



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

***«Μελέτη της γήρανσης των κυττάρων του
μεσοσπονδύλιου δίσκου»***

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΝΤΟΓΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ, ΕΚΕΦΕ
ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

***«Μελέτη της γήρανσης των κυττάρων του
μεσοσπονδύλιου δίσκου»***

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΝΤΟΓΚΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Α.Μ.: 41820

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ι. Τρουγκάκος, Καθηγητής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας
Ζωικού Κυττάρου & Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Βιολογίας,
Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. Τρουγκάκος, Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Ι. Παπασιδέρη Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», με σκοπό την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019 - 2020.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο που μου έκανε την τιμή να είναι ο επιβλέπων καθηγητής της εργασίας μου και την Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιστημονικό Υπεύθυνο Δρα Δημήτρη Κλέτσα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να μελετήσω ένα σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα στο εργαστήριο του, την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα από αυτή την εμπειρία. Είμαι ευγνώμων για την άριστη συνεργασία μας, καθώς και το συνεχές ενδιαφέρον του και τη στήριξη κατά την υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρα Ελένη Μαυρογονάτου (Ερευνήτρια Γ') για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για τον σχεδιασμό των πειραμάτων, καθώς και για τις γνώσεις, τις συμβουλές και τις υποδείξεις που μου παρείχε κατά την εκπαίδευσή μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Δρα Χάρη Πρατσίνη (Ερευνήτης Β'), Δρα Αδαμαντία Παπαδοπούλου (Μετα-διδακτορική συνεργάτις), Δρα Αναστάσιο Κουρούμαλη (Μετα-διδακτορικός συνεργάτης), Ασημίνα Φωτοπούλου (Υποψήφια διδάκτωρ), Μαρίνα Κελεμένη (Μεταπτυχιακή φοιτήτρια), Ελένη Καπλάνη (Μεταπτυχιακή φοιτήτρια), Χαρά Αλμπάνη (Μεταπτυχιακή φοιτήτρια) και Βάνια-Νικόλ Μπερν (Προπτυχιακή φοιτήτρια) για το φιλικό κλίμα συνεργασίας κατά την εκπόνηση της ερευνητικής μου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους και την αγάπη τους σε αυτή τη σημαντική φάση της ζωής μου.

Χριστίνα Ντόγκα

Δεκέμβριος 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1. Μεσοσπονδύλιος δίσκος	12
1.1.1. Δομή και σύσταση μεσοσπονδύλιου δίσκου	12
1.1.2. Φυσικοχημικό περιβάλλον μεσοσπονδύλιου δίσκου	17
1.2. Κυτταρική γήρανση	21
1.2.1. Αναπαραγωγική γήρανση	21
1.2.2. Πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες γήρανση	23
1.3. Γήρανση και εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων	24
1.3.1. Αλλαγές σχετιζόμενες με την ηλικία στη δομή και τη σύσταση των δίσκων	24
1.3.2. Βιολογικές αλλαγές των κυττάρων κατά τη γήρανση και την εκφύλιση των δίσκων	26
1.3.3. Βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων κατά τη γήρανση και την εκφύλιση των δίσκων	28
1.3.3.1. Τα βιοχημικά μονοπάτια των MAPKs	31
1.3.3.2. Τα βιοχημικά μονοπάτια p53/p21 ^{WAF1} και p16 ^{INK4a} /Rb	33
1.3.3.3. Η απόκριση των κυττάρων στις βλάβες του DNA μέσω του μονοπατιού ATM-Chk2-p53-p21WAF1	35
1.4. Ο φαινότυπος των γηρασμένων κυττάρων (SASP)	39
1.4.1. Τα μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με το φαινότυπο SASP	40
1.4.1.1. Ο ρόλος του μονοπατιού NF-κB στον εκφυλισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου	41
1.4.1.2. Ο ρόλος του μονοπατιού των MAPKs στο μεσοσπονδύλιο δίσκο	43
1.5. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1. Όργανα	49
2.2. Υλικά	51
2.3. Ασηπτικές συνθήκες	53
2.4. Καλλιέργειες βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	54
2.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας των κυττάρων με τις δοκιμασίες εκτίμησης	

της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες	56
2.5.1. Επίστρωση κυττάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης των 96 θέσεων	56
2.5.2. Επίδραση των κυττάρων με διαφορετικές τιμές ωσμωμοριακότητας	56
2.5.3. Δοκιμασία εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας με MTT	57
2.5.4. Δοκιμασία εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από χρώση των κυττάρων με Neutral Red	58
2.6. Εφαρμογή επαναλαμβανόμενου ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα	60
2.6.1. Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλία	60
2.6.2. Μελέτη της επίδρασης ωσμωτικού στρες στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων μέσω ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU)	61
2.6.3. Ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης (Senescence-Associated β-galactosidase - SA-β-Gal) των κυττάρων έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες	62
2.6.4. Χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet έπειτα από την επίδραση παρατεταμένου ωσμωτικού στρες	63
2.7. Παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα	65
2.8. Μελέτη της έκφρασης δεικτών κυτταρικής γήρανσης σε επίπεδο RNA με την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR)	66
2.8.1. Απομόνωση και καθαρισμός του RNA των κυττάρων	67
2.8.2. Σύνθεση cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής	68
2.8.3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative Reverse-Transcription PCR, qRT-PCR)	69
2.9. Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των κυττάρων με ανάλυση Western	70
2.9.1. Απομόνωση πρωτεϊνών έπειτα από λύση των κυττάρων	71
2.9.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία θεικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS - PAGE)	71
2.9.3. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυβινυλοφθοριδίου	

(PVDF)	74
2.9.4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυβινυλοφθοριδίου (PVDF)	75
2.9.5. Απομάκρυνση των δεσμευμένων αντισωμάτων και επανυβριδισμός της μεμβράνης με νέα αντισώματα	77
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1. Επίδραση ωσμωτικού στρες στη βιωσιμότητα των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου με τις μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red	78
3.1.1. Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα	79
3.1.2. Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα	81
3.2. Επίδραση ωσμωτικού στρες στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	83
3.2.1. Το ωσμωτικό στρες μειώνει την αύξηση (%) του αριθμού των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	83
3.2.2. Το ωσμωτικό στρες μειώνει την ικανότητα σύνθεσης του DNA των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	87
3.3. Μελέτη της προαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες	93
3.3.1. Η επίδραση ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου δεν εμφανίζει θετική ειδική για τη γήρανση	93
3.3.2. Η παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες δεν οδηγεί σε πρόωρη γήρανση των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα	95
3.3.3. Η παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες δεν επηρεάζει τη δημιουργία αποικιών κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	97
3.4. Επίδραση ωσμωτικού στρες στην έκφραση γνωστών δεικτών κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου με την τεχνική qRT-PCR	99
3.4.1. Έκφραση δεικτών της κυτταρικής γήρανσης	99
3.5. Επίδραση ωσμωτικού στρες στην πρωτεϊνική έκφραση των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου	101

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	126
ABSTRACT	128

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μεσοσπονδύλιος δίσκος

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι αποτελούν ινο-χόνδρινες δομές, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ γειτονικών σπονδυλικών σωμάτων της σπονδυλικής στήλης (Εικόνα 1.1) (Shapiro et al., 2012; Vo et al., 2016). Κάθε δίσκος συμμετέχει στο σχηματισμό άρθρωσης, η οποία αφενός λειτουργεί ως ισχυρός σύνδεσμος μεταξύ των σπονδύλων, σταθεροποιώντας τη σπονδυλική στήλη (Buckwalter, 1995), αφετέρου, επιτρέπει ταυτόχρονα την κίνηση (κάμψη, έκταση και περιστροφή) των σπονδύλων, γεγονός που παρέχει στη σπονδυλική στήλη ευελιξία, ικανότητα απορρόφησης των κραδασμών που προκύπτουν κατά τις διάφορες δραστηριότητες του ατόμου και σωστή κατανομή του φορτίου σε αυτή (Buckwalter, 1995; Roberts et al., 2006; Vo et al., 2016). Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων, της σταθερότητας, της κινητικότητας, της ευκαμψίας, της ικανότητας απορρόφησης των κραδασμών και της κατανομής του φορτίου μετατρέπει τη σπονδυλική στήλη σε μοναδική λειτουργική κατασκευή, αναντικατάστατη στη φύση, καθιστώντας τον μεσοσπονδύλιο δίσκο σημαντικό λειτουργικό μόριό της.

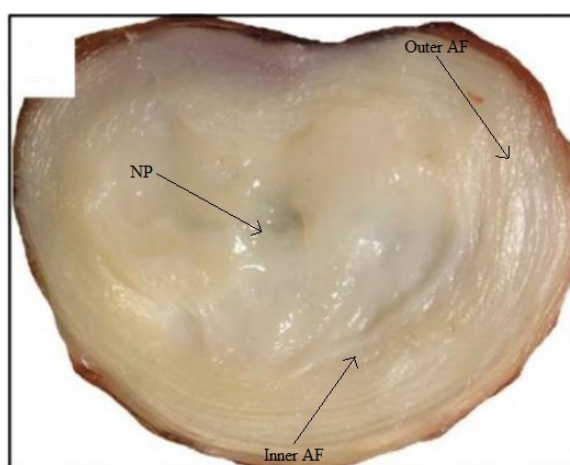


Εικόνα 1.1: Γραφική απεικόνιση της σπονδυλικής στήλης, στην οποία διακρίνονται τα σώματα των σπονδύλων και μεταξύ αυτών οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι

1.1.1. Δομή και σύσταση μεσοσπονδύλιου δίσκου

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος αποτελείται από τρεις συστατικούς ιστούς (Εικόνα 1.1.1.1): 1. τον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο (Outer Annulus Fibrosus), αποτελούμενο από ένα καλά οργανωμένο και πυκνά πακεταρισμένο δίκτυο ινών κολλαγόνου (Εικόνα 1.1.1.2 Α), 2. τη μεταβατική ζώνη, μια λεπτή ζώνη μεταξύ του εσωτερικού

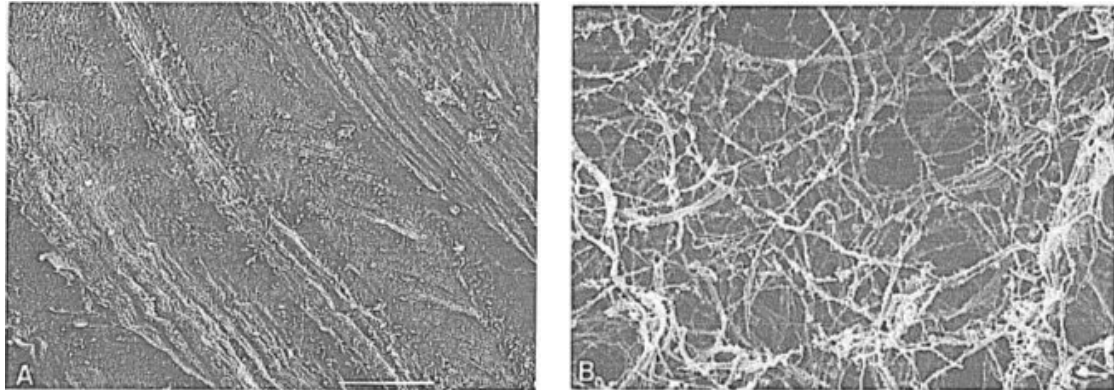
ινώδους δακτυλίου (Inner Annulus Fibrosus) και του πηκτοειδούς πυρήνα και 3. τον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα (nucleus pulposus), ένα ζελατινώδες τμήμα, αποτελούμενο από ένα χαλαρά οργανωμένο δίκτυο ινών κολλαγόνου (Εικόνα 1.1.1.2 B) (Buckwalter, 1982; Vo et al., 2016). Κάθε δίσκος συνδέεται με τους παρακείμενους σπονδύλους μέσω των χόνδρινων τελικών πλακών (Cartilaginous Endplates) (Vo et al., 2016), που συμβάλλουν στη διατροφή και αύξηση των σπονδυλικών σωμάτων (Roberts et al., 2006b). Οι ίνες κολλαγόνου εκτείνονται από το δακτύλιο προς τους γειτονικούς ιστούς, ενώνοντας αυτή την ινώδη δομή με τα σπονδυλικά σώματα και τις τελικές πλάκες (Roberts et al., 2006b).



Εικόνα 1.1.1.1: Εγκάρσια τομή μεσοσπονδύλιου δίσκου νεαρού ατόμου, όπου διακρίνονται ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος (Outer Annulus Fibrosus - Outer AF), ο εσωτερικός ινώδης δακτύλιος (Inner Annulus Fibrosus - Inner AF) και ο κεντρικός πηκτοειδής πυρήνας (Nucleus Pulposus - NP) (Vo et al., 2016)

Όπως κάθε συνδετικός ιστός έτσι και οι δίσκοι περιέχουν αραιό πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος αποτελεί περίπου το 1 % του συνολικού όγκου ενός δίσκου (Roberts et al., 2006b), και άφθονη εξωκυττάρια μήτρα, η οποία σχηματίζεται από ένα περίπλοκο δίκτυο μακρομορίων που περιβάλλεται από νερό (Buckwalter, 1995). Τα μακρομόρια αυτά, τα οποία αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με το νερό, συντίθενται από τα κύτταρα, τα οποία παράλληλα είναι υπεύθυνα και για τη σύνθεση των παραγόντων αποικοδόμησης των μακρομορίων της μήτρας. Τα κύτταρα διατηρούν και ανακατασκευάζουν το δίκτυο αυτό των μακρομορίων, του οποίου η σύνθεση και η αποικοδόμηση βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η δομική ακεραιότητα και οι μηχανικές ιδιότητες των δίσκων (Buckwalter, 1995) και τελικά η διατήρηση ενός υγιούς ιστού (Dimozi et al., 2015; Kouroumalis et al., 2018; Urban, 2002). Αδυναμία των κυττάρων να διατηρήσουν την ισορροπία αυτή, σε περιπτώσεις συνδυασμού μειωμένης σύνθεσης και

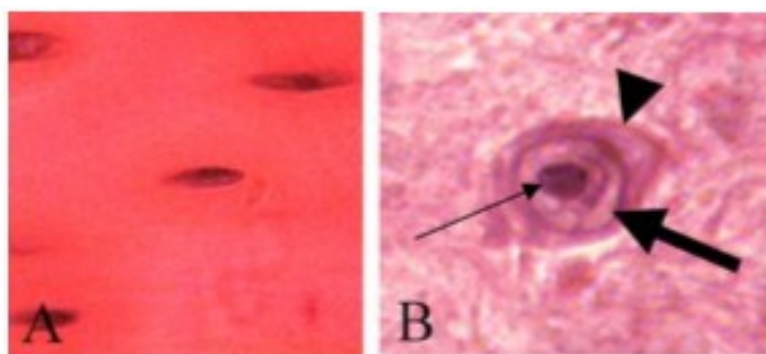
αυξημένης αποικοδόμησης, έχει ως συνέπεια την αποικοδόμηση της μήτρας και αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό της εκφύλισης των δίσκων (Le Maitre et al., 2004; Le Maitre et al., 2006; Le Maitre et al., 2007b; Roberts et al., 2006b).



Εικόνα 1.1.1.2: Εγκάρσια τομή ανθρώπινου μεσοσπονδύλιου δίσκου σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου διακρίνεται η οργάνωση και πυκνότητα των ινών κολλαγόνου Α) στον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο και Β) στον πηκτοειδή πυρήνα (Buckwalter, 1995)

Οι κυτταρικοί τύποι που έχουν παρατηρηθεί στο μεσοσπονδύλιο δίσκο ανήκουν σε δύο φαινοτυπικά διακριτούς πληθυσμούς (Chelberg et al., 1995). Ο εξωτερικός δακτύλιος περιέχει κύτταρα που μοιάζουν περισσότερο με τους ινοβλάστες, ενώ ο εσωτερικός δακτύλιος και η μεταβατική ζώνη περιέχουν κύτταρα που μοιάζουν περισσότερο στα χονδροκύτταρα (Buckwalter, 1982). Ο πυρήνας, από την άλλη, αρχικά περιέχει κύτταρα νωτοχορδιακής προέλευσης, τα οποία εξαφανίζονται κατά την έναρξη της ενήλικης ζωής του ανθρώπου (Buckwalter, 1982; Trout et al., 1982a; Trout et al., 1982b). Έτσι ο πυρήνας των ανθρώπινων μεσοσπονδύλιων δίσκων αποτελείται εξ' ολοκλήρου από κύτταρα που μοιάζουν με χονδροκύτταρα (Buckwalter, 1982; Trout et al., 1982a; Trout et al., 1982b). Τα κύτταρα των πλακών μοιάζουν επίσης με χονδροκύτταρα (Buckwalter, 1995). Από ιστολογικής απόψεως, τα κύτταρα του εξωτερικού ινώδους δακτυλίου εμφανίζονται πιο επιμηκυμένα (Εικόνα 1.1.1.3 Α), ενώ τα κύτταρα του εσωτερικού ινώδους δακτυλίου και του πυρήνα έχουν πιο σφαιρική μορφή (Εικόνα 1.1.1.3 Β) (Roberts et al., 2006b).

Κύρια δομικά και λειτουργικά στοιχεία του μακρομοριακού δικτύου της μήτρας του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι τα μόρια κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών (Eyre et al., 1989). Τα μόρια κολλαγόνου προσδίδουν στον ιστό δύναμη και αντοχή εφελκυσμού στους κραδασμούς, ενώ επίσης εξασφαλίζουν για το δίσκο την αναγκαία ελαστικότητα, ώστε να λειτουργεί ως άρθρωση. Οι



Εικόνα 1.1.1.3: Φωτογραφίες μικροσκοπίου Α) κυττάρων του εξωτερικού ινώδους δακτυλίου και Β) του κεντρικού πηκτοειδούς πυρήνα και των τελικών πλακών. Στην εικόνα Α τα κύτταρα είναι περισσότερο πολικά και επιμηκυμένα, ενώ στην εικόνα Β τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα (λεπτό βέλος) είναι περισσότερο στρογγυλεμένα και συχνά εγκλείονται μέσα σε μια κάψουλα (έντονο μαύρο βέλος), η οποία μπορεί να περιτριγυρίζεται από εμφανή περικυττάρια μήτρα (κεφαλή βέλους) (Roberts et al., 2006b)

πρωτεογλυκάνες, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με το νερό, παρέχουν τη σκληρότητα και την ανθεκτικότητα του ιστού στη συμπίεση, ενώ μαζί με το κολλαγόνο πρωταγωνιστούν στη διατήρηση της ενυδάτωσης του δίσκου. Βέβαια, το ποσοστό των δύο αυτών ειδών μορίων διαφέρει ανάμεσα στα τέσσερα είδη ιστού που εντοπίζονται στο μεσοσπονδύλιο δίσκο (Buckwalter, 1982; Eyre et al., 1989). Συγκεκριμένα, τα μόρια κολλαγόνου αποτελούν το 70 % του ξηρού βάρους του εξωτερικού δακτυλίου, αλλά λιγότερο από το 20 % του ξηρού βάρους του κεντρικού πυρήνα στα νεαρά άτομα. Αντίθετα, οι πρωτεογλυκάνες αποτελούν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του ξηρού βάρους του εξωτερικού δακτυλίου, αλλά το 50 % του ξηρού βάρους του πυρήνα, επίσης σε νεαρές ηλικίες.

Στις διακριτές αυτές περιοχές του μεσοσπονδύλιου δίσκου ποικίλλουν, επίσης, και οι τύποι κολλαγόνου που συμμετέχουν στο σχηματισμό του μακρομοριακού δικτύου της μήτρας (Πίνακας 1.1.1) (Buckwalter, 1995). Η πυκνή μήτρα του εξωτερικού δακτυλίου αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από εξαιρετικά οργανωμένα ινίδια κολλαγόνου τύπου Ι (σχεδόν το 80 % του συνολικού κολλαγόνου του ιστού), καθώς και από μικρά ποσά ινών κολλαγόνου τύπου V (σχεδόν το 3 % του συνολικού κολλαγόνου). Αντίθετα, ο πυρήνας αποτελείται από χαλαρά οργανωμένα ινίδια κολλαγόνου τύπου ΙΙ, καθώς και ελαστίνης, που εγκλείουν την πρωτεογλυκάνη αγγρεκάνη (Vo et al., 2016), της οποίας η συγκέντρωση είναι αρκετά υψηλή στον πυρήνα. Στον πυρήνα η συγκέντρωση του κολλαγόνου τύπου ΙΙ φτάνει το 80 %, ενώ ο τύπος Ι απουσιάζει (Buckwalter, 1995). Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι συγκεντρώσεις του κολλαγόνου τύπου ΙΙ και των πρωτεογλυκανών προοδευτικά αυξάνονται προς το κέντρο του δίσκου, ενώ η συγκέντρωση του

κολλαγόνου τύπου I μειώνεται. Ο πυρήνας επίσης περιέχει μικρά ποσά κολλαγόνου τύπου XI (περίπου 3 %), ενώ τόσο ο πυρήνας όσο και ο δακτύλιος περιέχουν μικρά ποσά (λιγότερο από 2 %) κολλαγόνου τύπου IX (Buckwalter, 1995). Επιπλέον, οι δίσκοι περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις κολλαγόνου τύπου VI και πιο συγκεκριμένα περίπου 10 % αυτού περιέχεται στο δακτύλιο και 15 % ή περισσότερο στον πυρήνα (Buckwalter, 1995).

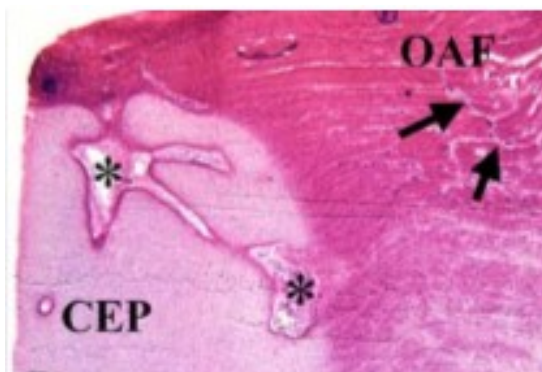
Πίνακας 1.1.1: Κατανομή των διαφόρων τύπων κολλαγόνου στο μεσοσπονδύλιο δίσκο
(Buckwalter, 1995)

Τύπος κολλαγόνου	Κατανομή	Ποσοστό συνολικού κολλαγόνου (%)
I	Εξωτερικός και εσωτερικός ινώδης δακτύλιος, μεταβατική ζώνη	Μείωση από το 80% έως το 0% από τον εξωτερικό δακτύλιο προς τον πυρήνα
II	Πυρήνας, Μεταβατική ζώνη, Εσωτερικός δακτύλιος	Αύξηση από το 0% έως το 80% από τον εξωτερικό δακτύλιο προς τον πυρήνα
III	Πιθανά ίχνη κατά μήκος του δίσκου	
V	Εξωτερικός και εσωτερικός δακτύλιος	Περίπου 3%
XI	Πυρήνας	Περίπου 3%
VI	Δακτύλιος, Πυρήνας	Περίπου 10%, Περισσότερο από 15%
IX	Σε όλο το μήκος του δίσκου	2% ή λιγότερο

Η διαφορετική, λοιπόν, σύσταση των διακριτών περιοχών του μεσοσπονδύλιου δίσκου φανερώνει και το διαφορετικό τους ρόλο στον ιστό. Κύριος ρόλος του ινώδους δακτυλίου είναι να απορροφά τις μηχανικές πιέσεις που δημιουργούνται από τον κεντρικό πυρήνα κατά την κάμψη και τη συστροφή (Vo et al., 2016). Επίσης, το πυκνό δίκτυο των ινών κολλαγόνου του δακτυλίου είναι απαραίτητο για την πρόσφυση του ιστού στο οστό (Bibby et al., 2001). Αντίθετα, ο κεντρικός πυρήνας λειτουργεί κυρίως με σκοπό την εξουδετέρωση και ομαλή κατανομή των δυνάμεων συμπίεσης που υφίσταται, ενώ ταυτόχρονα η σύστασή του εξασφαλίζει την ενυδάτωση του δίσκου (Bibby et al., 2001; Roughley and Alini, 2002; Vo et al., 2016). Η μεγάλη σημασία του μεσοσπονδύλιου δίσκου έγκειται στο διαχωρισμό και στην κατανομή (μεταβίβαση και απορρόφηση) αυτών των φορτίων, με τέτοιο τρόπο ώστε να μην προκαλείται βλάβη στο υποκείμενο σπονδυλικό σώμα αλλά και να διατηρείται η σταθερότητα της κίνησης (Wang et al., 2007).

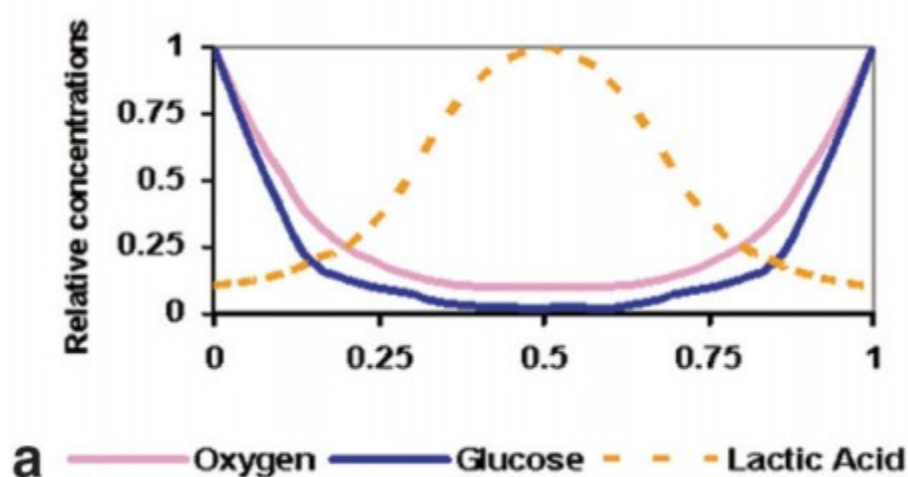
1.1.2. Φυσικοχημικό περιβάλλον μεσοσπονδύλιου δίσκου

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος αποτελεί τον μεγαλύτερο μη-αγγειούμενο ιστό του σώματος, με αποτέλεσμα τα κύτταρα του δίσκου, και ιδιαίτερα αυτά του πηκτοειδούς πυρήνα, να βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από την πηγή θρέψης τους (Roberts et al., 2006b). Παρόλο που κατά τη γέννηση οι τελικές πλάκες και ο ινώδης δακτύλιος διαθέτουν αγγείωση (Εικόνα 1.1.2.1), πολύ σύντομα μετά τη γέννηση, τα αγγεία γεμίζουν με εξωκυττάρια μήτρα, με αποτέλεσμα την έλλειψη αγγείων κατά την ενήλικη ζωή (Roberts et al., 2006b). Λόγω της μειωμένης παροχής αίματος, κι επομένως θρεπτικών στοιχείων και οξυγόνου στον ιστό, και ιδιαίτερα στον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα, ο εξωτερικός δακτύλιος τροφοδοτείται από τα αιμοφόρα αγγεία που περιβάλλουν την περιφέρεια του δίσκου, ενώ ο πυρήνας και ο εσωτερικός δακτύλιος τροφοδοτούνται με θρεπτικά στοιχεία μέσω τριχοειδικών φαινομένων (Urban, 2002). Η θρέψη των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου βασίζεται στην ικανότητα των θρεπτικών στοιχείων και των μεταβολιτών να κινούνται διαμέσου της μήτρας και να διατίθενται μέσω διάχυσης στα κύτταρα από τα εγγύς αιμοφόρα τριχοειδή αγγεία των τελικών πλακών και της περιφέρειας του ινώδους δακτυλίου (Buckwalter, 1995; Urban et al., 2004). Η μετακίνηση αυτή σχετίζεται με τη σύσταση και την οργάνωση του μακρομοριακού δικτύου, καθώς και με την ποσότητα του νερού στη μήτρα, τα οποία καθορίζονται κυρίως από τη συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών (Urban, 1993). Εξαιτίας της περιορισμένης παροχής θρεπτικών στοιχείων και του αραιού πληθυσμού των κυττάρων στους δίσκους, αυτοί καθίστανται ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε τραυματισμούς αλλά και στη γήρανση, μέσω της συσσώρευσης βλαβών στους ιστούς τους.



Εικόνα 1.1.2.1: Ιστολογική τομή εξωτερικού ινώδους δακτυλίου (Outer Annulus Fibrosus - OAF) και χόνδρινης τελικής πλάκας (Cartilaginous Endplate) νεογνού, όπου διακρίνονται τα αγγεία (βέλη) και τα αγγειακά κανάλια (αστερίσκοι) (Roberts et al., 2006b)

Λόγω της απουσίας αιμάτωσης και κατά συνέπεια της χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, ο μεταβολισμός του δίσκου πραγματοποιείται κυρίως μέσω γλυκόλυσης. Επομένως, στο δίσκο, και ιδιαίτερα στον πηκτοειδή πυρήνα, παράγονται υψηλά ποσοστά γαλακτικού οξέος, δημιουργώντας μια κλίση με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού προς τον πηκτοειδή πυρήνα (Holm et al., 1981). Ωστόσο, το οξυγόνο και η γλυκόζη καταναλώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι διαχέονται σε αυτόν, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αντίθετη κλίση στη συγκέντρωσή τους (Εικόνα 1.1.2.2) (Maroudas et al., 1975; Urban and Winlove, 2007). Η αύξηση αυτή του γαλακτικού οξέος και η ταυτόχρονη μείωση του οξυγόνου και της γλυκόζης προς το κέντρο έχουν ως συνέπεια τη μείωση του pH προς το κέντρο του πηκτοειδούς πυρήνα, τη δημιουργία δηλαδή όξινου περιβάλλοντος.



Εικόνα 1.1.2.2: Σχηματική αναπαράσταση της κλίσης των συγκεντρώσεων οξυγόνου, γλυκόζης και γαλακτικού οξέος κατά μήκος του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Κατά μήκος του δίσκου παρατηρείται αντίθετη κλίση της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της γλυκόζης συγκριτικά με αυτή της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος, η οποία καθορίζεται από τα υψηλά επίπεδα παραγωγής γαλακτικού οξέος και την υψηλή κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα (Urban and Winlove, 2007)

Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, τα κύτταρα του δίσκου είναι βυθισμένα σε πυκνή μήτρα, όπου η συγκέντρωση της αγγρεκάνης είναι υψηλή. Η υψηλή της συγκέντρωση αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που ρυθμίζουν το φυσικοχημικό περιβάλλον του δίσκου, καθώς μέσω των αρνητικά φορτισμένων ομάδων στις αλυσίδες της γλυκοζαμινογλυκάνης (GAG) της, συμβάλλει στο υψηλό αρνητικό φορτίο της μήτρας του δίσκου (Maroudas et al., 1969). Η διατήρηση της ισορροπίας του φορτίου επιτυγχάνεται με μετακίνηση των ιόντων μεταξύ του εσωτερικού των κυττάρων και της εξωκυττάριας μήτρας. Συνεπώς, στο εξωκυττάριο περιβάλλον του δίσκου η συγκέντρωση των κατιόντων είναι υψηλή, ενώ αυτή των

ανιόντων είναι χαμηλή. Χαρακτηριστικά, η συγκέντρωση νατρίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον του πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου είναι 2,8-3,8 φορές υψηλότερη από αυτή στο εσωτερικό των κυττάρων (Urban and Maroudas, 1979).

