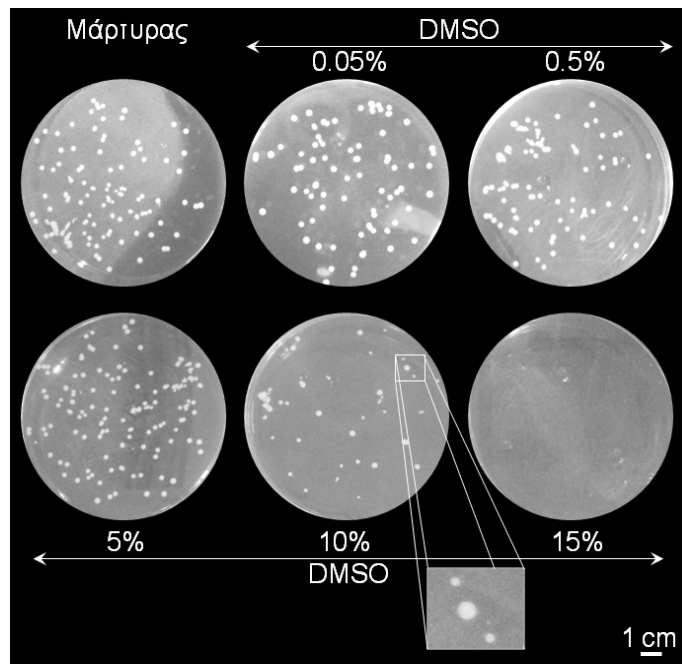


Εικόνα 39. Κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά γήρανσης που περιλαμβάνουν ακανόνιστο αχνό περίβλημα, πολλαπλά ευμεγέθη κενοτόπια και κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Μεγέθυνση $\times 400$, – 10 μm .

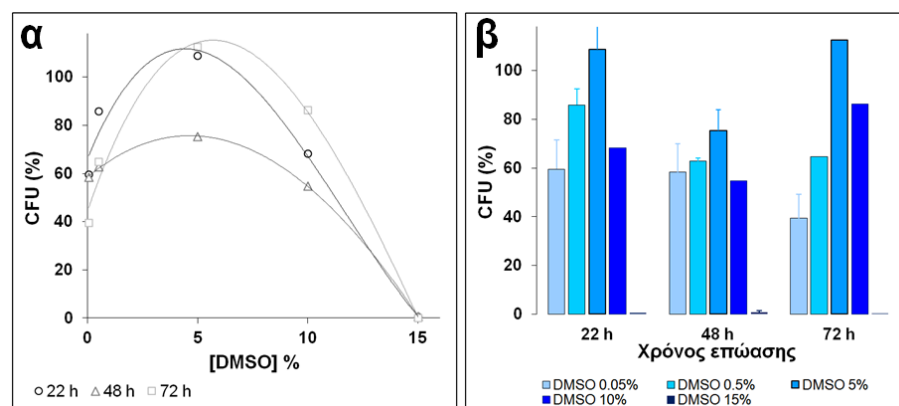
Γ2.6. Επίδραση του DMSO στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Η **μακροσκοπική εικόνα** των αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από επίστρωση σε στερεό υλικό δειγμάτων των καλλιιεργειών που είχαν εκτεθεί για 72 h σε 0.05-5% DMSO ήταν φυσιολογική, χωρίς εμφανείς αλλοιώσεις (Εικόνα 40). Στις ανακαλλιέργειες των δειγμάτων που είχαν εκτεθεί σε 15% DMSO δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη στον τάπητα. Σε αυτές όπου είχε χορηγηθεί 10% DMSO για 72 h διακρίνονταν αποικίες δύο διαφορετικών μεγεθών (Εικόνα 40), μακροσκοπικά παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες των μαρτύρων μετά από 10 ημέρες επώασης (Εικόνα 26).

Επιπλέον, η υπό μορφή ‘καμπάνας’ (bell-shaped) σχέση δόσης-αποτελέσματος με κορυφή στη δόση του DMSO που αντιστοιχεί στην ID_{50} και η μερική ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες (Εικόνα 41α), χωρίς να ακολουθείται το προφίλ των άτυπων (Εικόνα 38) ή των ζωντανών διαιρούμενων ή μη κυττάρων (Εικόνα 36) παραπέμπει στη συμμετοχή πολλαπλών παραγόντων στις φαινοτυπικές μεταβολές που παρατηρούνται στον σακχαρομύκητα υπό την επίδραση του DMSO. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τη μέγιστη αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών κατά τη χορήγηση 15% DMSO (Εικόνα 41β), παρά την παρουσία ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες (Εικόνα 36).



Εικόνα 40. Ενδεικτική μακροσκοπική εικόνα αποικιών που αναπτύχθηκαν 48 h μετά την επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό δειγμάτων των καλλιιεργειών του *S. cerevisiae* μετά από επώαση 72 h απουσία (μάρτυρας, αραιώση 1:110000) και παρουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) σε συγκέντρωση 0.05% (αραιώση 1:110000), 0.5% (αραιώση 1:90000), 5% (αραιώση 1:60000), 10% (αραιώση 1:30000) και 15% (αραιώση 1:1).



Εικόνα 41. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων του *S. cerevisiae* στην έναρξη της επώασης (0), στη διαυξική μετατόπιση (22 h) και σε διάφορα χρονικά σημεία της στάσιμης φάσης (48 h, 72 h) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα (α) Οι καμπύλες τάσης απεικονίζουν τη σχέση δόσης-αποτελέσματος. Τα σύμβολα ○, ◇, □ δείχνουν τα πειραματικά δεδομένα σε κάθε φάση. (β) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO ± SEM (n = 2-5).

Συμπέρασμα

Η χρόνια επίδραση της χορήγησης DMSO στον σακχαρομύκητα ήταν δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη. Σε μικρές συγκεντρώσεις, το DMSO δεν επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, προκάλεσε μεταβολές στον πολλαπλασιασμό, στη διαίρεση, στην επιβίωση καθώς και στη μορφολογία των κυττάρων. Τα δεδομένα υποστηρίζουν **ότι το DMSO ασκεί δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στην κυτταρική διαίρεση**, με $ID_{50} \sim 5\%$, κατά τα αρχικά στάδια της ταχείας ανάπτυξης του μύκητα και **δεν επιτρέπει την είσοδο του στη λογαριθμική φάση**. Η κυτταροστατική δράση του DMSO έχει **μικρό εύρος** και δεν προκαλεί άμεσα θάνατο. Στις συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, οι LD_{50} και LD_{99} ήταν $\sim 11\%$ και $\sim 22\%$, αντίστοιχα. Συγκεντρώσεις της τάξεως του 15% επάγουν άμεσα χαρακτηριστικές **μορφολογικές αλλοιώσεις** και σύνθετες μεταβολές στις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Συνεπώς, η συγκέντρωση 15% επελέγη για την διερεύνηση των μακροχρόνιων επιπτώσεων της δράσης του DMSO στους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα.

Ερώτημα 3: Ποιές είναι οι μακροχρόνιες επιπτώσεις της δράσης του DMSO στα κύτταρα του σακχαρομύκητα;

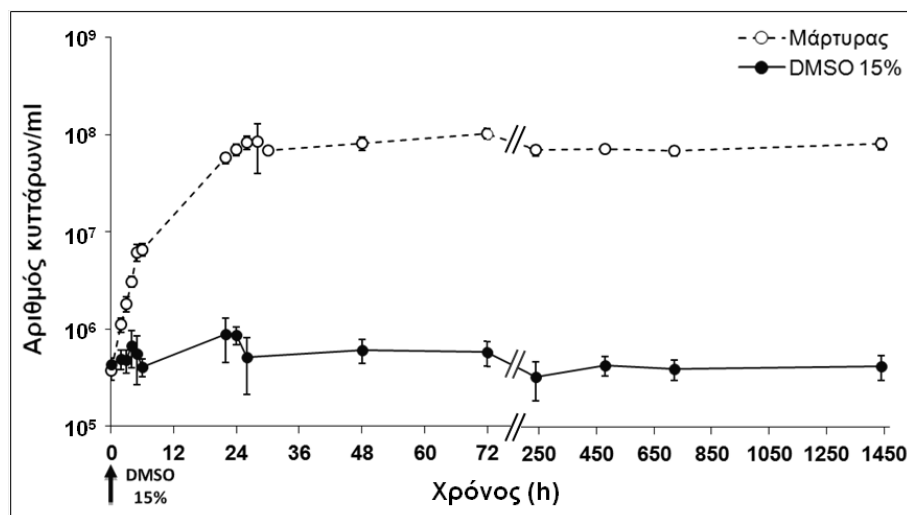
Γ3. ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ 15% DMSO ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η συγκέντρωση 15% του DMSO ήταν εκείνη –μεταξύ των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν– που προκάλεσε άμεσες και ανιχνεύσιμες μεταβολές στο προφίλ της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, επάγοντας αλλοιώσεις που παραπέμπουν σε χαρακτηριστικά γήρανσης. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση 15% χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθούν περαιτέρω οι μακροχρόνιες επιπτώσεις της δράσης του DMSO στην ανάπτυξη του σακχαρομύκητα, τόσο κατά τη χρόνια όσο και κατά την οξεία έκθεση στην ουσία.

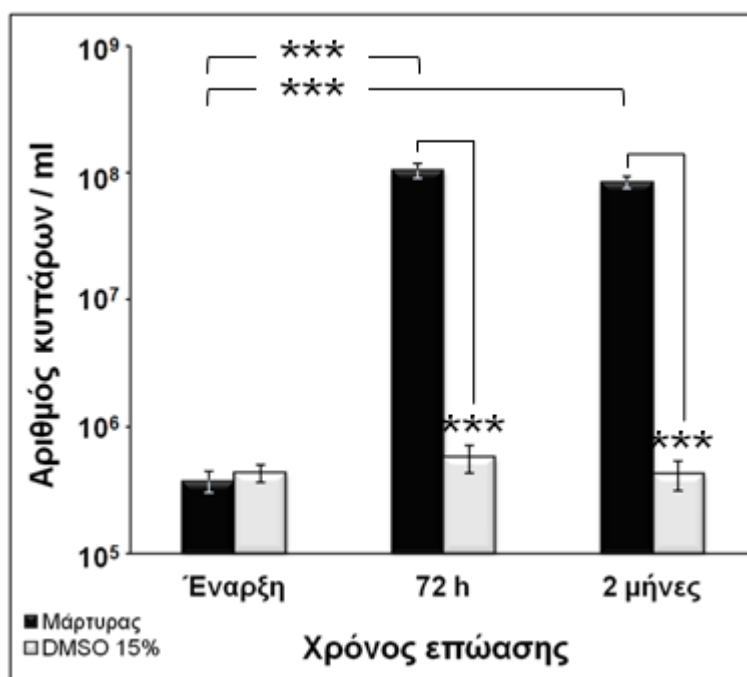
Γ3.1. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων

Στη διάρκεια των 2 μηνών, ο αριθμός των κυττάρων στις καλλιέργειες του σακχαρομύκητα που είχαν εκτεθεί σε 15% DMSO ήταν ανεξάρτητος του χρόνου επώασης (Spearman's $\rho = -0.024$, $P > 0.8$), σε αντίθεση με τις καλλιέργειες του μάρτυρα, όπου ο αριθμός των κυττάρων εμφάνισε σημαντική θετική συσχέτιση (Spearman's $\rho = 0.832$, $P < 0.001$) με τον χρόνο επώασης (Εικόνα 42).

Η ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια των 2 μηνών ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ αυτών των δύο πληθυσμών ($P < 0.001$, Mann-Whitney U test). Κατά την έναρξη της επώασης ο αριθμός των κυττάρων ήταν όμοιος σε όλα τα δείγματα, ενώ τόσο στις 72 h όσο και στους 2 μήνες, η ανάπτυξη των πληθυσμών που εκτέθηκαν σε 15% DMSO μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με τον μάρτυρα ($P < 0.001$, ANOVA, Εικόνα 43).



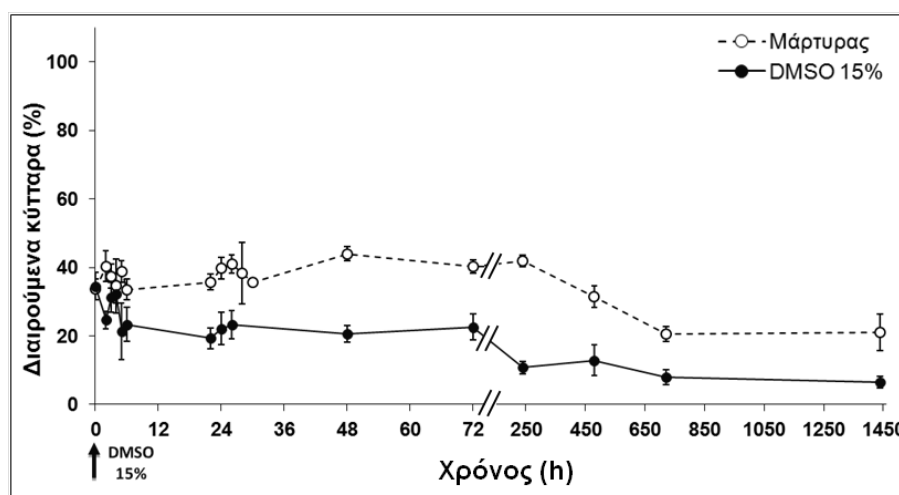
Εικόνα 42. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 μετά από χρόνια έκθεση σε 15% (v/v) DMSO και επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Παρουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) δεν παρατηρείται η λογαριθμική φάση της ανάπτυξης, η οποία είναι ευδιάκριτη στις καλλιέργειες του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας ($n = 3-9$).



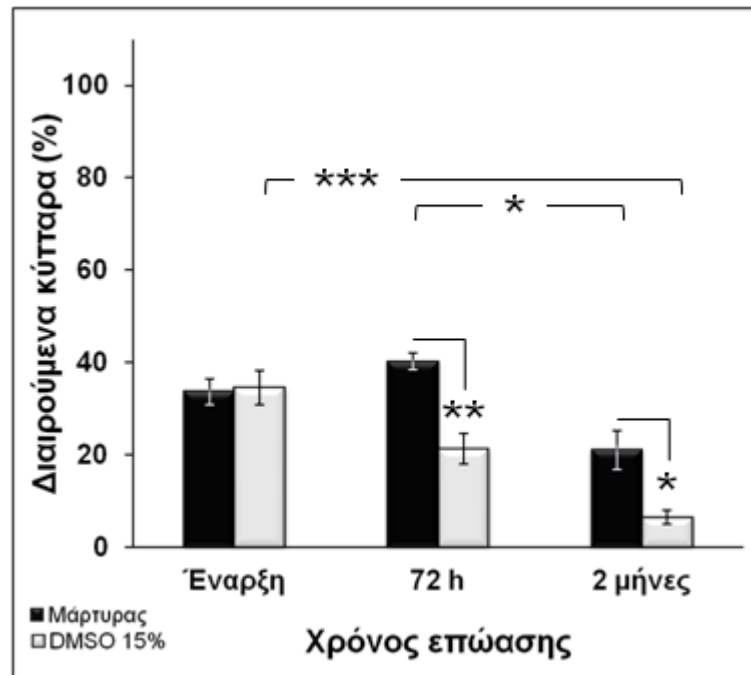
Εικόνα 43. Ανάπτυξη του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά την έναρξη και μετά από 72 h και 2 μήνες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27 °C παρουσία (μάρτυρας) και παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η ανάπτυξη προσδιορίστηκε με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$). *** $P < 0.001$, ANOVA.

Γ3.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα

Η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 44, ακολουθούσε κανονική κατανομή και ήταν ανεξάρτητη του αριθμού των κυττάρων στις αντίστοιχες καλλιέργειες (Pearson $r = -0.055$, $P > 0.05$). Παρουσία 15% DMSO, η πολλαπλασιαστική ικανότητα εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με το χρόνο επώασης (Pearson $r = -0.453$, $P < 0.001$) και σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών που είχαν εκτεθεί σε 15% DMSO και του μάρτυρα ($P < 0.001$, Mann-Whitney U test). Οι αντίστοιχες τιμές των καλλιέργειών του μάρτυρα (Εικόνα 44) ήταν αντιστρόφως ανάλογες του χρόνου επώασης (Pearson $r = -0.482$, $P < 0.001$) και ευθέως ανάλογες του αριθμού των κυττάρων (Pearson $r = 0.335$, $P < 0.001$). Ενώ κατά την έναρξη της επώασης η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων ήταν όμοια και στις δύο καλλιέργειες, μετά από τις 72 h έως και 2 μήνες επώασης, η χορήγηση 15% DMSO μείωσε σημαντικά την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων συγκριτικά με τον μάρτυρα ($P < 0.05$, ANOVA, Εικόνα 45).



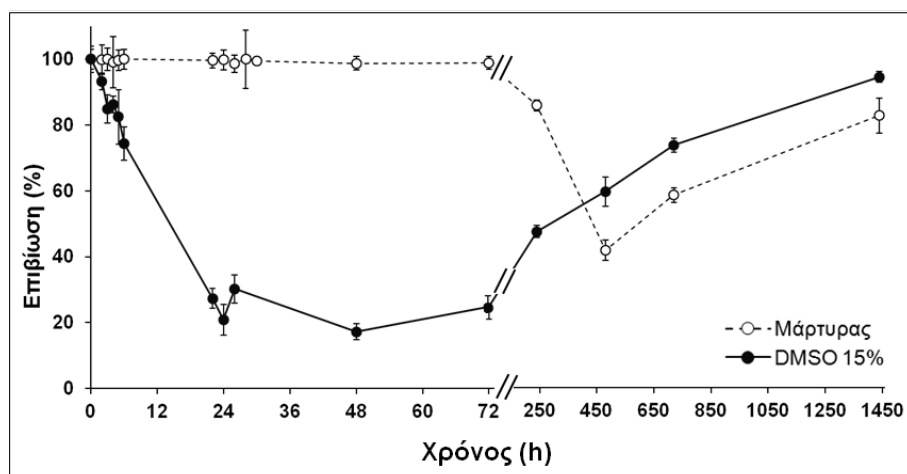
Εικόνα 44. Αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h) παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-9$).



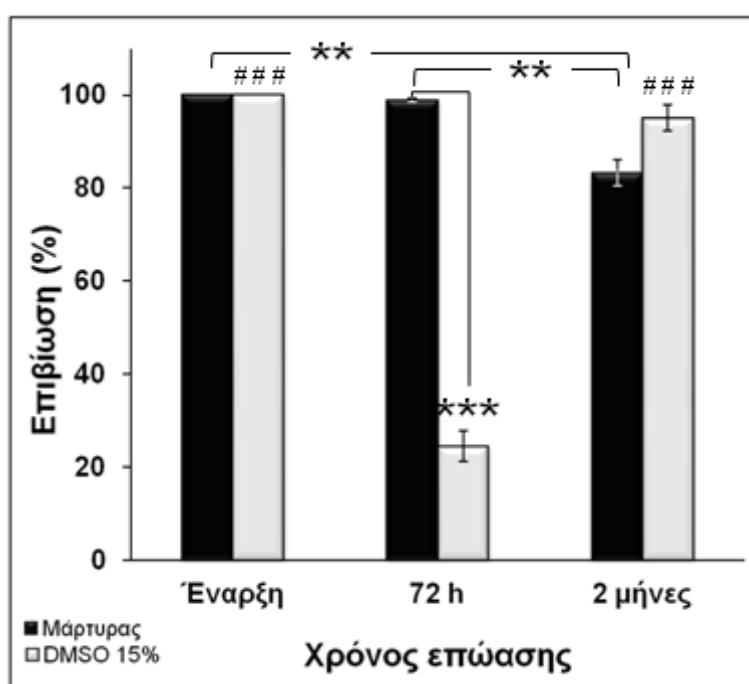
Εικόνα 45. Αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά την έναρξη και μετά από 72 h και 2 μήνες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C απουσία (μάρτυρας) και παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ANOVA.

Γ3.3. Επιβίωση

Μετά την αρχική ανασταλτική δράση του 15% DMSO τις πρώτες 72 h της επώασης παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη (Εικόνα 46), στατιστικά σημαντική (Εικόνα 47) αύξηση της επιβίωσης (Spearman's $\rho = 0.937$, $P < 0.001$), ανεξάρτητα από τον συνολικό αριθμό των κυττάρων (Spearman's $\rho = -0.136$, $P > 0.05$) και αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού των διαιρούμενων κυττάρων (Spearman's $\rho = -0.542$, $P < 0.01$) στις καλλιέργειες (Εικόνα 46). Σε αντίθεση, στους μάρτυρες που δεν εκτέθηκαν στο DMSO, η επιβίωση άρχισε να μειώνεται μετά τις 72 h (Spearman's $\rho = -0.607$, $P < 0.001$) και σχετιζόταν τόσο με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.350$, $P < 0.05$) όσο και με την πολλαπλασιαστική ικανότητα τους (Spearman's $\rho = 0.437$, $P < 0.01$, Εικόνα 46). Η κατανομή της επιβίωσης ήταν διαφορετική μεταξύ των μαρτύρων και των πληθυσμών που είχαν εκτεθεί σε 15% DMSO ($P < 0.001$, Mann-Whitney U test).