Το αρνητικό φορτίο της μήτρας, και ως εκ τούτου η υψηλή συγκέντρωση των κατιόντων του δίσκου, καθορίζουν την ωσμωμοριακότητα, η οποία είναι υψηλότερη συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς (Urban and Maroudas, 1979; Urban, 2002). Πιο συγκεκριμένα, η ωσμωμοριακότητα αυξάνεται απότομα από τον εξωτερικό δακτύλιο προς τον πηκτοειδή πυρήνα (Urban and Maroudas, 1979). Τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου, μάλιστα, υφίστανται συνεχώς ωσμωτικές διακυμάνσεις, οι οποίες οφείλονται στη χημική σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας, στη στάση του σώματος και στο μηχανικό φορτίο που ασκείται στον ιστό κατά τη διάρκεια των καθημερινών δραστηριοτήτων του ατόμου (Urban, 2002). Η ωσμωμοριακότητα του μεσοσπονδύλιου δίσκου μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 550 mOsm / kg H₂O στο τέλος της ημέρας, μέσω σταδιακής απώλειας νερού από το δίσκο λόγω της υψηλής υδροστατικής πίεσης, σε αντίθεση με τους περισσότερους ιστούς όπου η ωσμωμοριακότητα είναι σταθερή στα 300 mOsm / kg H₂O (Urban, 2002). Ωστόσο, τα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχουν αναπτύξει μια φυσιολογική ανοχή στην υπερωσμωμοριακότητα, μέσω ενός μηχανισμού που αντισταθμίζει τις επιβλαβείς συνέπειές της (Mavrogenatou and Kletsas, 2011). Η οξεία υπερτονικότητα οδηγεί σε συρρίκνωση των κυττάρων και συσσώρευση μακρομορίων που προκαλείται με την έξοδο νερού από αυτά και ακολούθως σε αύξηση των ενδοκυτταρικών ανόργανων ιόντων. Η αποκατάσταση του όγκου των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω του φυσιολογικού μηχανισμού της εισροής ιόντων διαμέσου των μεμβρανικών καναλιών και της παθητικής εισόδου νερού, οδηγώντας σε υψηλή ενδοκυτταρική ιοντική ισχύ που διαταράσσει τη λειτουργία των πρωτεϊνών και του DNA. Η κυτταρική ομοιοστασία αποκαθίσταται τελικά μετά από τη σύνθεση ή την πρόσληψη οργανικών ωσμωλυτών από τα κύτταρα (Alfieri και Petronini, 2007).

Το αρνητικό φορτίο του δίσκου επηρεάζει επίσης και την ενυδάτωση αυτού, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ωσμωμοριακότητα (Urban and McMullin, 1985). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν το φορτίο είναι υψηλό, κάτι που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ημέρας, πραγματοποιείται εκροή νερού από τον δίσκο, ενώ τη νύχτα, κατά την οποία το φορτίο είναι χαμηλό, ο ιστός ενυδατώνεται με είσοδο νερού (Boos et al., 2002). Ως αποτέλεσμα αυτών των διακυμάνσεων της ενυδάτωσης

του ιστού, η ωσμωμοριακότητα του πηκτοειδούς πυρήνα μεταβάλλεται από 450-550 mOsm / kg H₂O (Urban, 2002).

1.2. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως μια μη-αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, παρόλο που παύουν πλέον να διαιρούνται, παραμένουν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά (Blagosklonny, 2003), ενώ, επίσης, συνεχίζουν να αποκρίνονται στα ερεθίσματα του ιστού για μεγάλο διάστημα μετά την έναρξη της γήρανσης (Baker et al., 2011). Η γήρανση διαφοροποιείται από την προσωρινή έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο, γνωστή ως κατάσταση ηρεμίας (G0), από το γεγονός ότι κατά τη γήρανση τα κύτταρα δεν δύνανται να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο (Campisi, 1997). Η κυτταρική γήρανση αποτελεί, μεταξύ άλλων, έναν μέγιστης σημασίας ογκοκατασταλτικό μηχανισμό των ευκαρυωτικών κυττάρων, ο οποίος παρεμποδίζει τη μεγάλης έκτασης γενωμική αστάθεια στα κύτταρα που εκτίθενται στο γενοτοξικό στρες (Coppe et al., 2010). Υπάρχουν δύο τύποι κυτταρικής γήρανσης, η αναπαραγωγική γήρανση (replicative senescence) και η πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες γήρανση (Stress-Induced Premature Senescence - SIPS) (Roberts et al., 2006a).

1.2.1. Αναπαραγωγική γήρανση

Πρώτος ο Hayflick ήταν αυτός που περιέγραψε τον όρο της αναπαραγωγικής γήρανσης πριν από περίπου 60 χρόνια σε καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών, ως τη διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα εμφανίζουν σταδιακή μείωση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας, όταν καλλιεργούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα (Hayflick and Moorhead, 1961). Μάλιστα, όρισε και ένα όριο, πάνω από το οποίο τα κύτταρα παύουν εντελώς να πολλαπλασιάζονται, το οποίο ονόμασε «όριο Hayflick» και το οποίο ισούται με περίπου 50 - 70 κυτταρικές διαιρέσεις στα ανθρώπινα κύτταρα. Τα περισσότερα φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν ορισμένο εύρος ζωής και παρουσιάζουν σταδιακά μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα, μέσω της διαδικασίας της αναπαραγωγικής γήρανσης (Campisi, 1997). Εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα της γαμετικής σειράς και τα βλαστοκύτταρα, καθώς και τα καρκινικά, τα οποία πολλαπλασιάζονται αέναα (Campisi, 1997).

Ο μηχανισμός της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που σχετίζεται με την κυτταρική αναπαραγωγική γήρανση πιθανότερα σχετίζεται με τη μείωση του μήκους των τελομερών (Campisi, 1997; Harley et al., 1990). Πιο

συγκεκριμένα, αναπαραγωγική γήρανση προάγεται από τη μείωση του μήκους των τελομερών, η οποία συσσωρεύεται καθώς τα κύτταρα υφίστανται επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις (Campisi, 1997; Chiu and Harley, 1997). Τα τελομερή αποτελούν τα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων, αποτελούμενα από τη γραμμική αλληλουχία TTAGGG σε όλα τα σπονδυλόζωα και από εξειδικευμένες πρωτεΐνες (Campisi, 1997). Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται πάνω στην τελομερική αλληλουχία, σχηματίζοντας μια δομή, η οποία είναι απαραίτητη για την προστασία του ευκαρυωτικού γονιδιώματος (Blackburn, 1991). Επειδή οι DNA πολυμεράσες είναι μονής κατεύθυνσης και απαιτούν έναν αρχικό εκκινητή προκειμένου να ξεκινήσουν την αντιγραφή, σε κάθε κύκλο αναδιπλασιασμού η DNA πολυμεράση αφήνει κάποιες βάσεις από το τέλος του τελομερούς εκτός αντιγραφής (Blackburn, 1991; Harley, 1991; Levy, 1992; Shay, 1991). Το μήκος των τελομερών μπορεί να διατηρηθεί από την ενεργότητα της τελομεράσης, ενός ενζύμου το οποίο προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις στα άκρα των χρωμοσωμάτων με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο *de novo* (Blackburn, 1992). Ωστόσο, η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα τελομερή να μειώνονται σε μήκος σε κάθε κύκλο αντιγραφής (Campisi, 1997). Ο μηχανισμός αυτός μείωσης του μήκους των τελομερών αποτελεί έναν μηχανισμό των κυττάρων μέτρησης και αντίληψης του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων (Harley, 1991; Levy, 1992; Shay, 1991).

Από ένα κρίσιμο σημείο και έπειτα η μείωση αυτή των τελομερών γίνεται αντιληπτή από τα κύτταρα ως βλάβη του DNA, ενεργοποιώντας έτσι μια κλασική απόκριση των κυττάρων σε βλάβες του DNA (DNA Damage Response - DDR), η οποία χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού ATM-Chk2-p53-p21^{WAF1} που οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb και συνεπώς στην ανικανότητα των κυττάρων να μεταβούν από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Έτσι γίνεται αντιληπτό ότι, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διαιρέσεων ενός κυττάρου, τόσο πιο γρήγορα επέρχεται η γήρανση. Πράγματι, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα γηρασμένα ανθρώπινα κύτταρα έχουν μικρότερα τελομερή από τα αντίστοιχα νεαρά (Harley, 1991). Ειδικότερα, σε ανθρώπινους ινοβλάστες σε καλλιέργεια *in vitro* έχει υπολογιστεί ότι σε κάθε κύκλο αντιγραφής τα τελομερή μειώνονται κατά 50 ζεύγη βάσεων (Allsopp, 1992; Levy, 1992).

1.2.2. Πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες γήρανση

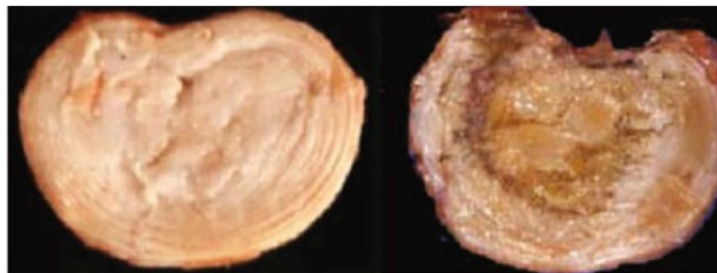
Η πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες γήρανση (SIPS) έρχεται ως αποτέλεσμα, όπως προκύπτει και από το όνομά της, διαφόρων στρεσογόνων και γενοτοξικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η ιονίζουσα ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες (ενεργές ρίζες οξυγόνου) (Chen et al., 1995; Homma et al., 1994), το μηχανικό φορτίο (Martin et al. 2004) και οι κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1 (Dai et al., 2006), καθώς και μιτογόνα, ογκογονικές και τοξικές ενώσεις (McConnell et al., 1999). Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την υπέρ-ενεργοποίηση ογκογονιδίων, τα οποία επάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προκειμένου λοιπόν να αποφευχθεί η καρκινογένεση, τα κύτταρα οδηγούνται σε πρόωρη γήρανση, μέσω ενός μηχανισμού που περιγράφεται παρακάτω (Han and Sun, 2007).

Ο μηχανισμός της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης περιλαμβάνει δύο στάδια-βασικές προϋποθέσεις προκειμένου να επαχθεί η γήρανση των κυττάρων. Αυτά είναι η διέγερση σχετικών μονοπατιών ως απόκριση στην αυξημένη παρουσία είτε ενδογενών είτε εξωγενών μιτογονικών ερεθισμάτων στο περιβάλλον των κυττάρων, καθώς και η αναστολή, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω αύξησης της έκφρασης των αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors - CKIs), της λειτουργικότητας των G1 κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (G1-Cyclin-Dependent Kinase- G1-CDK), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μετάβαση των κυττάρων από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Blagosklonny, 2003).

1.3. Γήρανση και εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι φαίνεται να εμφανίζουν χαρακτηριστικά γήρανσης και εκφύλισης νωρίτερα συγκριτικά με άλλους ιστούς (Εικόνα 1.3) (Boos et al., 2002; Miller et al., 1988; Roberts et al., 2006a). Η ιδιαιτερότητά τους αυτή οφείλεται πιθανόν στην επίδραση των πολλαπλών στρεσογόνων παραγόντων στους οποίους εκτίθενται οι δίσκοι. Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε ενδογενείς, οι οποίοι οφείλονται στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές συνθήκες του ιστού που περιγράφηκαν προηγουμένως (§ 1.1.2 - μειωμένη αγγείωση, μειωμένη παροχή θρεπτικών, υποξία, μειωμένο pH, αφυδάτωση, αυξημένη ωσμωμοριακότητα), είτε εξωγενείς (μηχανικό στρες, ακτινοβολία, οξειδωτικό στρες). Βάσει ερευνών, κανένα άλλο συστατικό της σπονδυλικής στήλης ή μυοσκελετικός ιστός δεν υφίσταται πιο δραματικές αλλαγές με την αύξηση της ηλικίας, συγκριτικά με αυτές που υφίστανται οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι (Buckwalter, 1982; Buckwalter, 1993).

Οι αλλαγές που υφίστανται οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στον όγκο και στο σχήμα (Zhao et al., 2007), στη δομή και στη σύσταση των δίσκων (Buckwalter, 1995), καθώς και αλλαγές που αφορούν τη βιολογική και βιοχημική βάση των κυττάρων (Vo et al., 2016).



Εικόνα 1.3: Εγκάρσια τομή φυσιολογικού (αριστερά) και εκφυλισμένου (δεξιά) οσφυϊκού μεσοσπονδύλιου δίσκου. Στο φυσιολογικό δίσκο είναι σαφή τα όρια μεταξύ του ινώδους δακτυλίου και του πηκτοειδούς πυρήνα. Στον εκφυλισμένο δίσκο ο πηκτοειδής πυρήνας έχει αφυδατωθεί και ο δακτύλιος έχει αποδιοργανωθεί (Urban and Roberts, 2003).

1.3.1. Αλλαγές σχετιζόμενες με την ηλικία στη δομή και τη σύσταση των δίσκων

Το μέγεθος και το σχήμα των μεσοσπονδύλιων δίσκων αλλάζει αφενός με την ανάπτυξη και αφετέρου με τη σκελετική ωριμότητα. Μετά τη γέννηση οι δίσκοι αυξάνονται σε ύψος και διάμετρο, ενώ μετά τη σκελετική ωριμότητα μειώνονται σε ύψος και παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά, όπως η κάμψη και διόγκωση του δακτυλίου και η προεξοχή του κεντρικού δίσκου προς τα σπονδυλικά σώματα (Buckwalter, 1982).

Οι αλλαγές στο μέγεθος και στο σχήμα των δίσκων συνοδεύονται από αλλαγές στη δομή και στη σύνθεση του ιστού των δίσκων (Buckwalter, 1995). Οι αλλαγές μάλιστα στην οργάνωση των πρωτεογλυκανών και στη συγκέντρωση του νερού ξεκινούν κατά την ανάπτυξη, πολύ πριν από την εμφάνιση των πρώτων ενδείξεων εκφύλισης των δίσκων. Αυτές οι αλλαγές βέβαια μπορεί να αποτελέσουν τη βάση γι' αυτές που θα συμβούν κατά τη σκελετική ωριμότητα. Οι εκτενέστερες αλλαγές, ωστόσο, παρατηρούνται στον πηκτοειδή πυρήνα των δίσκων, όπου ο αριθμός των κυττάρων, η συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών και του νερού μειώνονται, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και θρυμματισμός των συσσωματωμένων πρωτεογλυκανών (Buckwalter, 1982; Buckwalter et al., 1985; Buckwalter et al., 1994; Eyre et al., 1989). Όλες αυτές οι αλλαγές στο μέγεθος, στο σχήμα, στη δομή και στη σύσταση ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών ατόμων αλλά και μεταξύ των δίσκων (Buckwalter, 1995).

Άλλες μελέτες αναφέρουν και κάποιες ιστομορφολογικές αλλαγές των μεσοσπονδύλιων δίσκων κατά τη γήρανση και την εκφύλισή τους (Zhao et al., 2007). Κατά την εκφύλιση του δίσκου ο πηκτοειδής πυρήνας γίνεται πιο ινώδης, καθώς η περιεκτικότητά του σε πρωτεογλυκάνη και η ενυδάτωσή του μειώνονται με την ηλικία, οδηγώντας στη δημιουργία ρωγμών στον ιστό, καθώς και σε προοδευτική μείωση του μεγέθους και του ύψους του δίσκου (Kumaresan et al., 2000; Prescher, 1998). Συνήθως μετά την ηλικία των 40 ετών, η διαυγής και ζελατινώδης υφή του πηκτοειδούς πυρήνα μετασχηματίζεται σε κίτρινη, λόγω της εναπόθεσης λιποφουσκίνης, η οποία προκύπτει από την αργή υπεροξειδωση των λιπιδίων (Hormel and Eyre, 1991). Εκτός της ίνωσης του πηκτοειδούς πυρήνα, ιστομορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι η αποδιοργάνωση των ελασμάτων του ινώδους δακτυλίου και η λέπτυνση και ασβεστοποίηση των τελικών πλακών (Ishii et al., 1991; Thompson et al., 1990; Yasuma et al., 1990). Όλες αυτές οι αλλαγές είναι συνέπειες της αναδιαμόρφωσης του ιστού η οποία πραγματοποιείται από τα κύτταρα του δίσκου (Adams and Roughley, 2006).

Μηχανισμοί που φαίνεται να συνεισφέρουν σε αυτές τις αλλαγές που υφίστανται οι δίσκοι (Buckwalter, 1995) περιλαμβάνουν τη διατροφή μειωμένης θρεπτικής αξίας, τον αραιό κυτταρικό πληθυσμό, την κυτταρική γήρανση, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών της μήτρας, τη συσσωμάτωση των μακρομορίων της μήτρας (Buckwalter, 1993) και αλλαγές στην εξωκυττάρια μήτρα.

1.3.2. Βιολογικές αλλαγές των κυττάρων κατά τη γήρανση και την εκφύλιση των δίσκων

Οι βιολογικές αλλαγές των κυττάρων περιλαμβάνουν την αλλαγή του κυτταρικού τύπου, της κυτταρικής πυκνότητας, του κυτταρικού θανάτου και πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής γήρανσης και του κυτταρικού φαινοτύπου (Zhao et al., 2007).

Σε κάθε μεσοσπονδύλιο δίσκο εντοπίζονται διάφοροι τύποι κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, οι τελικές χόνδρινες πλάκες, όπως και άλλοι χόνδροι, αποτελούνται από χονδροκύτταρα (Maroudas et al., 1975). Όπως έχει ήδη αναφερθεί νωρίτερα, στον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο εντοπίζονται επιμήκη κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες, ενώ αντίθετα στην εσωτερική περιοχή του δακτυλίου και στον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα τα κύτταρα είναι περισσότερο στρογγυλεμένα και μοιάζουν με χονδροκύτταρα (Buckwalter, 1995). Ωστόσο, τα κύτταρα του πυρήνα είναι τα μόνα στον μεσοσπονδύλιο δίσκο που υφίστανται μεταβολή του κυτταρικού τύπου σε πρώιμες ηλικίες, ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν σχετικά αμετάβλητα (Zhao et al., 2007). Τα κύτταρα νωτοχορδιακής προέλευσης, που πιθανολογείται ότι αποτελούν πρόδρομα των κυττάρων του πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου, μειώνονται ταχέως μετά τη γέννηση του ανθρώπου, ενώ είναι εντελώς μη ανιχνεύσιμα στις ηλικίες μεταξύ 4-10 ετών (Pazzaglia et al., 1989; Wolfe et al., 1965). Η περιοχή του πυρήνα σταδιακά καλύπτεται από κύτταρα που μοιάζουν με χονδροκύτταρα, τα οποία πιστεύεται ότι μεταναστεύουν από τις τελικές χόνδρινες πλάκες και την εσωτερική περιοχή του δακτυλίου (Zhao et al., 2007). Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ότι τα πρώτα δείγματα εκφύλισης των δίσκων στον άνθρωπο υπάρχουν ήδη από την παιδική ηλικία (Phelip, 1999), όταν δηλαδή συμβαίνει η εξαφάνιση των νωτοχορδιακών κυττάρων στον πηκτοειδή πυρήνα. Επιπλέον, σχετικές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα νωτοχορδιακά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του υγρού ζελατινώδους πυρήνα (Cappello et al., 2006), κι επομένως η αντικατάστασή τους από χονδροκύτταρα οδηγεί στο μετασχηματισμό του πυρήνα από υγρό και ζελατινώδη σε χόνδρινο στερεό.

Όπως αναφέρθηκε πιο πριν, ο κυτταρικός πληθυσμός του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι αραιός, με ανεπαρκή παροχή θρεπτικών συστατικών (Maroudas et al., 1975). Ωστόσο τα κύτταρα αυτά διατηρούν το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και επομένως η πυκνότητά τους δεν παραμένει αμετάβλητη. Σύμφωνα με έρευνες, στον ανθρώπινο μεσοσπονδύλιο δίσκο ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται κυματοειδώς

και όχι γραμμικά κατά την εκφύλισή του (Zhao et al., 2007). Ιδιαίτερα ο πληθυσμός των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα φαίνεται να μειώνεται κατά την εκφύλιση του δίσκου (Buckwalter and Martin, 1996). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται από την παρατήρηση της αισθητά μειωμένης κυτταρικής πυκνότητας, συνοδευόμενης από χαρακτηριστικά πρόωρης εκφύλισης, όπως μειωμένη ενυδάτωση, σε δίσκους που απομονώθηκαν από εφήβους με σκολίωση (Urban et al., 2001a).

Εδώ και πολύ καιρό αναγνωρίζεται από την επιστημονική κοινότητα ότι υπάρχει συνεχής αύξηση του κυτταρικού θανάτου κατά τη γήρανση και την εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Boos et al., 2002; Gruber and Hanley, 1998; Trout et al., 1982a). Η επιβίωση των κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου, και ειδικότερα αυτών της εσωτερικής περιοχής του δακτυλίου και αυτών του πυρήνα, βασίζεται κυρίως στη διάχυση των θρεπτικών στοιχείων από τις τελικές χόνδρινες πλάκες (O' Hare et al., 1991; Urban et al., 2001b). Λόγω της εξάλειψης των αιμοφόρων αγγείων στην τελική χόνδρινη πλάκα κατά την παιδική ηλικία και της μείωσης του πάχους των πλακών και την ασβεστοποίηση κατά τη γήρανση (Bernick and Cailliet, 1982), η παροχή θρεπτικών συστατικών στο μεσοσπονδύλιο δίσκο γίνεται πιο δύσκολα (Roberts et al., 1996) και τελικά επηρεάζεται αρνητικά η βιωσιμότητά του (Bibby et al., 2002; Horner and Urban, 2001). Η μειωμένη αγγείωση του δίσκου μπορεί να συμβάλλει, επιπλέον, και στη συσσώρευση παραπροϊόντων του μεταβολισμού και τελικά σε ένα ολοένα και πιο όξινο περιβάλλον ($\text{pH} = 6,3 - 6,6$), που μαζί με άλλους στρεσογόνους παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την κυτταρική λειτουργία (Bibby et al., 2005), και τελικά να συμβάλουν στην εμφάνιση χαρακτηριστικών εκφύλισης και γήρανσης. Εκτός όμως από τις φυσιολογικές αυτές διαδικασίες, μη φυσιολογικές καταπονήσεις της σπονδυλικής στήλης οδηγούν, επίσης, στην αύξηση του κυτταρικού θανάτου στους δίσκους (Ariga et al., 2001; Court et al., 2001; Lotz et al., 1998; Lotz and Chin, 2000; Rannou et al., 2004; Walsh et al., 2004).

Όπως έχει προαναφερθεί, ως γήρανση χαρακτηρίζεται η μη-αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, παρόλο που παύουν πλέον να διαιρούνται, παραμένουν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά. (Blagosklonny, 2003). Ήδη εδώ και αρκετά χρόνια έχει τεθεί η υπόθεση ότι η κυτταρική γήρανση πιθανώς να συμβάλλει στη γήρανση και στην εκφύλιση του δίσκου (Buckwalter, 1995). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά το 2006 σε συνεργασία με το εργαστήριό μας (Roberts et al., 2006a), όταν δείχθηκε η

θετική χρώση β-γαλακτοσιδάσης, η οποία αποτελεί βιοδείκτη γήρανσης, σε κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου ανθρώπου που έπασχε από κήλη, και εδραιώθηκε αργότερα με επιπλέον συναφείς μελέτες (Feng et al., 2016; Gruber et al., 2007; Gruber et al., 2009; Jeong et al., 2014; Kim et al., 2009; Le Maitre et al., 2007). Μάλιστα, η έκφραση αυτού του βιοδείκτη γήρανσης αυξάνεται σημαντικά με τον αυξανόμενο βαθμό εκφύλισης του δίσκου (Gruber et al., 2007). Πιο πρόσφατες μελέτες, επίσης, έδειξαν ότι το μειωμένο μήκος των τελομερών και η αυξημένη έκφραση του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p16^{INK4a}, που αποτελούν δείκτες της κυτταρικής γήρανσης, είναι περισσότερο εμφανή σε εκφυλισμένους δίσκους στους οποίους παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (Le Maitre et al., 2007).

Κατά την εκφύλιση του δίσκου τα κύτταρα αυτού υφίστανται και ορισμένες φαινοτυπικές αλλαγές, όπως αλλοιωμένη μορφολογία, αλλαγές στο μεταβολισμό, μεταβολές στην απόκρισή τους στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και μεταβολές στην έκφραση γονιδίων (Zhao et al., 2007). Όσον αφορά στη μορφολογία τους, τα κύτταρα γηρασμένων και εκφυλισμένων δίσκων εμφανίζονται περισσότερο επιμηκυμένα και πεπλατυσμένα, ενώ το κυτταρόπλασμά τους χαρακτηρίζεται από πλήθος λυσοσωμάτων (Kouroumalis et al., 2018). Τα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου, πιο συγκεκριμένα, ενώ φυσιολογικά το σχήμα τους είναι ατρακτοειδές, γίνονται πιο στρογγυλεμένα, όπως τα χονδροκύτταρα (Tolonen et al., 2006). Επιπλέον αλλαγές που εντοπίστηκαν κατά την ηλικίωση σε μελέτες σε ανθρώπους και διάφορα ζωικά μοντέλα είναι ο αυξημένος αριθμός και το μέγεθος σχισμών στους ιστούς των δίσκων, η παρουσία κοκκιωδών θραυσμάτων και η νεοαγγείωση από την εξωτερική περιοχή του δακτυλίου προς τον πυρήνα (Boos et al., 2002; Vo et al., 2016). Όσον αφορά στον μεταβολισμό, στην απόκριση στο περιβάλλον και στην έκφραση γονιδίων, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν ένα τροποποιημένο φαινότυπο ο οποίος έχει συσχετιστεί με τη γήρανση και αναλύεται παρακάτω (βλ. § 1.4).

1.3.3. Βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων κατά τη γήρανση και την εκφύλιση των δίσκων

Κατά τη γήρανση, η συσσώρευση βλαβών στα διάφορα βιομόρια, η οποία είναι χρονοεξαρτώμενη (Campisi and Vijg, 2009), οδηγεί σε γενωμική αστάθεια,

απώλεια της πρωτεόστασης και επιγενετικές αλλοιώσεις (Vo et al., 2016). Μεταξύ αυτών οι επιγενετικές αλλοιώσεις δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί.

Οι βλάβες στο DNA των κυττάρων γηρασμένων δίσκων προκύπτουν συνηθέστερα από χημικούς και περιβαλλοντικούς μεταλλαξιγόνους παράγοντες, μεταβολικά παραπροϊόντα και γενοτοξίνες (Niedernhofer and Robbins, 2008), καθώς και από ενδογενείς και εξωγενείς, οξειδωτικούς και φλεγμονώδεις παράγοντες (Risbud and Shapiro, 2014; Vo et al., 2013). Τα κύτταρα του δίσκου και ειδικότερα αυτά του ινώδους δακτυλίου έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία καταλήγει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, παρά το γεγονός ότι διαβιούν σε ένα υποξικό περιβάλλον. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν σε αλλαγές των κυττάρων που σχετίζονται με τη γήρανση περιλαμβάνει την καταστροφή των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA (Vo et al., 2016). Ένας ακόμη παράγοντας που έχει αποδειχτεί πρόσφατα ότι προκαλεί βλάβες στο DNA είναι η υπερωσμωμοριακότητα (Vo et al., 2016), στην οποία οι δίσκοι εκτίθενται φυσιολογικά, όπως περιγράφηκε στην § 1.1.2. Το DNA που έχει συσσωρεύσει βλάβες μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιβλαβές και γι' αυτό το λόγο απαιτείται επιδιόρθωση από τους ειδικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα κύτταρα, προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Οι βλάβες αυτές περιλαμβάνουν θραύσεις στη διπλή έλικα του DNA, οι οποίες ενεργοποιούν το μονοπάτι ATM-p53-p21^{WAF1} το οποίο οδηγεί τελικά στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Mavrogomatou and Kletsas, 2009). Παρά τη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, όμως, τα κύτταρα συσσωρεύουν βλάβες με το πέρασμα του χρόνου και εμπλέκονται στον εκφυλισμό και τη γήρανση των δίσκων.

Φυσιολογικά, η πρωτεόσταση ρυθμίζεται από τη δυναμική ισορροπία της πρωτεϊνολύσεως και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας των δίσκων και οι παράγοντες αποικοδόμησης τους βρίσκονται σε ισορροπία (Dimozi et al., 2015; Kouroumalis et al., 2018; Urban, 2002). Κατά τη γήρανση, η διαταραχή αυτής της δυναμικής ισορροπίας οδηγεί στην κατάρρευση της πρωτεόστασης και τελικά στην καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας (Vo et al., 2016). Επιπλέον, με την αύξηση της ηλικίας αλλάζει τόσο η αφθονία όσο και η δομή των ινών κολλαγόνου (Vo et al., 2016). Η απορρύθμιση της δράσης της κολλαγενάσης, που προκύπτει με την ηλικία, προκαλεί πρωτεολυτική βλάβη του ινώδους κολλαγόνου και κατά συνέπεια αλλαγή της δομής του

(Hollander, 1996). Το κατεστραμμένο κολλαγόνο μειώνει τη μηχανική αντοχή του ιστού του δίσκου και οδηγεί σε αντιδράσεις που καταλήγουν στο σχηματισμό τελικών προϊόντων γλυκοποίησης (Advanced Glycation End-products - AGEs), τα οποία προκαλούν οξειδωτικό στρες (Pokharna and Phillips, 1998). Τα προϊόντα αυτά αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου στο δίσκο και μπορεί να επηρεάσουν το σχηματισμό των ινών κολλαγόνου (Gautieri et al., 2014; Verzijl et al., 2002). Όλες αυτές οι μοριακές αλλοιώσεις στην εξωκυττάρια μήτρα που περιγράφηκαν παραπάνω μπορεί να μειώσουν τη δομική ακεραιότητα και τη λειτουργία του δίσκου.

Τέλος, παράγοντες που θεωρούνται βλαπτικοί για τους ιστούς των δίσκων είναι η μη-φυσιολογική μηχανική καταπόνηση και το θερμιδικό στρες (Vo et al., 2016). Η έλλειψη αγγείωσης και το όξινο pH είναι παράγοντες που μειώνουν την ανθεκτικότητα του δίσκου σε αυτές τις επιπλέον περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Shirazi-Adl et al., 2010). Παρά τις χαμηλές φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Urban et al., 1982) και γλυκόζης (Holm et al., 1981) και τις υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού (Ohshima and Urban, 1992), οι οποίες οξινίζουν το περιβάλλον του δίσκου, τα κύτταρα αυτού παραμένουν βιώσιμα και λειτουργικά σε αυτό το εχθρικό περιβάλλον. Οι όξινες συνθήκες βέβαια μπορούν να μειώσουν ως ένα βαθμό τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Bibby et al., 2005), ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 και το χαμηλό pH έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη σύνθεση της πρωτεογλυκάνης και του κολλαγόνου (Ohshima and Urban, 1992; Ishihara and Urban, 1999).

Σε μία συνεχή προσπάθεια των κυττάρων να αποκαταστήσουν τις βλάβες, οι κυτταρικές αποκρίσεις μπορεί να απορρυθμιστούν με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που οδηγεί σε βλάβες στο επίπεδο του ιστού (Vo et al., 2016). Η απορρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων προάγει μη-φυσιολογικές μεταβολές στα κύτταρα και την απορρύθμιση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Οι μη-φυσιολογικές μεταβολές που υφίστανται τα κύτταρα μπορεί να είναι είτε φαινοτυπικές είτε λειτουργικές. Οι φαινοτυπικές αλλαγές, που περιλαμβάνουν τη μετάπτωση των γηρασμένων κυττάρων του δίσκου από έναν αναβολικό σε έναν καταβολικό φαινότυπο (Singh et al., 2009), πιθανώς να συμβάλλουν στην απώλεια της λειτουργικότητας των κυττάρων, οδηγώντας σε μείωση των πρωτεογλυκανών της μήτρας των κυττάρων του δίσκου, σε αφυδάτωση των ιστών και σε μεταβολή της κατανομής του φορτίου που μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο τραυματισμού (Zhu et al., 2014). Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στους διάφορους ιστούς και

όργανα διαταράσσει τη δομή και τη λειτουργία τους, προάγοντας περαιτέρω τη γήρανση (Campisi, 2005; Rodier et al., 2009).

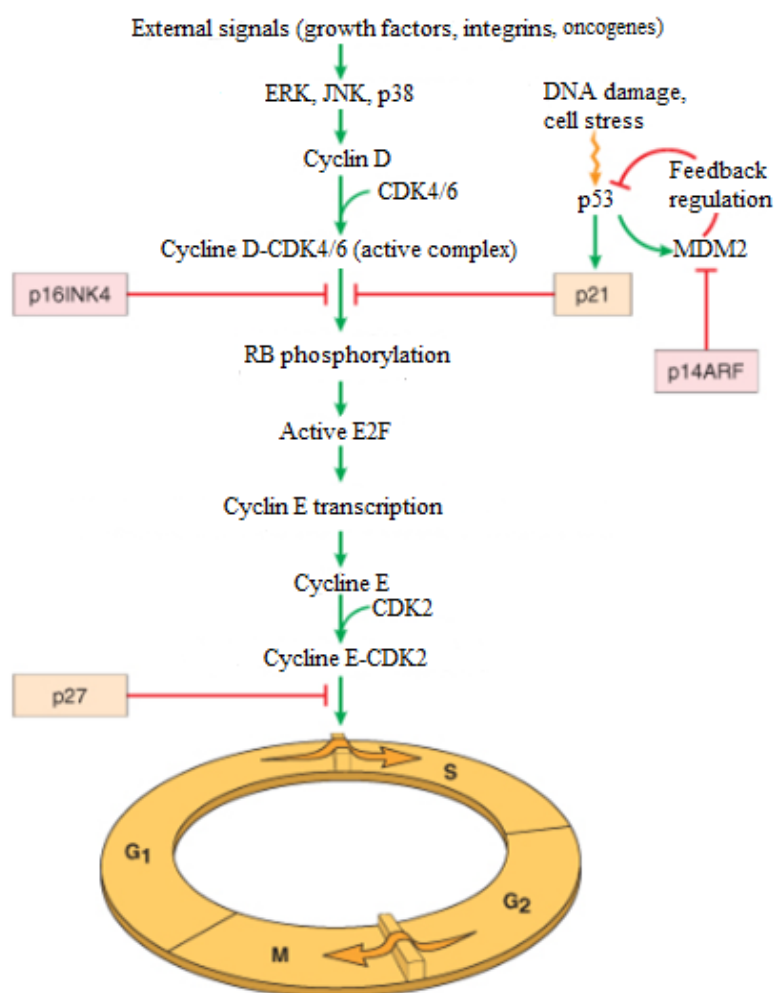
Οι βλάβες των βιομορίων που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να επηρεάσουν τα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε να προκληθεί περαιτέρω μοριακή βλάβη (Vo et al., 2016). Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη γήρανση είναι το insulin/IGF-1, των σιρτουινών και του mTOR (Guarente, 2008; Cuervo, 2008; Pawlikowska et al., 2009). Αυτές οι τρεις οδοί συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, της πρωτεϊνσύνθεσης και της μεταγραφής. Δύο ακόμη σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην απόκριση των κυττάρων στο στρες κατά τη γήρανση και αναλύονται στην παρούσα εργασία είναι το μονοπάτι απόκρισης των κυττάρων στις βλάβες του DNA (DNA Damage Response), το NF-κB και το MAPK (Vo et al., 2016).

Η απώλεια της βιολογικής δομής και της λειτουργίας του δίσκου είναι απόρροια της συσσώρευσης βλαβών στα διάφορα βιομόρια και της μετέπειτα ιστικής βλάβης και αλλοίωσης σηματοδοτικών μονοπατιών. Η απόπτωση, η κυτταρική γήρανση και οι παθολογικές μεταβολές στο μεταβολισμό της μήτρας, που προκύπτουν από τις διάφορες βλάβες, συμβάλλουν πιθανώς στην απώλεια της λειτουργικότητας των κυττάρων του δίσκου και της δομικής ακεραιότητας της εξωκυττάριας μήτρας. Οι μεταβολές αυτές τροποποιούν την επικοινωνία των κυττάρων με τη μήτρα, και τελικά τη φυσιολογία και τη βιομηχανική λειτουργία του δίσκου. Η απώλεια των πρωτεογλυκανών της μήτρας (Setton and Chen, 2006), η απώλεια της ενυδάτωσης (Setton and Chen, 2004), η γλυκοζυλίωση (Wagner et al., 2009) και η μετουσίωση των πρωτεϊνών μπορούν να αυξήσουν την ακαμψία του δίσκου, ενώ ταυτόχρονα θέτουν σε κίνδυνο τη φυσιολογική λειτουργία του δίσκου. Με την ηλικίωση, τα κύτταρα του δίσκου δημιουργούν συστάδες και μεταβάλλεται η αλληλεπίδρασή τους με τη μήτρα, με αποτέλεσμα την αλλοίωση των μηχανικών ιδιοτήτων των κυττάρων.

1.3.3.1. Τα βιοχημικά μονοπάτια των MAPKs

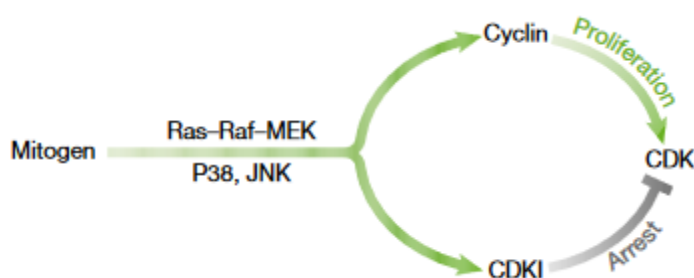
Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός επάγεται από μιτογόνα και αυξητικούς παράγοντες, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού που ενεργοποιείται από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen-Activated Protein

Kinase - MAPK) (Εικόνα 1.3.3.1.1). Οι MAP κινάσες (ERK, JNK, p38) επάγουν την κυκλίνη D, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο είτε με την CDK4 είτε με την CDK6. Το σημείο αυτό της G1 φάσης είναι γνωστό ως «σημείο περιορισμού», καθώς έπειτα από την ενεργοποίηση του συμπλόκου κυκλίνης D - CDK4/6, δεν απαιτούνται πλέον μιτογόνα προκειμένου να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος (Pardee, 1974). Το σύμπλοκο CDK4/6 - κυκλίνης D, με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του αμφιβληστροειδούς Rb, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης E, η



Εικόνα 1.3.3.1.1: Γραφική αναπαράσταση MAPK μονοπατιού. Οι MAP κινάσες (ERK, JNK, p38) επάγουν την κυκλίνη D, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο είτε με την CDK4 είτε με την CDK6. Το σύμπλοκο CDK4/6 - κυκλίνης D, με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του αμφιβληστροειδούς Rb, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα E2F, οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή της κυκλίνης E, η οποία στη συνέχεια με τη σειρά της δημιουργεί σύμπλοκο με την CDK2. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση αναστολέων των κινασών (CDKIs) (p21, p16, p15 and p57) δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb, με αποτέλεσμα ο παράγοντας E2F να παραμένει συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Rb και τελικά να εμποδίζεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου.

οποία στη συνέχεια με τη σειρά της δημιουργεί σύμπλοκο με την CDK2. Μέσω αυτού του μονοπατιού λοιπόν ρυθμίζεται η έκφραση των κυκλινών, οι οποίες αποτελούν ενεργοποιητές των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που οδηγούν στην επιτυχή μετάβαση των κυττάρων από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, μέσω του μονοπατιού MAPK ενεργοποιούνται ταυτόχρονα αναστολείς των κινασών (CDKIs) (p21, p16, p15 and p57) (Chang et al., 2002; Marshall, 1995; Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997), δίνοντας έτσι στο κύτταρο την επιλογή είτε του πολλαπλασιασμού είτε της διακοπής της ανάπτυξης (Εικόνα 1.3.3.1.2). Τι καθορίζει όμως ποια πορεία θα έχει το κύτταρο; Σε φυσιολογικές συνθήκες, η επαγωγή και η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού βρίσκονται σε ισορροπία. Σε παθολογικές περιπτώσεις, όπως κατά την εκφύλιση των δίσκων, η παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, περίπτωση γνωστή και ως «υπερμιτογονική παύση» (Blagosklonny, 2003), ενώ η παροδική ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK προκαλεί την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Marshall, 1995). Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι κυτταρική γήρανση επάγεται μόνο όταν η μιτογονική διέγερση οδηγεί σε αναστολή των κινασών.

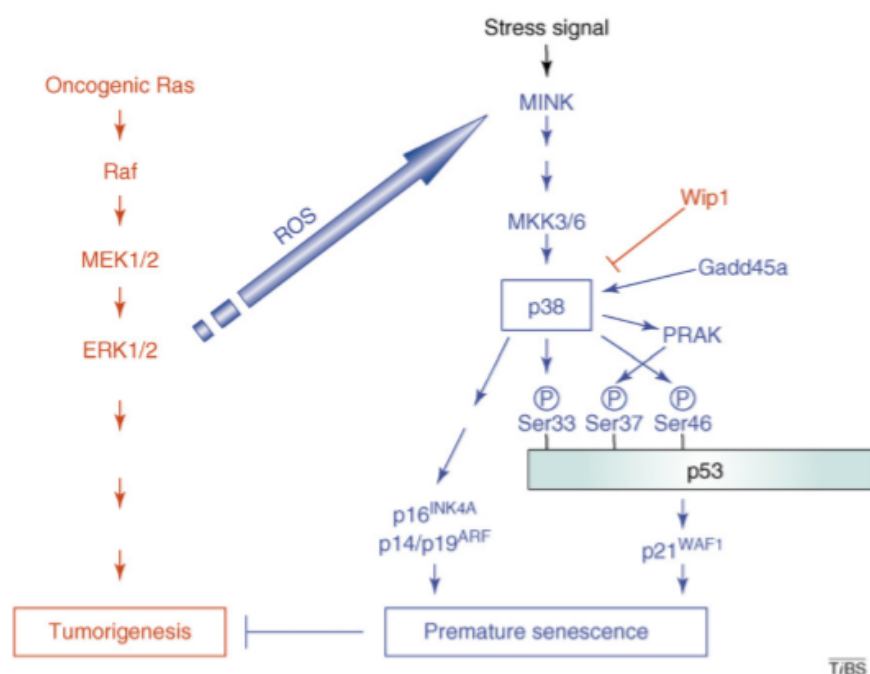


Εικόνα 1.3.3.1.2: Αναπαράσταση του μηχανισμού διπλής μιτογονικής σηματοδότησης. Μιτογόνα (Ras, Raf, MEK, ERK, JNK, p38) επάγουν την ενεργοποίηση κυκλινών (cyclin), που με τη σειρά τους ενεργοποιούν κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), καθώς και την ενεργοποίηση αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKIs), με αποτέλεσμα είτε την επαγωγή είτε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, αντίστοιχα (Blagosklonny, 2003).

1.3.3.2. Τα βιοχημικά μονοπάτια $p53/p21^{WAF1}$ και $p16^{INK4a}/Rb$

Σε μοριακό επίπεδο, η παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την κυτταρική γήρανση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια $p53/p21^{WAF1}$ και $p16^{INK4a}/Rb$ (Εικόνα 1.3.3.2) (Beausejour et al., 2003; Lowe et al., 2004). Ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών $p16^{INK4a}$ και ο μεταγραφικός παράγοντας $p53$ είναι δύο κύριες πρωτεΐνες που

εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38 MAPK οδηγεί στη φωσφορυλίωση αμινοξικών καταλοίπων του μεταγραφικού παράγοντα p53, συμπεριλαμβανομένων των καταλοίπων Ser33, Ser46, Ser37, οδηγώντας στην αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου p53, καθώς και στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης του αναστολέα p21, μεταγραφικό στόχο του p53 (Sun et al., 2007). Μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού, η ενεργοποιημένη p38 MAPK προάγει, επίσης, την έκφραση των αναστολέων p16^{INK4a} και p14/p19^{ARF} (Bulavin et al., 2004; Wang et al., 2002), οι οποίοι σε συνδυασμό με τον καταρράκτη



Εικόνα 1.3.3.2: Γραφική αναπαράσταση του ρόλου των μονοπατιών p53/p21^{WAF1} και p16^{INK4a}/Rb στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης και στην καταστολή της καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38 MAPK οδηγεί στη φωσφορυλίωση αμινοξικών καταλοίπων του μεταγραφικού παράγοντα p53 (Ser33, Ser46, Ser37), οδηγώντας στην αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου p53, καθώς και στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης του αναστολέα p21, μεταγραφικό στόχο του p53. Μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού, η ενεργοποιημένη p38 MAPK προάγει, επίσης, την έκφραση των αναστολέων p16^{INK4a} και p14/p19^{ARF}, οι οποίοι σε συνδυασμό με τον καταρράκτη p53/p21^{WAF1}, επάγουν την πρόωρη κυτταρική γήρανση που εξυπηρετεί έναν ογκοκατασταλτικό αμυντικό μηχανισμό *in vitro* και *in vivo*. Στην εικόνα, όλα τα γεγονότα που προωθούν την καρκινογένεση εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ τα γεγονότα που δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση εμφανίζονται με μπλε χρώμα (Han and Sun, 2007).

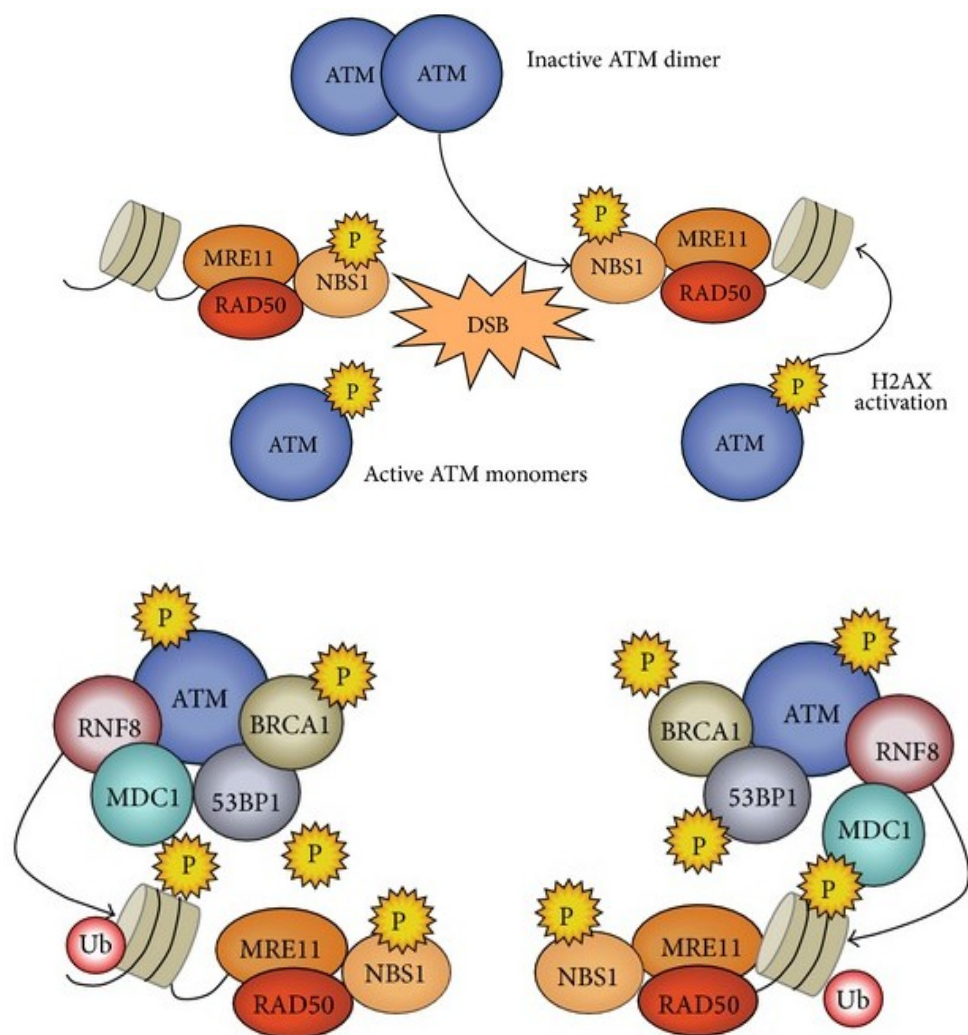
p53/p21^{WAF1}, επάγουν την πρόωρη κυτταρική γήρανση που εξυπηρετεί έναν ογκοκατασταλτικό αμυντικό μηχανισμό *in vitro* και *in vivo*. Γίνεται κατανοητό, λοιπόν, ότι τα δύο αυτά μονοπάτια (p53/p21^{WAF1} και p16^{INK4a}/Rb) οδηγούν τα κύτταρα που εκτίθενται σε στρεσογόνους παράγοντες σε πρόωρη κυτταρική γήρανση, η οποία δρα ανασταλτικά στην επαγόμενη από την υπερενεργοποίηση ογκογονιδίων καρκινογένεση (Han and Sun, 2007).

1.3.3.3. Η απόκριση των κυττάρων στις βλάβες του DNA μέσω του μονοπατιού ATM-Chk2-p53-p21^{WAF1}

Το γενοτοξικό στρες μπορεί να προκύψει με ποικίλους τρόπους, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται τα κυτταροτοξικά φάρμακα, η ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες, η υπερέκφραση ογκογονιδίων, καθώς και η μείωση του μήκους των τελομερών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Corpe et al., 2008). Αυτό μπορεί να προκαλέσει ποικίλους τύπους αλλοιώσεων στο DNA, αλλά όταν είναι τόσο ισχυρό ώστε να προκαλέσει γήρανση, σχεδόν πάντα δημιουργεί δίκλωνα θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA (Double Strand Breaks - DSBs), τα οποία ενεργοποιούν αμέσως την απόκριση των κυττάρων στη βλάβη αυτή (DNA Damage Response - DDR) (Jackson and Bartek, 2009). Η απόκριση των κυττάρων στις βλάβες του DNA αποτελείται από ένα τεράστιο δίκτυο σηματοδότησης, που περιλαμβάνει πολλούς παράγοντες που εντοπίζουν τα δίκλωνα θραύσματα, μετασχηματίζουν και ενισχύουν το σήμα βλάβης του DNA και ενεργοποιούν μοριακούς τελεστές, οι οποίοι τελικά επάγουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου για την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA (Corpe et al., 2010; Shiloh and Ziv, 2013).

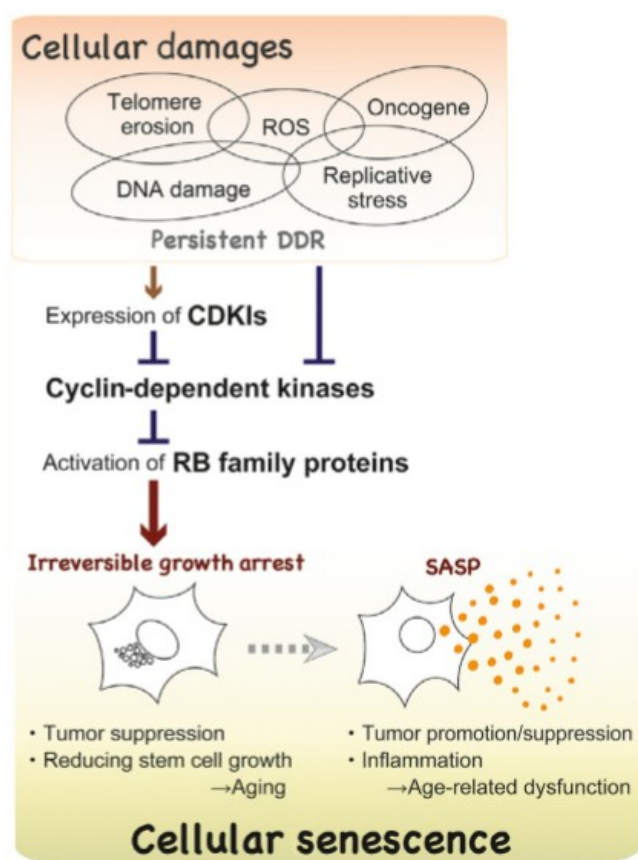
Πιο συγκεκριμένα, τα δίκλωνα θραύσματα αναγνωρίζονται από το σύμπλεγμα MRN (MRE11, RAD50 και NBS1), το οποίο επιτρέπει τη στρατολόγηση στο σημείο του θραύσματος και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), που αποτελεί κύρια κινάση στην απόκριση των κυττάρων στις βλάβες του DNA (Εικόνα 1.3.3.3.1). Η ενεργοποίηση της κινάσης ATM προκύπτει από την αυτοφωσφορυλίωσή της στη σερίνη 1981 (S1981-ATM) (Bakkenist and Kastan, 2003) και τον επακόλουθο διαχωρισμό των ανενεργών διμερών της σε καταλυτικά ενεργά μονομερή της κινάσης. Με σκοπό τη διάδοση του σήματος DDR, η ενεργοποιημένη ATM φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένης της ιστόνης H2AX (γH2AX), του MDC1, της πρωτεΐνης 53BP1 και της κινάσης CHK2 (Bonner et al., 2008; Rogakou et al., 1998), ενώ οδηγεί και στη στρατολόγηση της λιγάσης ουβικουιτίνης RNF8 (Di Domenico et al., 2014). Οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται στις θέσεις των θραυσμάτων της διπλής έλικας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δομών που ονομάζονται DNA Damage Foci (DDF). Η πρόσδεση της RNF8 προκαλεί την ουβικουτινίωση της H2AX, διευκολύνοντας τη σύνδεση της BRCA1 και, τελικά, της 53BP1, που απαιτείται για τη συγκράτηση της ATM στο σημείο του θραύσματος (Di Domenico et al., 2014). Το μονοπάτι σηματοδότησης απόκρισης στη βλάβη που επάγεται λοιπόν από τις δομές αυτές

βελτιστοποιεί την περαιτέρω πρόσδεση συστατικών του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA στα θραύσματα, ενώ παράλληλα οδηγούν στην ενεργοποίηση των μονοπατιών της p53 και p21^{CDKN1A} (Bartek and Lukas, 2007) και τελικά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 1.3.3.3.1: Γραφική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην απόκριση της κινάσης ATM στα δίκλινα θραύσματα του DNA. Φυσιολογικά, η κινάση ATM βρίσκεται ως ανενεργό διμερές. Σε περίπτωση δίκλωνου θραύσματος η κινάση ATM στρατολογείται μέσω του συμπλέγματος MRN στο σημείο αυτό, οδηγώντας στην αυτοφωσφορυλίωση και το διαχωρισμό των διμερών σε ενεργά μονομερή της κινάσης. Η ενεργοποιημένη ATM φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένης της ιστόνης H2AX, του MDC1, της 53BP1 και της κινάσης CHK2, ενώ στρατολογεί και τη λιγάση ουβικουιτίνης RNF8. Η πρόσδεση της RNF8 προκαλεί την ουβικουτινίωση της H2AX, διευκολύνοντας τη σύνδεση της BRCA1 και, τελικά, της 53BP1, που απαιτείται για τη συγκράτηση της ATM στο σημείο του θραύσματος (Di Domenico et al., 2014).

Κύριο χαρακτηριστικό λοιπόν των γηρασμένων κυττάρων, είτε μέσω της αναδιπλασιαστικής είτε μέσω της πρόωρα επαγόμενης από στρεσογόνους παράγοντες γήρανσης, είναι η μη-αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία προκύπτει ως απόκριση των κυττάρων στις κυτταρικές βλάβες που πραγματοποιούνται και στις δύο περιπτώσεις. Η μη-αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου αποτελεί αναγκαία, όμως όχι και επαρκή προϋπόθεση ώστε ένα κύτταρο να θεωρηθεί γηρασμένο. Μετά την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ένα σύνολο διαφορετικών φαινοτύπων που σχετίζονται με τη γήρανση εμφανίζεται προοδευτικά στα κύτταρα, καθώς αυτά εισέρχονται σε ένα



Εικόνα 1.3.3.3.2: Συνοπτική εικόνα της κυτταρικής γήρανσης που χαρακτηρίζεται από μη-αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και έναν φαινότυπο που σχετίζεται με τη γήρανση. Μία ποικιλία ερεθισμάτων μπορεί να είναι γενοτοξικά ενεργοποιώντας την απόκριση των κυττάρων για την επιδιόρθωση των βλαβών DNA (DDR), με αποτέλεσμα την έκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKIs) p21^{Waf1/Cip1} και p16^{Ink4a}. Η αναστολή των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), με αποτέλεσμα τη μη-αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από την αναστολή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού και την παρακρινική δραστηριότητα του γηρασμένου φαινοτύπου. (Watanabe et al., 2017).

πρόγραμμα γήρανσης (Baker and Sedivy, 2013; Malaquin et al., 2015). Τα γηρασμένα κύτταρα υφίστανται μορφολογικές μεταβολές, επιγενετικές αλλοιώσεις, αλλοιώσεις της μεταβολικής τους δραστηριότητας και της χρωματίνης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τη λυσοσωμική τους μάζα, την αυτοφαγική τους δραστηριότητα, την αντίσταση στην απόπτωση και παρουσιάζουν την ικανότητα να τροποποιούν το μικροπεριβάλλον τους, παρουσιάζοντας έναν φαινότυπο ο οποίος έχει συσχετιστεί με τη γήρανση (Senescence-Associated Secretory Phenotype - SASP) (Εικόνα 1.3.3.3.2) (Acosta et al., 2013; Coppe et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Kuilman and Peeper, 2009; Malaquin et al., 2016; Rodier et al., 2011).

1.4. Ο φαινότυπος των γηρασμένων κυττάρων (SASP)

Τα γηρασμένα κύτταρα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παραμένουν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά, όμως με τροποποιημένο φαινότυπο, μορφολογία, μεταβολισμό και γονιδιακή έκφραση (Malaquin et al., 2016; Roberts et al., 2006a). Αυτά χαρακτηρίζονται από την υπερέκφραση πολλών γονιδίων και την έκκριση μορίων τα οποία συνιστούν έναν σχετιζόμενο με τη γήρανση φαινότυπο (Senescence Associated Secretory Phenotype - SASP), γνωστό και ως προ-φλεγμονώδη φαινότυπο (Coppe et al., 2008; Watanabe et al., 2017). Ο φαινότυπος αυτός αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων, το οποίο τα διαφοροποιεί από τα μη-γηρασμένα κύτταρα, τα κύτταρα που βρίσκονται στη G0 φάση και τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (Watanabe et al., 2017). Η έκκριση των παραγόντων SASP που δρουν παρακρινικά μπορεί να επηρεάσει τα γειτονικά κύτταρα και την ιστική ομοιοστασία (Campisi, 1998; Demaria et al., 2015; Fisher et al., 2009; Sardy, 2009; Varani et al., 2000), με συνέπεια την τροποποίηση της λειτουργίας τους (Roberts et al., 2006a). Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων *in vivo* με την αύξηση της ηλικίας, η διαταραχή της ιστικής ομοιοστασίας και η επικείμενη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης εμπλέκονται στην κυτταρική και οργανισμική γήρανση, και επομένως συνεισφέρουν στην ανάπτυξη ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Acosta et al., 2008a,b; Bodner et al., 1998; Coppe et al., 2008; Nelson et al., 2018; Rodier et al., 2009).

Μεταξύ άλλων, ο προ-φλεγμονώδης αυτός φαινότυπος περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες, φλεγμονώδη και καταβολικά μόρια (π.χ. κυτοκίνες, χημειοκίνες, ιντερλευκίνες) και εξωκυτταρικές πρωτεάσες (π.χ. μεταλλοπρωτεάσες), που ρυθμίζουν την πλειοψηφία τόσο των ευεργετικών (εμβρυϊκή ανάπτυξη, επούλωση πληγών, καταστολή ανάπτυξης καρκίνου) όσο και των επιβλαβών επιδράσεων (προώθηση καρκίνου, γήρανση) των γηρασμένων κυττάρων (Malaquin et al., 2016; Watanabe et al., 2017). Ο προκύπτων καταβολικός προ-φλεγμονώδης φαινότυπος όλων των γηρασμένων κυττάρων είναι αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης των καταβολικών ενζύμων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας και της ταυτόχρονης μειωμένης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα συστατικά της μήτρας (Dimozi et al., 2015). Ωστόσο, αν και η παρουσία κάποιων παραγόντων SASP είναι γενικευμένη κατά τη γήρανση, οι περισσότεροι ποικίλλουν αναλόγως τον κυτταρικό τύπο, τα ερεθίσματα που οδηγούν στη γήρανση και τα υποκείμενα

μοριακά μονοπάτια που ενεργοποιούνται (Malaquin et al., 2016; Watanabe et al., 2017). Για παράδειγμα, οι ιντερλευκίνες IL-1α, IL-1β, IL-6 και η χημειοκίνη IL-8 συχνά χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες SASP στα περισσότερα γηρασμένα κύτταρα (Coppe et al., 2008; Watanabe et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, τα ανθρώπινα κύτταρα εκφυλισμένων μεσοσπονδύλιων δίσκων εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα σύνθεσης των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, και ειδικότερα μειωμένα επίπεδα των πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας μήτρας αγκρεκάνης, διγλυκάνης, ντεκορίνης, βερσικάνης, των αναστολέων μεταλλοπρωτεασών TIMP-1, -2, -3 (Dimozi et al., 2015; Le Maitre et al., 2004; Pockert et al., 2009; Roberts et al., 2000; Singh et al., 2009; Sivan et al., 2014) και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, όπως της ελαστίνης, της λαμινίνης και των διαφόρων μορφών κολλαγόνου (Campisi, 2005; Cristofalo et al., 2004), ενισχυμένο καταβολισμό, και ειδικότερα αυξημένα επίπεδα των μεταλλοπρωτεασών ADAMTS-5, MMP-1, MMP-2 και MMP-9 (Dimozi et al., 2015; Le Maitre et al., 2004; Pockert et al., 2009; Roberts et al., 2000; Singh et al., 2009; Sivan et al., 2014), τροποποιημένη έκκριση αυξητικών παραγόντων (bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, TGF-α, TGF-β, BMP-RII, FGF-R3, IGF-RI, TGF-β-RII και EGF-R) (Konttinen et al., 1999; Le Maitre et al., 2005b; Specchia et al., 2002; Tolonen et al., 2006) και αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-1-RI, IL-6-R και TNF-α) (Le Maitre et al., 2005a; Miyamoto et al., 2000; Specchia et al., 2002).