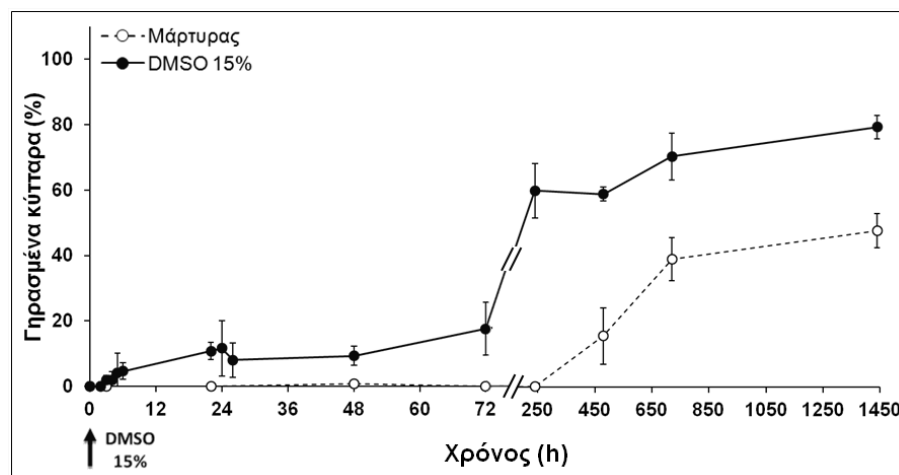
Εικόνα 46. Επιβίωση των κυττάρων του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 σε διάφορα χρονικά σημεία της επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η επιβίωση εκφράστηκε ως αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 5-9$).



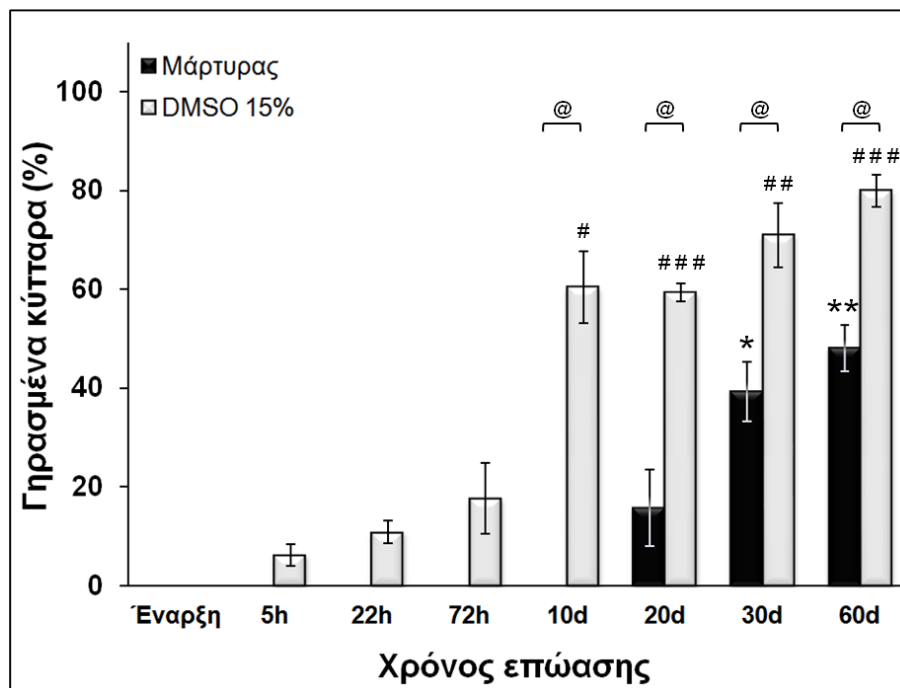
Εικόνα 47. Επιβίωση του *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά την έναρξη και μετά από 72 h και 2 μήνες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C απουσία (μάρτυρας) και παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ως επιβίωση ορίστηκε η αναλογία των ζωντανών κυττάρων (%) στα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ και #### $P < 0.001$ vs επιβίωση παρουσία DMSO στις 72 h (ANOVA).

Γ3.4. Φαινότυπος γήρανσης

Όπως στις καλλιέργειες του μάρτυρα, έτσι και σε αυτές που επώαστηκαν παρουσία 15% DMSO, εμφανίστηκαν κύτταρα με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γήρανσης (Εικόνα 39). Η αναλογία των 'γηρασμένων' κυττάρων αυξήθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 48) τόσο στον μάρτυρα (Spearman's $\rho = 0.818$, $P < 0.001$) όσο και τους πληθυσμούς υπό χορήγηση 15% DMSO (Spearman's $\rho = 0.858$, $P < 0.001$). Ωστόσο, η κατανομή τους μεταξύ των μαρτύρων και των πληθυσμών που είχαν εκτεθεί στο DMSO ήταν διαφορετική στα διάφορα χρονικά σημεία της επώασης ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test). Τα 'γηρασμένα' κύτταρα εμφανίστηκαν νωρίτερα παρουσία DMSO (Εικόνα 48) και η αναλογία τους ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στον μάρτυρα στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης (Εικόνα 49).



Εικόνα 48. Αναλογία (%) των 'γηρασμένων' κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae* ATCC 2366 σε διάφορα χρονικά σημεία της επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-6$).

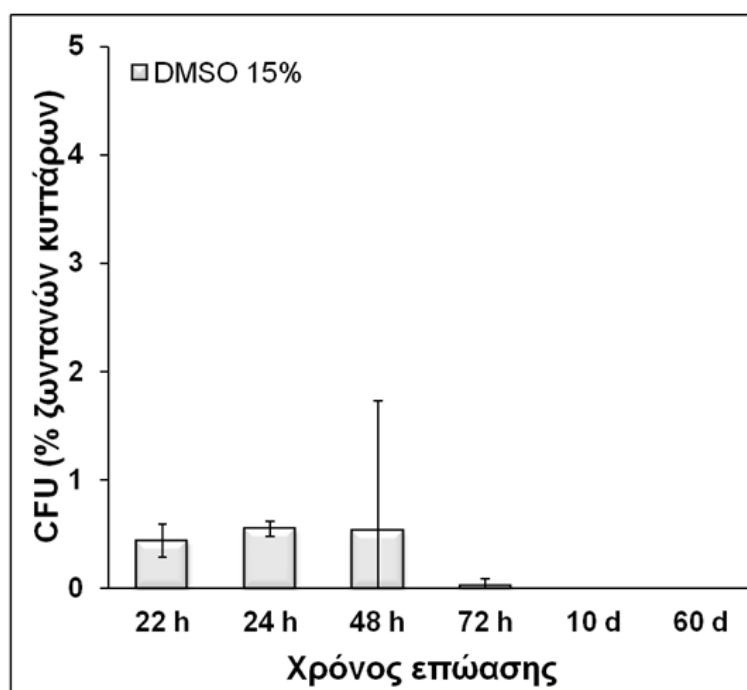


Εικόνα 49. Αναλογία (%) των ‘γηρασμένων’ επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae* παρουσία και απουσία (μάρτυρας) 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) σε διάφορα χρονικά σημεία δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs έναρξη στον μάρτυρα, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs έναρξη παρουσία DMSO, @ $P < 0.05$, ANOVA.

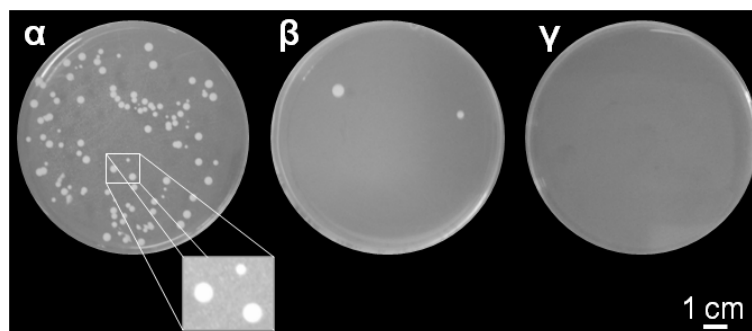
Το ποσοστό των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων εμφάνισε επίσης θετική συσχέτιση με το χρόνο καθόλη τη διάρκεια της επώασης τόσο στον μάρτυρα (Spearman’s $\rho = 0.613$, $P < 0.01$) όσο και κατά τη χορήγηση 15% DMSO (Spearman’s $\rho = 0.766$, $P < 0.001$). Αντίθετα, το ποσοστό των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των ‘γηρασμένων’ κυττάρων ήταν ανεξάρτητο του χρόνου επώασης παρουσία DMSO (Spearman’s $\rho = -0.145$, $P > 0.05$), όπως και στις καλλιέργειες του μάρτυρα (Spearman’s $\rho = 0.392$, $P > 0.05$). Σε κάθε περίπτωση, τα ζωντανά ‘γηρασμένα’ κύτταρα αποτελούσαν το 65-100% του συνόλου των ‘γηρασμένων’ κυττάρων. Συνεπώς, τα ‘γηρασμένα’ κύτταρα ήταν στην πλειονότητά τους ζωντανά.

Γ3.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 15% DMSO δημιούργησαν ελάχιστες αποικίες στην αρχή της στάσιμης φάσης και στη συνέχεια αδυνατούσαν να σχηματίζουν αποικίες (Εικόνα 50). Οι λίγες αυτές αποικίες ήταν δύο διαφορετικών μεγεθών (Εικόνα 51) και οι θυγατρικές τους διατηρούσαν τα αρχικά μεγέθη των μητρικών αποικιών έπειτα από 12 γενεές. Η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες δεν ανακτήθηκε, παρά την αύξηση της επιβίωσης κατά την όψιμη στάσιμη φάση (Εικόνα 46).



Εικόνα 50. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών κατά τη στάσιμη φάση της ανάπτυξης του *S. cerevisiae* που είχε εκτεθεί σε 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα και παρουσιάζεται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-7$).



Εικόνα 51. Μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που σχηματίστηκαν μετά από επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό δειγμάτων των καλλιιεργειών του *S. cerevisiae* που ελήφθησαν στις (α) 24 h, (β) 48 h, (γ) 72 h επώασης παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η αραίωση σε όλα τα χρονικά σημεία ήταν 1:1. Μετά τις 72 h δεν αναπτύχθηκαν αποικίες στα τρυβλία.

Συμπέρασμα

Στη διάρκεια των 2 μηνών που μελετήθηκε, η έκθεση σε 15% DMSO ανέστειλε την ανάπτυξη και την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του σακχαρομύκητα, ενώ προκάλεσε **διφασική χρονοεξαρτώμενη επίδραση στην κυτταρική επιβίωση**. Επιπρόσθετα, **επιτάχυνε την εμφάνιση των ‘γήρασμένων’ κυττάρων** και αύξησε το ποσοστό τους σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ ελαχιστοποίησε την ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες.

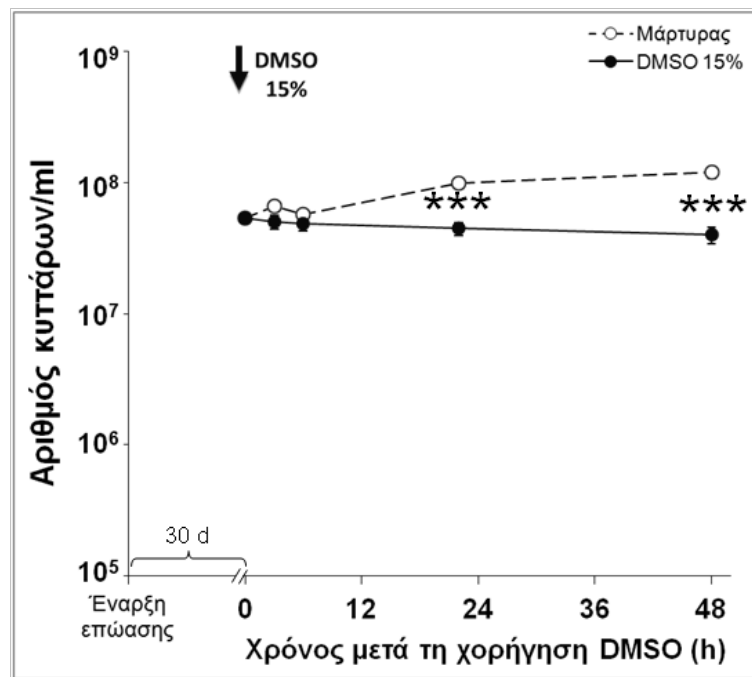
Ερώτημα 4: Παρουσιάζει η δράση του DMSO εκλεκτικότητα ως προς τη φάση ανάπτυξης των κυτταρικών πληθυσμών; Διαφέρει η απάντηση των κυττάρων του σακχαρομύκητα όταν αυτά εκτίθενται οξέως σε DMSO κατά την όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης; Εντοπίζονται ομοιότητες ή διαφορές στις παραμέτρους αξιολόγησης μεταξύ των πληθυσμών που έλαβαν 15% DMSO στην έν φξη κ α στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα;

Γ4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ 15% DMSO ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΨΙΜΗ ΣΤΑΣΙΜΗ ΦΑΣΗ

Για την εκτίμηση της εκλεκτικότητας της δράσης του DMSO ως προς τη φάση ανάπτυξης μελετήθηκε η επίδραση της οξείας έκθεσης σε 15% DMSO στα χαρακτηριστικά των κυττάρων του σακχαρομύκητα όταν οι καλλιέργειες βρίσκονταν ήδη σε αδρανή κατάσταση και υπό στρεσογόνες συνθήκες. Σύμφωνα με τα δεδομένα που περιγράφονται στην § Γ3, η χορήγηση 15% DMSO στις καλλιέργειες των μαρτύρων που είχαν επωαστεί για 30 ημέρες και η μελέτη των παραμέτρων αξιολόγησης επί 48 h μετά τη χορήγηση κρίθηκαν ως κατάλληλες συνθήκες για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα.

Γ4.1. Πολλαπλασιασμός του σακχαρομύκητα

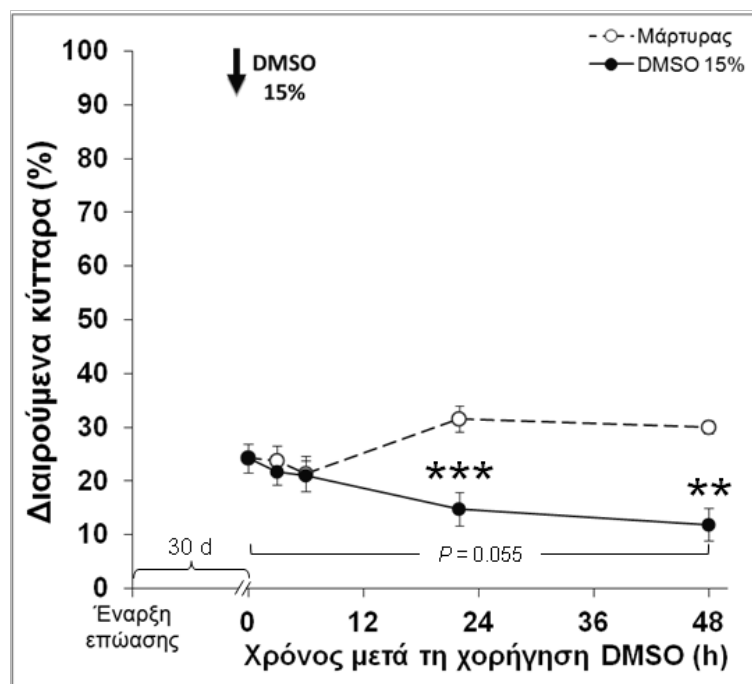
Στη διάρκεια των 48 h μετά τη χορήγηση DMSO, η κατανομή του αριθμού των κυττάρων διέφερε σημαντικά (Εικόνα 52) μεταξύ των καλλιεργειών του μάρτυρα και αυτών που εκτέθηκαν στο DMSO (Mann-Whitney test, $P < 0.001$). Κατά τη χορήγηση του DMSO ο αριθμός των κυττάρων ήταν όμοιος στους δύο πληθυσμούς, ενώ 24-48 h μετά τη χορήγηση μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.001$, Student's t-test) συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 52).



Εικόνα 52. Ανάπτυξη του *S. cerevisiae* που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), το οποίο χορηγήθηκε στις 30 ημέρες (30 d) επώασης (βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας ($n = 6-9$). *** $P < 0.001$ vs αντίστοιχα χρονικά σημεία στον μάρτυρα.

Γ4.2. Πολλαπλασιαστική ικανότητα

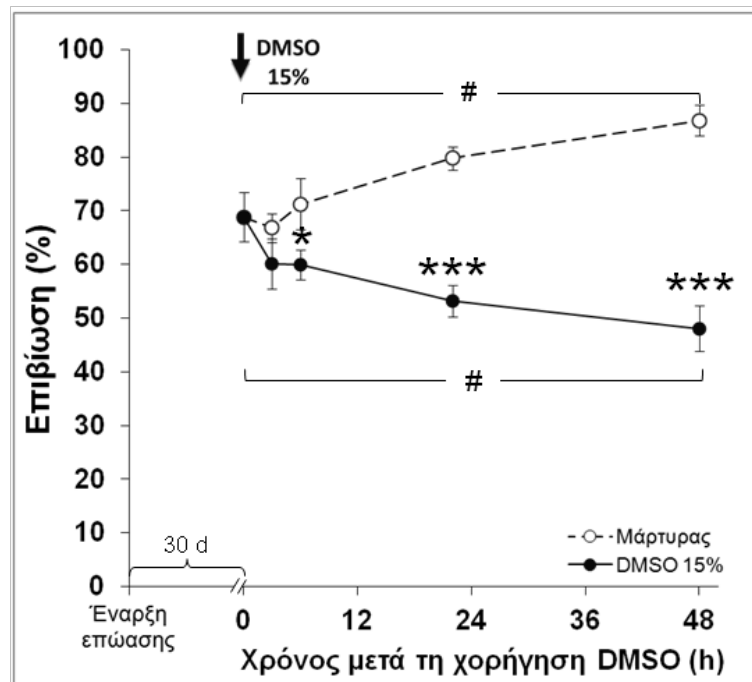
Στη διάρκεια των 48 h μετά τη χορήγηση DMSO, η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τον χρόνο (Spearman's $\rho = -0.486$, $P < 0.05$) και ήταν ανεξάρτητη του συνολικού αριθμού των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.163$, $P > 0.05$), σε αντίθεση με τις καλλιέργειες του μάρτυρα, στις οποίες ήταν ευθέως ανάλογη του χρόνου (Spearman's $\rho = 0.320$, $P < 0.05$) και του συνολικού αριθμού των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.471$, $P < 0.05$). Η κατανομή των διαιρούμενων κυττάρων διέφερε μεταξύ των δύο πληθυσμών (Mann-Whitney U test, $P < 0.01$) και η αναλογία τους μειώθηκε σημαντικά 24-48 h μετά την έκθεση των καλλιεργειών στο DMSO ($P < 0.01$, Student's t-test) συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 53). Υπό την επίδραση του DMSO, η πολλαπλασιαστική ικανότητα του μύκητα παρουσίασε οριακή μείωση 48 h μετά τη χορήγηση του DMSO ($P = 0.055$, ANOVA).



Εικόνα 53. Αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων του *S. cerevisiae* που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), το οποίο χορηγήθηκε στις καλλιέργειες μετά από 30 ημέρες (30 d) επώασης (βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO ± SEM (n = 6-9). **P < 0.01, ***P < 0.001 vs αντίστοιχα χρονικά σημεία στον μάρτυρα.