1.4.1. Τα μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με το φαινότυπο SASP

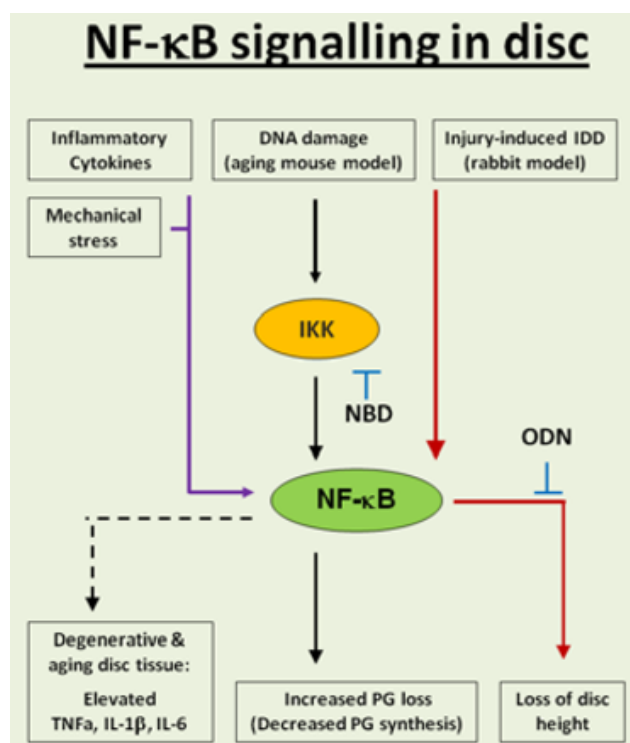
Οι παράγοντες SASP εκκρίνονται από τα κύτταρα μέσω διαφόρων μοριακών μηχανισμών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται το μονοπάτι NF-κΒ, το μονοπάτι των MAPK και το μονοπάτι mTOR. Τα διαφορετικά μονοπάτια συγκλίνουν έτσι ώστε να είναι δυνατή η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων απαραίτητων για την έκφραση των γονιδίων του SASP (Malaquin et al., 2016). Τα μονοπάτια MAPK και NF-κΒ, κυρίως, είναι αυτά που πιθανόν παίζουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην εξέλιξη των μοριακών γεγονότων που συμβάλλουν στην έναρξη και πρόοδο της εκφύλισης των μεσοσπονδύλιων δίσκων (Wuertz et al., 2012). Ωστόσο, είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό το γεγονός ότι το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με άλλα μοριακά μονοπάτια. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το μονοπάτι

(PI3K)/Akt, το οποίο αλληλεπιδρά με τα παραπάνω δύο μονοπάτια και φαίνεται να εμπλέκεται στην ομοιοστασία των μεσοσπονδύλιων δίσκων.

1.4.1.1. Ο ρόλος του μονοπατιού NF-κB στον εκφυλισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου

Ο παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor – Kappa B) είναι κεντρικό συστατικό της κυτταρικής απόκρισης στις βλάβες, στο στρες και στη φλεγμονή. Οι πρωτεΐνες NF-κB αποτελούν μια οικογένεια δομικά συγγενών μεταγραφικών παραγόντων. Στα θηλαστικά, η οικογένεια NF-κB αποτελείται από πέντε πρωτεϊνικές υπομονάδες, τις RelA ή p65, c-Rel, RelB, p50 και p52 (Baeuerle and Henkel, 1994).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας NF-κB είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης των περισσότερων παραγόντων SASP (π.χ. IL-6, IL-8) σε αρκετές περιπτώσεις γηρασμένων κυττάρων (Malaquin et al., 2016). Σε φυσιολογικές συνθήκες, απουσία δηλαδή στρεσογόνων παραγόντων, ο NF-κB αναστέλλεται, μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον αναστολέα του κB (Inhibitor of κB - IκB) στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας έτσι τη μετακίνησή του στον πυρήνα. Σε περίπτωση όμως έκθεσης των κυττάρων σε στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, παθογόνα, κυτταρικό και μηχανικό στρες, ακτινοβολία και αυξητικούς παράγοντες, η κινάση του αναστολέα του παράγοντα κB (IκB kinase - IKK) ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τον αναστολέα σε δύο συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης (S32 και S36) (Bubici et al., 2006; Hacker and Karin, 2006; Hayden and Ghosh, 2008; Karin και Ben-Neriah, 2000; Ramana et al., 2004). Η αποικοδόμηση του αναστολέα επιτρέπει τη μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται επιλεκτικά με συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA, καθώς και με πρωτεΐνες-συν-ενεργοποιητές, με σκοπό την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης (Furia et al., 2002). Η επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί στην έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών και στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων (Karin and Lin, 2002), αλλά και πιθανόν στην έναρξη και πρόοδο τη εκφύλισης των δίσκων (Εικόνα 1.4.1.1).



Εικόνα 1.4.1.1: Η εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κB στο μεταβολισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η φλεγμονή, το μηχανικό στρες, οι βλάβες στο DNA, οι κυτταρικές βλάβες ενεργοποιούν τον NF-κB στα κύτταρα του δίσκου, οδηγώντας στην έκφραση καταβολικών παραγόντων, όπως οι μεταλλοπρωτεάσες και πιθανόν τελικά στην εκφύλιση και τη γήρανση του ιστού των δίσκων (Wuertz et al., 2012).

Παρότι μέχρι σήμερα οι πληροφορίες που αφορούν το ρόλο του NF-κB στην εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων είναι περιορισμένες, υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που θα μπορούσαν να στηρίξουν αυτή την υπόθεση. Η χρόνια ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί με τη γήρανση των ιστών, και του μεσοσπονδύλιου δίσκου, καθώς και πολλές εκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικίωση, συμπεριλαμβανομένων των μυοσκελετικών διαταραχών, όπως η μυϊκή δυστροφία, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση (Acharya et al., 2007; Adler et al., 2007; Kim et al., 2006). Σε σχετικές μελέτες, δείγματα αυτοψίας συμπτωματικών δίσκων παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονοδών κυτταροκινών που θεωρούνται τυπικά γονίδια-στόχοι του NF-κB, όπως τα γονίδια TNF-α, IL-1β, IL-6 και IL-8 (Adams et al., 2010; Bachmeier et al., 2007; Burke et al., 2002; Hoyland et al., 2008; Le Maitre et al., 2005a; Le Maitre et al., 2007b; Ulrich et al., 2007). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες επίσης, έδειξαν την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κB σε γηρασμένους και εκφυλισμένους ανθρώπινους μεσοσπονδύλιους δίσκους *in vivo*, και ειδικότερα στον πηκτοειδή πυρήνα (Nerlich et al., 2007), ενώ μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι η

ενεργοποίηση του μονοπατιού έχει συσχετιστεί με την αποικοδόμηση της μήτρας των δίσκων (Akedo et al., 2005). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η αναστολή του NF-κΒ με φαρμακολογικά και γενετικά μέσα αποδείχτηκε ότι βελτιώνει την εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου σε μοντέλα ποντικού με επιταχυνόμενη γήρανση (Nasto et al., 2012). Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι ο παράγοντας NF-κΒ και η ενεργοποίησή του πιθανόν παίζουν σημαντικό διαμεσολαβητικό ρόλο στην εκφύλιση των δίσκων.

1.4.1.2. Ο ρόλος του μονοπατιού των MAPKs στο μεσοσπονδύλιο δίσκο

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinases - MAPKs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων που συμμετέχουν σε εξαιρετικά συντηρημένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, επιτρέποντας στα κύτταρα να αποκρίνονται σε ποικίλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Το μονοπάτι των MAPKs ενεργοποιείται από διαφορετικά ερεθίσματα, όπως ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, πεπτίδια, καθώς και περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία ή το ωσμωτικό στρες (Huang et al., 2010; Kyriakis and Avruch, 2001). Στα θηλαστικά, τα διαφορετικά αυτά σήματα ενεργοποιούν τουλάχιστον τρεις κύριες υποοικογένειες των MAPKs · τις ελεγχόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες (Extracellular signal – regulated kinase - ERK), τις c-Jun αμινοτελικές κινάσες (c-Jun NH₂ terminal Kinases - JNK) και τις διαφορετικές ισομορφές των p38 MAPKs (p38 MAPKs) (Boutros et al., 2008; Wagner and Nebreda, 2009).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK ελέγχει αρκετές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαμεσολαβούμενη συμμετοχή της ERK στη ρύθμιση των συστατικών του κυτταρικού κύκλου, όπως το c-Myc, την κυκλίνη D1 και τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb, οδηγώντας στην απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F και επιτρέποντας, έτσι, τη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Chambard et al., 2007).

Οι JNK ενεργοποιούνται από διάφορους εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν στη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης και θρεονίνης από τις κινάσες MMK4 και MKK7. Οι JNK εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης (Wagner and Nebreda, 2009).

Τέλος, το μονοπάτι της p38 MAPK ενεργοποιείται επίσης από πολλούς διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα τη διπλή φωσφορυλίωση

στα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης από τις κινάσες MKK3 / 6. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38 MAPK εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, στον κυτταρικό θάνατο και στη φλεγμονή (Kaminska, 2005; Kyriakis and Avruch, 2001; Pearson et al., 2001). Ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες που ενεργοποιούν την p38 MAPK είναι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. ιντερλευκίνες, TNF- α), παθογόνα (π.χ. LPS) (Kaminska, 2005) και η υπερϊώδης και γ ακτινοβολία (Dent et al., 2003).

Και όσον αφορά στο μονοπάτι των MAPKs, δεν έχει διασαφηνιστεί μέχρι στιγμής πλήρως η εμπλοκή του στην εκφύλιση και γήρανση των κυττάρων των δίσκων, όμως υπάρχουν αρκετά δεδομένα που το στηρίζουν. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της p38 MAPK είναι υψηλότερη σε γηρασμένα ανθρώπινα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου συγκριτικά με τα νεαρά κύτταρα (Gruber et al., 2010), καθώς επίσης ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού σε υπερωσμωτικές συνθήκες, έχει ανασταλτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε βόεια κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα (Mavrogenatou and Kletsas, 2009). Επίσης, το μονοπάτι των ERK φαίνεται να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/b-catenin, που πιθανόν συμβάλλει στην παθογένεια της εκφύλισης των δίσκων (Hijama et al., 2011). Επιπλέον, οι αυξητικοί παράγοντες PDGF, IGF-I και b-FGF, που ως γνωστόν υπερεκφράζονται στους εκφυλισμένους δίσκους, μπορούν να διεγείρουν το μονοπάτι των ERK, υποδεικνύοντας ότι οι MAPKs πιθανόν εμπλέκονται στις καταβολικές και αναβολικές διεργασίες των δίσκων (Pratsinis and Kletsas, 2007). Το μονοπάτι των MAPKs, λοιπόν, φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης και αποικοδόμησης της μήτρας των δίσκων, τροποποιώντας την έκφραση των καταβολικών και αναβολικών γονιδίων, ενώ παράλληλα ευθύνονται για γεγονότα όπως η αυξημένη κυτταρική απόπτωση και η αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.4.1.2). Όλα αυτά τα γεγονότα εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση, κι επομένως πιθανολογείται η εμπλοκή του μονοπατιού των MAPKs σε αυτή.

1.5. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας

Οι χρόνιες ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες περιλαμβάνουν ασθένειες του μυοσκελετικού συστήματος, οι οποίες μάλιστα έχουν μεγάλες κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις και αποτελούν εμπόδιο στην παγκόσμια υγεία (Vo et al., 2016). Μία από τις σοβαρότερες ηλικιοεξαρτώμενες χρόνιες παθήσεις που αποτελεί κύρια αιτία κινητικών προβλημάτων στις σύγχρονες κοινωνίες είναι η εκφύλιση των αρθρώσεων της σπονδυλικής στήλης, σημαντικότερη αιτία της οποίας στους ηλικιωμένους είναι η οστεοαρθρίτιδα και η εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων (Derby et al., 2008; Goldring et al., 2007). Η εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων, μάλιστα, εμφανίζεται αρκετά νωρίς κατά τη διάρκεια της ζωής των ατόμων. Επομένως, η προσπάθεια διατήρησης υγιών μεσοσπονδύλιων δίσκων έχει ζωτική σημασία για τη διατήρηση υγιών αρθρώσεων και ακολούθως για τη διατήρηση ενός υγιούς πληθυσμού ηλικιωμένων. Η κατανόηση, λοιπόν, της φυσιολογίας του ιστού των δίσκων, τόσο σε καταστάσεις υγιούς γήρανσης όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, είναι αναγκαία.

Το περιβάλλον των κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι ιδιαίτερα ασυνήθιστο από φυσικοχημικής άποψης. Τα κύτταρα συνθέτουν έναν πληθυσμό μικρής κυτταρικής πυκνότητας, βυθισμένο σε πυκνή εξωκυττάρια μήτρα. Η μειωμένη αγγείωση του δίσκου έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παροχή θρεπτικών στοιχείων και οξυγόνου στα κύτταρα. Ο αναερόβιος μεταβολισμός των κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή υψηλών επιπέδων γαλακτικού οξέος και επομένως στην πρόκληση ενός όξινου περιβάλλοντος (μειωμένου pH). Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση της πρωτεογλυκάνης αγκρεκάνης στη μήτρα του δίσκου συμβάλλει στο υψηλό αρνητικό φορτίο της μήτρας, το οποίο σε συνδυασμό με τη μειωμένη ενυδάτωση και το υψηλό μηχανικό φορτίο που ασκείται στο δίσκο κατά τις διάφορες καθημερινές δραστηριότητες του ατόμου, έχει ως συνέπεια τα υψηλά επίπεδα ωσμωμοριακότητας στο δίσκο. Οι διάφοροι αυτοί στρεσογόνοι παράγοντες που ασκούνται στα κύτταρα του δίσκου πιστεύεται ότι ευθύνονται για την εκφύλιση και τη γήρανση των δίσκων.

Η παρούσα εργασία εστιάζει κυρίως στις επιπτώσεις της αυξημένης ωσμωμοριακότητας στα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου. Στους περισσότερους ιστούς η ωσμωμοριακότητα είναι σταθερή στα 300 mOsm / kg H₂O. Στο μεσοσπονδύλιο δίσκο η ωσμωμοριακότητα μεταβάλλεται συνεχώς και μπορεί να

φτάσει έως και τα 550 mOsm / kg H₂O. Παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα παραμένουν βιώσιμα σε ένα τέτοιο ιδιαίτερο περιβάλλον, μέσω ενός φυσιολογικού μηχανισμού ανοχής στην υπερτονικότητα, αρκετές μελέτες έχουν κάνει λόγο για την εμπλοκή της στην εμφάνιση χαρακτηριστικών εκφύλισης και γήρανσης. Η αυξημένη ωσμωμοριακότητα και οι επιπτώσεις της έχουν μελετηθεί εκτενώς σε νεφρικά κύτταρα, καθώς οι νεφροί αποτελούν, επίσης, έναν ανθεκτικό στην υπερτονικότητα ιστό (Kültz and Chakravarty, 2000). Με βάση σχετικές μελέτες σε νεφρικά κύτταρα, η αυξημένη ωσμωμοριακότητα προκαλεί αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στο σημείο από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53 (Dmitrieva et al., 2001) και στο σημείο από τη G2 στη M φάση, μέσω ενεργοποίησης του p38 MAPK μονοπατιού (Dmitrieva et al., 2002), και θραύσματα στη διπλή έλικά του DNA, τα οποία ωστόσο δεν επιδιορθώνονται λόγω αναστολής του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA σε υπερωσμωτικές συνθήκες (Burg et al., 2007). Από την άλλη μεριά, η διερεύνηση της υπερτονικότητας σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει δείξει ότι οι αυξημένες τιμές ωσμωμοριακότητας (400, 500 mOsm / kg H₂O) που δεν καθίστανται τοξικές για τη βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων προκαλώντας καθυστερημένη μετάβαση των κυττάρων από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53 και καθυστερημένη μετάβαση των κυττάρων από τη G2 στη M φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω ενεργοποίησης του p38 MAPK μονοπατιού, λόγω βλαβών στο DNA (Mavrogonatou and Kletsas, 2009), οι οποίες ωστόσο επιδιορθώνονται μέσω ενός πιο ενισχυμένου επιδιορθωτικού μηχανισμού σε συνθήκες αυξημένης ωσμωμοριακότητας (Mavrogonatou and Kletsas, 2009).

Πρόσφατες έρευνες υποστήριξαν ότι το υπερωσμωτικό περιβάλλον προάγει τη γήρανση των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου *in vitro*, μέσω οξειδωτικού στρες (Xu et al., 2019). Κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα αρουραίου καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο υψηλής ωσμωμοριακότητας (550 mOsm / kg H₂O) για 13 ημέρες και ελέγχθηκαν η ικανότητα πολλαπλασιασμού, η ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal, η τελομερική δραστηριότητα, τα επίπεδα ROS και η έκφραση αγκρεκάνης, κολλαγόνου, p53 και p16 των κυττάρων ως δείκτες κυτταρικής γήρανσης, παρουσία ωσμωτικού στρες. Όταν όμως μιλάμε για γήρανση, πρόκειται για ένα μη-αντιστρεπτό φαινόμενο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Δεδομένου λοιπόν, ότι η παρουσία ωσμωτικού στρες μειώνει την πολλαπλασιαστική ικανότητα

των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα και ενισχύει την έκφραση δεικτών γήρανσης σε αυτά *in vitro*, προκύπτει το ερώτημα εάν τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης επιβεβαιώνονται έπειτα από την απομάκρυνση του στρεσογόνου παράγοντα.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η επίδραση της υπερωσμομοριακότητας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης λόγω ωσμωτικού στρες στον πηκτοειδή πυρήνα του δίσκου. Η παρούσα εργασία φιλοδοξεί να αποτελέσει κίνητρο για μελλοντικές μελέτες του ρόλου της υπερωσμομοριακότητας στη γήρανση των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα και να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της γήρανσης κατά την εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Όργανα

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης Tuttnauer 3870E Autoclave-Steam Sterilizer από Tuttnauer (Heidolph, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8 από Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Επωαστικός κλίβανος κυτταροκαλλιιεργειών Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Leitz Diavert (Wetzlar, Germany)
- Μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan 2 (Oberkochen, Germany)
- Αιμοκυττόμετρο Improved Neubauer από Bright Line – Hausser Scientific (Horsham, Pennsylvania, USA)
- Κυτταρομετρητής νηματικής ροής Coulter Particle Counter από Coulter Electronics LTD (UK)
- Ωσμόμετρο Osmomat 030 Cryoscopic Osmometer από Gonotec GmbH (Berlin, Germany)
- Αναδευτήρας Vortex-Genie2 από Scientific Industries Inc. (NY, USA)
- Αναδευτήρας υγρών υλικών thermolyne Cimarec 2 από Thermo Scientific (Leicestershire, UK)
- Αναδευτήρας πλακών πολλαπλών θέσεων Heidolph Titramax 1000 από Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Germany)
- Φωτόμετρο πλάκας πολλαπλών θέσεων Fluostar Optima microplate reader από BMG Labtechnologies (Offenburg, Germany)
- Δεξαμενές υγρού αζώτου Dewar LS750 από Lab Systems Taylor (Wharton, USA)
- Θερμικός κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου Mx 3000P QPCR Systems Cyclor (Stratagene, La Jolla, USA)
- Φυγόκεντροι HERMLE Z233 M-2 από Labnet Int. (NY, USA), BHG Fixette από Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen, Germany) και HARRIER 18/80 Refrigerated από MSE, SANYO (London, UK)

- Μικροφυγόκεντρος Hermle Z233 M-2 από Hermle Labortechnik GmbH (Wehnigen, Germany)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών από Hoefer Inc. (San Francisco, USA)
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνες Mini Trans-Blot Cell από Bio-Rad (Milan, Italy)
- Τροφοδοτικό μηχανήμα Electrophoresis power supply EPS 300 από Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)
- Συσκευή εμφάνισης ανοσοαποτυπώματος LAS-3000 από Fujifilm (Bedford, UK)
- Συσκευή παραγωγής απιονισμένου νερού Millipore Elix 10 από Merck Millipore (Massachusetts, USA)
- Ψυγεία 4°C PITSOS από BSH ABE (Αθήνα, Ελλάδα) και ESKIMO Hi Style από FG Europe (Γλυφάδα, Αθήνα)
- Ψυγιοκαταψύκτες -30°C από ARISTON και FOURLIS (Αθήνα, Ελλάδα)
- Ψυγιοκαταψύκτες -80°C ULT Freezer 925 από Thermo Forma (Ohio, USA) και Thermo HERA freeze από Thermo Electron Corporation (NY, USA)

2.2. Υλικά

Τα υλικά (αντιδραστήρια και διαλύματα) που χρησιμοποιούνταν κατά τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας μελέτης είναι τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium), high glucose (300 mOsm) από Panbiotech (Aidenbach, Bavaria, Germany)
- Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας DMEM απουσία phenol red από Lonza (Verviers, Belgium)
- Διάλυμα πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης από Panbiotech (Aidenbach, Bavaria, Germany)
- Εμβρυϊκός βόειος ορός FBS (Fetal Bovine Serum) από Gibco, Thermo Fisher Scientific (San Jose, USA)
- Διάλυμα θρυψίνης / κιτρικού οξέος 0,25 / 0,30 % w/v από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- MTT από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Χρωστική Neutral Red από Biochrom AG (Berlin, Germany)
- Ισοτονικό αλατούχο διάλυμα Coulter Counter Isoton από Coulter Electronics LTD (UK)
- Ισοπροπανόλη από MERCK (Damstadt, Germany)
- Διάλυμα BrdU 50 mM
- Διάλυμα φορμαλδεύδης 36,5 % από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Διάλυμα Triton X-100 από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Διάλυμα HCl 12 N από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Gelatin from cold water fish skin 40-50 % in H₂O από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού συζευγμένο με φλουορεσκεΐνη έναντι της BrdU (anti-BrdU) από BioLegend (SanDiego, CA, USA)
- Διάλυμα 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)

- 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολλυλο-β-D-γαλακτοσίδιο (X-Gal) 20 mg / ml από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Χρωστική Crystal Violet 0,01 % w/v σε H₂O από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Διάλυμα τριζόλης από Invitrogen (Paisley, UK)
- Χλωροφόρμιο από MERCK (Darmstadt, Germany)
- PrimeScript RT Reagent Kit από Takara (Tokyo, Japan)
- qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX από PCR Biosystems Ltd (London, UK)
- Εκκινητές RT-PCR από Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), από τη Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της πρωτεΐνης p21^{WAF1} από τη BD Pharmingen Biosciences (Bedford, MA)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της p53 από τη Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
- Δευτερογενή αντισώματα που αναγνωρίζουν τα παραπάνω μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά πρωτογενή αντισώματα και έχουν δεσμευμένη την υπεροξειδάση αγριοραπανιού (Horseradish Peroxidase, HRP) από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Μίγματα αναστολέων πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail) από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Μίγματα αναστολέων φωσφατασών (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 and 3) από Sigma-Aldrich Chemie GmbH (St. Louis, MO, USA)
- Γάλα αποβουτυρωμένο σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης από Regilait CS (Macon, France)
- Μεμβράνη πολυβινυλοφθοριδίου Amersham Hybond P 0,45 PVDF από GE Healthcare (Germany)
- Μίγματα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστού μοριακού βάρους από Nippon Genetics Co. (Tokyo, Japan)
- Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL από Milipore (Beverly, MA, USA)

2.3. Ασηπτικές συνθήκες

Προκειμένου να αποφεύγεται οποιαδήποτε μόλυνση των κυτταροκαλλιιεργειών (από βακτήρια και μύκητες), κατά τις πειραματικές διαδικασίες εφαρμόζονταν μέθοδοι αποστείρωσης υλικών και σκευών και τηρούνταν κανόνες ασηπτικών συνθηκών.

Η υγρή αποστείρωση των tips, μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων, θερμοανθεκτικών πλαστικών σκευών και γυάλινων μπουκαλιών γινόταν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 20 λεπτά. Η ξηρή αποστείρωση των γυάλινων πιπεττών, πιπεττών Pasteur και μεταλλικών σκευών γινόταν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 180 °C για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Για τις κυτταροκαλλιέργειες οι ασηπτικές συνθήκες εξασφαλιζόνταν με την εργασία σε εστία νηματικής ροής, καθώς και με τη χρήση αιθανόλης 70% (v/v) σε επιφάνειες. Τα υλικά των κυτταροκαλλιιεργειών (θρεπτικό μέσο, διάλυμα θρυψίνης και άλλα) και τα αποστειρωμένα σκεύη (τρυβλία, πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων, σωληνάρια τύπου falcon και άλλα), τα οποία παραλαμβάνονταν ήδη αποστειρωμένα από τους προμηθευτές, ανοίγονταν και κλείνονταν μόνο μέσα στην εστία νηματικής ροής.

2.4. Καλλιέργειες βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

Κατά την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιούνταν καλλιέργειες βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα αυτά είχαν ήδη απομονωθεί από τους ιστούς και διατηρούνταν στην Τράπεζα Κυττάρων του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

Οι καλλιέργειες των κυττάρων διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο περιέχει τα απαραίτητα αμινοξέα, άλατα, βιταμίνες και γλυκόζη, και το οποίο εμπλουτίζαμε με 10 % εμβρυϊκού βόειου ορού και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη για την αποφυγή της ανάπτυξης Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, αντίστοιχα. Η διατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών γινόταν σε επωαστικό κλίβανο, όπου επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας 95 %, η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 37 °C και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5 % CO₂.

Όταν η επιφάνεια του τρυβλίου ή της φλάσκας καλυπτόταν από τα κύτταρα κατά το 80 - 100 %, γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων, προκειμένου να αποφεύγεται ο περιορισμός της ανάπτυξης των κυττάρων ελλείψει χώρου. Για το σκοπό αυτό, αρχικά γινόταν αναρρόφηση του παλιού θρεπτικού μέσου και έπειτα έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης / κιτρικού νατρίου, ώστε να απομακρύνονται τα υπολείμματα ορού του θρεπτικού, ο οποίος περιέχει αναστολείς της θρυψίνης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα θρυψίνης / κιτρικού νατρίου στον επωαστικό κλίβανο (θρυψινοποίηση) για μερικά λεπτά έως ότου τα κύτταρα παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο στρογγυλοποιημένα. Η εικόνα αυτή υποδηλώνει την αποκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και από το στερεό υπόστρωμα των δοχείων καλλιέργειας, στο οποίο τα κύτταρα προσδένονται μέσω των μορίων φιβρονεκτίνης. Το κιτρικό οξύ δρα ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, τα οποία συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, ενώ η θρυψίνη υδρολύει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμα. Έπειτα από την απόρριψη του διαλύματος θρυψίνης / κιτρικού νατρίου και την ήπια μηχανική ανατάραξη των κυττάρων, τα κύτταρα αποκολλούνταν εντελώς από το υπόστρωμα. Ακολούθως, γινόταν προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου και επαναιώρηση των κυττάρων με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις, με σκοπό τη διάλυση των συσσωματωμάτων και τη λήψη όλων των

κυττάρων του τρυβλίου ή της φλάσκας στο εναιώρημα. Το εναιώρημα αυτό μοιραζόταν σε νέα τρυβλία ή φλάσκες με λόγο κατανομής 1:2.

2.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας των κυττάρων με τις δοκιμασίες εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου γινόταν σε διάφορες επιλεγμένες τιμές ωσμωμοριακότητας από τα 300 έως και τα 1000 mOsm / kg H₂O με τις μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red. Οι τιμές ωσμωμοριακότητας που επιλέχθηκαν ήταν τα 300 mOsm / kg H₂O, η οποία έχει παρατηρηθεί φυσιολογικά στους περισσότερους ιστούς, τα 400 mOsm / kg H₂O, η οποία αποτελεί τις φυσιολογικές ισοτονικές συνθήκες του πηκτοειδούς πυρήνα, οι τιμές 500 και 550 mOsm / kg H₂O, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί ως υπερτονικές συνθήκες στον πηκτοειδή πυρήνα και οι τιμές 600, 700, 800, 900 και 1000 mOsm / kg H₂O. Ο έλεγχος της βιωσιμότητας γινόταν τόσο σε βόεια όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου.

2.5.1. Επίστρωση κυττάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης των 96 θέσεων

Η επίστρωση των κυττάρων στις πλάκες μικροτιτλοδότησης των 96 θέσεων γινόταν έπειτα από μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τον κυτταρομετρητή ροής Coulter Counter ή/και με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer ώστε να προκύπτουν 20.000 κύτταρα / βοθρίο. Η επίστρωση των κυττάρων γινόταν μόνο στα 60 εσωτερικά πηγαδάκια της κάθε πλάκας, ενώ στα ακριανά πηγαδάκια προστίθετο H₂O, με σκοπό τον περιορισμό της εξάτμισης. Οι πλάκες διατηρούνταν στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες.

2.5.2. Επίδραση των κυττάρων με διαφορετικές τιμές ωσμωμοριακότητας

Για τη δημιουργία των θεραπευτικών υλικών με τις επιλεγμένες τιμές ωσμωμοριακότητας, ήταν απαραίτητη η ρύθμιση των τιμών με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων διαλύματος αλάτων περιεκτικότητας 5 M χλωριούχου νατρίου και 0,4 M χλωριούχου καλίου. Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιούνταν με ένα ωσμόμετρο κρυσταλλικής, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην ιδιότητα της ταπείνωσης του σημείου πήξεως ενός βιολογικού υγρού όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των διαλυμένων σωματιδίων σε αυτό. Αρχικά, ελεγχόταν η τιμή ωσμωμοριακότητας του θεραπευτικού υλικού και στη συνέχεια προσθέτοντας διάφορες

ποσότητες αλάτων στο θρεπτικό, βρίσκονταν οι κατάλληλες ποσότητες για κάθε τιμή ωσμωμοριακότητας, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

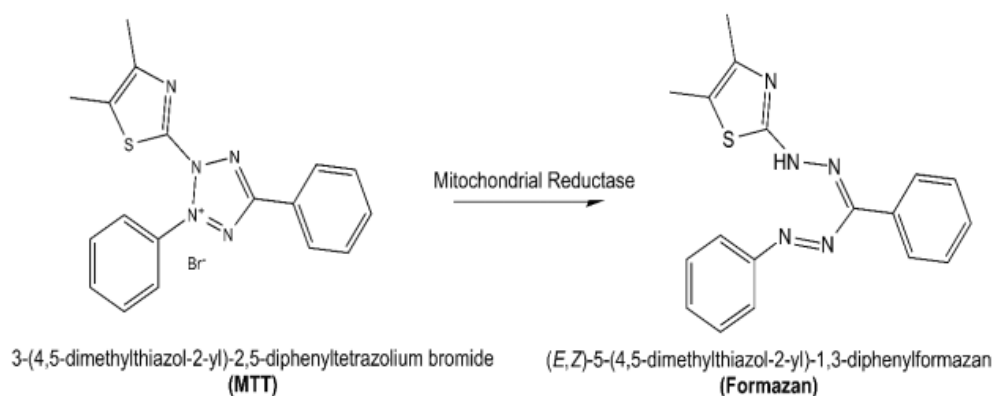
Πίνακας 2.5.2: Ποσότητες διαλύματος αλάτων σε 5 ml θρεπτικού μέσου για την επίτευξη των διαφορετικών τιμών ωσμωμοριακότητας

Διάλυμα αλάτων (λ)	Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)
0	300
50	400
100	500
120	550
150	600
200	700
240	800
300	900
400	1000

Μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο παρουσία 10 % ορού και φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O), αφαιρούταν το παλίο τους θρεπτικό και προστίθεντο τα θρεπτικά μέσα με τις επιλεγμένες τιμές ωσμωμοριακότητας παρουσία 10 % ορού. Ακολουθούσε επώαση των κυττάρων για 72 ώρες.