Γ4.3. Επιβίωση του σακχαρομύκητα

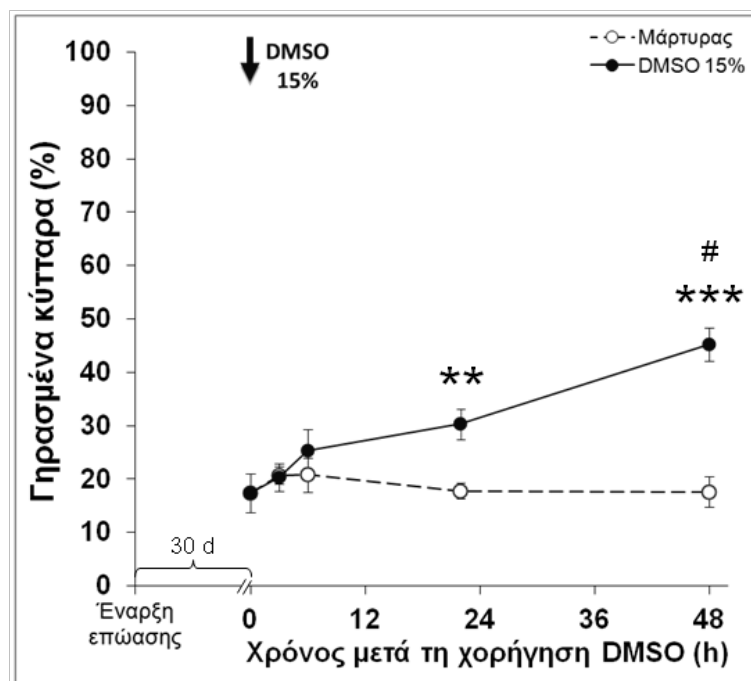
Η επιβίωση του σακχαρομύκητα παρουσία DMSO εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με το χρόνο (Spearman's $\rho = -0.503$, $P < 0.01$) και θετική με τον αριθμό των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.538$, $P < 0.001$), σε αντίθεση με τον μάρτυρα, όπου η επιβίωση ήταν χρονοεξαρτώμενη (Spearman's $\rho = 0.540$, $P < 0.001$) και ανάλογη του αριθμού των κυττάρων (Spearman's $\rho = 0.668$, $P < 0.001$) στη διάρκεια των 48 h μετά τη χορήγηση DMSO (Εικόνα 54). Η αναλογία των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά από τις 6 έως και τις 48 h μετά την έκθεση των καλλιεργειών στο DMSO ($P < 0.05$, Student's t-test) συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 54). Επίσης, αντίθετα από τις καλλιέργειες του μάρτυρα, η επιβίωση μειώθηκε σημαντικά 48 h μετά τη χορήγηση του DMSO ($P < 0.05$, ANOVA).



Εικόνα 54. Επιβίωση του *S. cerevisiae* που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), το οποίο χορηγήθηκε στις καλλιέργειες μετά από 30 ημέρες (30 d) επώασης (βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$) της αναλογίας (%) των ζωντανών κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων στα δείγματα. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs αντίστοιχα χρονικά σημεία στον μάρτυρα, # $P < 0.5$.

Γ4.4. Φαινότυπος γήρανσης

Κατά την έναρξη της μελέτης της οξείας χορήγησης DMSO στην όψιμη στάσιμη φάση, τα 'γηρασμένα' κύτταρα ήταν 17.4 ± 3.6 % του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες. Στα δείγματα του μάρτυρα, η αναλογία αυτή παρέμεινε σταθερή (Spearman's $\rho = -0.007$, $P > 0.9$), ενώ στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν στο DMSO αυξήθηκε χρονοεξαρτώμενα (Spearman's $\rho = 0.649$, $P < 0.001$) στις επόμενες 48 h και η κατανομή της ήταν διαφορετική (Mann-Whitney test $P < 0.01$) στους δύο πληθυσμούς (Εικόνα 55).



Εικόνα 55. Αναλογία (%) των 'γηρασμένων' κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων του *S. cerevisiae* που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), το οποίο χορηγήθηκε στις καλλιέργειες μετά από 30 ημέρες (30 d) επώασης (βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs αντίστοιχα χρονικά σημεία στον μάρτυρα, $\#P < 0.5$ vs όλα τα προηγούμενα χρονικά σημεία της αντίστοιχης καλλιέργειας.

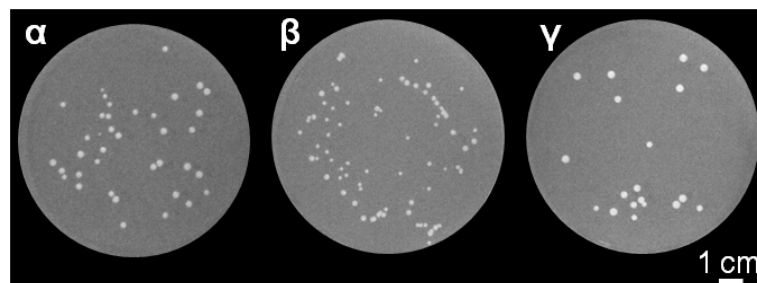
Η αναλογία των 'γηρασμένων' κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά 24 & 48 h μετά την έκθεση των καλλιεργειών στο DMSO ($P < 0.01$, Student's t-test) συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικόνα 55). Επίσης, αντίθετα από τις καλλιέργειες του μάρτυρα, το ποσοστό των 'γηρασμένων' κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά 48 h μετά τη χορήγηση του DMSO συγκριτικά με όλα τα χρονικά σημεία της επώασης παρουσία DMSO ($P < 0.05$, ANOVA).

Τα 'γηρασμένα' κύτταρα ήταν στην πλειονότητα τους ζωντανά. Η αναλογία των ζωντανών 'γηρασμένων' κυττάρων επί του συνολικού αριθμού των 'γηρασμένων' κυττάρων στα διάφορα χρονικά σημεία επώασης των μαρτύρων ήταν ~80-84% και στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν στο DMSO ήταν ~68-79%, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην κατανομή των τιμών μεταξύ των δύο πληθυσμών κατά τις επόμενες 48 h της επώασης (Mann-Whitney test, $P > 0.05$).

Το ποσοστό των ζωντανών 'ξηρασμένων' κυττάρων επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων αυξήθηκε χρονοεξαρτώμενα (Spearman's $\rho = 0.621$, $P < 0.001$) στις καλλιέργειες που επωάστηκαν παρουσία DMSO και έφτασε από $24.2 \pm 5.3\%$ σε $70.4 \pm 5.0\%$ ($P < 0.05$, ANOVA, $n = 6-9$) 48 h μετά τη χορήγηση της ουσίας, ενώ στις καλλιέργειες του μάρτυρα ήταν κατά μέσο όρο $22.3 \pm 1.7\%$ ($n = 6-9$) και ανεξάρτητο του χρόνου (Spearman's $\rho = -0.175$, $P > 0.05$).

Γ4.5. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

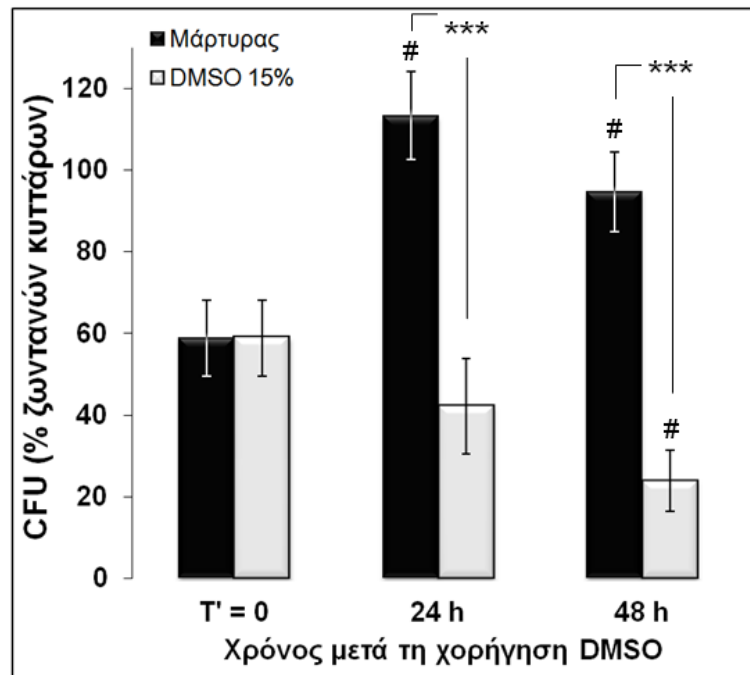
Η μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που αναπτύχθηκαν έπειτα από την επίστρωση των καλλιεργειών σε στερεό θρεπτικό υλικό ήταν φυσιολογική, χωρίς μορφολογικές αλλοιώσεις (Εικόνα 56). Η εμφάνιση δύο διαφορετικών μεγεθών αποικιών ήταν σποραδική σε αντίθεση με τη χρόνια έκθεση σε 15% DMSO, όπου τα δύο μεγέθη αποικιών εμφανίζονταν σε κάθε δείγμα (Εικόνα 51).



Εικόνα 56. Μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που σχηματίστηκαν μετά από επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό δειγμάτων των καλλιεργειών του *S. cerevisiae* που είχαν εκτεθεί σε 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) στις 30 ημέρες επώασης. Τα δείγματα ελήφθησαν (α) κατά τη χορήγηση του DMSO ($T' = 0$) κ α μετά από (β) 22 h (αραίωση 1:40000) και (γ) 48 h (αραίωση 1:20000).

Οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 15% DMSO εμφάνισαν σημαντικά ($P < 0.001$, Student's t-test) μειωμένη ικανότητα σχηματισμού αποικιών 24 και 48 h μετά τη χορήγηση του DMSO συγκριτικά με τις καλλιέργειες που δεν είχαν εκτεθεί στον παράγοντα (Εικόνα 57). Στις 48 h μετά την προσθήκη DMSO ο αριθμός των CFU

μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA), σε αντίθεση με τα δείγματα του μάρτυρα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των CFUs 24 και 48 h μετά το διαχωρισμό τους ($P < 0.05$, ANOVA), πιθανώς εξαιτίας του στρες που υπέστησαν λόγω του διαχωρισμού και των πειραματικών χειρισμών.



Εικόνα 57. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων του *S. cerevisiae* σε καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) μετά από 30 ημέρες επώασης. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα και παρουσιάζεται ως $MO \pm SEM$ ($n = 6-9$). *** $P < 0.001$ vs αντίστοιχα χρονικά σημεία στον μάρτυρα, [#] $P < 0.5$ vs $T' = 0$ της αντίστοιχης καλλιέργειας.

Συμπέρασμα

Η χορήγηση 15% DMSO σε καλλιέργειες κυττάρων που βρίσκονται σε κατάσταση αδράνειας (quiescence) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των κυττάρων, της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας, της επιβίωσης και της ικανότητας σχηματισμού αποικιών όταν μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υλικό. Επιπλέον, αύξησε την αναλογία των 'γηρασμένων' κυττάρων στις καλλιέργειες. Οι επιδράσεις του DMSO στα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Επίδραση του 15% DMSO στα χαρακτηριστικά των ασύγχρονων πληθυσμών του *S. cerevisiae* ATCC 2366 στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης

Χαρακτηριστικό πληθυσμού	Χρόνια επίδραση		Οξεία επίδραση	
	Λογαριθμική φάση	Στάσιμη φάση		Όψιμη στάσιμη φάση
		Πρώιμη	Όψιμη	
Κυτταρική ανάπτυξη	↓	↔	↔	↓
Επιβίωση	↔	↓	↑	↓
Πολλαπλασιαστική ικανότητα	↓	↔	↔	↓
Φαινότυπος γήρανσης	↔	↑	↑	↑
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	–	↓	↓	↓
Επιγενετικές φαινοτυπικές μεταβολές	–	↑*	–	↔

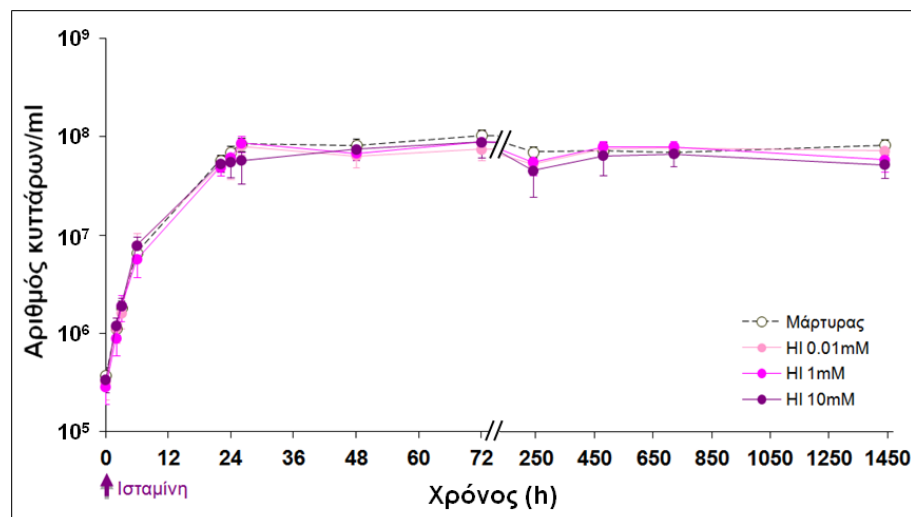
↔ αμετάβλητο χαρακτηριστικό, ↓ αναστολή, ↑ ενίσχυση, – δεν προσδιορίζεται, * παρατήρηση κατά τη διαυξική μετατόπιση

Ερώτημα 5: Ποια είναι τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του σακχαρομύκητα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης παρουσία ισταμίνης; Ποιές παράμετροι επηρεάζονται από την έκθεση των κυττάρων στην ισταμίνη και πώς;

Γ5. ΧΡΟΝΙΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ *S. CEREVISIAE*

Γ5.1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Έπειτα από χορήγηση ισταμίνης κατά την έναρξη της επώασης σε δόσεις μικρότερες της MIC ($MIC > 20 \text{ mM}$) και καλλιέργεια του σακχαρομύκητα στους 27°C για 2 μήνες, διαπιστώθηκε ότι κατά την έκθεση στην ισταμίνη, τα κύτταρα ακολούθησαν το ίδιο προφίλ με αυτά του μάρτυρα (Εικόνα 16), με εμφανείς τις φάσεις ανάπτυξης (Εικόνα 58). Η κατανομή του αριθμού των κυττάρων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που επωάστηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ισταμίνης ούτε με το μάρτυρα ($P > 0.8$, Kruskal – Wallis).



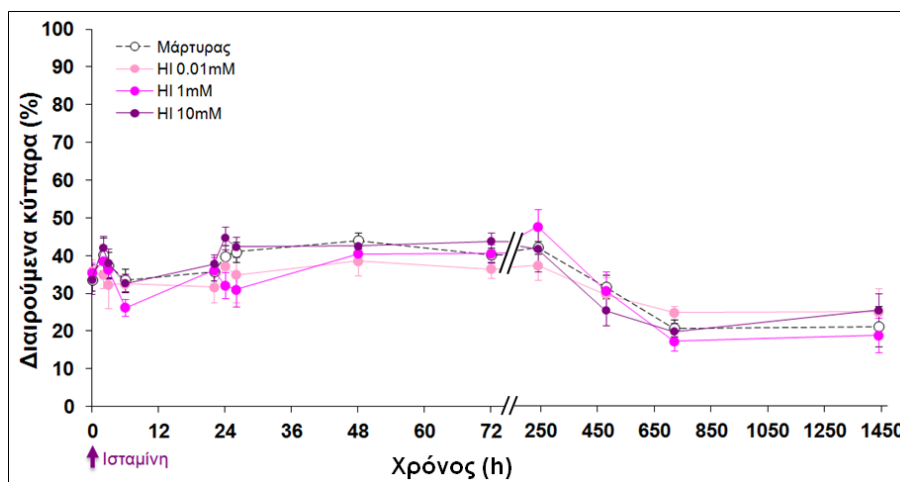
Εικόνα 58. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366, υπό χορήγηση ισταμίνης (HI) στην έναρξη της ανάπτυξης (βέλος) και επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27°C επί 2 μήνες (1440 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm S.E.M$ του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας ($n = 3-9$).

Γ5.2. Χρόνος διπλασιασμού

Ο χρόνος διπλασιασμού των πληθυσμών του σακχαρομύκητα που εκτέθηκαν σε 0.01, 1 και 10 mM ισταμίνης, όπως υπολογίστηκαν κατά την λογαριθμική φάση της ανάπτυξης, ήταν 64 ± 19 , 94 ± 30 και 84 ± 10 min αντίστοιχα. Οι χρόνοι αυτοί δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τον χρόνο διπλασιασμού του μάρτυρα ($P > 0.5$, ANOVA).

Γ5.3. Πολλαπλασιαστική ικανότητα

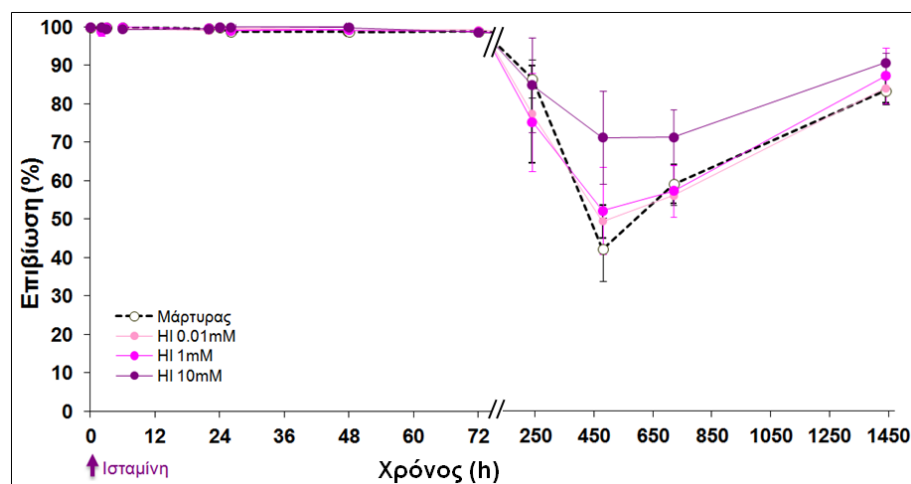
Η κατανομή των τιμών των διαιρούμενων κυττάρων μεταξύ των καλλιεργειών που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ισταμίνης και του μάρτυρα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test) κατά τη διάρκεια των δύο μηνών της επώασης (Εικόνα 59).



Εικόνα 59. Ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 κατά την επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440h) απουσία (μάρτυρας) και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Η ικανότητα πολλαπλασιασμού εκφράστηκε ως εκατοστιαία αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων (κύτταρα με εκβλαστήσεις) επί του συνόλου των κυττάρων σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της επώασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$).

Γ5.4. Επιβίωση

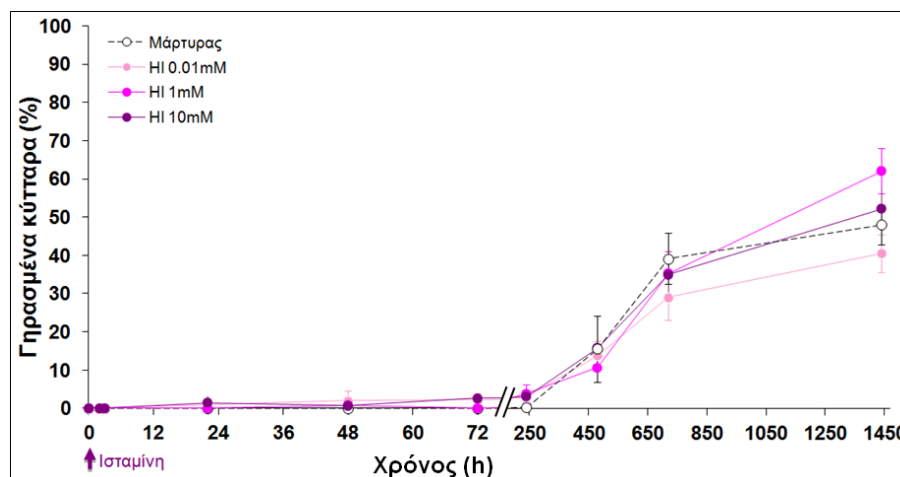
Κατά τη διάρκεια των δύο μηνών της επώασης, η επιβίωση του σακχαρομύκητα απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ισταμίνης παρουσίασε παρόμοια κατανομή ($P > 0.7$, Kruskal-Wallis test). Ενδιαφέρον παρουσίασε η τάση αναστολής της μείωσης της επιβίωσης μετά τις 10 ημέρες επώασης κατά την έκθεση σε 10 mM ισταμίνης, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$, ANOVA) συγκριτικά με την επιβίωση του μάρτυρα και την παρουσία μικρότερων συγκεντρώσεων ισταμίνης (Εικόνα 60).



Εικόνα 60. Επιβίωση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 μετά από χορήγηση ισταμίνης (HI) στην αρχή της ανάπτυξης ($T = 0$) και επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Η επιβίωση εκφράστηκε ως εκατοστιαία αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων ως προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$).

Γ5.5. Φαινότυπος γήρανσης

Όπως και στις καλλιέργειες του μάρτυρα, τα κύτταρα με το 'γηρασμένο' φαινότυπο εμφανίστηκαν μετά τις 10 ημέρες επώασης παρουσία ισταμίνης και η κατανομή των αναλογιών τους επί του συνόλου των κυττάρων δεν ήταν σημαντικά διαφορετική ($P > 0.9$, Kruskal-Wallis test) από αυτήν του μάρτυρα (Εικόνα 61).