2.5.3. Δοκιμασία εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας με MTT

Η μέθοδος ανάλυσης με χρήση του (3-(4,5-διμεθυλοθειαζόλ-2-υλ)-2,5-διφενυλτετραζολικού βρωμιδίου (MTT Assay) είναι μία χρωματομετρική μέθοδος κατά την οποία ελέγχεται η μεταβολική δραστηριότητα συγκεκριμένων κυτταρικών ενζύμων και η οποία χρησιμοποιείται σε μελέτες εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας. Η ένωση MTT είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας, το οποίο όταν διαλυθεί σε θρεπτικό μέσο από όπου απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης (phenol red), οδηγεί στη δημιουργία διαλύματος κίτρινου χρώματος. Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε αδιάλυτο μωβ φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες στο εσωτερικό των ζωντανών και μόνο κυττάρων (Εικόνα 2.5.3), σχηματίζοντας κρυστάλλους ορατούς ακόμα και μακροσκοπικά. Η διαλυτοποίηση του φορμαζανίου πραγματοποιείται με τη χρήση οργανικών διαλυτών και μετράται φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου μωβ χρώματος και επαγωγικά της μεταβολικής ενεργότητας και του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων (Borenfreund and Puerner, 1984; Borenfreund and Puerner, 1985; Mosmann, 1983).



Εικόνα 2.5.3: Αναπαράσταση της χημικής μετατροπής του διαλυμένου MTT σε αδιάλυτο μωβ φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες

Για τη δημιουργία του διαλύματος MTT, πραγματοποιούνταν διάλυση της ένωσης MTT, που βρίσκεται σε μορφή σκόνης, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ερυθρό της φαινόλης σε τελική συγκέντρωση 1 mg / ml. Ακολουθούσε ανάδευση του διαλύματος και παραμονή του σε ζεστό υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Με το πέρας των 10 λεπτών, απομακρύνονταν οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι φορμαζανίου στο διάλυμα με διέλευση του διαλύματος μέσα από φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,22 μm. Μετά από αναρρόφηση των παλιών υλικών, ακολουθούσε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα MTT στον επωαστικό κλίβανο για 4 ώρες. Με το πέρας των 4 ωρών επώασης, αφαιρούνταν το MTT, προστίθετο ισοπροπανόλη με σκοπό τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων του φορμαζανίου που είχαν σχηματιστεί στα ζωντανά κύτταρα και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση των πλακών για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση των κυττάρων γινόταν σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και αναφοράς 630 nm. Η μετρούμενη απορρόφηση ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του μωβ φορμαζανίου, και επομένως του ποσοστού επιβίωσης και μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων.

2.5.4. Δοκιμασία εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από χρώση των κυττάρων με Neutral Red

Η δοκιμασία χρώσης των κυττάρων με Neutral Red παρέχει μια ποσοτική εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων και βασίζεται στην ικανότητα μόνο των βιώσιμων κυττάρων να ενσωματώνουν και να συγκρατούν τη χρωστική ερυθρού χρώματος εντός των λυσοσωμάτων (Borenfreund and Puerner, 1984; Borenfreund and Puerner, 1985).

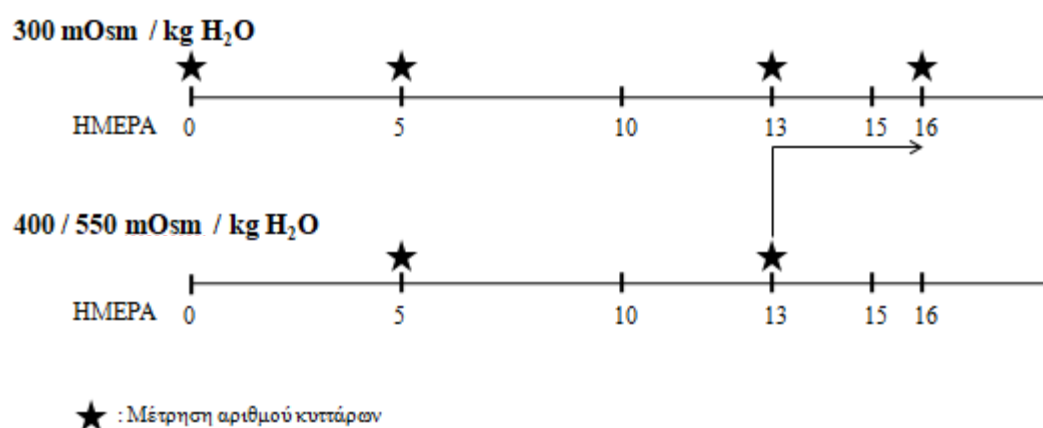
Για τη δημιουργία του διαλύματος Neutral Red, η χρωστική Neutral Red διαλυόταν σε θρεπτικό μέσο απουσία ερυθρού της φαινόλης σε τελική συγκέντρωση 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Μετά την αναρρόφηση των παλιών θρεπτικών υλικών των κυττάρων, ακολουθούσε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα Neutral Red στον κλίβανο για 4 ώρες. Με το πέρας των 4 ωρών, γινόταν έκπλυση με PBS (NaCl , KCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) και στη συνέχεια προσθήκη διαλύματος αποχρωματισμού (50 % αιθανόλη 100%, 49 % H_2O , 1 % οξικό οξύ 100%) και ανάδευση των πλακών για 5 λεπτά στην τράπεζα ανάδευσης. Η φωτομέτρηση των κυττάρων γινόταν σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και αναφοράς 660 nm. Η μετρούμενη απορρόφηση ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της χρωστικής και επομένως του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

2.6. Εφαρμογή επαναλαμβανόμενου ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα

2.6.1. Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλία

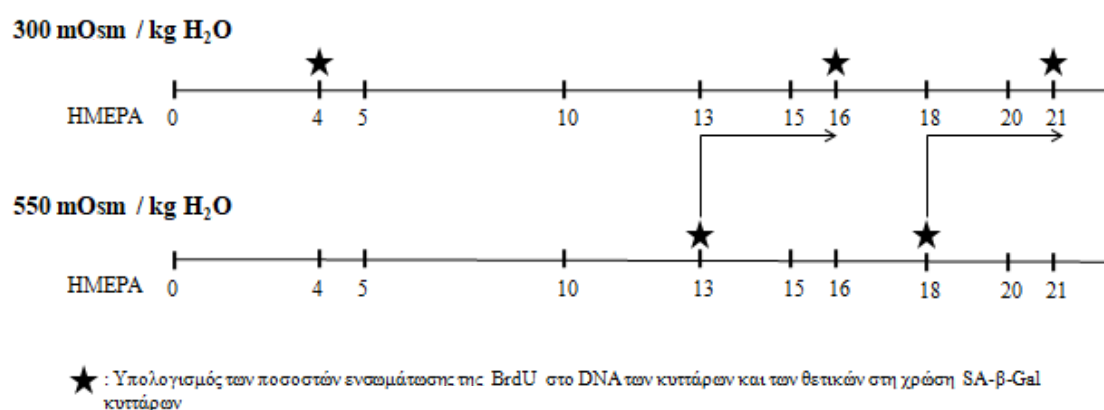
Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου επιστρώνονταν με θρεπτικό υλικό παρουσία 10 % ορού και φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O) σε καλυπτρίδες, οι οποίες τοποθετούνταν σε τρυβλία εμβαδού 8 cm², με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε καλυπτρίδα να επιστρώνονται 4.000 και 10.000 κύτταρα, αντίστοιχα. Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα εκτίθονταν σε υψηλή ωσμωμοριακότητα με αλλαγή του παλιού θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Έπειτα, πραγματοποιούνταν διαδοχικές εκθέσεις των κυττάρων στην υψηλή ωσμωμοριακότητα, οι οποίες επαναλαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες.

Την πέμπτη και δέκατη τρίτη ημέρα επώασης των κυττάρων στις υπερωσμωτικές συνθήκες γινόταν καταμέτρηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων. Τη δέκατη τρίτη ημέρα, επίσης, γινόταν επαναφορά των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας, με σκοπό την καταμέτρηση των βόειων και των ανθρώπινων κυττάρων μετά από τρεις ημέρες από την επαναφορά σε φυσιολογικές συνθήκες ωσμωμοριακότητας (Εικόνα 2.6.1.1).



Εικόνα 2.6.1.1: Σχεδιάγραμμα πειράματος μέτρησης του απόλυτου αριθμού των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα. Συγκεκριμένος αριθμός βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα (4.000 και 10.000 κύτταρα, αντίστοιχα) επιστρώθηκαν σε τρυβλία 8 cm² και επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300, 400 και 550 mOsm / kg H₂O. Την 5^η και 13^η ημέρα επώασης των κυττάρων με τα θρεπτικά υλικά διαφορετικών τιμών ωσμωμοριακότητας έγινε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Επιπλέον, τη 13^η ημέρα τα κύτταρα επαναφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκε ο αριθμός τους έπειτα από τρεις ημέρες.

Επιπλέον, τη δέκατη τρίτη και τη δέκατη όγδοη ημέρα παραμονής των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο υψηλής ωσμωμοριακότητας γινόταν έλεγχος της ικανότητας των κυττάρων να συνθέτουν το DNA τους μέσω ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU), καθώς και εκτίμηση της ενσωμάτωσης της ειδικής για τη γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης. Τη δέκατη τρίτη και τη δέκατη όγδοη ημέρα, επίσης, γινόταν επαναφορά των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας, με σκοπό την εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας και της ενσωμάτωσης της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης απουσία του στρεσογόνου παράγοντα μετά από τρεις ημέρες (Εικόνα 2.6.1.2).



Εικόνα 2.6.1.2: Σχεδιάγραμμα υπολογισμού των ποσοστών ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα και των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων. Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Την 13^η και 18^η ημέρα πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των ποσοστών ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων και των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων που εκτίθονταν στο ωσμωτικό στρες. Επιπλέον, τη 13^η και τη 18^η ημέρα τα κύτταρα επαναφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O και υπολογίστηκαν και πάλι τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων και τα θετικά στη χρώση SA-β-Gal κύτταρα. Ως κύτταρα-μάρτυρες της ικανότητας πολλαπλασιασμού και αντίστοιχα ως κύτταρα-αρνητικοί μάρτυρες της γήρανσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα που επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O για τέσσερις ημέρες.

Επιπλέον, τη δέκατη τρίτη ημέρα γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων και σε ένα μικρό αριθμό κυττάρων (200 κύτταρα) συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς και τιμής ωσμωμοριακότητας πραγματοποιούνταν εκτίμηση με τη χρωστική Crystal Violet της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται μέσω της δημιουργίας αποικιών.

2.6.2. Μελέτη της επίδρασης ωσμωτικού στρες στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων μέσω ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU)

Η βρωμοδεοξουριδίνη (5-bromo-2-deoxyuridine - BrdU) είναι ένα συνθετικό νουκλεοσίδιο, ανάλογο της θυμιδίνης, η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA των κυττάρων κατά τη διάρκεια αντιγραφής του DNA στη

φάση S του κυτταρικού κύκλου. Με τη χρήση ειδικού σεσημασμένου με μία φθορίζουσα ομάδα αντισώματος έναντι της BrdU, είναι δυνατή η ανίχνευση της ενσωμάτωσής της στο νεοσυντιθέμενο DNA των κυττάρων, αντανακλώντας την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων.

Αφού λοιπόν είχε προηγηθεί η επίστρωση των κυττάρων στις καλυπτρίδες και η επώασή τους με τα θρεπτικά υλικά διαφορετικής ωσμωμοριακότητας (300, 550 mOsm / kg H₂O), γινόταν προσθήκη διαλύματος BrdU σε τελική συγκέντρωση 50 μM στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και τα κύτταρα επωάζονταν για 48 ώρες. Με το πέρας των 48 ωρών γινόταν αναρρόφηση του υλικού των κυττάρων και τα κύτταρα μονιμοποιούνταν στις καλυπτρίδες με διάλυμα φορμαλδεΐδης 4 % (v/v) σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μονιμοποίηση πραγματοποιούνταν δύο εκπλύσεις με PBS και στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα TritonX-100 0,2 % (v/v) σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν διαπερατές. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν και πάλι δύο εκπλύσεις των κυττάρων με PBS και τα κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα HCl 2N σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να ανοίξει η διπλή έλικα του DNA. Έπειτα γίνονταν τρεις διαδοχικές επώσεις των 10 λεπτών των κυττάρων με διάλυμα ζελατίνης 0,5 % (v/v) σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό τη δέσμευση των μη-ειδικών θέσεων. Έπειτα και από τις τρεις επώσεις των κυττάρων με το διάλυμα ζελατίνης, τα κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα αντισώματος έναντι της BrdU με τίτλο 1:125 για 16 ώρες στους 4 °C στο σκοτάδι. Μετά από μία έκπλυση με το διάλυμα ζελατίνης για 10 λεπτά τα κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα DAPI 2,5 μg / ml σε PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Με το πέρας των 20 λεπτών, γινόταν έκπλυση των καλυπτρίδων αρχικά με PBS κι έπειτα με απιονισμένο νερό και αυτές τοποθετούνταν σε σταγόνα διαλύματος mounting που εμποδίζει την εξασθένηση του φθορισμού σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο φθορισμού και υπολογίζονταν τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU.

2.6.3. Ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης (Senescence-Associated β-galactosidase - SA-β-Gal) των κυττάρων έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες

Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της σύνθεσης του DNA αποτελεί μεν χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων, όμως δεν τα διαχωρίζει

από τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα και τα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία (φάση G0 του κυτταρικού κύκλου), και τα οποία έχουν αναστείλει προσωρινά τον πολλαπλασιασμό τους. Η χρώση β-γαλακτοσιδάσης θεωρείται ένας από τους καλύτερους βιοδείκτες της *in situ* ανίχνευσης γηρασμένου φαινοτύπου των κυττάρων (Dimri et al., 1995). Τα κύτταρα, τόσο τα γηρασμένα όσο και τα νεαρά, διαθέτουν το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων τους, το οποίο παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε pH 4. Σε pH 6 μόνο τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν θετική χρώση β-γαλακτοσιδάσης (Dimri et al., 1995), η οποία παρατηρείται ως κυανό χρώμα περιπυρηνικά των γηρασμένων κυττάρων. Αυτό συμβαίνει καθώς όταν το pH ισούται με 6, η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει το υπόστρωμα 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-β-D-γαλακτοσίδιο (X-Gal) στο εσωτερικό των γηρασμένων μόνο κυττάρων. Έτσι λοιπόν, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των γηρασμένων από τα νεαρά κύτταρα.

Και εδώ λοιπόν, αφού είχε προηγηθεί η επίστρωση των κυττάρων στις καλυπτρίδες και η επώασή τους με τα θρεπτικά υλικά διαφορετικής ωσμωμοριακότητας (300, 550 mOsm / kg H₂O), γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων και μονιμοποίηση αυτών στις καλυπτρίδες με διάλυμα φορμαδεϋδης 3 % (v/v) σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, γινόταν έκπλυση των κυττάρων με PBS για 10 λεπτά και στη συνέχεια αυτά επωάζονταν με το διάλυμα χρώσης της SA-β-Gal [1 mg/ml υποστρώματος της β-γαλακτοσιδάσης (X-Gal) σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 40 mM κιτρικό οξύ / φωσφορικό νάτριο pH 6.0, 5 mM σιδηροκυανιούχο κάλιο (potassium ferrocyanide), 5 mM σιδηροκυανιούχο κάλιο (potassium ferricyanide), 150 mM χλωριούχο νάτριο και 2 mM χλωριούχο μαγνήσιο] στους 37 °C για χρονικό διάστημα από 24 έως 72 ώρες, παρακολουθώντας την ενσωμάτωση της χρώσης των δειγμάτων και ενός θετικού στη χρώση δείγματος μάρτυρα. Η αντίδραση τερματιζόταν με έκπλυση των κυττάρων με PBS και μετά από μικροσκοπική παρατήρηση υπολογίζονταν τα ποσοστά ενσωμάτωσης της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης των κυττάρων.

2.6.4. Χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Crystal Violet έπειτα από την επίδραση επαναλαμβανόμενου φωσφορικού στρες

Η χρώση κυττάρων με Crystal Violet είναι μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής να δεσμεύεται σε πολυανιονικά

μόρια σακχάρου (π.χ. στο DNA) στον πυρήνα των κυττάρων (Gillies et al., 1986; Guzman et al., 2014; Vandersickel et al., 2011). Η δέσμευση της μωβ χρωστικής στον πυρήνα διάσπαρτων κυττάρων που σχηματίζουν αποικίες είναι ορατή μακροσκοπικά και μικροσκοπικά.

Τη δέκατη τρίτη ημέρα, ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων (200 κύτταρα) συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς και τιμής ωσμωμοριακότητας επιστρωνόταν με θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας σε τρυβλία εμβαδού 21 cm². Τα βόεια κύτταρα επωάζονταν για 7 ημέρες, ενώ τα ανθρώπινα κύτταρα για 14 ημέρες στους 37 °C και παρουσία 5 % CO₂. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνταν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 4 % (v/v) σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μονιμοποιημένα πλέον κύτταρα επωάζονταν με διάλυμα χρωστικής Crystal Violet 0,01 % (w/v) σε PBS για 60 λεπτά. Με το πέρας της 1 ώρας, γινόταν απομάκρυνση της χρωστικής και τα κύτταρα εκπλένονταν με απιονισμένο H₂O και αφήνονταν να στεγνώσουν. Τέλος, γινόταν καταμέτρηση του αριθμού και εκτίμηση του μεγέθους των αποικιών.

2.7. Παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα

Για τη μελέτη της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και της πιθανής επαγωγής γήρανσης εξαιτίας παρατεταμένου ωσμωτικού στρες, τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου επιστρώνονταν με θρεπτικό υλικό παρουσία 10 % ορού και φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O) σε φλάσκες εμβαδού 25 cm². Όταν οι καλλιέργειες γίνονταν πλήρεις, ακολουθούσαν αλλαγές υλικού των κυττάρων με υλικά ωσμωμοριακότητας 300 και 550 mOsm / kg H₂O για κάθε βόεια κυτταρική σειρά και με υλικά 300, 400 και 550 mOsm / kg H₂O για κάθε ανθρώπινη κυτταρική σειρά, οι οποίες επαναλαμβάνονταν κάθε δύο μέρες.

Έπειτα από κάθε 6 αλλαγές υλικού γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων και ένας μικρός αριθμός κυττάρων συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς και τιμής ωσμωμοριακότητας επιστρωνόταν με θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας σε καλυπτρίδες (4.000 βόεια κύτταρα και 10.000 ανθρώπινα κύτταρα / καλυπτρίδα), οι οποίες τοποθετούνταν σε τρυβλία εμβαδού 8 cm², για εκτίμηση της ενσωμάτωσης BrdU και για χρώση SA-β-Gal, όπως αυτές περιγράφηκαν στις § 2.6.2. και 2.6.3., αντίστοιχα. Σκοπός ήταν ο έλεγχος της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και της πιθανής επαγωγής κυτταρικής γήρανσης έπειτα από παρατεταμένο ωσμωτικό στρες. Για κάθε κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκαν συνολικά 36 αλλαγές υλικού και 6 ανακαλλιέργειες.

Σε κάθε ανακαλλιέργεια, ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων (200 κύτταρα) από κάθε κυτταρική σειρά συγκεκριμένης τιμής ωσμωμοριακότητας επιστρωνόταν με θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας σε τρυβλία εμβαδού 21 cm². Τα βόεια κύτταρα επωάζονταν για 7 ημέρες, ενώ τα ανθρώπινα κύτταρα για 14 ημέρες στους 37 °C και παρουσία 5 % CO₂. Στη συνέχεια ακολουθούσε όμοια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε στην § 2.6.4.

2.8. Μελέτη της έκφρασης δεικτών κυτταρικής γήρανσης σε επίπεδο RNA με την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR)

Η τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR) επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μικρών αλληλουχιών DNA ή RNA (100-600 bp), μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του νουκλεϊκού οξέος χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Μέσω της PCR είναι δυνατή η σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων, εφόσον είναι γνωστές οι παράπλευρες αλληλουχίες τους.

Για την υλοποίηση της PCR χρησιμοποιούνται ένα ζεύγος μονόκλωνων DNA εκκινητών γνωστής αλληλουχίας, οι οποίοι υβριδοποιούνται με τις παράπλευρες αλληλουχίες της αλληλουχίας-στόχου, και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) για την επιμήκυνση των εκκινητών. Κατά τη διάρκεια ενός κύκλου της PCR υπάρχουν τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο του διαχωρισμού των αλυσίδων του νουκλεϊκού οξέος οι δύο αλυσίδες του γονικού μορίου διαχωρίζονται με θέρμανση του διαλύματος στους 95 °C κατά το δεύτερο στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών το διάλυμα ψύχεται απότομα στους 60 °C, προκειμένου ο ένας εκκινητής να υβριδοποιηθεί στο άκρο 3' του στόχου της μίας αλυσίδας και ο άλλος εκκινητής στο άκρο 3' του στόχου της συμπληρωματικής αλυσίδας. Προσθέτοντας περίσσεια εκκινητών αποφεύγεται η υβριδοποίηση του γονικού μορίου με τον εαυτό του. Κατά το τρίτο στάδιο της σύνθεσης του νουκλεϊκού οξέος το διάλυμα θερμαίνεται στους 72 °C, που αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης και η πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας-στόχου (5' προς 3'). Μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους, οι οποίοι ενισχύουν την αλληλουχία-στόχο εκθετικά. Ιδανικά, μετά από n κύκλους, η αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί κατά 2^n φορές.

Εν συντομία η μέθοδος περιλαμβάνει την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, την παρασκευή cDNA από το δείγμα RNA με τη

χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης, την ενίσχυση του μεταγραφήματος παρουσία της χρωστικής SYBR Green I, η οποία φθορίζει έντονα όταν δεσμευθεί σε δίκλωνο DNA και την ανίχνευση του φθορισμού μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους PCR. Αφού η ένταση του φθορισμού υπερβεί τον ουδό ανίχνευσης, εξακολουθεί να αυξάνεται, καθώς ταυτόχρονα αυξάνεται ο αριθμός δίκλωνων μορίων που αντιστοιχούν στο μεταγραφικό προϊόν του ενδιαφέροντός μας.

Στην παρούσα εργασία ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτίθονταν σε υψηλή ωσμωμοριακότητα (400 και 550 mOsm / kg H₂O) 24 διαδοχικές φορές με αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υφίσταντο την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O) χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα-μάρτυρες της γονιδιακής έκφρασης. Έπειτα με την τεχνική qRT-PCR προσδιορίζονταν τα επίπεδα έκφρασης γνωστών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης, όπως οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21^{CIP1/WAF1} και p16^{INK4A}, καθώς και των εξωκυτταρικών πρωτεασών μεταλλοπρωτεασών 1 (mmp 1), που αποτελούν βασικούς παράγοντες, που προσδίδουν στα γηρασμένα κύτταρα τον ιδιαίτερο προ-φλεγμονώδη φαινότυπο (Senescence-Associated Secretory Phenotype - SASP). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιούταν το γονίδιο GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), το οποίο εμφανίζει σταθερή υψηλή έκφραση στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς.

2.8.1. Απομόνωση και καθαρισμός του RNA των κυττάρων

Για την απομόνωση του RNA από καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου που αναπτύσσονταν σε τρυβλία διαμέτρου 8 cm², αρχικά, γινόταν πλήρης απομάκρυνση με αναρρόφηση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού των κυττάρων και προσθήκη σε αυτά 400 λ διαλύματος τριζόλης, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η διαλυτοποίηση του βιολογικού υλικού με ταυτόχρονη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα κύτταρα συλλέγονταν στο υπερκείμενο διάλυμα με απόξεση και συλλέγονταν σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια, τα οποία φυλάσσονταν στους -180 °C για 30 λεπτά είτε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι την επεξεργασία τους. Στη συνέχεια, τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου και γινόταν προσθήκη 80 λ χλωροφορμίου σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα ανακινούνταν για περίπου 15 δευτερόλεπτα και έπειτα αφήνονταν για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το

πέρας των 2 λεπτών τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση παρατηρούνταν διαχωρισμός του διαλύματος σε τρεις φάσεις (οργανική, ενδιάμεση, υδατική). Η υδατική φάση του διαλύματος, όπου περιέχεται το RNA, μεταφερόταν σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και σε αυτό γινόταν προσθήκη 200 λ ισοπροπανόλης. Έπειτα από μια μικρή ανακίνηση, τα δείγματα μεταφέρονταν στους -20 °C για 16 ώρες, με σκοπό την πλήρη κατακρήμνιση του RNA. Την επόμενη ημέρα τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση, απομακρυνόταν το υπερκείμενο και γινόταν προσθήκη 400 λ 75 % (v/v) αιθανόλης. Ακολούθως, γινόταν ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα, γινόταν πλήρης απομάκρυνση του υπερκειμένου και το υπό μορφής ιζήματος RNA αφηνόταν να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Μόλις εξατμίζονταν και τα τελευταία ίχνη αιθανόλης, το RNA επαναδιαλυόταν σε 35 λ νερό ελεύθερο RNασών. Μία μικρή ποσότητα του κάθε δείγματος (4 λ) μεταφερόταν σε νέα σωληνάρια και πραγματοποιούνταν φωτομέτρηση των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο Nanodrop και υπολογισμός της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η ποιότητα του RNA φασματοφωτομετρικά.

2.8.2. Σύνθεση cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής

Έπειτα από την απομόνωση και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ολικού RNA κάθε δείγματος των ανθρώπινων κυττάρων ηηκτοειδούς πυρήνα, ακολουθούσε η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνταν το PrimeScript RT Reagent Kit, το οποίο περιέχει ένα διάλυμα με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, ένα ρυθμιστικό διάλυμα και έναν εκκινητή oligodT. Με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε κάθε αντίδραση συνολικού όγκου 10 λ για κάθε δείγμα προσθέτονταν οι εξής ποσότητες συστατικών:

- 2 λ ρυθμιστικού διαλύματος (5×)
- 0,5 λ διαλύματος ενζύμου
- 0,5 λ εκκινητή oligodT (50 μM)
- κατάλληλος όγκος RNA κάθε δείγματος ώστε η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση να ισούται με 500 ng

- κατάλληλος όγκος νερού απαλλαγμένου RNασών μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 10 λ κάθε αντίδρασης.

Έπειτα από την προσθήκη όλων των συστατικών σε κάθε αντίδραση, ακολουθούσε ανάδευση, επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά και τελικά επώαση στους 85 °C για 15 δευτερόλεπτα, όπου απενεργοποιούνταν το ένζυμο και τερματιζόταν η κάθε αντίδραση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι καθ' όλη τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας, τα αντιδραστήρια παρέμεναν στον πάγο προς αποφυγή της δράσης RNασών.

2.8.3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative Reverse-Transcription PCR, qRT-PCR)

Μετά τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA κάθε δείγματος, ακολουθούσε η ενζυμική ενίσχυση του DNA με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). Για κάθε γονίδιο προς μελέτη (p16, p21, mmp1) παρασκευαζόταν μια αντίδραση συνολικού όγκου 20 λ, σε κάθε μία από τις οποίες προσθέτονταν οι εξής ποσότητες συστατικών:

- 10 λ qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX
- 0,2 λ πρόσθιος εκκινητής (10 μM)
- 0,2 λ ανάστροφος εκκινητής (10 μM)
- 4,6 λ H₂O απαλλαγμένο RNασών
- 5 λ template DNA αραιωμένο σε αναλογία 1/25

Μετά την ανάδευση των δειγμάτων, ακολουθούσε η αντίδραση της PCR σε θερμικό κυκλοποιητή PCR πραγματικού χρόνου Mx 3000P QPCR Systems Cycler με τις ακόλουθες συνθήκες:

- 95 °C : 2 λεπτά
- 95 °C : 5 δευτερόλεπτα
- 60 °C : 20 δευτερόλεπτα
- 72 °C : 10 δευτερόλεπτα

για 50 κύκλους. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνταν με το πρόγραμμα MxPro qPCR software (Agilent Technologies).

2.9. Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των κυττάρων με ανάλυση Western

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης Western (Western blotting) επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου σε κυτταρικό εκχύλισμα με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτής. Εν συντομία, η μέθοδος περιλαμβάνει την απομόνωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου, την ηλεκτροφορητική ανάλυση αυτού σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτό, την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (Polyvinylidene difluoride - PVDF) και τέλος τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων στην πρωτεΐνη-στόχο. Το τελευταίο στάδιο προϋποθέτει τη δέσμευση των μη-ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking). Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με ειδικό έναντι της πρωτεΐνης-στόχου αντίσωμα, γνωστό ως πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο συνήθως είναι συνθετικό ή έχει παραχθεί σε κάποιο ζώο. Ως πρωτογενή χαρακτηρίζονται τα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν έναν ή πολλούς αντιγονικούς επιτόπους μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης και συνδέονται μέσω αυτών σε αυτή. Αφού η μεμβράνη εκπλυθεί από τη περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος, επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με τμήματα της βαριάς αλυσίδας των πρωτογενών αντισωμάτων και συνήθως είναι σεσημασμένο είτε ενζυμικά είτε με ραδιενέργεια. Επομένως, είναι δυνατή η έμμεση ανίχνευση και οπτικοποίηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισώματος, έπειτα από την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος.

Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν ο προσδιορισμός της έκφρασης πρωτεϊνών που θεωρούνται δείκτες κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες p-p38, p53 και p21 σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μετά από επαναλαμβανόμενο ωσμωτικό στρες. Ειδικότερα, τα κύτταρα δέχονταν την επίδραση υψηλής ωσμωμοριακότητας (400 και 550 mOsm / kg H₂O) 24 φορές. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υφίσταντο την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O) χρησιμοποιούνταν ως κύτταρα-μάρτυρες της πρωτεϊνικής έκφρασης.