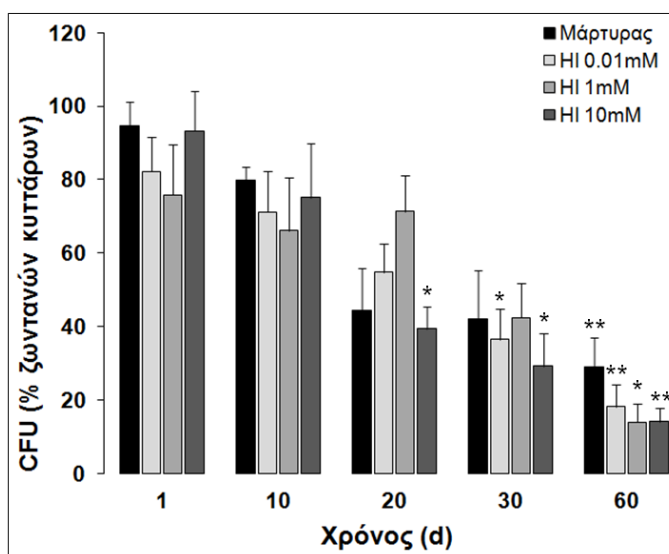
Εικόνα 61. Αναλογία των ‘γηρασμένων’ κυττάρων στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h) απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI), η οποία χορηγήθηκε κατά την έναρξη της ανάπτυξης ($T = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$).

Η αναλογία των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στους πληθυσμούς που είχαν εκτεθεί χρονίως στις διάφορες συγκεντρώσεις της ισταμίνης παρουσίασε επίσης παρόμοια κατανομή με το μάρτυρα ($P > 0.9$, Kruskal-Wallis test). Το ίδιο ισχύει και για την κατανομή των ζωντανών ‘γηρασμένων’ κυττάρων επί του συνόλου των ‘γηρασμένων’ κυττάρων ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test). Η αναλογία των τελευταίων κυμάνθηκε ~70-95%. Επομένως, τα ‘γηρασμένα’ κύτταρα ήταν ζωντανά στην πλειονότητά τους όπως και στους πληθυσμούς του μάρτυρα (Εικόνα 25).

Γ5.6. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) μετά από 2 μήνες επώασης τόσο στον μάρτυρα όσο και σε όλους τους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα που είχαν εκτεθεί σε διάφορες συγκεντρώσεις ισταμίνης (Εικόνα 62). Η μείωση αυτή δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη σε κανένα χρονικό σημείο της δειγματοληψίας ($P > 0.01$, ANOVA). Σημειώνεται ότι ως σημείο αναφοράς θεωρήθηκαν οι

24 h της επώσης, όπου τα κύτταρα διατηρούσαν στο σύνολό τους την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες σε στερεό θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 62. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 σε διάφορα χρονικά σημεία της δέμηνης επώσης σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 0.01 mM, 1 mM και 10 mM ισταμίνης (HI), η οποία χορηγήθηκε στην αρχή της ανάπτυξης ($T = 0$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$) της εκατοστιαίας αναλογίας (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα αντίστοιχα δείγματα. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs αντίστοιχη αναλογία CFU στις 22 h (1d) επώσης, ANOVA.

Συμπέρασμα

Η χορήγηση ισταμίνης στην έναρξη της επώσης δεν επηρέασε σημαντικά τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα. Αν και παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των ζωντανών κυττάρων με παράλληλη μείωση των CFUs στην όψιμη φάση κατά την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι πληθυσμοί που εκτέθηκαν στην ισταμίνη παρουσίασαν γενικά συγκρίσιμη ανάπτυξη, πολλαπλασιαστική ικανότητα, επιβίωση και ικανότητα σχηματισμού αποικιών με τον μάρτυρα που δεν είχε εκτεθεί σε αυτήν. Επιπλέον, η εμφάνιση 'ξηρασμένων' κυττάρων συνέπεσε χρονικά με την εμφάνισή τους στους πληθυσμούς του μάρτυρα και η αναλογία τους δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από αυτή του μάρτυρα καθόλη τη διάρκεια της επώσης.

Επομένως, η χρόνια παρουσία ισταμίνης στις καλλιέργειες επί 2 μήνες, μετά από εφάπαξ χορήγηση, δεν έδειξε να επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα, τουλάχιστον στο φάσμα των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Χρόνια επίδραση της ισταμίνης στα χαρακτηριστικά των ασύγχρονων πληθυσμών του *S. cerevisiae* ATCC 2366 στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης

Χαρακτηριστικό	Λανθάνουσα	Φάση ανάπτυξης Λογαριθμική	Στάσιμη	
			Πρώιμη	Όψιμη
Κυτταρική ανάπτυξη	↔	↔	↔	↔
Επιβίωση	↔	↔	↔	↑ [#]
Πολλαπλασιαστική ικανότητα	↔	↔	↔	↔
Φαινότυπος γήρανσης	↔	↔	↔	↔
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	—	↔	↔	↓ [#]
Επιγενετικές φαινοτυπικές μεταβολές	—	↔	↔	↔

↔ αμετάβλητο χαρακτηριστικό, ↓ αναστολή, ↑ ενίσχυση, — δεν προσδιορίζεται, [#] πιθανή δόσοεξαρτώμενη τάση

Ερώτημα 6: Επηρεάζει η ισταμίνη τα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα κατά τη χορήγηση στη λογαριθμική και τη στάσιμη φάση της ανάπτυξης; Έχει η οξεία χορήγηση ισταμίνης διαφορετική επίδραση στα κύτταρα του σακχαρομύκητα σε σχέση με τη χρόνια παρουσία της από την έναρξη της επώασης; Εντοπίζονται διαφορές στην επίδραση της ισταμίνης μεταξύ της πρώιμης και της όψιμης στάσιμης φάσης της ανάπτυξης, κατά την οποία τα κύτταρα βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση και υπό στρεσσογόνες συνθήκες;

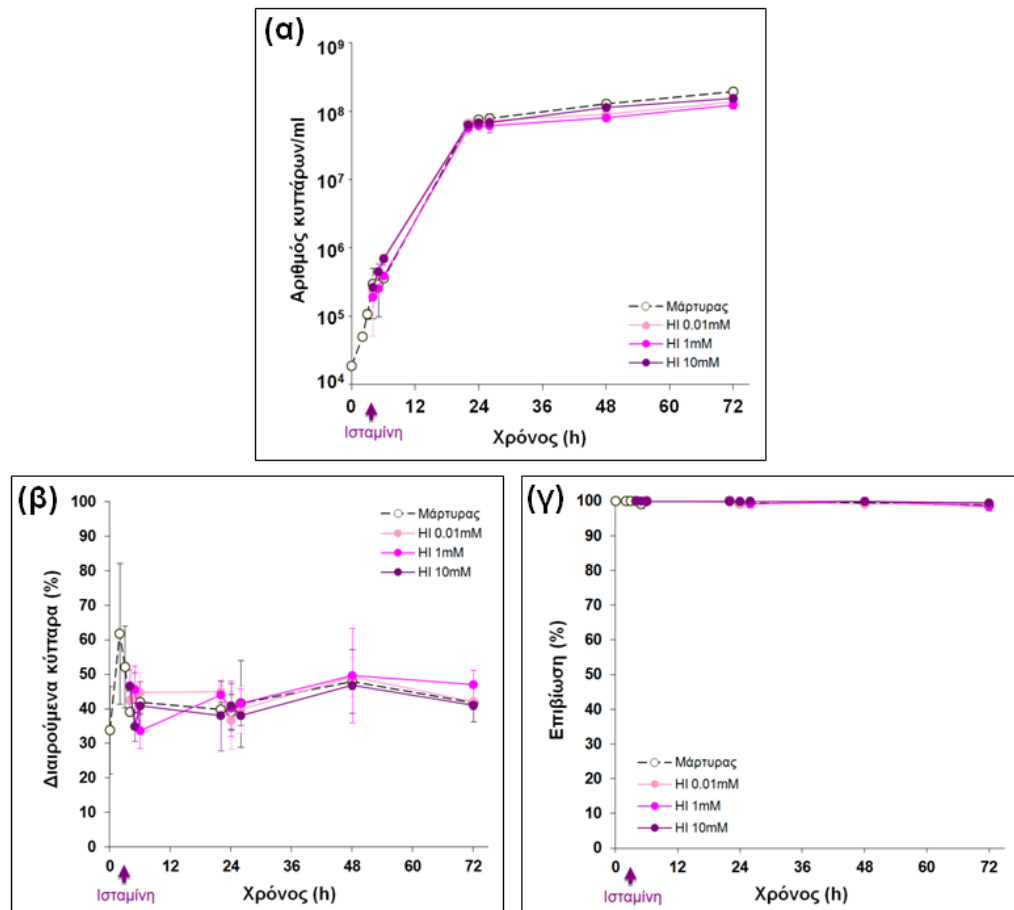
Γ6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΛΟΓΑΡΙΘΜΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΤΑΣΙΜΗ ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο απουσίας μακροχρόνιας δράσης της ισταμίνης λόγω άμεσης αδρανοποίησης ή/και εξάντλησης της, αλλά και η πιθανή διαφορική επίδραση στις φάσεις ανάπτυξης του σακχαρομύκητα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου η ουσία χορηγήθηκε στους πληθυσμούς που βρίσκονταν στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ($T = 3$ h), στην πρώιμη ($T = 22$ h, διαυξική μετατόπιση) ή στην όψιμη ($T = 30$ ημέρες) στάσιμη φάση. Για τη διερεύνηση της επίδρασης της ισταμίνης στην όψιμη στάσιμη φάση επιλέχθηκε η χορήγηση της σε πληθυσμούς του σακχαρομύκητα που είχαν αναπτυχθεί επί 30 ημέρες, σύμφωνα με τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι σε αυτό το χρονικό σημείο εντοπίζονται σαφείς μεταβολές στα χαρακτηριστικά τους καθώς και κύτταρα με φαινότυπο γήρανσης (Πίνακας 4). Οι υπό μελέτη παράμετροι καταγράφηκαν για χρονικό διάστημα 1-70 ωρών μετά τη χορήγηση της ισταμίνης, το οποίο κρίθηκε ικανό για να απαντηθούν τα ερωτήματα που τέθηκαν και να εξαχθούν ασφαλή και αξιόπιστα συμπεράσματα.

Γ6.1. Χορήγηση ισταμίνης στη λογαριθμική φάση

Όταν η ισταμίνη χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις 0.01, 1 και 10 mM στους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα που είχαν εισέλθει στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης ($T = 3$ h), ο αριθμός (Εικόνα 63α), η

πολλαπλασιαστική ικανότητα (Εικόνα 63β) και η επιβίωση (Εικόνα 63γ) των κυττάρων δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές μέχρι τις 72 h επώασης σε σχέση με το μάρτυρα και μεταξύ των καλλιεργιών που είχαν εκθετεί στις διαφόρες συγκεντρώσεις ισταμίνης ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test).



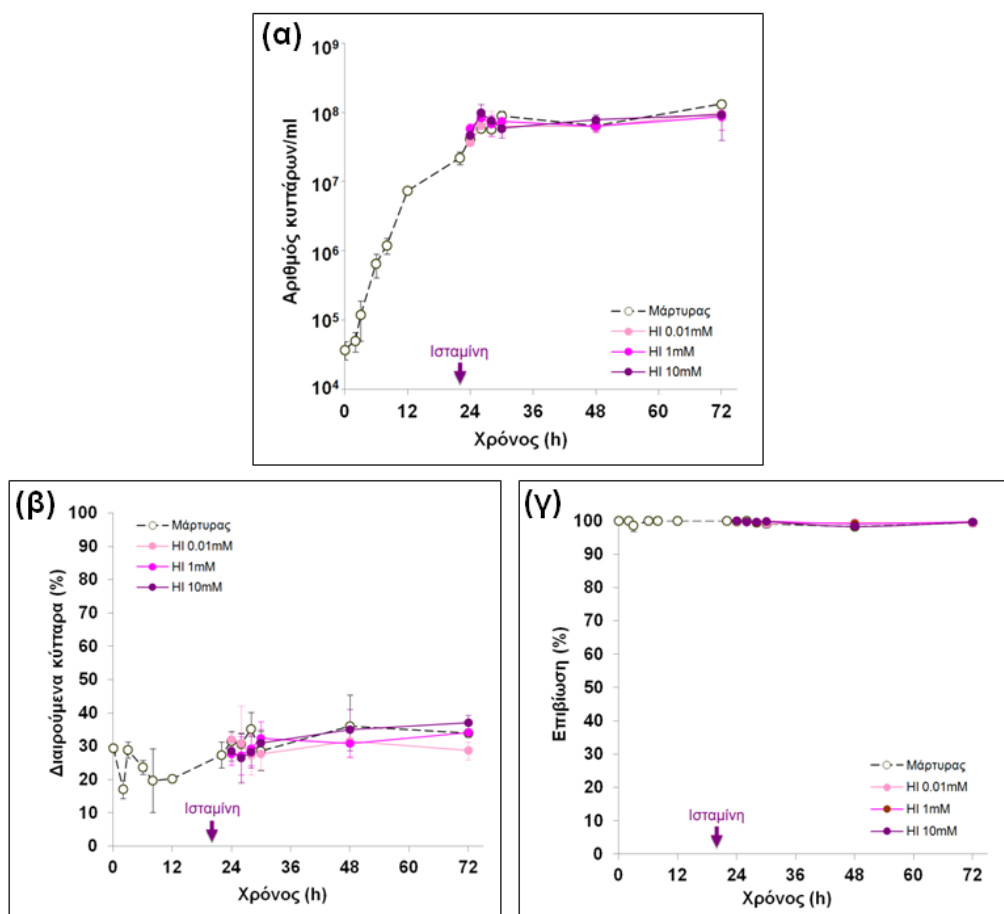
Εικόνα 63. (α) Καμπύλη ανάπτυξης, (β) αναλογία διαιρούμενων κυττάρων και (γ) επιβίωση του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επώαστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 72 h, απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI) που χορηγήθηκε στην αρχή της λογαριθμικής φάσης ($T = 3$ h, βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-3$).

Σε όλες τις καλλιέργειες η ανάπτυξη του μύκητα εμφάνισε θετική συσχέτιση με το χρόνο ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test), ενώ η πολλαπλασιαστική ικανότητα και η επιβίωση δεν παρουσίασαν χρονοεξαρτώμενη μεταβολή σε καμία περίπτωση στη διάρκεια που μελετήθηκε ($P > 0.1$, Spearman's nonparametric correlation test).

Γ6.2. Χορήγηση ισταμίνης κατά τη διαυξική μετατόπιση

Η χορήγηση 0.01, 1 και 10 mM ισταμίνης στους πληθυσμούς του σακχαρομύκητα κατά τη διαυξική μετατόπιση ($T = 22$ h) δεν μετέβαλε σημαντικά τον αριθμό (Εικόνα 64α), την πολλαπλασιαστική ικανότητα (Εικόνα 64β) και την επιβίωση (Εικόνα 64γ) των κυττάρων μέχρι και τις 72 h της επώασης, συγκριτικά με το μάρτυρα, ούτε καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές σε αυτές τις παραμέτρους μεταξύ των καλλιέργειών που είχαν εκθετεί στις διάφορες συγκεντρώσεις ισταμίνης ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test).

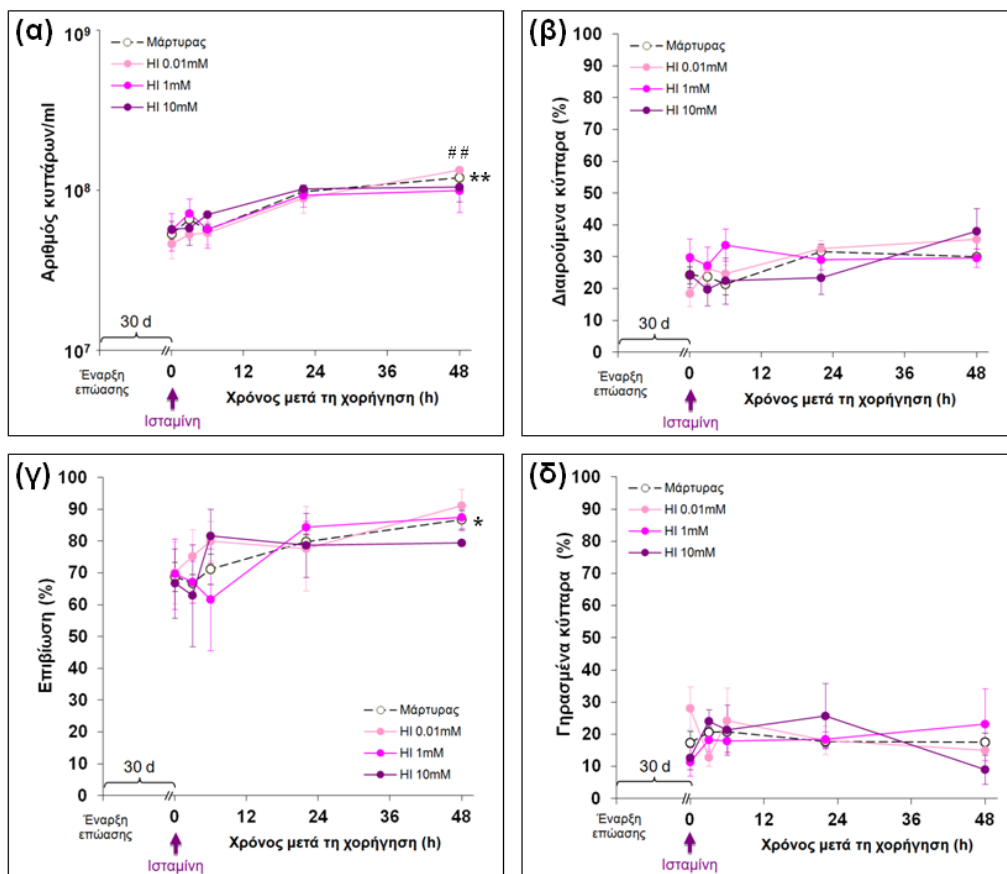
Σε όλες τις καλλιέργειες η ανάπτυξη του μύκητα εμφάνισε θετική ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test) και η επιβίωση αρνητική ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test) συσχέτιση με το χρόνο. Σε αντίθεση με τις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 0.01 mM ισταμίνης (Spearman's $\rho = 0.229$, $P > 0.1$), οι υπόλοιπες παρουσίασαν χρονοεξαρτώμενη πολλαπλασιαστική ικανότητα στη χρονική περίοδο που μελετήθηκε ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test).



Εικόνα 64. (α) Καμπύλη ανάπτυξης, (β) αναλογία διαιρούμενων κυττάρων και (γ) επιβίωση του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 72 h, απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI) που χορηγήθηκε στην αρχή της στάσιμης φάσης ($T = 22$ h, βέλος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 2-3$).

Γ6.3. Χορήγηση ισταμίνης στην όψιμη στάσιμη φάση

Στη διάρκεια από 1 έως 48 h μετά τη χορήγηση της ισταμίνης, ο αριθμός των κυττάρων (Εικόνα 65α), η πολλαπλασιαστική ικανότητα (Εικόνα 65β), η επιβίωση (Εικόνα 65γ) και η αναλογία των 'ξηρασμένων' κυττάρων (Εικόνα 65γ) παρουσίασαν παρόμοια κατανομή ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test) μεταξύ των πληθυσμών που είχε χορηγηθεί ισταμίνη και στον μάρτυρα.

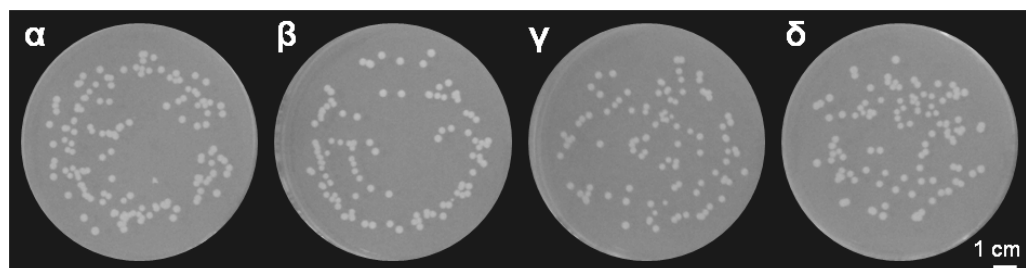


Εικόνα 65. (α) Ανάπτυξη, (β) αναλογία διαιρούμενων κυττάρων, (γ) επιβίωση και (δ) αναλογία 'γηρασμένων' κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h, απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI) που χορηγήθηκε σε καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί επί 30 ημέρες (30 d) και βρίσκονταν στην όψιμη φάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ συγκριτικά με το χρονικό σημείο 0 στις καλλιέργειες του μάρτυρα, ## $P < 0.01$ σε σχέση με το χρονικό σημείο προσθήκης 0.01 mM ισταμίνης (βέλος).