2.9.1. Απομόνωση πρωτεϊνών έπειτα από λύση των κυττάρων

Για τη λύση των κυττάρων, αρχικά αφαιρούνταν το θρεπτικό τους μέσο από τα τρυβλία με αναρρόφηση κι έπειτα πραγματοποιούνταν έκπλυση αυτών με κρύο διάλυμα TBS (20 mM Trisma, 137 mM NaCl, pH=7,6). Η λύση των κυττάρων πραγματοποιούνταν σε 150 λ (ανά τρυβλίο καλλιέργειας διαμέτρου 21 cm²) Laemmli sample buffer 2× (125mM Tris-HCL pH=6,8 , 2,5% (w/v) SDS, 20% (v/v) γλυκερόλη, 125 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,02% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και 10 λ αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών ανά ml διαλύματος Laemmli sample buffer 2×), προθερμασμένου στους 100 °C. Τα κύτταρα συλλέγονταν με απόξεση της επιφάνειας των τρυβλίων με τη χρήση πλαστικής ξύστρας σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια και επωάζονταν στους 100 °C για 2 λεπτά. Ακολουθούσε εφαρμογή υπερήχων στα δείγματα για 10 δευτερόλεπτα (sonication) και φυγοκέντρηση στις 13.500 rpm για 10 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση μεμβρανικών υπολειμμάτων και υποκυτταρικών οργανιδίων. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μοιραζόταν ισόποσα σε μικρότερες ποσότητες σε νέα μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια (aliquots) και αυτά φυλάσσονταν στους -40 °C έως την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

2.9.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS - PAGE)

Μετά τη λύση των κυττάρων και την απομόνωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους πραγματοποιούνταν ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία του απορρυπαντικού θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS), με σκοπό το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να μετακινούνται εντός ηλεκτρικού πεδίου και σε τιμές pH διαφορετικές από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ το SDS έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους ένα ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο και τελικά όμοιο προσανατολισμό εντός του ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών αποτελεί συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να μετακινούνται εντός των πόρων που σχηματίζονται στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου-δισ-ακρυλαμιδίου στα διαλύματα του πηκτώματος.

Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβαξης και το πήκτωμα διαχωρισμού. Το πρώτο είναι απαραίτητο για τη συγκέντρωση του συνόλου των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος σε μία ζώνη, ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα όλες οι πρωτεΐνες των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού, ενώ το δεύτερο είναι απαραίτητο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.

Αφού συναρμολογούταν η ειδική συσκευή πήξης των πηκτωμάτων, ξεκινούσε η διαδικασία παρασκευής τους με όλα τα υλικά να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά παρασκευαζόταν το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού με όλα τα υλικά πλην του υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium Persulphate - APS), το οποίο προστίθετο τελευταίο ακριβώς πριν την τοποθέτησή του στη συσκευή, προκειμένου να αποφευχθεί ο πολυμερισμός εκτός της συσκευής, και τοποθετούταν για μερικά λεπτά στους 37 °C. Με την προσθήκη 10% w/v APS, το διάλυμα τοποθετούταν στη συσκευή και αφηνόταν για πολυμερισμό σε ηρεμία. Αμέσως μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού, παρασκευαζόταν το διάλυμα για το πήκτωμα επιστοιβαξης και αυτό τοποθετούταν στη συσκευή, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοιβαξης τοποθετούταν ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία εσοχών τοποθέτησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων και αφηνόταν σε ηρεμία προκειμένου να πολυμεριστεί. Στην παρούσα εργασία, η επιθυμητή συγκέντρωση ακρυλαμίδιου του πηκτώματος διαχωρισμού ήταν 12,5 %, ενώ του πηκτώματος επιστοιβαξης είναι σταθερή στο 5 %. Το πρωτόκολλο παρασκευής των πηκτωμάτων που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.9.2.1):

Πίνακας 2.9.2.1: Πρωτόκολλο παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE)

Υλικά	Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel) (12,5 %)	Πήκτωμα επιστοιβαξης (Stacking gel) (5 %)
Separating / Stacking Buffer (4 ×)	5 ml	2,5 ml
SDS 10 %	0,2 ml	0,1 ml
Glycerol 10 %	0,2 ml	0,05 ml

TEMED	5λ	7,5 λ
APS 10 %	150 λ	62,5 λ
H₂O	6,25 ml	5,8 ml
Acryl / Bis	8,35 ml	1,9 ml
V_{total}	20 ml	10 ml

Μετά τον πολυμερισμό και του πήκτωματος επιστοιβαζής, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετούταν σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρωνόταν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που προηγουμένως παρασκευαζόταν, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 2.9.2.2. Τα πρωτεϊνικά δείγματα, μετά από θέρμανση στους 100 °C για 5 λεπτά, προκειμένου να αποφεύγεται η αποικοδόμηση των δειγμάτων από ενδοκυτταρικές πρωτεάσες, και φυγοκέντρωση στα 13.500 rpm για 2 λεπτά, τοποθετούνταν στις εσοχές που είχαν δημιουργηθεί στο πήκτωμα επιστοιβαζής με τη χρήση μικροσύριγγας Hamilton. Σε μία από τις εσοχές τοποθετούνταν πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστών μοριακών βαρών. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν στα 120 Volt.

Πίνακας 2.9.2.2: Παρασκευή διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1×)

Υλικά	Ποσότητα
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer 10×)	30 ml
SDS 10 %	3 ml
Millipore H₂O	Έως 300 ml
V_{total}	300 ml

Σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι η μέθοδος λύσης των κυττάρων που αναπτύχθηκε από τον Laemmli (Laemmli, 1970) και περιγράφηκε στην § 2.9.1. παρουσιάζει ως μειονέκτημα την αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων φωτομετρικά, εξαιτίας της παρουσίας του κυανού της βρωμοφαινόλης και της μερκαπταιθανόλης στο διάλυμα λύσης. Προκειμένου, λοιπόν, να εξασφαλιστεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων, χρησιμοποιούταν μία πρωτεΐνη με σταθερά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα (house-keeping protein) ως εσωτερικός μάρτυρας (loading control). Στην

παρούσα εργασία, ως πρωτεΐνη-μάρτυρας χρησιμοποιούταν η πρωτεΐνη GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

2.9.3. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυβινυλοφθοριδίου (PVDF)

Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ήταν απαραίτητη η ηλεκτρομεταφορά τους από το πήκτωμα σε μεμβράνη υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Με αυτόν τον τρόπο, ήταν δυνατή η μετέπειτα ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Όλη αυτή η διαδικασία πραγματοποιούταν σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Πίνακας 2.9.3), το οποίο εξασφαλίζει τη μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων από το SDS πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούταν μεμβράνη PVDF, η οποία απαιτείται να ενεργοποιηθεί σε μεθανόλη.

Με το πέρασμα, λοιπόν, της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα διαχωρισμού αφαιρούταν από τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης. Εντωμεταξύ, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιούνταν σε μεθανόλη για 5 λεπτά και εκπλενόταν με νερό. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση της μεμβράνης, αυτή τοποθετούταν σε κρύο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς μαζί με δύο χαρτιά Whattman και 2 σφουγγαράκια. Μέσα στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη τοποθετούταν πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Εκατέρωθεν αυτών τοποθετούνταν τα δύο χαρτιά Whattman και εκατέρωθεν αυτών τα δύο σφουγγαράκια. Το σύνολο αυτό συναρμολογούταν σε ειδική θήκη, η οποία τοποθετούταν μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με τέτοιο τρόπο ώστε το πήκτωμα να είναι προσανατολισμένο προς τον αρνητικό πόλο της συσκευής και η μεμβράνη προς το θετικό πόλο της συσκευής. Αυτό είναι σημαντικό προκειμένου οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται από το πήκτωμα προς τη μεμβράνη, όπου οι πρωτεΐνες καθιλώνονται όπως ακριβώς διαχωρίζονταν στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση. Μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προστίθετο κρύο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και πάγος. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιούταν στα 120 Volt για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Πίνακας 2.9.3: Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer)

Υλικά	Ποσότητα
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer 10×)	100 ml
Methanol	150 ml
Millipore H ₂ O	750 ml
V _{total}	1000 ml

2.9.4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη πολυβινυλοφθοριδίου (PVDF)

Μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη ακολουθούσε η ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών, δηλαδή η εκλεκτική ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, ενός πρωτογενούς και ενός δευτερογενούς. Πριν όμως από την ανοσοαποτύπωση, πραγματοποιούνταν επώαση της μεμβράνης με άπαχο γάλα σε μορφή σκόνης 5 % (w/v) σε TBS-T (0,1% Tween-20 σε TBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να δεσμεύονται οι μη-ειδικές θέσεις της μεμβράνης. Έπειτα, η μεμβράνη επωαζόταν ολονύχτια με το πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση σε άπαχο γάλα 5 % (v/v) σε TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Στο διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος προστίθετο 0,02 % νατραζιδίου (v/v) για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά την ολονύχτια επώαση.

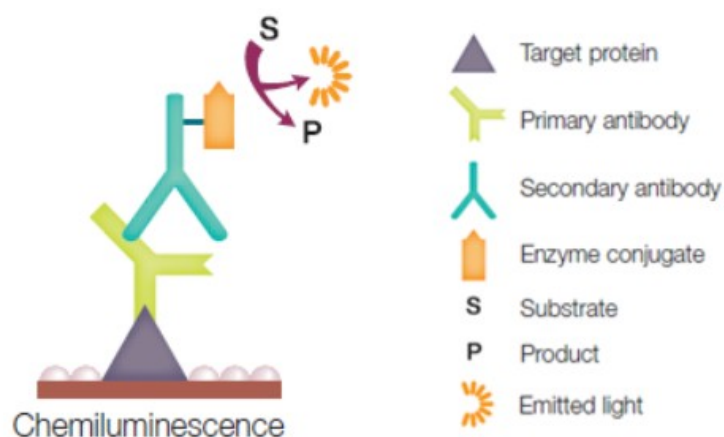
Μετά την ολονύχτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, ακολουθούσαν η απομάκρυνση του αντισώματος από τη μεμβράνη και τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των 20 λεπτών της μεμβράνης με άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Έπειτα, η μεμβράνη επωαζόταν με το δευτερογενές αντίσωμα σε άπαχο γάλα 5 % (v/v) σε TBS-T για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν ενζυμικά σεσημασμένο με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase - HRP), προκειμένου να είναι ορατή η αντίδραση δευτερογενούς αντισώματος - πρωτογενούς αντισώματος - πρωτεΐνης-στόχου. Μετά την επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, ακολουθούσαν η απομάκρυνση του αντισώματος από τη μεμβράνη και τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των 30 λεπτών της μεμβράνης, δύο με άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T και ένα με TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου υπό

ανακίνηση. Στον πίνακα 2.9.4.1 φαίνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι τίτλοι τους στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 2.9.4.1: Κατάλογος των αντισωμάτων και των συγκεντρώσεών τους

Πρωτογενές αντίσωμα	Δευτερογενές αντίσωμα
anti - p38 (1:1000) σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T	anti-rabbit 1:2.000 σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T
anti - p-p38 (1:1.000) σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T	anti-rabbit 1:2.000 σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T
anti - p21 (1:1.000) σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T	anti-mouse 1:2.000 σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T
anti - p53 (1:500) σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T	anti-mouse 1:2.000 σε άπαχο γάλα 5 % (w/v) σε TBS-T

Τέλος, η ανίχνευση του σήματος στη μεμβράνη πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) (Εικόνα 2.9.4.2). Κατά το φαινόμενο αυτό η υπεροξειδάση, η οποία είναι συνδεδεμένη με το δευτερογενές αντίσωμα, αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά της, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και οξειδώνει το χρωμογόνο λουμινόλη. Το αντιδραστήριο ECL, στο οποίο περιέχονται το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το χρωμογόνο λουμινόλη, προστίθετο απευθείας πάνω στη μεμβράνη (750 λ ECL / μεμβράνη) και αφηνόταν για μερικά λεπτά σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, το φως ανιχνευόταν από κάμερα που καταγράφει μια ψηφιακή εικόνα του ανοσοστυπώματος. Στο ανοσοστύπωμα οι πρωτεΐνες στις οποίες δεσμεύονταν τα αντισώματα αποτυπώνονταν ως ζώνες αμαύρωσης. Ο χρόνος έκθεσης της μεμβράνης εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος.



Εικόνα 3.9.4.2: Διαγραμματική απεικόνιση του φαινομένου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, το οποίο βασίζεται στην εκπομπή φωτονίων κατά την οξείδωση του χρωμογόνου λουμινόλη, η οποία καταλύεται από την αντίδραση της υπεροξειδάσης με το υπόστρωμά της, το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

2.9.5. Απομάκρυνση των δεσμευμένων αντισωμάτων και επανυβριδισμός της μεμβράνης με νέα αντισώματα

Ένα ανοσοστύπωμα είναι δυνατόν να επαναχρησιμοποιηθεί, απομακρύνοντας αρχικά τα ήδη δεσμευμένα αντισώματα και έπειτα επανυβριδίζοντάς το με διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα (stripping), με σκοπό την ανίχνευση μιας διαφορετικής πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, τα ανοσοστυπώματα ξεπλένονταν με TBS-T για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, απομακρυνόταν το TBS-T και οι μεμβράνες επωάζονταν με το διάλυμα απομάκρυνσης των αντισωμάτων (Stripping buffer) για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (Πίνακας 2.9.5). Στη συνέχεια, αφού απομακρυνόταν το διάλυμα απομάκρυνσης των αντισωμάτων, η μεμβράνη εκπλενόταν τρεις φορές για 30 λεπτά με TBS-T και έπειτα επωαζόταν με άπαχο γάλα 5 % σε TBS-T για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, για την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια ακολουθούσε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, όπως περιγράφηκε στην § 2.9.4.

Πίνακας 2.9.5: Παρασκευή του διαλύματος απομάκρυνσης των αντισωμάτων (Stripping buffer) (50 ml/ μεμβράνη)

Υλικά	Ποσότητα
Tris-HCl	3,125 ml
SDS	10 ml
β-mercaptoethanol	355 λ
H ₂ O	έως 50 ml
V _{total}	50 ml

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο μεσοσπονδύλιος δίσκος, και ιδιαίτερα ο πηκτοειδής πυρήνας, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ωσμωμοριακότητας, τα οποία οφείλονται κυρίως στην υψηλή συγκέντρωση της πρωτεογλυκάνης αγκρεκάνης στη μήτρα του δίσκου αλλά και σε διάφορους άλλους στρεσογόνους παράγοντες στους οποίους εκτίθενται τα κύτταρα του δίσκου (βλ. § 1.1.2). Παρότι στους περισσότερους ιστούς η φυσιολογική ωσμωμοριακότητα είναι σταθερή στα 300 mOsm / kg H₂O, στο δίσκο αυτή μεταβάλλεται διαρκώς μέσα στη μέρα από τα 400 έως και τα 550 mOsm / kg H₂O. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι το ωσμωτικό στρες που δέχεται ο μεσοσπονδύλιος δίσκος εμπλέκεται στην εμφάνιση χαρακτηριστικών εκφύλισης και γήρανσης σε αυτόν. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης λόγω ωσμωτικού στρες στον πηκτοειδή πυρήνα του δίσκου.

3.1. Επίδραση ωσμωτικού στρες στη βιωσιμότητα των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου με τις μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του ωσμωτικού στρες σε βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου, αρχικά πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της βιωσιμότητάς τους έπειτα από την έκθεσή τους σε επιλεγμένες τιμές ωσμωμοριακότητας με βάση αυτές που έχουν παρατηρηθεί *in vivo* με τις μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red. Οι τιμές ωσμωμοριακότητας που επιλέχτηκαν ήταν τα 300 mOsm / kg H₂O, η οποία έχει παρατηρηθεί φυσιολογικά στους περισσότερους ιστούς, τα 400 mOsm / kg H₂O, η οποία αποτελεί τις φυσιολογικές ισοτονικές συνθήκες του πηκτοειδούς πυρήνα, οι τιμές 500 και 550 mOsm / kg H₂O, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί ως υπερτονικές συνθήκες στον πηκτοειδή πυρήνα και οι τιμές 600, 700, 800, 900 και 1000 mOsm / kg H₂O.

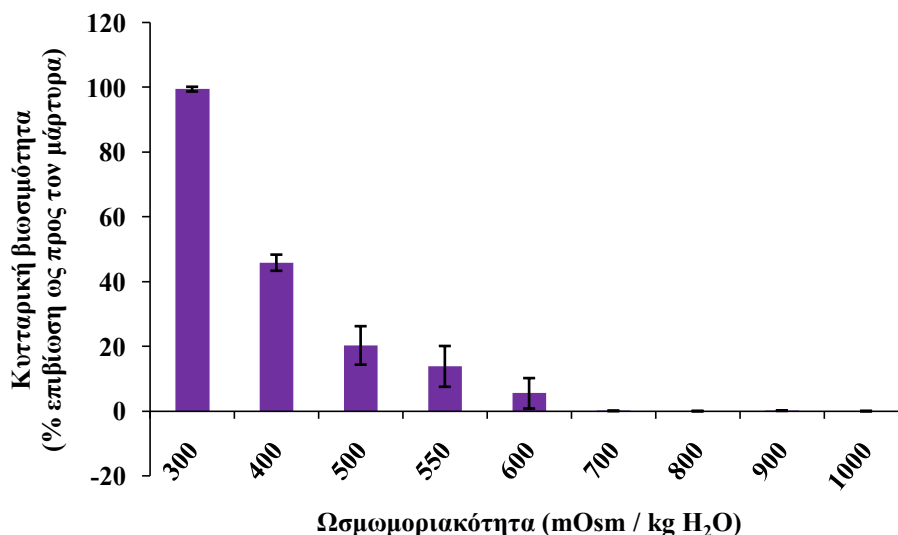
3.1.1. Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα

Τα βόεια κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (20.000 κύτταρα / βοθρίο) και διατηρήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με τα θρεπτικά μέσα με τις επιλεγμένες τιμές ωσμωμοριακότητας για 72 ώρες. Μετά από αναρρόφηση των θρεπτικών μέσων τα κύτταρα επώαστηκαν με το διάλυμα MTT ή με το διάλυμα Neutral Red για 4 ώρες. Έπειτα, ακολουθήθηκε η διαδικασία των δύο μεθόδων, όπως περιγράφηκε στην § *Υλικά και Μέθοδοι*, και μετρήθηκε η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος έπειτα από φωτομέτρηση των κυττάρων. Μετά από επεξεργασία των μετρήσεων, κατασκευάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις της βιωσιμότητας των βόειων κυττάρων συναρτήσει των διαφόρων τιμών ωσμωμοριακότητας (Εικόνα 3.1.1).

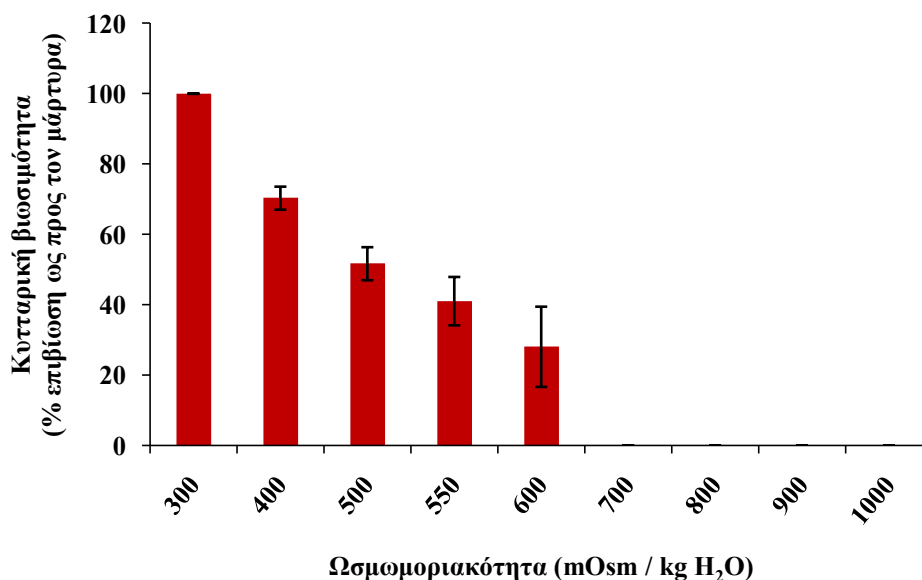
Παρατηρήθηκε ότι καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου από τα 300 έως και τα 600 mOsm / kg H₂O, μειώνεται εκθετικά η μετρούμενη απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος που παράγεται τόσο με τη δοκιμασία MTT (Εικόνα 3.1.1 A), όσο και με τη δοκιμασία Neutral Red (Εικόνα 3.1.1 B). Η μείωση της απορρόφησης υποδηλώνει μείωση του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων. Επιπλέον, τιμές ωσμωμοριακότητας μεγαλύτερες των 600 mOsm / kg H₂O καθίστανται κυτταροτοξικές, καθώς η μετρούμενη απορρόφηση ήταν μηδενική.

ΒΟΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

A. Δοκιμασία MTT



B. Δοκιμασία Neutral Red



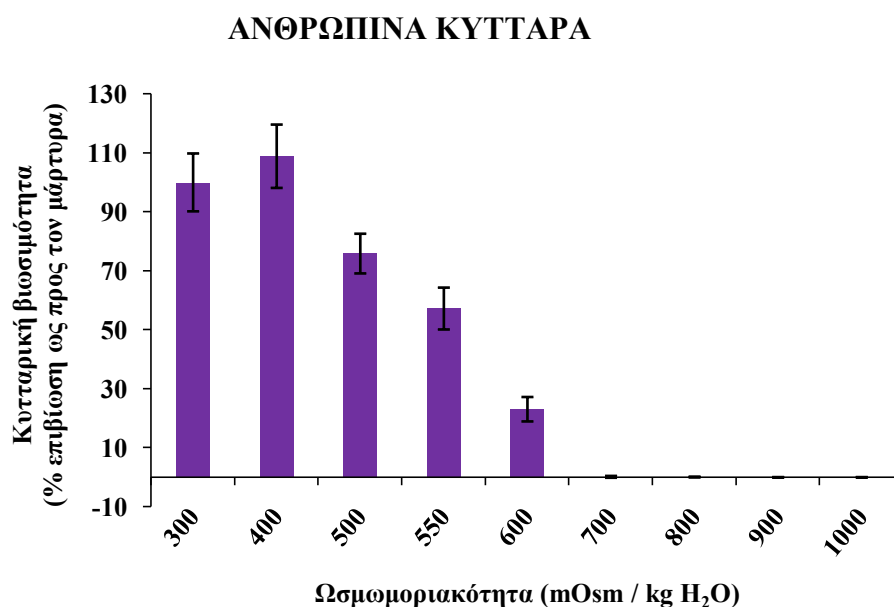
Εικόνα 3.1.1: Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των βόειων κυττάρων ηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα επώσθησαν με τα θρεπτικά μέσα των επιλεγμένων τιμών ωσμωμοριακότητας από 300 έως 1000 mOsm / kg H₂O για 72 ώρες.

A. Μετά την πραγματοποίηση της μεθόδου MTT, μετρήθηκε η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος στην κάθε τιμή ωσμωμοριακότητας έπειτα από φωτομέτρηση των κυττάρων σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και αναφοράς 630 nm. Παρατηρείται μείωση της μετρούμενης απορρόφησης και επαγωγικά της μεταβολικής ενεργότητας και του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του μέσου.

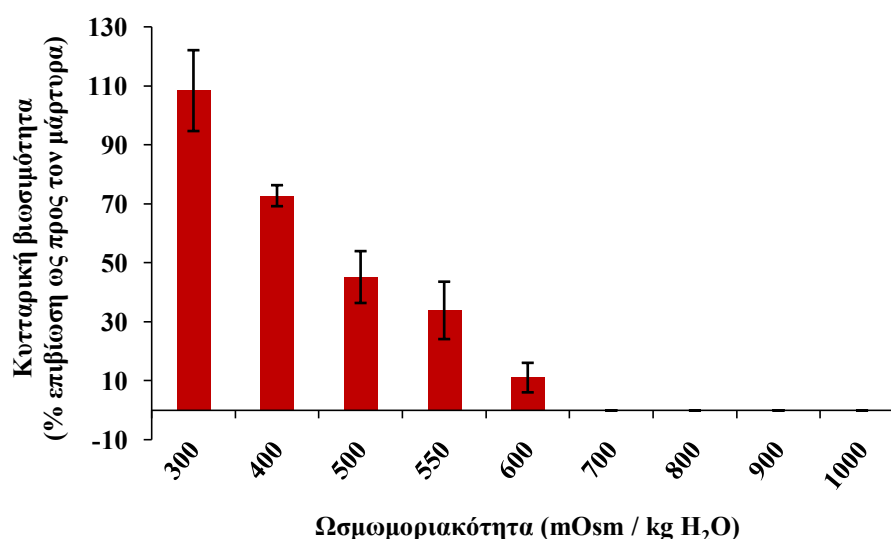
B. Μετά την πραγματοποίηση της μεθόδου Neutral Red, μετρήθηκε η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος στην κάθε τιμή ωσμωμοριακότητας έπειτα από φωτομέτρηση των κυττάρων σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και αναφοράς 660 nm. Παρατηρείται μείωση της μετρούμενης απορρόφησης και επαγωγικά του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του μέσου. Τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων αποτελούν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, όπου πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις για κάθε τιμή ωσμωμοριακότητας.

3.1.2. Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των ανθρώπινων κυττάρων ηκτηοειδούς πυρήνα

Για τα ανθρώπινα κύτταρα ακολουθήθηκε όμοια με αυτή των βόειων κυττάρων διαδικασία. Οι γραφικές παραστάσεις της βιωσιμότητας των ανθρώπινων κυττάρων συναρτήσεως των διαφόρων τιμών ωσμωμοριακότητας φαίνονται στην Εικόνα 3.1.2.



B. Δοκιμασία Neutral Red



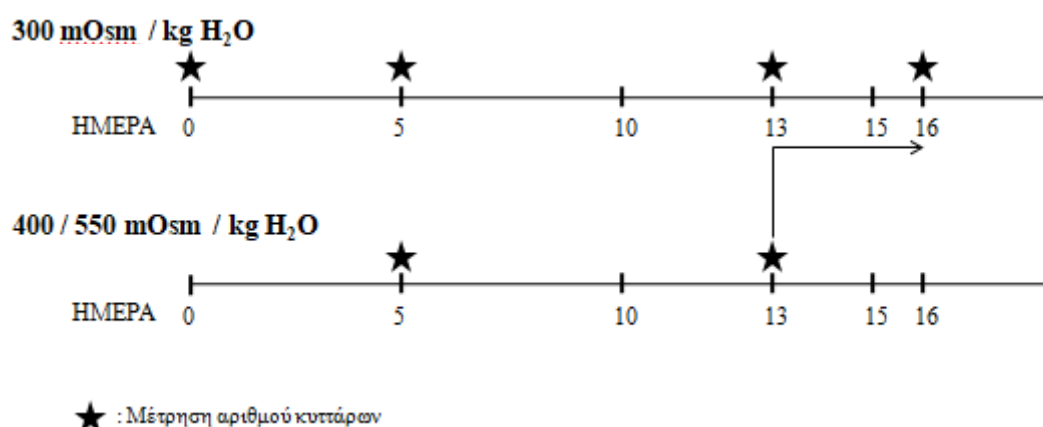
Εικόνα 3.1.2: Η αυξανόμενη ωσμωμοριακότητα μειώνει το ποσοστό επιβίωσης των ανθρώπινων κυττάρων ηκτηοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ομοίως, παρατηρείται μείωση της μετρούμενης απορρόφησης και επαγωγικά του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του μέσου τόσο με τη δοκιμασία MTT (Α) όσο και με τη δοκιμασία Neutral Red (Β).

Όπως και στην περίπτωση των βόειων κυττάρων, παρατηρείται εκθετική μείωση της μετρούμενης απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος που παράγεται και επομένως του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου τόσο με τη δοκιμασία MTT (Εικόνα 3.1.2 Α), όσο και με τη δοκιμασία Neutral Red (Εικόνα 3.1.2 Β), καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του μέσου έως τα 600 mOsm / kg H₂O.

3.2. Επίδραση ωσμωτικού στρες στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του ωσμωτικού στρες στον πολλαπλασιασμό βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης του απόλυτου αριθμού των κυττάρων και πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU), καθώς αυτά διατηρούνταν σε υψηλή ωσμωμοριακότητα. Κύτταρα που διατηρούνταν στα 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων.

3.2.1. Το ωσμωτικό στρες μειώνει την αύξηση (%) του αριθμού των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου



Εικόνα 3.2.1.1: Σχεδιάγραμμα πειράματος μέτρησης του απόλυτου αριθμού των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα. Συγκεκριμένος αριθμός βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα (4.000 και 10.000 κύτταρα, αντίστοιχα) επιστρώθηκαν σε τρυβλία 8 cm² και επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300, 400 και 550 mOsm / kg H₂O. Την 5^η και 13^η ημέρα επώασης των κυττάρων με τα θρεπτικά υλικά διαφορετικών τιμών ωσμωμοριακότητας έγινε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Επιπλέον, τη 13^η ημέρα τα κύτταρα επαναφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκε ο αριθμός τους έπειτα από τρεις ημέρες.

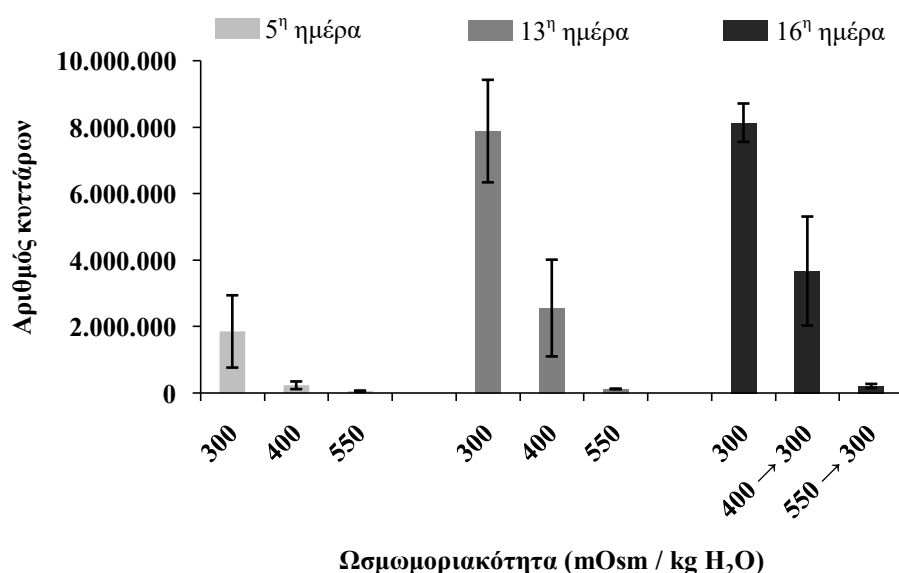
Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου επιστρώθηκαν σε τρυβλία (4.000 και 10.000 κύτταρα / 8 cm², αντίστοιχα) και εκτέθηκαν στα 400 και 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς συνεχόμενες μέρες. Την πέμπτη και τη δέκατη τρίτη ημέρα έγινε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων με κυτταρομετρητή ροής Coulter Counter ή/και με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Μετά

από δεκατρείς ημέρες έκθεσης των κυττάρων στις συνθήκες ωσμωτικού στρες, αυτά επαναφέρθηκαν στα 300 mOsm / kg H₂O και έγινε καταμέτρηση του αριθμού τους μετά από τρεις ημέρες απουσία του στρεσογόνου παράγοντα (Εικόνα 3.2.1.1). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του αριθμού των βόειων και των ανθρώπινων κυττάρων φαίνονται στις Εικόνες 3.2.1.2 και 3.2.1.3, αντίστοιχα.

A

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αριθμός κυττάρων (1 ^η ημέρα)	Αριθμός κυττάρων (5 ^η ημέρα)	Αριθμός κυττάρων (13 ^η ημέρα)	Ωσμ/τητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αριθμός κυττάρων (16 ^η ημέρα)
300	4.000	1.860.800 ± 1.087.954	7.891.942 ± 1.542.353	300	8.144.550 ± 577.116
400	4.000	240.100 ± 115.824	2.565.534 ± 1.455.980	400 → 300	3.679.983 ± 1.639.427
550	4.000	60.600 ± 21.401	129.367 ± 4.855	550 → 300	219.634 ± 61.753

B

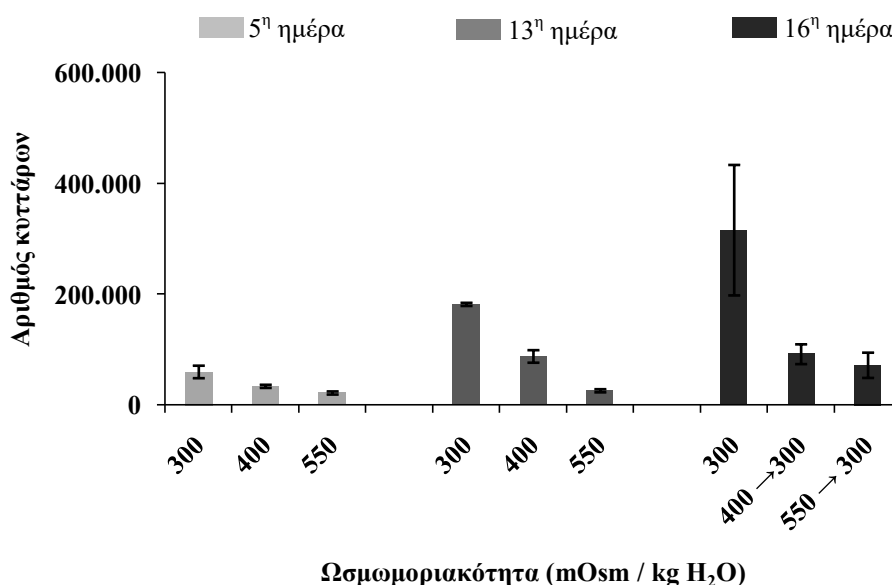


Εικόνα 3.2.1.2: Καταμέτρηση του αριθμού των βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου μετά από συγκεκριμένο αριθμό ημερών έκθεσης των κυττάρων σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 400 και 550 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκαν έπειτα από 5 και 13 ημέρες. Μετά από δεκατρείς ημέρες έκθεσής τους στις συνθήκες ωσμωτικού στρες, επαναφέρθηκαν στα 300 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκαν μετά από τρεις ημέρες απουσία του στρεσογόνου παράγοντα. Η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρητή ροής Coulter Counter. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις του κάθε δείγματος.

A

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αριθμός κυττάρων (1 ^η ημέρα)	Αριθμός κυττάρων (5 ^η ημέρα)	Αριθμός κυττάρων (13 ^η ημέρα)	Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αριθμός κυττάρων (16 ^η ημέρα)
300	10.000	60.000 ± 11.313	182.000 ± 2.828	300	316.000 ± 117.813
400	10.000	34.000 ± 2.828	88.000 ± 11.313	400 → 300	92.000 ± 17.888
550	10.000	22.000 ± 2.828	26.000 ± 2.828	550 → 300	72.000 ± 22.803

B



Εικόνα 3.2.1.3: Καταμέτρηση του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου μετά από συγκεκριμένο αριθμό ημερών έκθεσης των κυττάρων σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 400 και 550 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκαν έπειτα από 5 και 13 ημέρες. Μετά από δεκατρείς ημέρες έκθεσής τους στις συνθήκες ωσμωτικού στρες, επαναφέρθηκαν στα 300 mOsm / kg H₂O και καταμετρήθηκαν μετά από τρεις ημέρες απουσία του στρεσογόνου παράγοντα. Η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν πέντε μετρήσεις του κάθε δείγματος.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν σαφώς ότι σε κάθε μέτρηση ο αριθμός των κυττάρων που επωάζονται σε θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 400 mOsm / kg H₂O είναι μικρότερος συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, ενώ ο αριθμός των κυττάρων που επωάζονται σε θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 550 mOsm / kg H₂O είναι ακόμη μικρότερος. Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων υπολογίστηκε η αύξηση (%) του αριθμού των κυττάρων, προκειμένου να

συγκριθεί η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων στις διάφορες τιμές ωσμωμοριακότητας για το ίδιο χρονικό διάστημα, καθώς και μετά την επαναφορά τους από τις συνθήκες υψηλής ωσμωμοριακότητας στις φυσιολογικές. Έπειτα από τους κατάλληλους υπολογισμούς, τα αποτελέσματα της αύξησης (%) του αριθμού των βόειων και των ανθρώπινων κυττάρων φαίνονται στους πίνακες 3.2.1.4 και 3.2.1.5, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.2.1.4: Η αύξηση (%) του αριθμού των βόειων κυττάρων στις διάφορες τιμές ωσμωμοριακότητας. Η αύξηση (%) του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε στα 300, 400 και 550 mOsm / kg H₂O για το ίδιο χρονικό διάστημα (8 ημέρες), καθώς και μετά την επαναφορά τους από τα 400 και 550 mOsm / kg H₂O στα 300 mOsm / kg H₂O (3 ημέρες). Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις του κάθε δείγματος.

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αύξηση (%) αριθμού κυττάρων	Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αύξηση (%) αριθμού κυττάρων
300	4,2	300	1
400	10,7	400 → 300	1,4
550	2,1	550 → 300	1,7

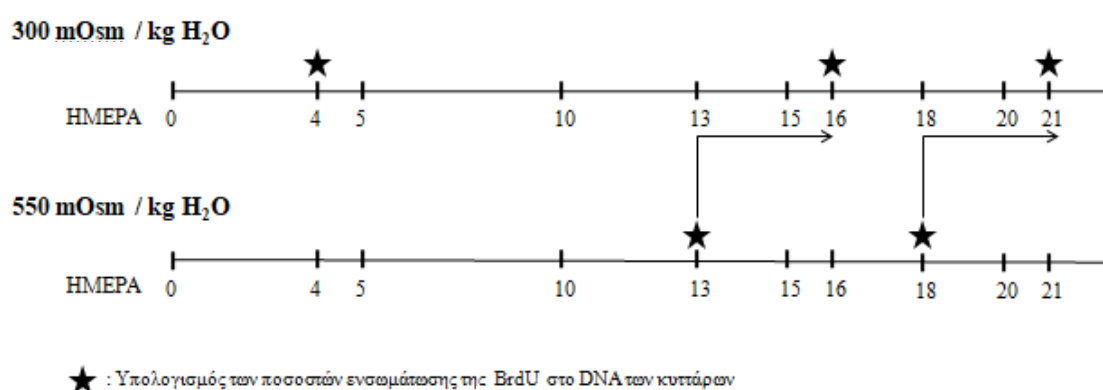
Πίνακας 3.2.1.5: Η αύξηση (%) του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων στις διάφορες τιμές ωσμωμοριακότητας. Η αύξηση (%) του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε στα 300, 400 και 550 mOsm / kg H₂O για το ίδιο χρονικό διάστημα (8 ημέρες), καθώς και μετά την επαναφορά τους από τα 400 και 550 mOsm / kg H₂O στα 300 mOsm / kg H₂O (3 ημέρες). Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν πέντε μετρήσεις του κάθε δείγματος.

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αύξηση (%) αριθμού κυττάρων	Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Αύξηση (%) αριθμού κυττάρων
300	3	300	1,7
400	2,6	400 → 300	1
550	1,2	550 → 300	2,7

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αύξηση (%) του αριθμού τόσο των βόειων όσο και των ανθρώπινων κυττάρων είναι μικρότερη, σχεδόν κατά το ήμισυ, σε συνθήκες ωσμωτικού στρες όπου η ωσμωμοριακότητα ισούται με 550 mOsm / kg H₂O συγκριτικά με τα 300 mOsm / kg H₂O. Όταν τα κύτταρα επαναφέρονταν στα 300 mOsm / kg H₂O για ορισμένο χρονικό διάστημα, ο αριθμός των κυττάρων που υπέστη ωσμωτικό στρες αυξάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό συγκριτικά με τα κύτταρα που επωάζονταν καθ' όλη τη διάρκεια στα 300 mOsm / kg H₂O.

3.2.2. Το ωσμωτικό στρες μειώνει την ικανότητα σύνθεσης του DNA των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Την ενδέκατη και τη δέκατη έκτη ημέρα τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα BrdU για 48 ώρες και έπειτα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΐδης. Ακολούθως, όπως περιγράφηκε στην § *Υλικά και Μέθοδοι*, επισημάνθηκαν με αντίσωμα έναντι της BrdU και με DAPI και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 4.2.2.1: Σχεδιάγραμμα υπολογισμού των ποσοστών ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα. Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Την 13^η και 18^η ημέρα πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των ποσοστών ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων που εκτίθονταν στο ωσμωτικό στρες. Επιπλέον, τη 13^η και τη 18^η ημέρα τα κύτταρα επαναφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O και υπολογίστηκαν και πάλι τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA των κυττάρων. Ως κύτταρα-μάρτυρες της ικανότητας πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα που επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O για τέσσερις ημέρες.

Μετά από δεκατρείς και μετά από δεκαοχτώ ημέρες έκθεσης των κυττάρων στις συνθήκες ωσμωτικού στρες, αυτά επαναφέρθηκαν στις φυσιολογικές συνθήκες και έγινε έλεγχος της ικανότητάς τους να συνθέτουν το DNA τους με τη μέθοδο ενσωμάτωσης της BrdU, όπως περιγράφηκε παραπάνω, μετά από τρεις ημέρες απουσία ωσμωτικού στρες. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στις υπερτονικές και μετά από επαναφορά στις ισοτονικές συνθήκες στο DNA βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου φαίνονται στους πίνακες 3.2.2.2 και 3.2.2.3, αντίστοιχα.

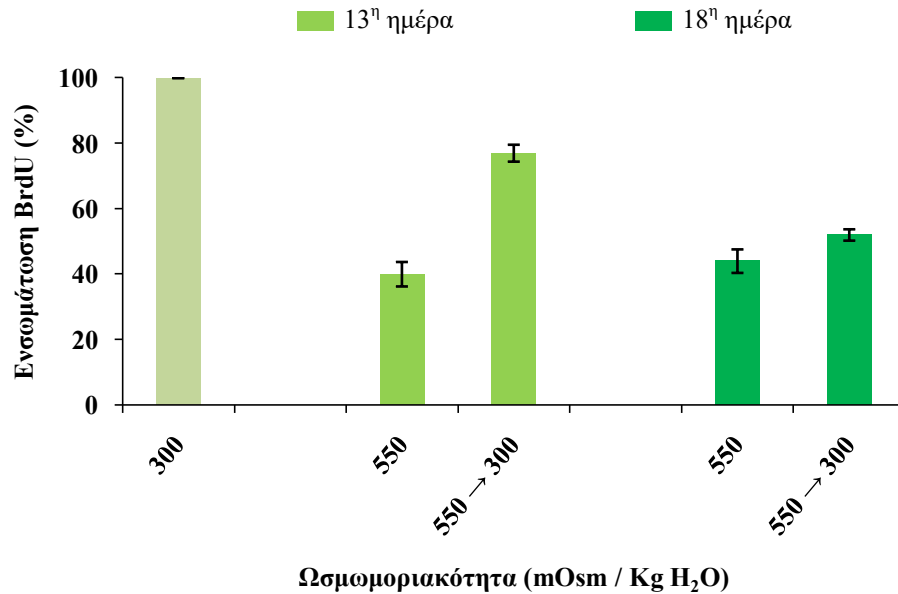
Πίνακας 3.2.2.2: Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στις υπερτονικές και μετά από επαναφορά στις φυσιολογικές συνθήκες στο DNA βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα βόεια κύτταρα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Μετά από τις δεκατρείς και τις δεκαοχτώ ημέρες, αυτά επαναφέρθηκαν στα 300 mOsm / kg H₂O. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU αποτελούν τον μέσο όρο $\pm$ την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

Ημέρες	Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	Ενσωμάτωση BrdU
4 ^η	300	100 %
13 ^η	550	40 $\pm$ 4 %
16 ^η	550 $\rightarrow$ 300	77 $\pm$ 3 %
18 ^η	550	44 $\pm$ 4 %
21 ^η	550 $\rightarrow$ 300	52 $\pm$ 2 %

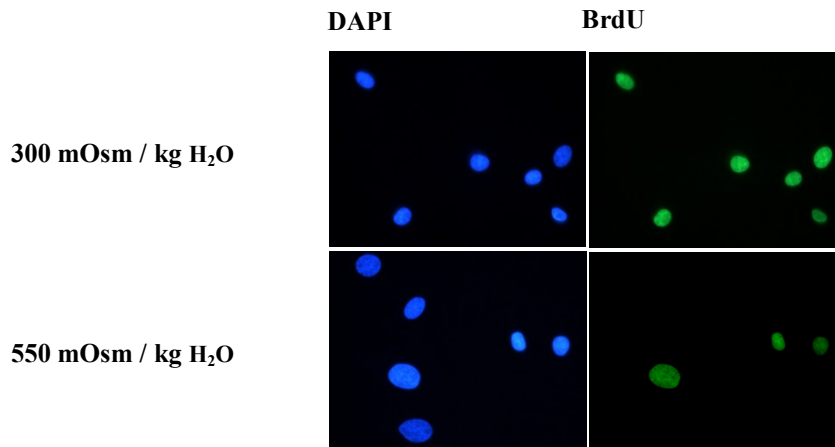
Ως γνωστόν από τη βιβλιογραφία, τα βόεια κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου είναι ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα *in vitro*. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και με τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, καθώς όταν τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA τους είναι 100 %, δηλαδή όλος ο κυτταρικός πληθυσμός πολλαπλασιάζεται. Όταν όμως τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU μειώνεται στο 40 % έπειτα από δεκατρείς ημέρες και στο 44 % έπειτα από δεκαοχτώ ημέρες συνεχόμενης έκθεσής τους στις υπερτονικές συνθήκες. Όταν, μετά από δεκατρείς συνεχόμενες ημέρες έκθεσης των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες, αυτά επαναφέρονται στις ισοτονικές συνθήκες για 3 ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU αυξάνεται στο 77 %, ενώ το ίδιο παρατηρείται και μετά από τις δεκαοχτώ ημέρες έκθεσης στο ωσμωτικό στρες αλλά σε μικρότερο βαθμό (52 %) (Εικόνα 3.2.2.1). Ενδεικτικές εικόνες, έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση, της ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.2.1 Β.

ΒΟΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

A



B



Εικόνα 3.2.2.3: Μελέτη της ενσωμάτωσης της βρωμοδεοξυουριδίνης (BrdU) στο DNA βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες.

A. Διαγραμματική απεικόνιση της ενσωμάτωσης της BrdU, και **B.** Ενδεικτικές εικόνες έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση της ενσωμάτωσης της BrdU σε τελική μεγέθυνση 40×.

Τα κύτταρα που εκτίθενται στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες παρουσιάζουν μειωμένη ενσωμάτωση της BrdU συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, ενώ μετά από την επαναφορά τους στις φυσιολογικές συνθήκες η ενσωμάτωση της BrdU αυξάνεται, χωρίς όμως να φτάνει τα αρχικά επίπεδα. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

Τα ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου παρουσιάζουν μικρότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τα βόεια *in vitro*. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, όταν τα κύτταρα

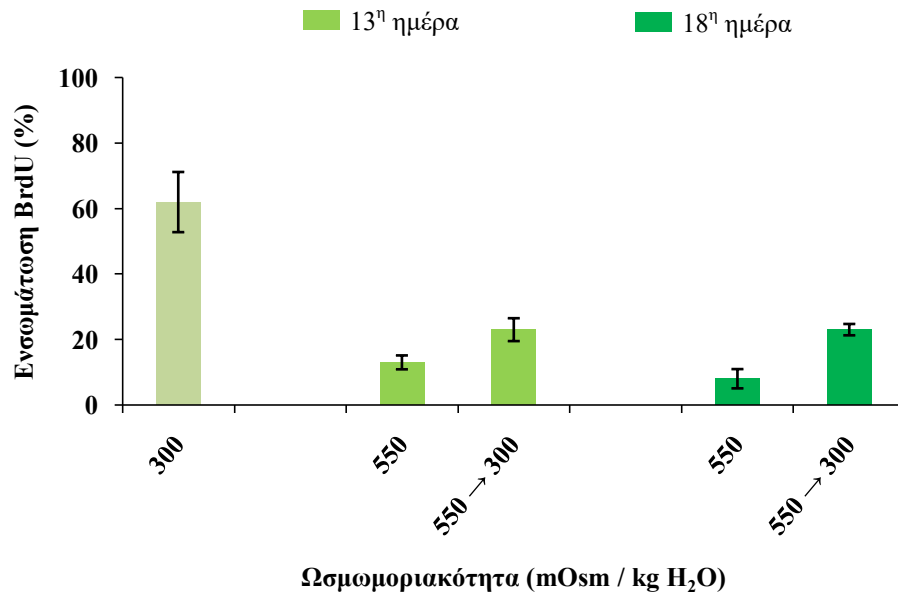
επωάζονται σε θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA τους είναι 62 %, δηλαδή το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού πληθυσμού πολλαπλασιάζεται. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες για δεκατρείς ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU μειώνεται σε μεγάλο βαθμό και φθάνει το 13 %, ενώ έπειτα από δεκαοχτώ ημέρες αυτό μειώνεται ακόμη περισσότερο και φθάνει το 8 %. Όταν, όμως, μετά από δεκατρείς συνεχόμενες ημέρες έκθεσης των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες, αυτά επαναφέρονται στις ισοτονικές συνθήκες για 3 ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU αυξάνεται στο 23 %, ενώ το ίδιο ποσοστό παρατηρείται και μετά από τις δεκαοχτώ ημέρες έκθεσης στο ωσμωτικό στρες (Εικόνα 3.2.2.2).

Πίνακας 3.2.2.2: Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στις υπερτονικές και μετά από επαναφορά στις φυσιολογικές συνθήκες στο DNA ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα ανθρώπινα κύτταρα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Μετά από τις δεκατρείς και μετά από δεκαοχτώ ημέρες, αυτά επαναφέρθηκαν στα 300 mOsm / kg H₂O. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

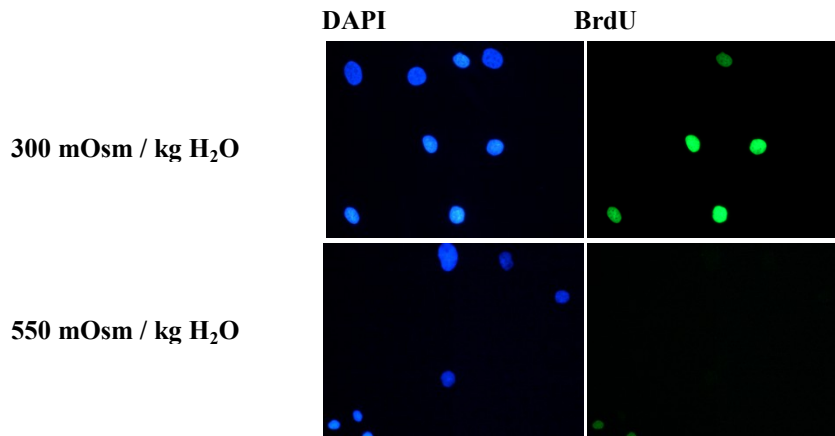
Ημέρες	Ωσμωμοριακότητα (mOsm/kg H ₂ O)	Ενσωμάτωση BrdU
4 ^η	300	62 ± 9 %
13 ^η	550	13 ± 2 %
16 ^η	550 → 300	23 ± 4 %
18 ^η	550	8 ± 3 %
21 ^η	550 → 300	23 ± 6 %

ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

A



B



Εικόνα 3.2.2.2: Μελέτη της ενσωμάτωσης της βρωμοδεοξυουριδίνης (BrdU) στο DNA ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες. Α. Διαγραμματική απεικόνιση της ενσωμάτωσης της BrdU, και **Β.** Ενδεικτικές εικόνες έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση της ενσωμάτωσης της BrdU σε τελική μεγέθυνση 40 $\times$.

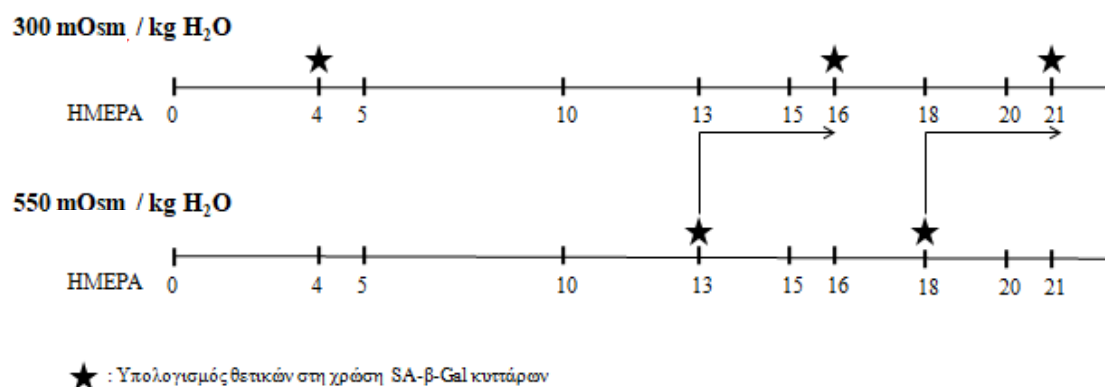
Τα κύτταρα που εκτίθενται στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες παρουσιάζουν μειωμένη ενσωμάτωση της BrdU συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, ενώ μετά από την επαναφορά τους στις φυσιολογικές συνθήκες η ενσωμάτωση της BrdU αυξάνεται, χωρίς όμως να φτάνει τα αρχικά επίπεδα. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU αποτελούν τον μέσο όρο $\pm$ την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

Αξίζει, βέβαια, να σημειωθεί ότι τόσο στην περίπτωση των βόειων όσο και σε αυτή των ανθρώπινων κυττάρων, όταν τα κύτταρα επαναφέρονται στις φυσιολογικές συνθήκες απουσία ωσμωτικού στρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU παρουσιάζει αυξητική τάση, όμως δεν επανέρχεται στα επίπεδα του αρχικού, όπου τα κύτταρα δεν είχαν προηγουμένως δεχτεί την επίδραση ωσμωτικού στρες.

3.3. Μελέτη της προαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες

Δεδομένου ότι η έκθεση των κυττάρων σε καταστάσεις στρες μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη κυτταρική γήρανση, σκοπός της παρούσας εργασίας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (§ 1.5), ήταν να διερευνηθεί η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης λόγω ωσμωτικού στρες στον πηκτοειδή πυρήνα του δίσκου. Γι' αυτό το σκοπό λοιπόν, αρχικά μελετήθηκε η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης που επιδεικνύει την χαρακτηριστική για τα γηρασμένα κύτταρα χρώση SA-β-Gal σε βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες. Έπειτα, μελετήθηκε η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης γήρανσης των κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως δείκτες γήρανσης την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, σε βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα έπειτα από παρατεταμένο ωσμωτικό στρες.

3.3.1. Η επίδραση ωσμωτικού στρες σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου δεν εμφανίζει θετική ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης



Εικόνα 3.3.1.1: Σχεδιάγραμμα πειράματος υπολογισμού των θετικών στη χρώση SA-β-Gal βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες. Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Την 13^η και 18^η ημέρα πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των ποσοστών των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων που εκτίθονταν στο ωσμωτικό στρες. Επιπλέον, τη 13^η και τη 18^η ημέρα τα κύτταρα επαναφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O και υπολογίστηκαν και πάλι τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων. Ως κύτταρα-αρνητικοί μάρτυρες της γήρανσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα που επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O για τέσσερις ημέρες.

Τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες ημέρες. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν την ίδια διαδικασία με θεραπευτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες. Την δέκατη τρίτη και δέκατη όγδοη ημέρα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης και στη συνέχεια επωάστηκαν με διάλυμα χρώσης SA-β-Gal για 16 ώρες. Μετά από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, υπολογίστηκαν τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal βόειων και ανθρώπινων κυττάρων, τα οποία παρουσιάζονται στους πίνακες 3.3.1.1 και 3.3.1.2, αντίστοιχα.

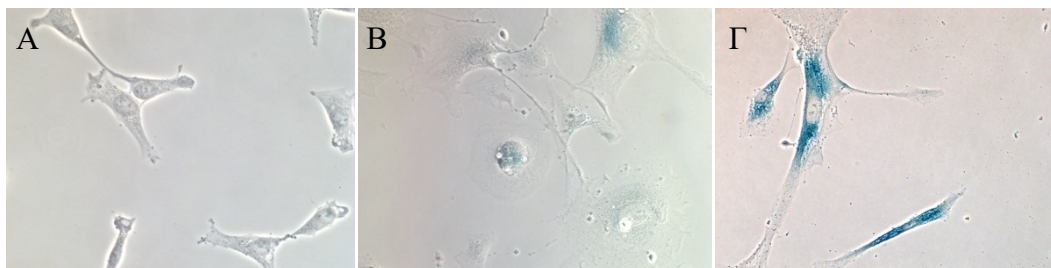
Πίνακας 3.3.1.1: Τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal βόειων κυττάρων έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες. Τα βόεια κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτέθηκαν στις υπερτονικές συνθήκες για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες μέρες. Τη 13^η και τη 18^η ημέρα τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα χρώσης SA-β-Gal και έπειτα υπολογίστηκαν τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal βόειων κυττάρων. Τα ποσοστά αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

Ημέρες	Ωσμωμοριακότητα (mOsm/kg H ₂ O)	Κύτταρα θετικά στη χρώση SA-β-Gal (%)
4 ^η	300	0 %
13 ^η	550	1 %
16 ^η	550 → 300	3 ± 1 %
18 ^η	550	2 ± 1 %
21 ^η	550 → 300	4 ± 1 %

Πίνακας 3.3.1.2: Τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal ανθρώπινων κυττάρων έπειτα από επίδραση ωσμωτικού στρες. Τα ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτέθηκαν στις υπερτονικές συνθήκες για δεκατρείς και για δεκαοχτώ συνεχόμενες μέρες. Τη 13^η και τη 18^η ημέρα τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα χρώσης SA-β-Gal και έπειτα υπολογίστηκαν τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal ανθρώπινων κυττάρων. Τα ποσοστά αποτελούν τον μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν δύο τουλάχιστον μετρήσεις.

Ημέρες	Ωσμωμοριακότητα (mOsm/kg H ₂ O)	Κύτταρα θετικά στη χρώση SA-β-Gal (%)
4 ^η	300	0 %
13 ^η	550	1 %
16 ^η	550 → 300	1 %
18 ^η	550	3 ± 1 %
21 ^η	550 → 300	3 ± 2 %

Κατά τη μελέτη της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που επιδεικνύει τη χαρακτηριστική της γήρανσης χρώση SA-β-Gal, παρατηρούνται πολύ μικρά ποσοστά τόσο των βόειων όσο και των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου θετικών στη χρώση. Για την ακρίβεια, τα κύτταρα που δεν εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες δεν εμφανίζουν καθόλου χρώση (0 % κύτταρα - θετικά στη χρώση) (Εικόνα 3.3.1. Α). Από την άλλη μεριά τα κύτταρα που εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες είτε για δεκατρείς είτε για δεκαοχτώ ημέρες, καθώς και αυτά που επαναφέρονται στις φυσιολογικές συνθήκες εμφανίζουν τη χαρακτηριστική της γήρανσης κυανή χρώση περιυπερηνικά σε πολύ μικρό ποσοστό που δεν ξεπερνά σε οποιαδήποτε περίπτωση το 4 %, ενώ ο υπόλοιπος πληθυσμός των κυττάρων παρουσιάζει μια πιο ήπιας έντασης χρώση που δεν είναι αντιπροσωπευτική της γήρανσης (Εικόνα 3.3.1. Β). Το χαρακτηριστικό της γήρανσης κυανό χρώμα της SA-β-Gal που εμφανίζεται περιυπερηνικά φαίνεται στην Εικόνα 3.3.1. Γ, όπου παρουσιάζονται γηρασμένοι ινοβλάστες έπειτα από ακτινοβολήση, οι οποίοι είναι θετικοί στη χρώση σε ποσοστό 80 ± 3 % και οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας της γήρανσης.



Εικόνα 3.3.1: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της χρώσης SA-β-Gal κυττάρων έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση. Α. Κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου που δεν εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες δεν εμφανίζουν καθόλου τη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA-β-Gal. **Β.** Κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου που εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες για δεκατρείς και για δεκαοχτώ ημέρες εμφανίζουν τη χαρακτηριστική της γήρανσης κυανή χρώση περιυπερηνικά σε μικρό ποσοστό, που δεν επιδεικνύει τη γήρανση του συνόλου του πληθυσμού. **Γ.** Γηρασμένοι ινοβλάστες έπειτα από ακτινοβολήση εμφανίζουν περιυπερηνικά το χαρακτηριστικό της γήρανσης κυανό χρώμα της SA-β-Gal στο μεγαλύτερο ποσοστό τους. Η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε σε τελική μεγέθυνση 40×.

3.3.2. Η παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες δεν οδηγεί σε πρόωρη γήρανση των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

Προηγουμένως, περιγράφηκε η διερεύνηση της επίδρασης ωσμωτικού στρες στην πολλαπλασιαστική ικανότητα και στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, που αποτελούν δείκτες κυτταρικής γήρανσης, των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα.

Προκειμένου όμως να μελετηθεί το ενδεχόμενο, όπως πολλές μελέτες ισχυρίζονται, το ωσμωτικό στρες να οδηγεί σε πρόωρη γήρανση των κυττάρων του δίσκου, διερευνήθηκε η παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες στην ικανότητα πολλαπλασιασμού και στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης των κυττάρων, έπειτα από απομάκρυνση του στρεσογόνου παράγοντα, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν πρόκειται για πραγματικό μη-αντιστρεπτό φαινόμενο.

Γι' αυτό το σκοπό, λοιπόν, τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 διαδοχικές φορές, με μία ημέρα να μεσολαβεί από τη μία έκθεση στην άλλη. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-αρνητικοί μάρτυρες της γήρανσης. Σε κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων, πραγματοποιούνταν έλεγχος της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω ενσωμάτωσης BrdU και της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης μετά την απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες. Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU και τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων μετά την παύση παρατεταμένου ωσμωτικού στρες σε βόεια κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου φαίνονται στους πίνακες 3.3.2.1 και 3.3.2.2, αντίστοιχα, ενώ τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU στα ανθρώπινα κύτταρα φαίνονται στον πίνακα 3.3.2.3.

Πίνακας 3.3.2.1: Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU μετά την παύση παρατεταμένου ωσμωτικού στρες σε βόεια κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 συνεχόμενες φορές. Σε κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων διερευνήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους μετά την απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες.