Τόσο στον μάρτυρα όσο και υπό την επίδραση ισταμίνης η ανάπτυξη του μύκητα εμφάνισε θετική συσχέτιση ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test) με το χρόνο στη διάρκεια που μελετήθηκε. Ενδιαφέρον αποτελεί η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων που έδειξε σημαντική ($P < 0.01$, ANOVA) αύξηση του αριθμού των κυττάρων μετά από 48 h επώασης στο μάρτυρα και στους πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε 0.01 mM ισταμίνης, αλλά όχι ($P > 0.05$, ANOVA) στις καλλιέργειες όπου χορηγήθηκε 1 mM ή 10 mM της ουσίας (Εικόνα 65α). Επίσης, η πολλαπλασιαστική ικανότητα και η επιβίωση των κυττάρων παρουσίασαν θετική συσχέτιση με το χρόνο επώασης

στο μάρτυρα και υπό την επίδραση 0.01 mM ισταμίνης ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test) αλλά παρέμειναν αμετάβλητες στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε 1 και 10 mM ισταμίνης ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test). Ενώ δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές ($P > 0.05$, ANOVA) μεταβολές στην αναλογία των διαιρούμενων (Εικόνα 65β) και των 'ξηρασμένων' κυττάρων (Εικόνα 65δ), τα οποία στην πλειονότητά τους ήταν ζωντανά, η επιβίωση του σακχαρομύκητα 48 h μετά την έναρξη της δειγματοληψίας αυξήθηκε σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) στο μάρτυρα, αλλά όχι ($P > 0.05$, ANOVA) στις καλλιέργειες που έλαβαν ισταμίνη (Εικόνα 65γ). Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές ($P > 0.05$, ANOVA) διαφορές σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω παραμέτρους μεταξύ του μάρτυρα και των πληθυσμών που εκτέθηκαν στην ισταμίνη στα διάφορα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν.

Αναφορικά με την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, οι αποικίες που σχηματίστηκαν μετά την επίστρωση των καλλιεργειών σε στερεό θρεπτικό υλικό είχαν φυσιολογική μακροσκοπική εικόνα τόσο στα δείγματα του μάρτυρα όσο και στους πληθυσμούς που εκτέθηκαν στην ισταμίνη (Εικόνα 66). Σε όλα τα δείγματα, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών 24 και 48 h μετά τη χορήγηση ισταμίνης δεν διέφερε σημαντικά ($P > 0.05$, ANOVA) από τον μάρτυρα (Εικόνα 66).



Εικόνα 66. Μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που σχηματίστηκαν μετά από επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό δειγμάτων των καλλιεργειών του *S. cerevisiae* (α) απουσία (μάρτυρας, 1:50000) ή παρουσία (β) 0.01 mM (1:90000), (γ) 1 mM (1:80000) και (δ) 10 mM (1:60000) ισταμίνης, η οποία είχε χορηγηθεί στους πληθυσμούς στις 30 ημέρες επώασης. Τα δείγματα ελήφθησαν 48 h μετά την έκθεση των καλλιεργειών στην ισταμίνη.

Συμπέρασμα

Η οξεία χορήγηση ισταμίνης στην αρχή της λογαριθμικής ή της στάσιμης φάσης (διαυξική μετατόπιση) φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα στη λανθάνουσα, τη λογαριθμική και στην πρώιμη και, πιθανώς, την όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης, αφού διατηρήθηκε ο συνολικός αριθμός, η πολλαπλασιαστική ικανότητα και η βιωσιμότητα των κυττάρων στα επίπεδα των μαρτύρων. Επίσης, δεν οδηγεί σε μακροχρόνιες μεταβολές που μεταδίδονται στις επόμενες γενεές. Υπάρχουν, ωστόσο, ενδείξεις για πιθανή μακροχρόνια ανασταλτική δράση των υψηλότερων δόσεων της ισταμίνης στην ανάπτυξη και επιβίωση του σακχαρομύκητα όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση και υπό τις στρεσογόνες συνθήκες λόγω σταδιακής έλλειψης θρεπτικών υλικών (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Οξεία επίδραση της ισταμίνης στα χαρακτηριστικά των ασύγχρονων πληθυσμών του *S. cerevisiae* ATCC 2366 στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης

Χαρακτηριστικό	Λανθάνουσα	Φάση ανάπτυξης Λογαριθμική	Στάσιμη	
			Πρώιμη	Όψιμη
Κυτταρική ανάπτυξη	↔	↔	↔	↓ [#]
Επιβίωση	↔	↔	↔	↓ [#]
Πολλαπλασιαστική ικανότητα	↔	↔	↔	↓ [#]
Φαινότυπος γήρανσης	—	—	—	↔
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	—	—	—	↔
Επιγενετικές φαινοτυπικές μεταβολές	↔	↔	↔	↔

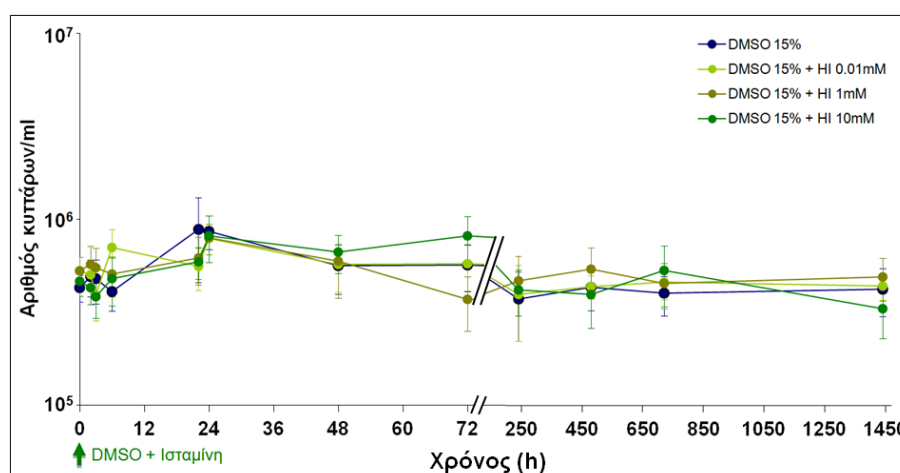
↔ αμετάβλητο χαρακτηριστικό, ↓ αναστολή, — δεν προσδιορίζεται, # πιθανή δοσοεξαρτώμενη τάση

Ερώτημα 7: Τροποποιείται η απάντηση των κυττάρων του σακχαρομύκητα κατά τη συγχορήγηση 15% DMSO και ισταμίνης; Ποια είναι η επίδραση της συγχορήγησης των ουσιών αυτών στα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης; Είναι ικανή η ισταμίνη να αντιστρέψει την μακροχρόνια επίδραση του DMSO στον σακχαρομύκητα;

Γ7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ DMSO ΚΑΙ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

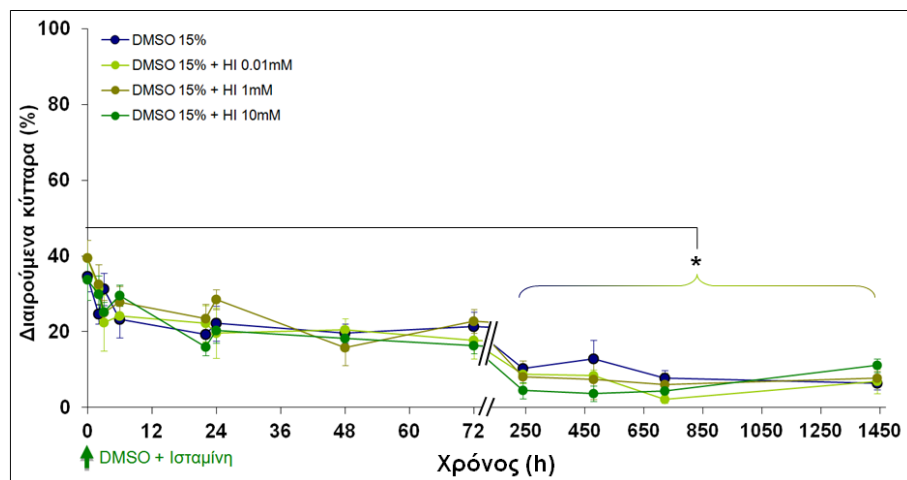
Γ7.1. Χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα σε 15% DMSO και ισταμίνη

Όταν το DMSO συγχορηγήθηκε με ισταμίνη στην αρχή της ανάπτυξης του μύκητα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην κατανομή ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test) του συνολικού αριθμού (Εικόνα 67) και των διαιρούμενων κυττάρων (Εικόνα 68) μεταξύ των πληθυσμών που εκτέθηκαν σε DMSO και ισταμίνη και των πληθυσμών που εκτέθηκαν μόνο σε DMSO (δείγμα ελέγχου) κατά τη διάρκεια των 2 μηνών επώασης που ακολούθησαν.



Εικόνα 67. Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *S. cerevisiae* ATCC 2366 μετά από συγχορήγηση 15% (v/v) DMSO και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI) και επώαση σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ του αριθμού των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας ($n = 3-9$).

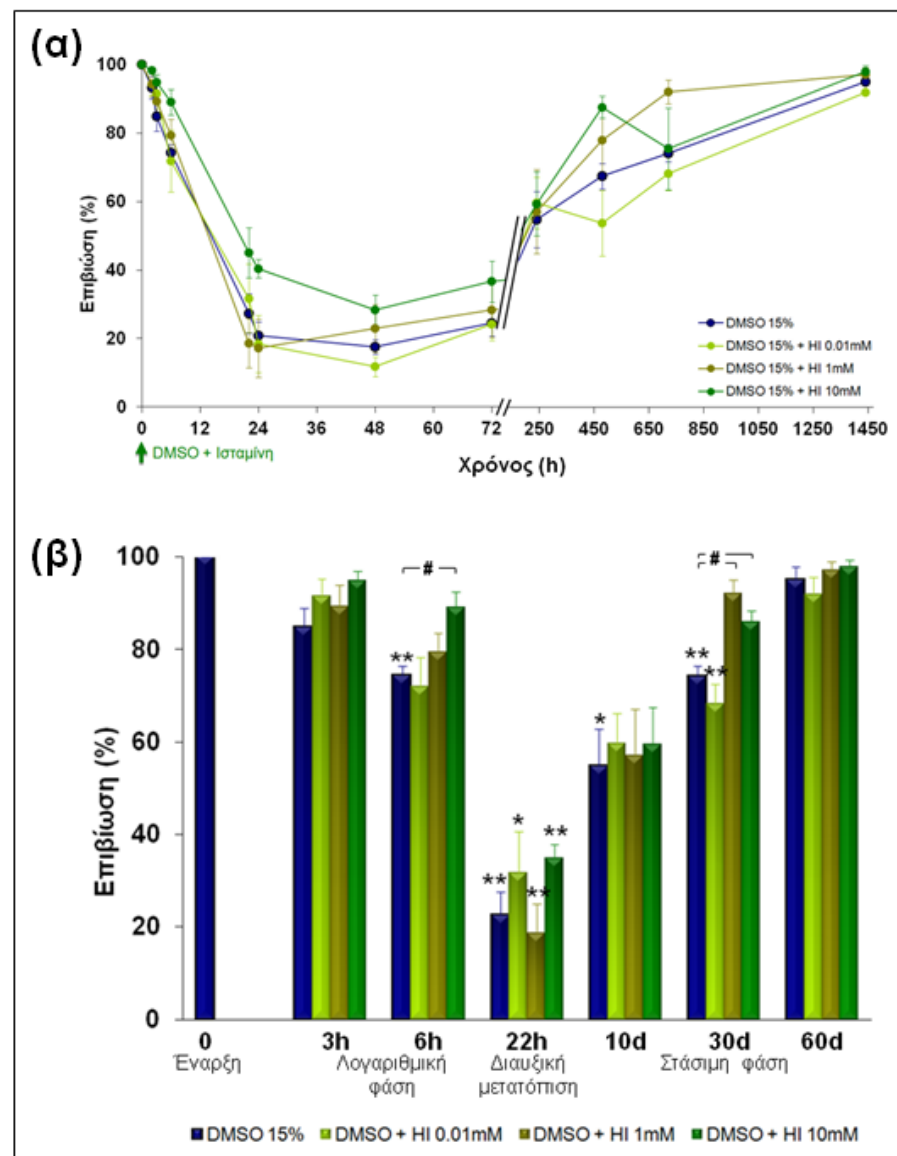
Σε κάθε περίπτωση, ο αριθμός των κυττάρων δε μεταβλήθηκε σημαντικά ($P > 0.8$, ANOVA) και, συνεπώς η ισταμίνη δεν αντέστρεψε την ανασταλτική δράση του DMSO ώστε τα κύτταρα να εισέλθουν στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 67). Όσον αφορά στην πολλαπλασιαστική ικανότητα, μετά τη δέκατη ημέρα επώασης, η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) σε όλα τα δείγματα συγκριτικά με την αντίστοιχη αναλογία που καταγράφηκε στην έναρξη της επώασης (Εικόνα 68).



Εικόνα 68. Αναλογία (%) των διαιρούμενων κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 2 μήνες (1440 h) παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Σε όλα τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν δείγματα στα οποία χορηγήθηκε DMSO χωρίς ισταμίνη (δείγμα ελέγχου). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$). * $P < 0.05$ vs έναρξη επώασης (βέλος).

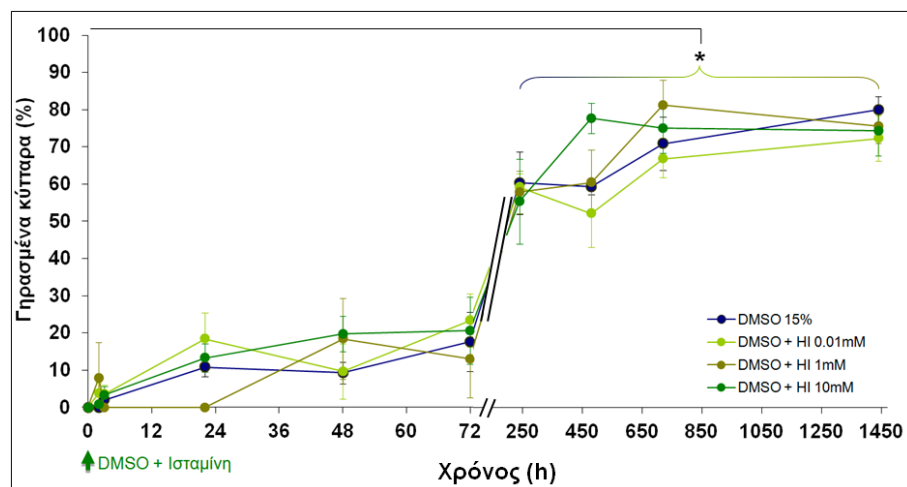
Αν και, κατά τη συγχορήγηση DMSO και ισταμίνης η επιβίωση του σακχαρομύκητα ακολούθησε παρόμοια διφασική καμπύλη (Εικόνα 69α) με αυτή που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί μόνο σε 15% DMSO εμφανίστηκαν διαφορές που σχετίζονταν με τη χορηγηθείσα δόση της ισταμίνης (Εικόνα 69). Συγκεκριμένα, η ισταμίνη, στις μεγαλύτερες δόσεις, ανέστειλε τη δράση του DMSO κατά την πρόοδο της λογαριθμικής φάσης στις 6 h επώασης (Εικόνα 69β). Μετά την επικράτηση των ενεργειών του DMSO, κρύως κρύα τη διαυξη ή μετατόπιση, η ισταμίνη φαίνεται να δίνει, δοσοεξαρτώμενα και σταδιακά,

και πάλι πλεονέκτημα στα βιώσιμα κύτταρα κατά την όψιμη στάσιμη φάση (Εικόνα 69β).

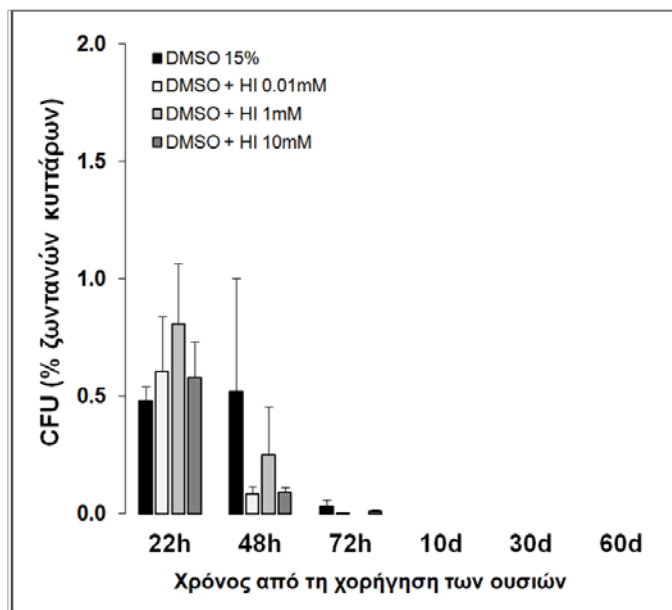


Εικόνα 69. (α) Επιβίωση του *S. cerevisiae* ATCC 2366 σε διάφορα χρονικά σημεία της επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο στους 27°C παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ή παρουσία 15% DMSO και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Η επιβίωση εκφράστηκε ως αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες. (β) Σύγκριση της επιβίωσης κατά τη συγχρόνηση DMSO και ισταμίνης στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs αναλογία ζωντανών κυττάρων στην έναρξη της επώασης, # $P < 0.05$ (ANOVA).

Η όποια δράση της ισταμίνης έναντι της χρονοεξαρτώμενης αναστολής της επιβίωσης που ασκείται από το DMSO δεν επηρέασε σημαντικά ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test) τον χρόνο εμφάνισης και την αναλογία των κυττάρων με 'ξηρασμένο' φαινότυπο (Εικόνα 70) που επάγεται από 15% DMSO (Εικόνα 49). Επίσης, κατά τη συγχορήγηση DMSO και ισταμίνης, οι πληθυσμοί του σακχαρομύκητα δημιούργησαν στην πρώιμη στάσιμη φάση ελάχιστες αποικίες, ενώ μετά τις 72 h επώασης αδυνατούσαν να σχηματίσουν αποικίες κατά την ακόλουθη επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό (Εικόνα 71).



Εικόνα 70. Αναλογία (%) των 'ξηρασμένων' επί του συνόλου των κυττάρων στις καλλιέργειες του *S. cerevisiae* παρουσία 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$). * $P < 0.05$ vs έναρξη επώασης (βέλος).

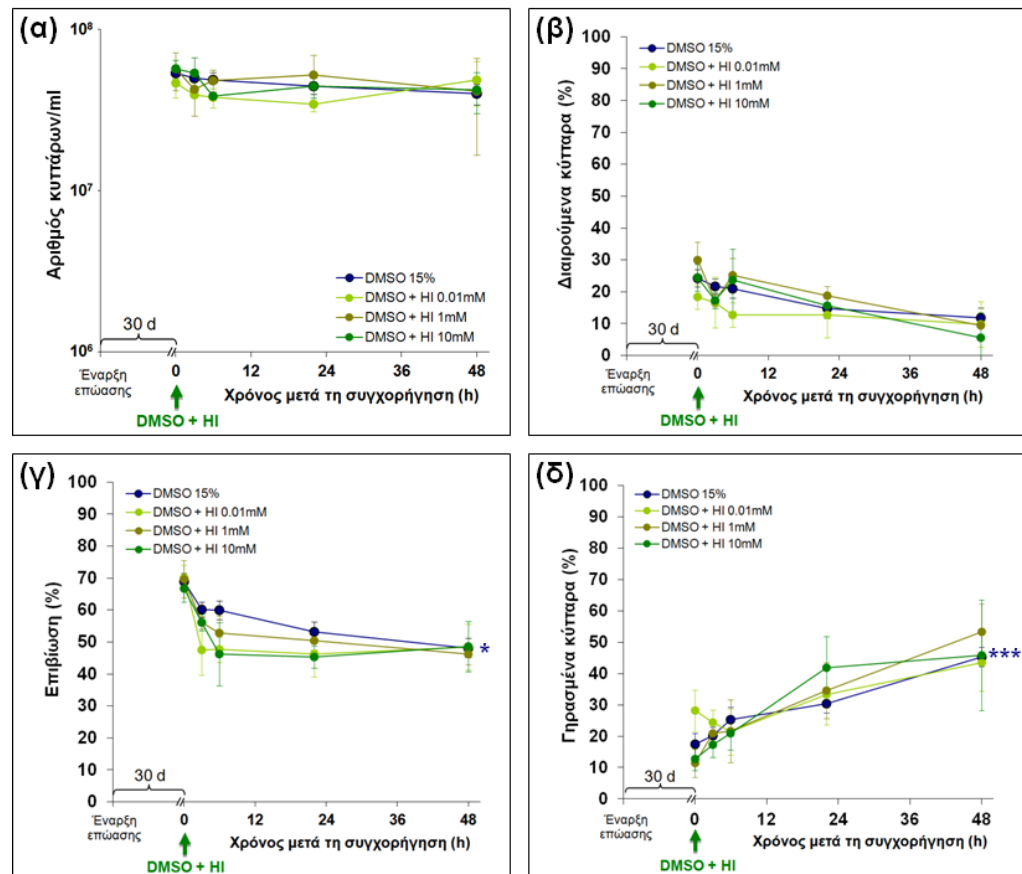


Εικόνα 71. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών κατά τη στάσιμη φάση της ανάπτυξης του *S. cerevisiae* που είχε εκτεθεί σε 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα και παρουσιάζεται ως $MO \pm SEM$ ($n = 4-7$).

Γ7.2. Οξεία έκθεση του σακχαρομύκητα σε 15% DMSO και ισταμίνη κατά την όψιμη φάση της ανάπτυξης

Με βάση τις ενδείξεις μιας πιθανής μακροχρόνιας δόσοεξαρτώμενης ανασταλτικής δράσης της ισταμίνης στην ανάπτυξη και επιβίωση του σακχαρομύκητα όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό στρεσογόνες συνθήκες στην στάσιμη φάση (§ Γ5.4, Γ6.3 και Εικόνες 60, 65) καθώς και την ενίσχυση της οξείας δράσης του DMSO στην όψιμη στάσιμη φάση (§ Γ4), διερευνήθηκε η επίδραση της ισταμίνης σε πληθυσμούς που έλαβαν 15% DMSO στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης. Οι πληθυσμοί αφέθηκαν να αναπτυχθούν επί 30 ημέρες και, στη συνέχεια, οι καλλιέργειες χωρίστηκαν, εκτέθηκαν σε 15% DMSO και 0.01, 1 ή 10 mM ισταμίνη όπως περιγράφεται στην § B2.9 και καταγράφηκε η επίδραση της συγχορήγησης των ουσιών στα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα επί 48 h.

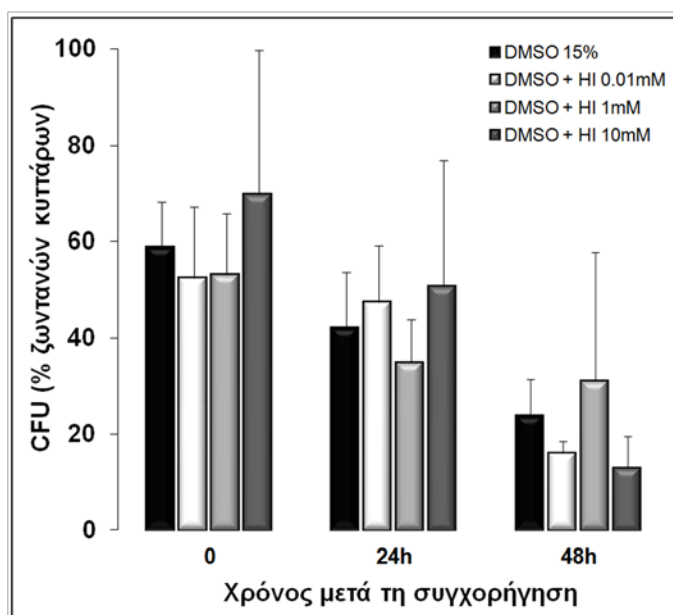
Σαράντα οκτώ ώρες μετά τη συγχορήγηση DMSO και ισταμίνης, η κατανομή του συνολικού αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 72α), της πολλαπλασιαστικής ικανότητας (Εικόνα 72β), της επιβίωσης (Εικόνα 72γ) και της εμφάνισης του γηρασμένου φαινότυπου (Εικόνα 72δ) ήταν όμοια μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test).



Εικόνα 72. (α) Ανάπτυξη, (β) αναλογία διαιρούμενων κυττάρων, (γ) επιβίωση και (δ) αναλογία 'γηρασμένων' κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 48 h μετά τη συγχορήγηση 15% (ν/ν) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Η χορήγηση των ουσιών έγινε σε καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί επί 30 ημέρες (30 d) και βρίσκονταν στην όψιμη στάσιμη φάση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ συγκριτικά με το χρονικό σημείο 0 στις καλλιέργειες του μάρτυρα.

Ο συνολικός αριθμός (Εικόνα 72α) και η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων που μελετήθηκαν ($P > 0.05$, ANOVA). Σε

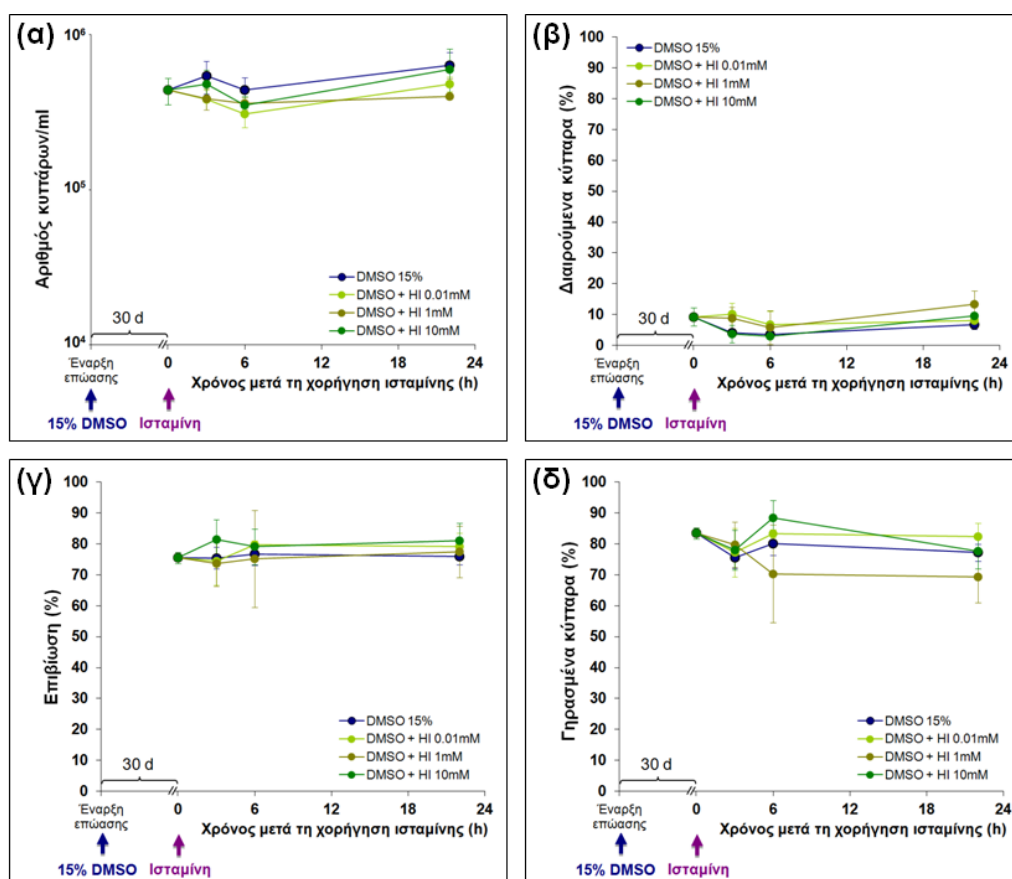
αντίθεση με τις καλλιέργειες που είχαν εκτεθεί και στις 2 ουσίες ($P > 0.05$, ANOVA), η επιβίωση (Εικόνα 72γ) των πληθυσμών που έλαβε μόνο DMSO μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA) 48 h μετά την έναρξη της δειγματοληψίας, ενώ η αναλογία των 'ξηρασμένων' κυττάρων αυξήθηκε (Εικόνα 72δ) στο ίδιο χρονικό διάστημα. Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της βιωσιμότητας με τον χρόνο σε όλες τις καλλιέργειες ($P < 0.05$, Spearman's nonparametric correlation test), εκτός από αυτή που είχε εκτεθεί σε 15% DMSO και 10 mM ισταμίνη, η οποία έδειξε μη χρονοεξαρτώμενη (Spearman's $\rho = -0.408$, $P > 0.1$) μείωση της επιβίωσης, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$, ANOVA) στα χρονικά σημεία που ακολούθησαν τη χορήγηση των ουσιών (Εικόνα 72γ). Έπειτα από επίστρωση των καλλιεργειών σε στερεό θρεπτικό υλικό η μακροσκοπική εικόνα των αποικιών που σχηματίστηκαν ήταν φυσιολογική και δεν διέφερε ($P > 0.9$, Kruskal-Wallis test) μεταξύ των πληθυσμών (Εικόνα 73).



Εικόνα 73. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών του *S. cerevisiae* σε καλλιέργειες που εκτέθηκαν μετά από 30 ημέρες επώασης σε 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών εκφράστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία (%) των σχηματισθέντων αποικιών στον τάπητα (CFU) επί του συνόλου των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα και παρουσιάζεται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3-9$).

Γ7.3. Οξεία χορήγηση ισταμίνης στην όψιμη φάση της ανάπτυξης πληθυσμών του σακχαρομύκητα υπό χρόνια έκθεση σε 15% DMSO

Κατά τις 22 h επώασης μετά την προσθήκη διαφόρων δόσεων ισταμίνης στις καλλιέργειες που είχαν επωαστεί επί ένα μήνα παρουσία 15% DMSO, η κατανομή του συνολικού αριθμού (Εικόνα 74α), των διαιρούμενων (Εικόνα 74β), των ζωντανών (Εικόνα 74γ) και των 'ξηρασμένων' (Εικόνα 74δ) κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών που μελετήθηκαν ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test). Τα 'ξηρασμένα' κύτταρα ήταν στην πλειονότητά τους ζωντανά, σε ποσοστό που κυμάνθηκε ~70-90%.



Εικόνα 74. Ανάπτυξη (α) και εκατοστιαία αναλογία των διαιρούμενων (β), ζωντανών (γ) και 'ξηρασμένων' (δ) κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που επωάστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό στους 27 °C επί 22 h μετά τη χορήγηση 15% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και διαφόρων συγκεντρώσεων ισταμίνης (HI). Το DMSO χορηγήθηκε στους πληθυσμούς στην αρχή της επώασης, ενώ η ισταμίνη 30 ημέρες μετά (30 d, βέλη). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SEM$ ($n = 3$).

Στο χρονικό σημείο κατά το οποίο προστέθηκε η ισταμίνη, οι πληθυσμοί του σακχαρομύκητα δεν είχαν την ικανότητα να δημιουργήσουν αποικίες. Το ίδιο παρατηρήθηκε και 24 h μετά την προσθήκη της ισταμίνης. Επομένως, η ισταμίνη δεν ήταν ικανή να αναστρέψει την ανασταλτική δράση του DMSO στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών.

Συμπέρασμα

Η συγχορήγηση ισταμίνης και DMSO δεν αντέστρεψε συνολικά την ανασταλτική δράση του DMSO. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μερικός περιορισμός από την ισταμίνη της ανασταλτικής δράσης του DMSO στην επιβίωση του σακχαρομύκητα, χωρίς όμως να αποτρέπεται η διφασική επίδραση στη βιωσιμότητα. Η έκθεση του μύκητα σε 15% DMSO και 10 mM ισταμίνη στην όψιμη φάση φαίνεται να παρεμποδίζει άμεσα, αλλά όχι σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η όποια δράση της ισταμίνης στην όψιμη στάσιμη φάση δεν επιτελείται όταν ο μύκητας έχει ήδη εκθετεί χρονίως στο DMSO, υποδηλώνοντας μη αναστρέψιμη από την ισταμίνη μακροχρόνια επίδραση του DMSO σε ασύγχρονους πληθυσμούς του μύκητα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Επίδραση της ισταμίνης στις μεταβολές των χαρακτηριστικών του *S. cerevisiae* ATCC 2366 που προκαλούνται από την έκθεση σε 15% DMSO

Χαρακτηριστικό πληθυσμού	Χρόνια συγχορήγηση		Οξεία συγχορήγηση	
	Λογαριθμική φάση	Στάσιμη φάση		Όψιμη στάσιμη φάση
		Πρώιμη	Όψιμη	
Κυτταρική ανάπτυξη	↔→	↔→	↔→	↔→
Επιβίωση	↓ [#]	↔→	↓ [#]	↑* [#]
Πολλαπλασιαστική ικανότητα	↔→	↔→	↔→	↔→
Φαινότυπος γήρανσης	↔→	↔→	↔→	↔→
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	↔→	↔→	↔→	↔→
Επιγενετικές φαινοτυπικές μεταβολές	↔→	↔→	↔→	↔→

↔→ αμετάβλητο χαρακτηριστικό, ↑ ενίσχυση, ↓ αναστολή, # δόσοεξαρτώμενη επίδραση

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση **συνδυασμού παραμέτρων** που χαρακτηρίζουν τη **φυσιολογική ανάπτυξη** και **γήρανση** των ευκαρυωτικών κυττάρων και οι επιδράσεις σε αυτές **φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών**. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στον *S. cerevisiae*, ο οποίος έχει αποτελέσει επί μακρόν **αξιόπιστο πειραματικό πρότυπο** για συναφείς ερευνητικές προσεγγίσεις (Kaeberlein, 2010 · Ντεληθέος, 2011).

Με βάση την τρέχουσα αντίληψη της (παθο)φυσιολογίας της γήρανσης και την υπάρχουσα γνώση κυρίως για συμμετοχή των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, του κυτταροσκελετού και της απάντησης στο κυτταρικό stress (Flatt and Schmidt, 2009 · Masoro, 2009 · Haigis and Yankner, 2010 · Ristow and Schmeisser, 2011 · Wasko and Kaeberlein, 2013 · Πίνακες 1, 2), οι ουσίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν το **DMSO**, η **ισταμίνη** και ο συνδυασμός τους. Τα κύρια δεδομένα που υποστήριξαν την επιλογή των ουσιών αυτών ήταν:

- (α) η ευρεία χρήση του **DMSO** ως **προστατευτικό κυττάρων** και ιστών (Kwak et al., 2010), (β) ο ρόλος του στο **κυτταρικό stress** (Kwak et al., 2010), (γ) η παρέμβαση στο σύστημα μεταφοράς του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi, μιμούμενο τις ιδιότητες των **μοριακών συνοδών** (Gaytán et al., 2013), (δ) η πιθανή αλληλεπίδρασή του με το σύστημα **mTOR** (Lalic et al., 2012), (ε) τη δοσοεξαρτώμενη επίδραση του στη δομή της **χρωματίνης** (Gaytán et al., 2013), καθώς και (στ) το πλήθος των **γονιδίων** του σακχαρομύκητα (Zhang et al., 2003) και των θηλαστικών (Sumida et al., 2011) που φαίνεται να επηρεάζονται από το DMSO με άγνωστες επιπτώσεις στους (παθο)φυσιολογικούς μηχανισμούς των οργανισμών.
- (α) ο τεκμηριωμένος σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει η **ισταμίνη** σε πλήθος **βιολογικών διεργασιών** μέσω πρόσδεσης σε 4 τύπους υποδοχέων (Zampeli and Tiligada, 2009 · O'Mahony et al., 2011 · Tiligada, 2012), (β) η προσφάτως αναφερθείσα ιδιότητά της να

επιφέρει **μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις** σε πρωτεΐνες (Vowinckel et al., 2012), (γ) η μέχρι σήμερα αδιερεύνητη δράση της στα **προκαρυωτικά κύτταρα**, η οποία δεν συντελείται μέσω των γνωστών υποδοχέων της (Kyriakidis and Tiligada, 2013), (δ) οι πιθανοί κοινοί μηχανισμοί δράσης της ραπαμυκίνης και της ισταμίνης όχι μόνο στις ανοσορυθμιστικές διαδικασίες των ανώτερων οργανισμών (Zampeli and Tiligada, 2009 · Powell et al., 2012), αλλά και στην αυτοφαγία στον σακχαρομύκητα (Bharadwaj et al., 2012), καθώς και (ε) η επαγωγή από την ισταμίνη της **προσαρμοστικής απάντησης** στο θερμικό shock και η μεταβολή στην έκφραση των **Hsps** και της **τουμπουλίνης** σε καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, ο οποίος δεν διαθέτει γνωστά ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα και υποδοχείς της ισταμίνης (Delitheos et al., 2010 · Paramichael et al., 2013).

Η πειραματική προσέγγιση των ερωτημάτων που τέθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας περιελάμβανε **χρόνια και οξεία έκθεση** των καλλιεργειών του σακχαρομύκητα σε συγκεντρώσεις DMSO ή/και ισταμίνης μικρότερης της αντίστοιχης MIC (Εικόνα 12) και επώαση στους 27 °C για μέγιστο χρονικό διάστημα 2 μηνών. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονταν **δείγματα ελέγχου**, τα οποία δεν είχαν εκτεθεί στις προς μελέτη ουσίες. Σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης γινόταν λήψη δείγματος από τις καλλιέργειες, χρώση των κυττάρων και προσδιορισμός της **επιβίωσης**, του **αριθμού**, της **πολλαπλασιαστικής ικανότητας** των κυττάρων, της ικανότητάς τους να **σχηματίζουν αποικίες**, καθώς και αξιολόγηση της **μορφολογίας** τους (Εικόνα 10).

Στη διεθνή βιβλιογραφία η γήρανση στο σακχαρομύκητα προσεγγίζεται μελετώντας είτε την **αναδιπλασιαστική** είτε τη **χρονολογική** διάρκεια ζωής. Η μελέτη της RLS επικεντρώνεται στον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που πραγματοποιεί ένα **μεμονωμένο κύτταρο** του σακχαρομύκητα έως ότου εξέλθει μη αντιστρεπτά από τον κυτταρικό κύκλο (Mortimer and Johnston, 1959 · Bartholomew and Mittwer, 1953 · Jazwinski, 1990). Αν και παρέχει αρκετές πληροφορίες σχετικά με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του

γηρασμένου κυττάρου, η μελέτη της RLS είναι αρκετά επίπονη, καθώς απαιτεί τη συνεχή μικροσκοπική παρατήρηση του διαιρούμενου κυττάρου, καθώς και ειδικό εξοπλισμό που να επιτρέπει το διαχωρισμό του μητρικού κυττάρου από τα θυγατρικά του (Barton, 1950 · Mortimer and Johnston, 1959· Bartholomew and Mittwer, 1953· Jazwinski, 1990). Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν εξετάζει το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το κύτταρο αυτό παραμένει μεταβολικά ενεργό και δεν λαμβάνει υπόψη τις *in vivo* αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων (Jazwinski, 1990).

Η μελέτη της CLS είναι αρκετά πιο εύκολη και οικονομική, καθώς δεν απαιτεί μικροσκοπική παρατήρηση και λεπτούς χειρισμούς. Στην περίπτωση αυτή, δεν μελετάται ένα μεμονωμένο κύτταρο, αλλά ολόκληρος **πληθυσμός κυττάρων** που προσομοιάζει περισσότερο την ζωή των κυττάρων τόσο του σακχαρομύκητα όσο και των ανώτερων πολυκύτταρων οργανισμών *in vivo*. Στη μελέτη της CLS, ο πληθυσμός των κυττάρων του *S. cerevisiae* σταματά να διαιρείται λόγω **στέρησης θρεπτικών υλικών** και στη συνέχεια μετράται ο χρόνος κατά τον οποίο τα μη διαιρούμενα κύτταρα παραμένουν ζωντανά. Η **βιωσιμότητα** των κυττάρων προσδιορίζεται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν **αποικίες** όταν μεταφέρονται σε πλήρες στερεό θρεπτικό υλικό ή με την αξιολόγηση άλλων μεταβολικών παραμέτρων (Longo 1999 · Fabrizio και Longo, 2003 · Longo et al., 2012). Κατά τη μελέτη της CLS δεν εξετάζεται η μορφολογία των κυττάρων. Το βασικό μειονέκτημα της προσέγγισης αυτής είναι ότι το δεν επιτρέπει τον **διαχωρισμό μεταξύ γήρανσης και stress** λόγω στέρησης τροφής.

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα της βιβλιογραφίας σύμφωνα με τα οποία οι RLS και CLS συνομιλούν και επηρεάζουν η μία την άλλη (Fabrizio et al., 2004 · Fontana et al., 2010), στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια **συνδυαστικής προσέγγισης** αντλώντας πληροφορίες από καθεμιά από αυτές, ώστε να ληφθούν δεδομένα που πλησιάζουν περισσότερο στη **φυσιολογική διαδικασία**. Η μελέτη ήταν **πληθυσμιακή σε μη συγχρονισμένες καλλιέργειες** και αξιολογήθηκαν παράμετροι που αφορούν τόσο στην RLS όσο και στην CLS (Εικόνα 10). Ιδιαίτερως, η **βιωσιμότητα** των κυττάρων αξιολογήθηκε με χρώση

με κυανούν του μεθυλενίου (Εικόνα 19) και όχι με κριτήριο την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, καθώς κύτταρα που είναι ανίκανα να δημιουργούν αποικίες μπορεί να παραμένουν ζωντανά (Εικόνα 15 · Vovou et al., 2004). Η **ικανότητα διαίρεσης** των κυττάρων αξιολογήθηκε με μικροσκοπικό προσδιορισμό της αναλογίας των κυττάρων με εκβλαστήσεις (Εικόνα 13) και με την ικανότητα σχηματισμού CFUs (Vovou et al., 2004 · Paramichael et al., 2006 · Delitheos et al., 2010). Επιπλέον, οι πληθυσμοί του μύκητα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για την εμφάνιση **φαινοτυπικών κυτταρικών αλλοιώσεων**, οι οποίες να παραπέμπουν σε αναδιπλασιαστική γήρανση (Πίνακας 2). Ως τέτοιες θεωρήθηκαν η εμφάνιση **κοκκώδους κυτταροπλάσματος**, η παρουσία **ευμεγεθών κενотоπίων** και η παρουσία **αχνού κυτταρικού τοιχώματος** με **ασαφή όρια** και **αλλοιωμένο σχήμα** (Εικόνα 23).

Υπό **φυσιολογικές συνθήκες** επώασης, η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* ήταν χρονοεξαρτώμενη με **διακριτές φάσεις ανάπτυξης** (Εικόνα 16). Η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Εικόνα 20), της ικανότητας πολλαπλασιασμού (Εικόνα 18) και σχηματισμού αποικιών (Εικόνες 26, 27) με την πάροδο του χρόνου, παράλληλα με την σταθεροποίηση του συνολικού αριθμού τους στις καλλιέργειες (Εικόνα 16) υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα εισέρχονται, μη αντιστρεπτά, στην **‘αδρανή’** κατάσταση (quiescence) ή **φάση G₀** (Εικόνα 4) για την οποία έχει ενοχοποιηθεί η μείωση των θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και η συμμετοχή μοριακών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων αυτών του TOR και των PKA, PKC και Snf1p (Gray et al., 2004). Περίπου 80% των κυττάρων φαίνεται ότι βρίσκονταν σε αδρανή κατάσταση μετά την πάροδο ενός μήνα επώασης (Εικόνα 22). Η εμφάνιση κυττάρων με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε **γήρανση** (Εικόνα 24) συνέπεσε χρονικά με τη μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας (Εικόνα 18) και της επιβίωσης (Εικόνα 20). Επιπλέον, η μείωση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων που είχαν επωαστεί για 2 μήνες σε σχέση με την έναρξη της στάσιμης φάσης (Εικόνα 27) υποδηλώνει **χρονοεξαρτώμενη απώλεια της ικανότητας**

πολλαπλασιασμού κατά την πρόοδο της **στάσιμης φάσης**, χωρίς παράλληλη απώλεια της βιωσιμότητάς τους. Η παρουσία των κυττάρων με **φαινότυπο γήρανσης** υπό τις στρεσογόνες συνθήκες της μακράς στάσιμης φάσης και η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των CFUs και του αριθμού των ζωντανών 'γηρασμένων' κυττάρων (Πίνακας 4) συνηγορούν υπέρ της **παύσης του κυτταρικού κύκλου** και της **αδυναμίας επανέναρξης του πολλαπλασιασμού** στο νέο πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα χαρακτηριστικά αυτά παραμένουν σε γήρανση των κυττάρων (Ashrafi et al., 1998 · Brengues et al., 2005 · Orozco et al., 2013 · Saunier et al., 2013), συμπεριλαμβανομένης της βλάβης του κυτταρικού τοιχώματος (Matile et al., 1971 · Schwencke et al., 1977).

Συνεπώς, τα δεδομένα υποστηρίζουν την εμφάνιση του **γηρασμένου αλλά βιώσιμου φαινότυπου** κατά την είσοδο των πληθυσμών στην κατάσταση αδράνειας, πιθανώς λόγω έλλειψης αρκετών θρεπτικών συστατικών (Gray et al., 2004). Ακόλουθη έξοδος από τη φάση αυτή δεν υποστηρίζεται από τη σταθερή αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων (Εικόνα 22). Η μετέπειτα αύξηση της βιωσιμότητας (Εικόνες 20, 21) πιθανώς οφείλεται στην ανάκαμψη των πληθυσμών λόγω παροχής νέων θρεπτικών υλικών που παρέχονται από τα νεκρά κύτταρα (Zambrano et al., 1993 · Zambrano and Kolter, 1996 · Zinser and Kolter, 2004). Επιπλέον, η **ανάκτηση της βιωσιμότητας** (Εικόνα 21) δεν συνοδεύτηκε από ανάκτηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού (Εικόνα 18) και σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 27). Αντιθέτως, μετά τις 10 ημέρες επώασης, η αναλογία των διαιρούμενων κυττάρων ήταν αντιστρόφως ανάλογη της επιβίωσης. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένδειξη ότι τα διαιρούμενα κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα συγκριτικά με τα μη διαιρούμενα και ενισχύει την άποψη ότι η **γήρανση αφορά σε κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται**. Είναι πιθανόν η παρατηρούμενη αύξηση της αναλογίας των βιώσιμων 'γηρασμένων' κυττάρων (Εικόνα 25α) να οφείλεται σε μεταβολές της κυτταρικής ομοιόστασης που επάγονται κατά την είσοδο κάθε κυττάρου στην κατάσταση αδράνειας (Gray et al., 2004). Λόγω του γεγονότος ότι οι πληθυσμοί του σακχαρομύκητα που μελετήθηκαν δεν ήταν συγχρονισμένοι ως προς την φάση του κύκλου αλλά και ως προς την

ηλικία των κυττάρων που τους αποτελούσαν, το χρονικό διάστημα κατά το οποίο επήλθε ισορροπία στις καλλιέργειες είναι ευρύ και μπορεί να προσδιορισθεί αδρά μετά τις 10 ημέρες επώασης (Εικόνα 24).

Το DMSO σε μικρές συγκεντρώσεις δεν επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα. Οι μεταβολές που προκάλεσε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 28, 30), στη διαίρεση (Εικόνες 33, 34), στην επιβίωση (Εικόνα 35) και στη μορφολογία (Εικόνα 36) των κυττάρων υποδεικνύουν την επίδραση του DMSO στις **αρχικές φάσεις ανάπτυξης** των καλλιεργειών και υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση της ουσίας με μηχανισμούς που εμπλέκονται στην **αναστολή του κυτταρικού κύκλου** (Pringle and Hartwell, 1981 · Lord and Wheals, 1981 · Futcher, 1996). Η επίδραση αυτή φαίνεται ότι δεν επιτρέπει στα κύτταρα να εισέλθουν στη λογαριθμική φάση με αποτέλεσμα την αναστολή του χρονοεξαρτώμενου φαινότυπου στις ακόλουθες φάσεις ανάπτυξης (Εικόνα 2). Επίσης, η σημαντική συσχέτιση που εντοπίστηκε μεταξύ της βιωσιμότητας των διαιρούμενων κυττάρων και της αναλογίας τους κατά την έκθεση σε 15% της ουσίας (Εικόνες 44, 46) αποτελεί ένδειξη της **ευαισθησίας των διαιρούμενων κυττάρων στο DMSO** σε σχέση με τα μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η στατιστικά μη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας κατά τη λογαριθμική φάση (Εικόνες 35, 36), σε συνδυασμό με τη σημαντική μείωση του αριθμού (Εικόνα 30) και της ικανότητας διπλασιασμού (Εικόνα 34) των κυττάρων στη φάση αυτή υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το DMSO, τουλάχιστον στη δόση του 15%, ασκεί ανασταλτική δράση στις διεργασίες διαίρεσης των κυττάρων, τα οποία παραμένουν ζωντανά, χωρίς όμως να μπορούν να πολλαπλασιαστούν για να εισέλθουν στη λογαριθμική φάση, και στη συνέχεια αποθνήσκουν.

Στη διάρκεια των 2 μηνών που μελετήθηκε, η έκθεση σε 15% DMSO προκάλεσε άμεσα διφασική χρονοεξαρτώμενη επίδραση στην κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 46). Η ανάκτηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από 72 h έκθεσης στο DMSO θα μπορούσε να αποδοθεί στην αποδόμηση ή στον μεταβολισμό της ουσίας –πιθανώς σε αδρανή προϊόντα– με την πάροδο του χρόνου, και/ή στην συμμετοχή

όψιμων προσαρμοστικών κυτταρικών μηχανισμών. Ως αποτέλεσμα, δεν παρατηρήθηκε ανάκτηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας (Εικόνα 44) παράλληλα με τη διατήρηση της βιωσιμότητας όσων κυττάρων παρέμειναν ζωντανά κατά την έκθεση στο DMSO (Εικόνα 46). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την πρώιμη και πολυπληθέστερη, συγκριτικά με τον μάρτυρα, εμφάνιση βιώσιμων 'ξηρασμένων' κυττάρων (Εικόνα 48). Η αδυναμία πολλαπλασιασμού, παρά τη μεταφορά των κυττάρων σε νέο πλήρες θρεπτικό υλικό (Εικόνα 50), σε συνδυασμό με την εμφάνιση του ξηρασμένου φαινοτύπου στην πλειονότητα των κυττάρων (Εικόνα 49), οδηγεί στην υπόθεση ότι το DMSO, πιθανώς, **επιταχύνει τη γήρανση** και προκαλεί κυτταρικές μεταβολές, οι οποίες δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να επανέλθουν στο 'φυσιολογικό' ενεργό φαινότυπο και να ανακτήσουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, ακόμα και όταν το DMSO έχει απομακρυνθεί από την καλλιέργεια.

Οι καλλιέργειες υπό την επίδραση 15% DMSO δημιούργησαν **αποικίες δύο διαφορετικών μεγεθών** (Εικόνα 51), τα οποία διατηρήθηκαν έπειτα από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες σε στερεό θρεπτικό μέσο. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποτελεί μια υπόνοια ότι το DMSO προκαλεί στα κύτταρα του σακχαρομύκητα κάποια **επιγενετική μεταβολή**, ανάλογα με τη φάση που βρίσκεται το κάθε ένα, η οποία μεταφέρεται στις επόμενες γενεές. Επιπλέον, έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση διαπιστώθηκε ότι η μορφολογία των κυττάρων των δύο διαφορετικών μεγεθών αποικιών ήταν και στις δύο περιπτώσεις φυσιολογική. Επομένως, οι διαφορετικών μεγεθών αποικίες διέφεραν μόνο ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Δημιουργείται, λοιπόν, η υπόνοια ότι το DMSO ίσως επηρεάζει το **ρυθμό πολλαπλασιασμού** των κυττάρων και κατ' επέκταση αυξάνει το χρόνο γενεάς, το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα αξιολόγησης της γήρανσης. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να γίνει περαιτέρω διερεύνηση ώστε να προκύψουν σαφέστερα συμπεράσματα επί του θέματος. Συνολικά, τα δεδομένα υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή του DMSO στην επιτάχυνση του φαινοτύπου που παραπέμπει σε γήρανση (Εικόνα

49) και, πιθανώς, στην διαφορική πρόκληση επιγενετικών παρεμβάσεων (Εικόνα 51).

Η ανασταλτική δράση του DMSO φαίνεται πως δεν παρουσιάζει εκλαστικότητα ως προς τη φάση της ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς η μείωση αριθμού των κυττάρων (Εικόνα 52), της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας (Εικόνα 53), της επιβίωσης (Εικόνα 54) και της ικανότητας σχηματισμού αποικιών όταν μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υλικό (Εικόνα 57) παρατηρούνται και όταν το DMSO χορηγείται σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση αδράνειας (quiescence). Επιπλέον, η αύξηση των 'γήρασμένων' κυττάρων στις καλλιέργειες (Εικόνα 55) υποστηρίζει την **ενισχυτική δράση** του DMSO στη διαδικασία της γήρανσης, τόσο σε ταχιάως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Εικόνα 48) όσο και σε κύτταρα που βρίσκονται στην όψιμη στάσιμη φάση (Εικόνα 55) και σε στρεσογόνο περιβάλλον (Πίνακας 5). Η εμφάνιση αποικιών δύο διαφορετικών μεγεθών ήταν σποραδική στην περίπτωση της χορήγησης DMSO στην όψιμη στάσιμη φάση, σε αντίθεση με τη χρόνια χορήγηση, κατά την οποία τα δύο διαφορετικά μεγέθη αποικιών εμφανίζονταν σε κάθε καλλιέργεια. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι τα **ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα** είναι περισσότερο ευαίσθητα σε τυχόν επιγενετικές αλλαγές, σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στην όψιμη στάσιμη φάση.

Η χρόνια παρουσία ευρέως φάσματος συγκεντρώσεων ισταμίνης δεν επηρέασε σημαντικά τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα, αν και παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης της επιβίωσης (Εικόνα 60) με παράλληλη μείωση των CFUs (Εικόνα 62) στην όψιμη φάση κατά την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 6). Γενικώς, τα δεδομένα υποδηλώνουν την αδυναμία εμφανούς αλληλεπίδρασης της ισταμίνης με τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μεταβολικής ή χημικής αδρανοποίησης ή/και εξάντλησης της ουσίας κατά τη χρόνια παραμονή της στο θρεπτικό υλικό σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Σε αυτήν την περίπτωση, το συμπέρασμα ότι η ισταμίνη δεν επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των κυττάρων τουλάχιστον κατά την λανθάνουσα φάση της ανάπτυξης είναι ασφαλές και αξιόπιστο, αφού δεν παρατηρήθηκε καμία οξεία μεταβολή

στις 3 πρώτες ώρες της επώασης. Επίσης, οποιαδήποτε μη ανιχνεύσιμη άμεση επίδραση της ισταμίνης κατά την λανθάνουσα φάση δεν οδηγεί σε μακροχρόνιες κυτταρικές μεταβολές που να μεταδίδονται στις επόμενες γενεές. Τα δεδομένα αυτά δεν απέκλεισαν ωστόσο πιθανή οξεία δράση στις επόμενες φάσεις της ανάπτυξης, σε περίπτωση άμεσης αδρανοποίησης ή/και εξάντλησης της ουσίας.

Η περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι η οξεία χορήγηση ισταμίνης επίσης δεν επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα όταν χορηγήθηκε στην έναρξη της λογαριθμικής, στην έναρξη της στάσιμης ή στην όψιμη στάσιμη φάση (Πίνακας 7). Οι ενδείξεις μιας πιθανής μακροχρόνιας ανασταλτικής δράσης των υψηλότερων δόσεων της ισταμίνης στην ανάπτυξη και επιβίωση (Εικόνα 65) του σακχαρομύκητα, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση και υπό τις στρεσογόνες συνθήκες λόγω σταδιακής έλλειψης θρεπτικών υλικών, είναι περιορισμένες και δύσκολο αξιολογηθούν υπό τις πειραματικές συνθήκες αυτής της μελέτης. Συνολικά όμως, απομακρύνεται το ενδεχόμενο η απουσία εμφανούς δράσης της ισταμίνης κατά τη χρόνια έκθεση του σακχαρομύκητα να οφείλεται σε αδρανοποίηση ή/και εξάντληση της ουσίας.

Η συγχορήγηση ισταμίνης και DMSO στην αρχή της επώασης δεν αντέστρεψε συνολικά την ανασταλτική δράση που ασκεί το DMSO στην ανάπτυξη (Εικόνα 67), την πολλαπλασιαστική ικανότητα (Εικόνα 68), την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 71), ούτε την επίδρασή του στην αναλογία των ‘γηρασμένων’ κυττάρων (Εικόνα 70). Ενδιαφέρον παρουσίασε ο μερικός περιορισμός από την ισταμίνη της ανασταλτικής δράσης του DMSO στην επιβίωση (Εικόνα 69β), χωρίς όμως να αποτρέπεται η διφασική επίδρασή του στη βιωσιμότητα του σακχαρομύκητα (Εικόνα 69α). Παρουσία DMSO, η ισταμίνη αύξησε δοσοεξαρτώμενα και προοδευτικά –όσον αφορά στο χρόνο έκθεσης– την επιβίωση στη λογαριθμική και στην στάσιμη φάση (Εικόνα 69). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν τη δοσοεξαρτώμενη τάση της ισταμίνης, όταν χορηγείται στην αρχή της επώασης, να αυξάνει μακροχρόνια την επιβίωση των κυττάρων κατά την όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης (Εικόνα 60)..

Όταν η ισταμίνη συγχορηγήθηκε με 15% DMSO στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης δεν επηρέασε σημαντικά την απάντηση των πληθυσμών του σακχαρομύκητα στο DMSO. Όμως, σε αντίθεση με τη συγχορήγηση των ουσιών στην έναρξη της καλλιέργειας (Εικόνα 67), η έκθεση του σακχαρομύκητα σε 15% DMSO και 10 mM ισταμίνης κατά την όψιμη φάση φαίνεται να παρεμποδίζει άμεσα, αλλά όχι σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Εικόνα 72γ). Λαμβάνοντας υπ' όψιν την επαγόμενη από την ισταμίνη **τάση μείωσης της βιωσιμότητας** κατά τη χορήγηση της στην όψιμη φάση της ανάπτυξης, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανή **οξεία συνεργιστική δράση του DMSO και της ισταμίνης** στα κύτταρα που βρίσκονται σε **αδράνεια** υπό **περιβαλλοντικές συνθήκες stress**. Ωστόσο, η όποια δράση της ισταμίνης στην όψιμη στάσιμη φάση της ανάπτυξης δεν επιτελείται όταν ο σακχαρομύκητας έχει ήδη εκθετεί χρονίως σε 15% DMSO (Εικόνα 74), υποδηλώνοντας μη αναστρέψιμη από την ισταμίνη μακροχρόνια επίδραση του DMSO στους ασύγχρονους πληθυσμούς του μύκητα (Πίνακας 8).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- Οι φυσιολογικοί πληθυσμοί του σακχαρομύκητα κατά τη μακροχρόνια επώαση παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε αναδιπλασιαστική και χρονολογική γήρανση. Επειδή, υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, τα θρεπτικά συστατικά στο καλλιεργητικό μέσο εξαντλούνται, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ο φαινότυπος αυτός να οφείλεται σε stress λόγω στέρησης τροφής. Επομένως, θα πρέπει η ανάπτυξη του μύκητα να μελετηθεί περαιτέρω σε συνθήκες κατά τις οποίες τα θρεπτικά υλικά παραμένουν ανεξάντλητα (π.χ. ανανέωση ανά τακτά χρονικά διαστήματα), ώστε να διαχωριστούν οι επιπτώσεις της γήρανσης από αυτές του stress λόγω στέρησης τροφής.
- Το DMSO αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την ανάπτυξη του μύκητα ανεξάρτητα από τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται. Είναι, επομένως, απαραίτητο να γίνει περαιτέρω διερεύνηση του/των

σταδίου/σταδίων του κυτταρικού κύκλου που επηρεάζεται/ονται από το DMSO και της εκλεκτικότητας της απάντησης.

- Το DMSO σε υψηλή συγκέντρωση επιταχύνει την κυτταρική γήρανση ανεξάρτητα από το χρονικό σημείο κατά το οποίο χορηγείται, χωρίς ωστόσο να έχει γίνει ο σαφής ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η δράση. Ο προσδιορισμός των υποκείμενων μηχανισμών χρήζει διερεύνησης.
- Το DMSO προκαλεί φαινοτυπικές μεταβολές όταν επιδρά σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, οι οποίες φαίνεται να μεταφέρονται στις επόμενες γενιές. Συνεπώς, θα πρέπει να διερευνηθούν οι κυτταρικοί ή/και οι μοριακοί μηχανισμοί που επηρεάζονται από το DMSO, καθώς και σε τι οφείλεται αυτή η εκλεκτική ως προς το στάδιο ανάπτυξης δράση του DMSO.
- Η χορήγηση ισταμίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του μύκητα. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα δεδομένα αυτά, είναι απαραίτητη η μελέτη αναλόγων της ισταμίνης και/ή τροποποιητών του μεταβολισμού της.
- Κατά τη συγχορήγηση DMSO και ισταμίνης παρατηρείται τάση μερικού περιορισμού της ανασταλτικής δράσης του DMSO στην επιβίωση, κυρίως κατά την όψιμη φάση της ανάπτυξης, η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.
- Συνολικά, τα αποτελέσματα της εργασίας υποστηρίζουν τη χρησιμότητα του σακχαρομύκητα ως πειραματικού προτύπου μελέτης της γήρανσης, αν και είναι απαραίτητη η διερεύνηση τους σε διάφορα στελέχη του σακχαρομύκητα. Παράλληλα, θέτουν ενδιαφέροντα ερωτήματα προς διερεύνηση, τόσο μέσω κυτταρικής όσο και μοριακής προσέγγισης, που αφορούν στην πιθανή δράση του DMSO στη γήρανση και στις επιγενετικές βλάβες. Ο απώτερος σκοπός των μελλοντικών προσεγγίσεων είναι η διερεύνηση του φυσιολογικού υποστρώματος της γήρανσης, καθώς και ο προσδιορισμός νέων πιθανών στόχων φαρμακολογικής τροποποίησης του φαινομένου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί έναν ευκαρυωτικό μονοκύτταρο οργανισμό που χρησιμοποιείται ευρύτατα ως πειραματικό πρότυπο για τη μελέτη πληθώρας βιολογικών διεργασιών, μεταξύ των οποίων κ α η γ ήρανση. Η ευρεία χρήση του οφείλεται κυρίως στα εξελικτικώς διατηρημένα μοριακά μονοπάτια και στην υψηλή ομολογία των γονιδίων μεταξύ του σακχαρομύκητα και των ανώτερων θηλαστικών. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση συνδυασμού παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη και τη γήρανση των ευκαρυωτικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό πρότυπο ασύγχρονους πληθυσμούς του *S. cerevisiae*, καθώς και η επίδραση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και της ισταμίνης στις παραμέτρους αυτές. Η πειραματική προσέγγιση περιελάμβανε μακροχρόνια επώαση των πληθυσμών του σακχαρομύκητα απουσία ή παρουσία των φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών, οι οποίες χορηγούνταν στις καλλιέργειες σε διάφορα χρονικά σημεία της ανάπτυξης. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα γινόταν προσδιορισμός των παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη γήρανση, όπως ο αριθμός των κυττάρων, η βιωσιμότητα, η ικανότητα πολλαπλασιασμού και δημιουργίας αποικιών και η αξιολόγηση της μορφολογίας που παραπέμπει σε γήρανση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ισταμίνη δεν επιδρά σημαντικά στις παραμέτρους αυτές. Αντίθετα, το DMSO ανέστειλε δοσοεξαρτώμενα την ανάπτυξη, επιτάχυνε την εμφάνιση του 'γήρασμένου' φαινότυπου και επέφερε επιγενετικού τύπου μεταβολές στις καλλιέργειες του μύκητα, χωρίς την εμφάνιση εκλεκτικότητας ως προς τη φάση της ανάπτυξης. Η συγχορήγηση ισταμίνης αντέστρεψε μερικώς την ανασταλτική δράση του DMSO. Συνολικά, τα δεδομένα υποστηρίζουν τη χρησιμότητα του σακχαρομύκητα ως πειραματικού προτύπου μελέτης της γήρανσης. Παράλληλα, θέτουν ενδιαφέροντα ερωτήματα προς διερεύνηση, που αφορούν στην πιθανή δράση του DMSO στη γήρανση και στις επιγενετικές βλάβες με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό νέων πιθανών στόχων φαρμακολογικής τροποποίησης του φαινομένου της γήρανσης.

SUMMARY

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a eukaryotic unicellular organism which is commonly used as an experimental model for the study of numerous biological processes, including ageing. Its wide use is mainly due to the highly conserved molecular pathways and the homology of genes between yeasts and mammals. The aim of this study was to investigate a combination of parameters that characterize eukaryotic growth and ageing, using *S. cerevisiae* as an experimental organism, as well as the effects of dimethylsulfoxide (DMSO) and histamine on these parameters. The experimental approach included long-term incubation of asynchronous yeast cultures in the absence or presence of pharmacologically active substances administered at various time points. The determination of parameters characterizing growth and ageing, such as cell proliferation, viability, division, colony forming potential and morphology was performed at defined intervals during growth. The results showed that histamine induces no detectable effects on these parameters. On the contrary, DMSO induced dose-dependent and phase of growth-independent inhibition of cell proliferation, acceleration of the onset of the aged phenotype and epigenetic-like phenotype in yeast cultures. Histamine co-administration partially reversed the inhibitory effect of DMSO. Overall, the findings support the use of yeast as an experimental model to study ageing. In parallel, they provide the lead for further investigating the putative effect of DMSO on ageing and in the long-term for identifying new potential pharmacological targets for ageing.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adachi H, Ishii N. (2000) Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 55:280-285.

Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T. (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. Science 299:1751-1753.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat Rev Mol Cell Biol 11:545-555.

Alvers AL, Wood MS, Hu D, Kaywell AC, Dunn WA Jr, Aris JP. (2009) Autophagy is required for extension of yeast chronological lifespan by rapamycin. Autophagy 5:847-849.

Ashrafi K, Farazi TA, Gordon JI. (1998) A role for *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation protein 4 in regulating protein N-myristoylation during entry into stationary phase. J Biol Chem 273:25864-25874.

Ashrafi K, Sinclair D, Gordon JI, Guarente L. (1999) Passage through stationary phase advances replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 96:9100-9105.

Bartholomew JW, Mittwer T. (1953) Demonstration of yeast bud scars with the electron microscope. J Bacteriol 65:272-275.

Barton AA. (1950) Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol 4:84-86.

Bharadwaj PR, Verdile G, Barr RK, Gupta V, Steele JW, Lachenmayer ML, Yue Z, Ehrlich ME, Petsko G, Ju S, Ringe D, Sankovich SE, Caine JM, Macreadie IG, Gandy S, Martins RN. (2012) Latrepirdine (dimebon) enhances autophagy and reduces intracellular GFP-A β 42 levels in yeast. J Alzheimers Dis 32:949-967.

Bitterman KJ, Medvedik O, Sinclair DA. (2003) Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, genome stability, and heterochromatin. Microbiol Mol Biol Rev 67:376-399.

Boeck LD, Clem GM, Wilson MM, Westhead JE. (1973) A9145, a new adenine-containing antifungal antibiotic: fermentation. Antimicrob Agents Chemother 3:49-56.

Brack C, Bechter-Thuring E, Labuhn M. (1997) N-acetylcysteine slows down ageing and increases the life span of *Drosophila melanogaster*. Cell Mol Life Sci 53:960-966.

Bregues M, Teixeira D, Parker R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. Science 310:486-489.

Burtner CR, Murakami CJ, Kennedy BK, Kaeberlein M. (2009) A molecular mechanism of chronological ageing in yeast. Cell Cycle 8:1256-1270.

Chen XZ, Chen H, Lou AF, Lü CC. (2006) Dose-response study of spinal hyperbaric ropivacaine for cesarean section. J Zhejiang Univ Sci B 7:992-997.

- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA.** (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390–392.
- Costa V, Moradas-Ferreira P.** (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* 22:217-246.
- De Virgilio C, Loewith R.** (2006) The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1476-1481.
- Delitheos A, Karavokyros I, Tiligada E.** (1995) Response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to antineoplastic agents. *J Appl Bacteriol* 79:379-383.
- Delitheos B, Papamichael K, Tiligada E.** (2010) Histamine modulates the cellular stress response in yeast. *Amino Acids* 38:1219-1226.
- Dymond JS.** (2013) *Saccharomyces cerevisiae* growth media. *Methods Enzymol* 533:191-204.
- Egilmez NK, Chen JB, Jazwinski SM.** (1989) Specific alterations in transcript prevalence during the yeast life-span. *J Biol Chem* 264:14312-14317.
- Egilmez NK, Jazwinski SM.** (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the ageing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171:37-42.
- Egilmez NK, Chen JB, Jazwinski SM.** (1990) Preparation and partial characterization of old yeast cells. *J Gerontol* 45:B9-17.
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Buttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breit-enbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Frohlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F.** (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11:1305-1314.
- Erjavec N, Larsson L, Grantham J, Nyström T.** (2007) Accelerated ageing and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev* 21:2410-2421.
- Fabrizio P, Longo VD.** (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ageing Cell* 2:73-81.
- Fabrizio P, Pletcher SD, Minois N, Vaupel JW, Longo VD.** (2004) Chronological ageing-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 557:136-142.
- Flatt T, Schmidt PS.** (2009) Integrating evolutionary and molecular genetics of ageing. *Biochim Biophys Acta* 1790:951-962.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD.** (2010) Extending healthy life span - from yeast to humans. *Science* 328:321-326.
- Forsburg SL.** (1994) Cell cycle: in and out of the cell cycle. *Curr Biol* 4:828-830.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A.** (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010:214074.

Futcher B. (1993) Analysis of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. In The cell cycle: a practical approach, pp. 69-92. Edited by P. Fantes & R. Brooks. Oxford: IRL Press.

Futcher B. (1996) Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* 16:1635-1646.

Ganley ARD, Ide S, Saka K, Kobayashi T. (2009) The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to ageing. *Mol Cell* 35:683-693.

Gaytán BD, Loguinov AV, De La Rosa VY, Lerot J, Vulpe CD. (2013) Functional genomics indicates yeast requires Golgi/ER transport, chromatin remodeling, and DNA repair for low dose DMSO tolerance. *Front Genet* 13:4:154.

Gelino S, Hansen M. (2013) Autophagy - An emerging anti-ageing mechanism. *J Clin Exp Pathol* S4:pil:006.

Gershon H, Gershon D. (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for ageing research: a critical review. *Mech Ageing Dev* 120:1-22

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546.

Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:187-206.

Haigis MC, Yankner BA. (2010) The ageing stress response. *Mol Cell* 40:333-344.

Harman D. (1956) Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.

Harrington LA, Harley CB. (1988) Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 43:71-78.

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460:392-395.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46-51.

Hayflick L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.

Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M. (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1:3.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.

- Ishii N, Senoo-Matsuda N, Miyake K, Yasuda K, Ishii T, Hartman PS, Furukawa S.** (2004) Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 125:41-46.
- Izmaylov DM, Obukhova LK.** (1999) Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 106:233-240.
- James AP, Johnson BF, Inhaber ER, Gridgeman NT.** (1975). A kinetic analysis of spontaneous w mutations in yeast. *Mutat Res* 30:199-208.
- Jazwinski SM.** (1990) Ageing and senescence of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 4:337-343.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L.** (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13:2570-2580.
- Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK.** (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310:1193-1196.
- Kaeberlein M.** (2010) Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 464:513-519.
- Kennedy BK, Austriaco NR Jr, Guarente L.** (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol* 127:1985-1993.
- Kennedy BK, Steffen KK, Kaeberlein M.** (2007) Ruminations on dietary restriction and ageing. *Cell Mol Life Sci* 64:1323-1328.
- Kirkwood TBL.** (2002) Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev* 123:737-745.
- Kwak GH, Choi SH, Kim HY.** (2010) Dimethyl sulfoxide elevates hydrogen peroxide-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the antioxidant function of methionine sulfoxide reductase A. *BMB Rep* 43:622-628.
- Kyriakidis, D.A., and E. Tiligada.** (2013) Non receptor-mediated histamine actions. In *Histamine H₄ receptor: A novel drug target for immunoregulation and inflammation*, ed. H. Stark, 309–332. London: Versita.
- Lalic H, Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D.** (2012) Rapamycin enhances dimethyl sulfoxide-mediated growth arrest in human myelogenous leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 53:2253-2261.
- Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA** (2012) Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335:1638-1643.
- Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA.** (2013) Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-ageing therapeutics. *J Clin Invest* 123:980-989.
- Lillie SH, Pringle JR.** (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* 143:1384-1394.
- Longo VD, Butler Gralla E, Selverstone Valentine J.** (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in

Saccharomyces cerevisiae. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. J. Biol. Chem 271:12275-12280.

Longo VD, Fabrizio P. (2002) Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? Cell Mol Life Sci 59:903-908.

Longo VD, Fabrizio P. (2012) Chronological ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. Subcell Biochem 57:101-121.

Longo VD, Liou L, Selverstone Valentine J, Butler Gralla E. (1999) Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. Arch Biochem Biophys 365:131-142.

Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B. (2012) Replicative and chronological ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Metab 16:18-31.

Longo VD. (1999) Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. Neurobiol Ageing 20:479-486.

Lord PG, Wheals AE. (1981) Variability in individual cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci 50:361-376.

Lu JY, Lin YY, Sheu JC, Wu JT, Lee FJ, Chen Y, Lin MI, Chiang FT, Tai TY, Berger SL, Zhao Y, Tsai KS, Zhu H, Chuang LM, Boeke JD. (2011) Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic ageing independently of caloric restriction. Cell 146:969-979.

Lucanic M, Lithgow GJ, Alavez S. (2013) Pharmacological lifespan extension of invertebrates. Ageing Res Rev 12:445-458.

Maintz L, Novak N. (2007) Histamine and histamine intolerance. Am J Clin Nutr 85:1185-1196.

Masoro EJ. (2005) Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev 126:913-922.

Masoro EJ. (2009) Biochemical and molecular mechanisms of ageing: from model systems to human longevity. Bioch Biophys Acta 1790:949-950.

Matile P, Cortat M, Wiemken A, Frey-Wyssling A. (1971) Isolation of glucanase-containing particles from budding *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 68:636-640.

McCay CM, Crowell MP, Maynard LA. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. J Nutr 10:63-79.

Miligkos V, Tiligada E, Papamichael K, Ypsilantis E, Delitheos A. (2000) Anticancer drugs as inducers of thermotolerance in yeast. Folia Microbiol (Praha) 45:339-342.

Mortimer RK, Johnston JR (1959) Life span of individual yeast cells. Nature 183:1751-2.

Mortimer RK. (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. Genome Res 10:403-409.

Motizuki M, Tsurugi K. (1992). The effect of ageing on protein synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mech Ageing Dev 64:235-245.

Müller I. (1971) Experiments on ageing in single cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Mikrobiol 77:20-25.

Müller I. (1985) Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51:1-10.

Nasmyth K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 12:405-412.

Ντεληθέος Β. (2011) Επίδραση φαρμάκων στη στάσιμη φάση του κυτταρικού κύκλου του σακχαρομύκητα. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Αθήνα.

O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. (2011) Regulation of the immune response

and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* 128:1153-1162.

Omodei D, Fontana L. (2011) Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett* 585:1537-1542.

Orozco H, Matallana E, Aranda A. (2013) Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb Cell Fact* 12:1.

Painting K, Kirsop B. (1990) A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World J Microbiol Biotechnol* 6:346-347.

Papamichael K, Delitheos B, Tiligada E. (2013) A subset of histamine receptor ligands improve thermotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 114:492-501.

Papamichael K, Delitheos B, Tiligada E. (2013) A subset of histamine receptor ligands improve thermotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 114:492-501.

Papamichael K, Vovou I, Miligkos V, Stavriniadis E, Delitheos A, Tiligada E. (2006) Effect of the Hsp90 modulators on the heat-shock response in eukaryotic cells. *Folia Microbiol (Praha)* 51:33-37.

Powell CD, Quain DE, Smart KA. (2003) Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 149:3129-3137.

Powell CD, Van Zandycke SM, Quain DE, Smart KA. (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology* 146:1023-1034.

Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. (2012) Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol* 30:39-68.

Pretorius IS, Curtin CD, Chambers PJ. (2012) The winemaker's bug. From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioeng Bugs* 3:147-156.

Pringle JR, Hartwell LH. (1981). The *Saccharomyces* cell cycle. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, pp. 97-142. Edited by J. Strathern, E. W. Jones & J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Press.

Ristow M, Schmeisser S. (2011) Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51:327-336.

Sadowska-Bartosz I, Pączka A, Mołoń M, Bartosz G. (2013) Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 13:820-830.

Sando N, Maeda M, Endo T, Oka R, Hayashibe M. (1973) Induction of meiosis and sporulation in differently aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Appl Microbiol 19:359-373.

Saunier R, Esposito M, Dassa EP, Delahodde A. (2013) Integrity of the *Saccharomyces cerevisiae* Rpn11 protein is critical for formation of proteasome storage granules (PSG) and survival in stationary phase. PLoS One 8:e70357.

Schwencke J, Magaña-Schwencke N, Laporte J. (1977) Yeast protoplasts from stationary and starved cells: preparation, ultrastructure and vacuolar development. Ann Microbiol (Paris) 128A:3-18.

Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadan F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, Gems D, Withers DJ. (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. Science 326:140–144.

Sevcik P, Dunford HB. (1991) Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system. J Phys Chem 95:2411-2415.

Shah KH, Zhang B, Ramachandran V, Herman PK. (2013) Processing body and stress granule assembly occur by independent and differentially regulated pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 193:109-123.

Shama S, Lai C, Antoniazzi JM, JC Jiang, Jazwinski SM. (1998) Heat Stress-Induced Life Span Extension in Yeast. Exp Cell Res 245:379-388.

Sherman F. (2002) Getting started with yeast. Methods Enzymol 350:3-41.

Sinclair DA, Guarente L. (1997) Extrachromosomal rDNA Circles – A Cause of Ageing in Yeast. Cell 91:1033–1042.

Smeal T, Claus J, Kennedy B, Cole F, Guarente L. (1996) Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 84:633-642.

Stahl F. (1996) Meiotic recombination in yeast: coronation of the double-strand-break repair model. Cell 87(6):965-968.

Σταυρινίδης H. (1999) Η επίδραση των αντικαρκινικών φαρμάκων στον κυτταρικό κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, σελ. 77-84.

Stavrinidis E, Delitheos A, Tiligada E. (2002) Induction of morphological alterations by antineoplastic agents in yeast. Folia Microbiol (Praha) 47:157-160.

Sumida K, Igarashi Y, Toritsuka N, Matsushita T, Abe-Tomizawa K, Aoki M, Urushidani T, Yamada H, Ohno Y. (2011) Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. Hum Exp Toxicol 30:1701-1709.

Thomas JN, Smith-Sonneborn J. (1997) Supplemental melatonin increases clonal lifespan in the protozoan *Paramecium tetraurelia*. J Pineal Res 23:123–130.

Tiligada E, Delitheos A. (1993) Involvement of potassium ions in the action of various antineoplastic drugs on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Lett Appl Microbiol 16:251-253.

- Tiligada E, Miligkos V, Ypsilantis E, Papamichael K, Delitheos A.** (1999) Molybdate induces thermotolerance in yeast. *Lett Appl Microbiol* 29:77-80.
- Tiligada E, Papamichael K, Vovou I, Delitheos A.** (2006) Circumvention of camptothecin-induced resistance during the adaptive cellular stress response. *Anticancer Res* 26:421-425.
- Tiligada E.** (2006) Chemotherapy: induction of stress responses. *Endocr Relat Cancer* 13(S1):S115-124.
- Tiligada E.** (2012) Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? *J Leukoc Biol* 92:4-6.
- Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN.** (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 10:721-726.
- Vovou I, Delitheos A, Tiligada E.** (2004) The heat shock response is dependent on the external environment and on rapid ionic balancing by pharmacological agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 96:1271-1277.
- Vowinckel J, Stahlberg S, Paulmann N, Bluemlein K, Grohmann M, Ralser M, Walther DJ.** (2012) Histaminylation of glutamine residues is a novel posttranslational modification implicated in G-protein signaling. *FEBS Lett* 586:3819-3824.
- Wang HY.** (1981) Application of polymeric resins as means in microbiological assay. *Dev Ind Microbiol* 22:739-747.
- Wasko BM, Kaeberlein M.** (2013) Yeast replicative ageing: A paradigm for defining conserved longevity interventions. *FEMS Yeast Res* doi: 10.1111/1567-1364.12104 [Epub ahead of print]
- Wei W, Nurse P, Broek D.** (1993) Yeast cells can enter a quiescent state through G1, S, G2, or M phase of the cell cycle. *Cancer Res* 53:1867-1870.
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA.** (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 57:383-401.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ.** (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23:481-485.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.** (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-484.
- Yiannakopoulou ECh, Tiligada E.** (2009) Protective effect of salicylates against hydrogen peroxide stress in yeast. *J Appl Microbiol* 106:903-908.
- Zambrano MM, Kolter R.** (1996) GASping for life in stationary phase. *Cell* 86:181-184.
- Zambrano MM, Siegele DA, Almirón M, Tormo A, Kolter R.** (1993) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259:1757-1760.
- Zampeli E, Tiligada E.** (2009) The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol* 157:24-33.

Zhang W, Needham DL, Coffin M, Rooker A, Hurban P, Tanzer MM, Shuster JR. (2003) Microarray analyses of the metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:57-69.

Zinser ER, Kolter R. (2004) *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res Microbiol* 155:328-336.

Zou S, Sinclair J, Wilson MA, Carey JR, Liedo P, Oropeza A, Kalra A, de Cabo R, Ingram DK, Longo DL, Wolkow CA. (2007) Comparative approaches to facilitate the discovery of prolongevity interventions: effects of tocopherols on lifespan of three invertebrate species. *Mech Ageing Dev* 128:222-226.