Ωσμωμοριακότητ α (mOsm / kg H ₂ O)	18	24	30	36
300	98 ± 1 %	98 %	98 ± 2 %	89 ± 5 %
550	97 ± 2 %	98 ± 1 %	98 ± 1 %	95 ± 1 %

Πίνακας 3.3.2.2: Τα ποσοστά των θετικών στη χρώση SA-β-Gal κυττάρων μετά την παύση παρατεταμένου ωσμωτικού στρες σε βόεια κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 συνεχόμενες φορές. Σε κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων διερευνήθηκε η ικανότητα ενσωμάτωσης της ειδικής για την κυτταρική γήρανση χρώσης SA-β-Gal των βόειων κυττάρων μετά την απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες.

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	18	24	30	36
300	0%	0%	0.5 ± 0.7%	0 %
550	1 ± 1 %	0%	0%	0 %

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 3.3.2.1 και 3.3.2.2, οι οποίοι αφορούν τα βόεια κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα δίσκου, μέχρι και τις 36 εκθέσεις των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες, αυτά παρουσιάζουν υψηλή ενσωμάτωση της BrdU, δηλαδή διατηρούν την ικανότητά τους να συνθέτουν το DNA τους και να πολλαπλασιάζονται όμοια με τα κύτταρα-μάρτυρες. Επιπλέον, τα κύτταρα παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική ενσωμάτωση της ειδικής για την γήρανση χρώσης SA-β-Gal, όπως και τα κύτταρα-μάρτυρες.

Πίνακας 3.3.2.3: Τα ποσοστά ενσωμάτωσης της BrdU μετά την πάυση παρατεταμένου ωσμωτικού στρες σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 συνεχόμενες φορές. Σε κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων διερευνήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων κυττάρων μετά την απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες.

Ωσμωμοριακότητα (mOsm / kg H ₂ O)	12	24	36
300	43 %	33 ± 10 %	34 ± 4 %
550	63 ± 1 %	33 ± 10 %	30 ± 8 %

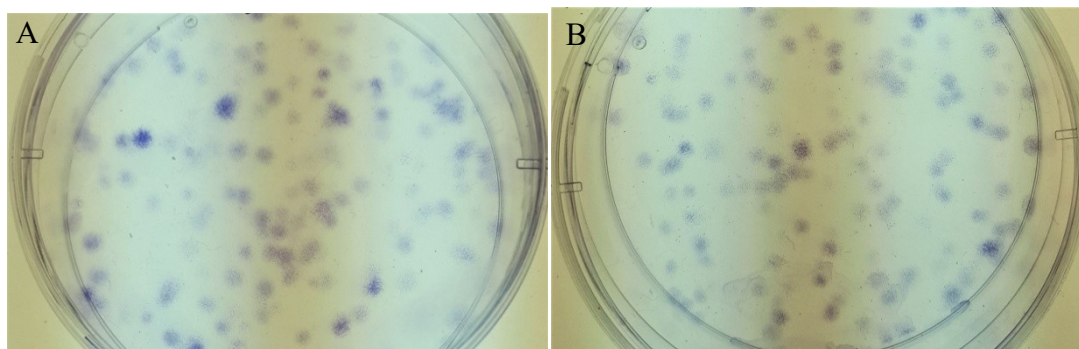
Ομοίως, τα ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα δίσκου που εκτίθενται στο παρατεταμένο ωσμωτικό στρες εμφανίζουν παρόμοια ενσωμάτωση της BrdU συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, δηλαδή υψηλή ενσωμάτωση της BrdU. Επιπλέον, όπως και στην περίπτωση των βόειων κυττάρων, ελέγχθηκε η ενσωμάτωση της SA-β-Gal στα ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα που εκτίθενται στο παρατεταμένο ωσμωτικό στρες. Παρόλο που τα δεδομένα της ενσωμάτωσης της SA-β-Gal δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα και όμοια με τα κύτταρα-μάρτυρες.

3.3.3. Η παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες δεν επηρεάζει τη δημιουργία αποικιών κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

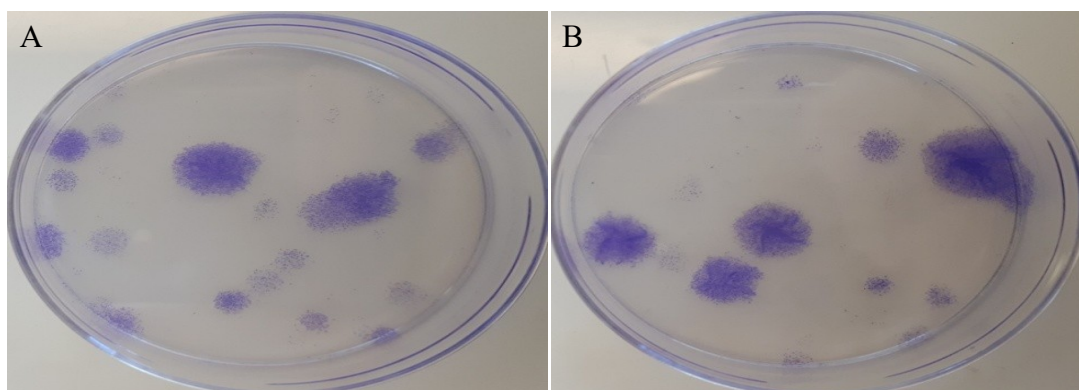
Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου ελέγχθηκε και μέσω της ικανότητάς τους να δημιουργούν αποικίες. Γι' αυτό το σκοπό, μικρός αριθμός κυττάρων που υπέστησαν ωσμωτικό στρες 36 φορές, ανακαλλιεργήθηκε, μονιμοποιήθηκε με διάλυμα φορμαδεΰδης και επώαστηκε με διάλυμα χρωστικής Crystal Violet.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο τα βόεια (Εικόνα 3.3.3.1) όσο και τα ανθρώπινα (Εικόνα 3.3.3.2) κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα που υπέστη ωσμωτικό

στρες δημιουργούν ένα σχεδόν παρόμοιο πρότυπο αποικιών, όσον αφορά στον αριθμό και στο μέγεθος, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες.



Εικόνα 3.3.3.1: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της δημιουργίας αποικιών των βόειων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου που εκτέθηκαν σε ωσμωτικό στρες έπειτα από χρώση με Crystal Violet. Τα κύτταρα της Εικόνας B εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 φορές, ανακαλλιεργήθηκαν και οι αποικίες που δημιουργήθηκαν από ένα μικρό αριθμό κυττάρων (n = 200) επώαστηκαν με διάλυμα χρωστικής Crystal Violet έπειτα από 7 ημέρες επώασης των κυττάρων απουσία ωσμωτικού στρες. Τα κύτταρα της Εικόνας A υπέστησαν την ίδια διαδικασία, χωρίς να εκτεθούν σε ωσμωτικό στρες (κύτταρα-μάρτυρες). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές του αποτελέσματος δύο τουλάχιστον πειραμάτων.



Εικόνα 3.3.3.2: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της δημιουργίας αποικιών των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου που εκτέθηκαν σε ωσμωτικό στρες έπειτα από χρώση με Crystal Violet. Τα κύτταρα της Εικόνας B εκτέθηκαν στα 550 mOsm / kg H₂O 36 φορές, ανακαλλιεργήθηκαν και οι αποικίες που δημιουργήθηκαν από ένα μικρό αριθμό κυττάρων (n = 200) επώαστηκαν με διάλυμα χρωστικής Crystal Violet έπειτα από 14 ημέρες επώασης των κυττάρων απουσία ωσμωτικού στρες. Τα κύτταρα της Εικόνας A υπέστησαν την ίδια διαδικασία, χωρίς να εκτεθούν σε ωσμωτικό στρες (κύτταρα-μάρτυρες). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές του αποτελέσματος δύο τουλάχιστον πειραμάτων.

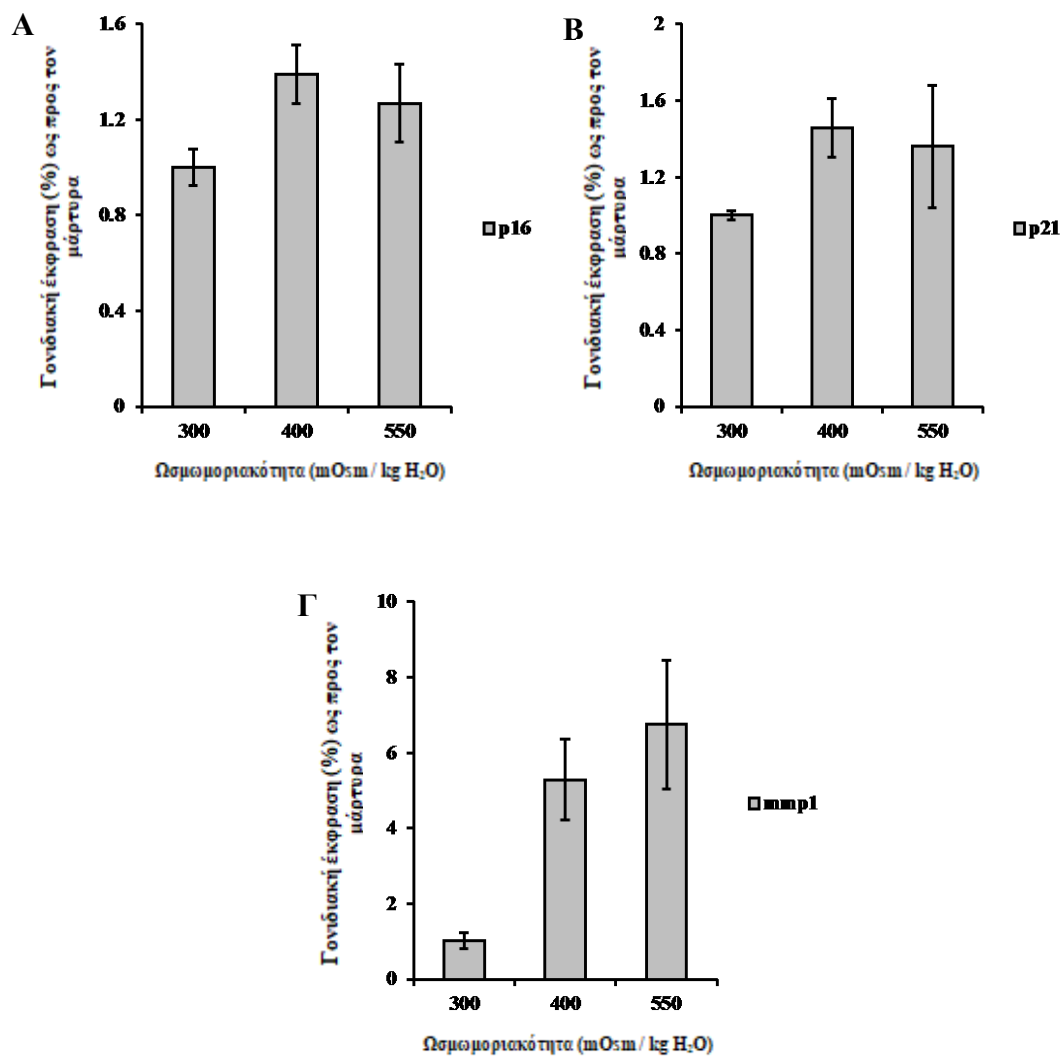
3.4. Επίδραση ωσμωτικού στρες στην έκφραση γνωστών δεικτών κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου με την τεχνική qRT-PCR

Προκειμένου να διερευνηθεί και σε μοριακό επίπεδο εάν τα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου γερνάνε πρόωρα λόγω ωσμωτικού στρες, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης με PCR σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα που υπέστη παρατεταμένο ωσμωτικό στρες.

3.4.1. Έκφραση δεικτών της κυτταρικής γήρανσης

Ο έλεγχος της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών κυτταρικής γήρανσης έγινε έπειτα από διαδοχικές εκθέσεις των κυττάρων σε υψηλή ωσμωμοριακότητα (400 και 550 mOsm / kg H₂O). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, πραγματοποιήθηκαν 24 εκθέσεις των κυττάρων με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 2 ημέρες. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Ακολούθως, απομονώθηκε το RNA των κυττάρων, συντέθηκε το cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής και πραγματοποιήθηκε η ενζυμική ενίσχυση του DNA με τη μέθοδο της PCR. Τα επίπεδα έκφρασης στις υπερτονικές συνθήκες των γονιδίων p16, p21 και mmp1, που αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες κυτταρικής γήρανσης, φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.4.1).

Η έκφραση των γονιδίων p16 και p21 παρουσιάζει μία πολύ μικρή αύξηση στα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα που εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες. Αντίθετα, το γονίδιο της mmp1 παρουσιάζει σημαντική αύξηση στα κύτταρα που εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες.

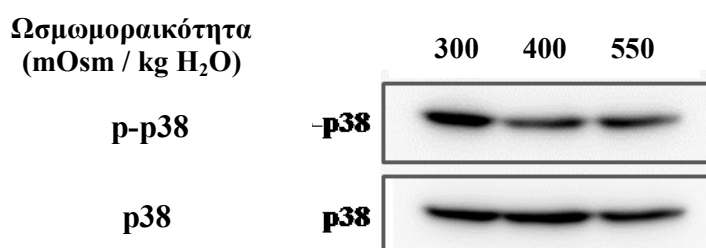


Εικόνα 5.4.1: Έκφραση των χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου υπό την επίδραση ωσμωτικού στρες. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα 400 και 550 mOsm / kg H₂O 24 φορές. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες της πρωτεϊνικής έκφρασης. Έπειτα με την τεχνική qRT-PCR προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων p16 (**A**), p21 (**B**) και mmp1 (**Γ**), χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης.

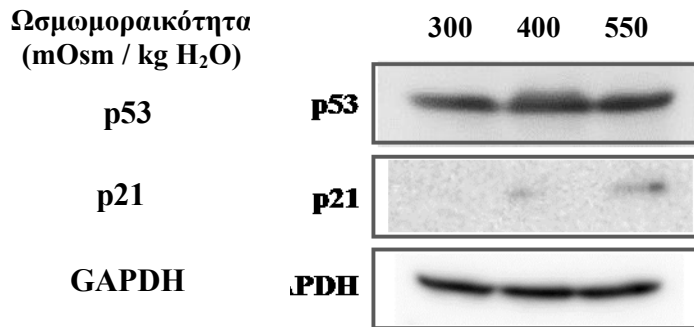
3.5. Επίδραση ωσμωτικού στρες στην πρωτεϊνική έκφραση των ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι MAPKs αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, επιτρέποντας στα κύτταρα να αποκρίνονται σε ποικίλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα, μεταξύ των οποίων και το ωσμωτικό στρες. Αρκετά δεδομένα στηρίζουν την ενεργοποίηση της p38 κινάσης και των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου p53 και p21 σε υπερτονικές συνθήκες, καθώς και τη συμμετοχή τους στην παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την κυτταρική γήρανση. Προκειμένου, λοιπόν, να μελετηθεί η επίδραση του ωσμωτικού στρες στη διεγερση σχετικών μονοπατιών που επάγουν την πρόωμη κυτταρική γήρανση στα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάλυσης Western.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών, ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου δέχτηκαν παρατεταμένη επίδραση υψηλής ωσμωμοριακότητας (400 και 550 mOsm / kg H₂O) και έπειτα επαναφέρθηκαν σε συνθήκες ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O. Κύτταρα που για το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν την ίδια διαδικασία με θρεπτικό μέσο ωσμωμοριακότητας 300 mOsm / kg H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες της πρωτεϊνικής έκφρασης. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και απομονώθηκε το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Τα πειράματα ανάλυσης Western πραγματοποιήθηκαν στα τρία δείγματα χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της p-p38, δεδομένου ότι η p38 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης, της p21 και της p53.



Εικόνα 3.5.1: Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38 κινάσης δε μεταβάλλονται έπειτα από παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες στα ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα δέχτηκαν παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες και έπειτα επαναφέρθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες. Πειράματα ανάλυσης Western πραγματοποιήθηκαν στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της p-p38. Η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της p38 χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.



Εικόνα 3.5.2: Τα επίπεδα ενεργοποίησης της p53 δε μεταβάλλονται, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της p21 αυξάνονται απειροελάχιστα έπειτα από παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες στα ανθρώπινα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου. Τα κύτταρα δέχτηκαν παρατεταμένη επίδραση ωσμωτικού στρες και έπειτα επαναφέρθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες. Πειράματα ανάλυσης Western πραγματοποιήθηκαν στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της p53 και της p21. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος δείχνουν ότι, παρότι η p38 κινάση εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στο ωσμωτικό στρες, τα επίπεδα φωσφορυλίωσής της δεν εμφανίζουν σημαντική απόκλιση συγκριτικά με αυτά του μάρτυρα (Εικόνα 3.5.1). Επιπλέον, σημαντική απόκλιση δεν εμφανίζουν ούτε τα επίπεδα ενεργοποίησης της p53, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της p21 εμφανίζουν μια μικρή μόνο αύξηση στα κύτταρα που υπέστησαν ωσμωτικό στρες (Εικόνα 3.5.2).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι αποτελούν ινο-χόνδρινες δομές, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γειτονικών σωμάτων των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης (Shapiro et al., 2012; Vo et al., 2016). Κάθε δίσκος συμμετέχει στο σχηματισμό άρθρωσης, η οποία λειτουργεί σαν σύνδεσμος μεταξύ των σπονδύλων, σταθεροποιώντας, αφενός, τη σπονδυλική στήλη (Buckwalter, 1995), επιτρέποντας, αφετέρου, ταυτόχρονα μια μικρή κίνηση της στήλης. Όσον αφορά στη δομή του, κάθε δίσκος αποτελείται από έξω προς τα μέσα από: 1. τον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο, ο οποίος συγκροτείται από ένα καλά οργανωμένο και πυκνά πακεταρισμένο δίκτυο ινών κολλαγόνου, 2. τη μεταβατική ζώνη, και 3. τον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα, ένα ζελατινώδες τμήμα, που συγκροτείται από ένα χαλαρά οργανωμένο δίκτυο ινών κολλαγόνου (Buckwalter, 1982; Vo et al., 2016). Όπως κάθε συνδετικός ιστός, οι δίσκοι περιέχουν αραιό πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος αποτελεί περίπου το 1% του συνολικού όγκου ενός δίσκου (Roberts et al., 2006) και άφθονη εξωκυττάρια μήτρα, η οποία σχηματίζεται από ένα περίπλοκο δίκτυο μακρομορίων (Buckwalter, 1995), κύρια στοιχεία του οποίου είναι τα μόρια κολλαγόνου, που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον ινώδη δακτύλιο, και τα μόρια πρωτεογλυκανών, που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον πηκτοειδή πυρήνα (Eyre et al., 1989).

Κύρια πρωτεογλυκάνη της μήτρας του δίσκου και ιδιαίτερα του πηκτοειδούς πυρήνα είναι η αγκρεκάνη, η υψηλή συγκέντρωση της οποίας συμβάλλει στο υψηλό αρνητικό φορτίο της εξωκυττάριας μήτρας, ένας παράγοντας που σε συνδυασμό με άλλους (έλλειψη αγγείωσης, μειωμένη παροχή θρεπτικών και οξυγόνου, μειωμένο pH) συμβάλλει στο ιδιαίτερο από φυσικοχημικής άποψης περιβάλλον του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Maroudas et al., 1969). Το αρνητικό φορτίο της μήτρας, και ως εκ τούτου η υψηλή συγκέντρωση των κατιόντων και η μειωμένη ενυδάτωση του δίσκου, καθορίζουν την ωσμωμοριακότητά του, η οποία είναι υψηλότερη συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς (Urban, 2002; Urban et al., 1979). Πιο συγκεκριμένα, αυτή αυξάνεται απότομα από τον εξωτερικό δακτύλιο προς τον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα (Urban and Maroudas, 1979), ενώ η ωσμωμοριακότητα του δίσκου συνολικά μεταβάλλεται διαρκώς από τα 400 mOsm / kg H₂O μέχρι και τα 550 mOsm / kg H₂O στο τέλος της ημέρας, σε αντίθεση με τους περισσότερους ιστούς όπου η ωσμωμοριακότητα είναι σταθερή στα 300 mOsm / kg H₂O (Urban,

2002). Τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα, λοιπόν, είναι αυτά που υφίστανται τις πιο δραματικές συνέπειες των ωσμωτικών διακυμάνσεων που πραγματοποιούνται στο δίσκο.

Η αυξημένη ωσμωμοριακότητα και οι επιπτώσεις της έχουν μελετηθεί εκτενώς σε νεφρικά κύτταρα, καθώς οι νεφροί αποτελούν, επίσης, έναν ανθεκτικό στην υπερτονικότητα ιστό, όπου η ωσμωμοριακότητα φτάνει έως και τα 1000 mOsm / kg H₂O (Burg et al., 2002). Με βάση σχετικές μελέτες, η έκθεση νεφρικών κυττάρων σε αυξημένη ωσμωμοριακότητα οδηγεί στη δημιουργία βλαβών στο DNA (Kultz and Chakravarty, 2001) και σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Dmitrieva et al., 2001; Dmitrieva et al., 2002), δεδομένα τα οποία επιβεβαιώνονται και σε αντίστοιχες έρευνες σε πρώιμους ανθρώπινους ινοβλάστες (Kishi et al., 2001). Η διερεύνηση της υπερτονικότητας έχει πραγματοποιηθεί και σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου, η οποία έχει δείξει ότι οι αυξημένες τιμές ωσμωμοριακότητας (400, 500, 600 mOsm / kg H₂O), που δεν καθίστανται τοξικές για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, δεδομένου ότι έχει αποδειχτεί πως δεν προκαλείται απόπτωση (Mavrogonatou and Kletsas, 2009), μειώνουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου, λόγω βλαβών στο DNA (Mavrogonatou and Kletsas, 2009).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του ωσμωτικού στρες στη βιωσιμότητα και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η βιωσιμότητα των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου προσδιορίστηκε έπειτα από την έκθεσή τους σε διάφορες επιλεγμένες, με βάση αυτές που έχουν παρατηρηθεί *in vivo*, τιμές ωσμωμοριακότητας από τα 300 έως και τα 1000 mOsm / kg H₂O με τις μεθόδους εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας MTT και Neutral Red. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι καθώς αυξάνεται η ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου από τα 300 έως και τα 600 mOsm / kg H₂O, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα, ενώ τιμές ωσμωμοριακότητας μεγαλύτερες των 600 mOsm / kg H₂O καθίστανται κυτταροτοξικές. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να υπάρχει χώρος μεταξύ αυτών προκειμένου να πολλαπλασιαστούν, επομένως η μείωση του ποσοστού των κυττάρων που παρατηρήθηκε αντιπροσωπεύει τη μείωση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας. Βέβαια, η μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των

κυττάρων προσδιορίστηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Και στις δύο μεθόδους η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής και επαγωγικά του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων. Αυτό που διαφοροποιεί τη μία μέθοδο από την άλλη είναι η προσέγγιση της κάθε μίας στον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η τεχνική Neutral Red βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής να ενσωματώνεται και να συγκρατείται στα λυσοσώματα των βιώσιμων μόνο κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η τεχνική MTT βασίζεται στη μετατροπή της ένωσης MTT σε μωβ φορμαζάνιο, λόγω διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες στο εσωτερικό των ζωντανών και μόνο κυττάρων, κι επομένως βασίζεται στη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων. Άρα, γίνεται κατανοητό ότι μέσω της τεχνικής Neutral Red προσδιορίζεται άμεσα ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων, ενώ μέσω της τεχνικής MTT προσδιορίζεται η μεταβολική ενεργότητα των μιτοχονδρίων κι επομένως έμμεσα ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων.

Ακολούθως, προσδιορίστηκε ο πολλαπλασιασμός βόειων και ανθρώπινων κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα μέσω πειραμάτων μέτρησης της αύξησης (%) του αριθμού των κυττάρων καθώς αυτά διατηρούνταν σε ισοτονικές (300 mOsm / kg H₂O) και υπερτονικές συνθήκες (400 και 550 mOsm / kg H₂O). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών αρχικά έδειξαν ότι σε κάθε μέτρηση ο αριθμός των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων που βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αριθμό των κυττάρων που για το ίδιο χρονικό διάστημα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες. Ειδικότερα για τις υπερτονικές συνθήκες, ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται, ανάλογα με το βαθμό του ωσμωτικού στρες. Στη συνέχεια, με βάση τις μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε η αύξηση του αριθμού των κυττάρων και βρέθηκαν τα εξής: η αύξηση (%) του αριθμού των βόειων κυττάρων που βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες ισούται με 420 %, ενώ η αύξηση του αριθμού των βόειων κυττάρων που για το ίδιο χρονικό διάστημα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες (550 mOsm / kg H₂O) ισούται με 210 %. Αντίστοιχα για τα ανθρώπινα κύτταρα, η αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων που βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες ισούται με 300 % , ενώ η αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων που για το ίδιο χρονικό διάστημα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες (550 mOsm / kg H₂O) ισούται με 120 %. Γίνεται εμφανές λοιπόν, ότι όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τις φυσιολογικές

συνθήκες. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα υπολογίστηκε, επίσης, και κατά την επαναφορά των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες και τα αποτελέσματα έδειξαν τα εξής: η αύξηση του αριθμού των βόειων κυττάρων που βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες δε μεταβάλλεται, ενώ η αύξηση του αριθμού των βόειων κυττάρων που για το ίδιο χρονικό διάστημα βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες, ενώ προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε ωσμωτικό στρες (550 mOsm / kg H₂O) ισούται με 170 %. Αντίστοιχα για τα ανθρώπινα κύτταρα, η αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων που βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες ισούται με 170 % , ενώ η αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων κυττάρων που για το ίδιο χρονικό διάστημα βρίσκονται σε ισοτονικές-φυσιολογικές συνθήκες, ενώ προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε ωσμωτικό στρες (550 mOsm / kg H₂O) ισούται με 270 %. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι όταν απομακρυνθεί ο παράγοντας ωσμωτικό στρες από το περιβάλλον των κυττάρων, αυτά επαναφέρουν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται. Μάλιστα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, πιθανόν λόγω της πυκνότητας που επιτυγχάνουν νωρίτερα τα κύτταρα-μάρτυρες, με αποτέλεσμα να μην έχουν τον απαραίτητο χώρο για να πολλαπλασιαστούν.

Ο πολλαπλασιασμός βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα προσδιορίστηκε και μέσω πειραμάτων ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU), καθώς αυτά διατηρούνταν σε ισοτονικές (300 mOsm / kg H₂O) και υπερτονικές συνθήκες (400 και 550 mOsm / kg H₂O) σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων για τα βόεια κύτταρα έδειξαν τα εξής: όταν τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας (300 mOsm / kg H₂O), το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA τους είναι 100 %, δηλαδή όλος ο κυτταρικός πληθυσμός πολλαπλασιάζεται. Όταν όμως τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες (550 mOsm / kg H₂O), το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU μειώνεται στο 40 % έπειτα από δεκατρείς ημέρες και στο 44 % έπειτα από δεκαοχτώ ημέρες συνεχόμενης έκθεσής τους στις υπερτονικές συνθήκες. Όταν, μετά από δεκατρείς συνεχόμενες ημέρες έκθεσης των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες, αυτά επαναφέρονται στις ισοτονικές συνθήκες για 3 ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU αυξάνεται στο 77 %, ενώ το ίδιο παρατηρείται και μετά από τις δεκαοχτώ ημέρες έκθεσης στο ωσμωτικό στρες αλλά σε μικρότερο βαθμό (52 %). Όσον αφορά στα ανθρώπινα κύτταρα, τα αποτελέσματα έδειξαν τα εξής: όταν τα κύτταρα

επωάζονται σε θρεπτικό υλικό φυσιολογικής ωσμωμοριακότητας, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU στο DNA τους είναι 62 %, δηλαδή το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού πληθυσμού πολλαπλασιάζεται. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες για δεκατρείς ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU μειώνεται σε μεγάλο βαθμό και φθάνει το 13 %, ενώ έπειτα από δεκαοχτώ ημέρες αυτό μειώνεται ακόμη περισσότερο και φθάνει το 8 %. Όταν, όμως, μετά από δεκατρείς συνεχόμενες ημέρες έκθεσης των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες, αυτά επαναφέρονται στις ισοτονικές συνθήκες για 3 ημέρες, το ποσοστό ενσωμάτωσης της BrdU αυξάνεται στο 23 %, ενώ το ίδιο ποσοστό παρατηρείται και μετά από τις δεκαοχτώ ημέρες έκθεσης στο ωσμωτικό στρες. Επομένως, με βάση αυτά τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό, ότι η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων μειώνεται όταν αυτά εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες, ενώ αυτή αυξάνεται χωρίς όμως να επαναφέρεται στα αρχικά της επίπεδα όταν τα κύτταρα επιστρέφουν σε φυσιολογικές συνθήκες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα έχουν ειπωθεί μέχρι στιγμής, ένα πρώτο συμπέρασμα της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι η υψηλή ωσμωμοριακότητα που δεν καθίσταται κυτταροξική μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται. Απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες από το περιβάλλον των κυττάρων αναιρεί την παύση του πολλαπλασιασμού που είχε προκληθεί προηγουμένως λόγω ωσμωτικού στρες, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερο ρυθμό απ' ό,τι παρουσία ωσμωτικού στρες, χωρίς όμως να επαναφέρονται στα αρχικά επίπεδα πολλαπλασιασμού.

Η έκθεση των κυττάρων σε καταστάσεις στρες, όπως η υψηλή ωσμωμοριακότητα του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου, μπορεί να ευθύνεται για την πρόκληση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης. Μάλιστα, σε εκφυλισμένους και γηρασμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους έχει παρατηρηθεί υψηλό ποσοστό γηρασμένων κυττάρων (Roberts et al., 2006), το οποίο αυξάνει ανάλογα με το βαθμό εκφύλισης των δίσκων (Gruber et al., 2007). Ως κυτταρική γήρανση ορίζεται η μη-αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, παρόλο που παύουν πλέον να διαιρούνται, παραμένουν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά. (Mathon and Lloyd, 2001; Blagosklonny, 2003). Η πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες γήρανση (Roberts et al., 2006) προκύπτει από διάφορους στρεσογόνους και γενοτοξικούς παράγοντες (Toussaint et al., 2000), που οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού

κύκλου (Blagosklonny, 2003) και διαφέρει από την αναπαραγωγική γήρανση η οποία προάγεται από τη μείωση του μήκους των τελομερών, που συσσωρεύεται καθώς τα κύτταρα υφίστανται επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις (Campisi, 1997; Chiu and Harley, 1997). Δεδομένου λοιπόν των παραπάνω, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης λόγω ωσμωτικού στρες στον πηκτοειδή πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

Η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης γήρανσης των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα λόγω ωσμωτικού στρες μελετήθηκε μέσα από δύο διαφορετικούς κύκλους πειραμάτων. Ο πρώτος κύκλος πειραμάτων, ο οποίος βασίστηκε στη δημοσιευμένη μελέτη των Xu et al., 2019, περιλάμβανε την αξιολόγηση της πιθανότητας επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης έπειτα από επαναλαμβανόμενο ωσμωτικό στρες για δεκατρείς και για δεκαοχτώ ημέρες χρησιμοποιώντας ως δείκτες την ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-Gal) και την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης έδειξαν ότι τα βόεια και ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα που εκτίθενται στις υπερτονικές συνθήκες (550 mOsm / kg H₂O) για δεκατρείς και για δεκαοχτώ ημέρες είναι θετικά στη χρώση SA-β-Gal σε πολύ μικρό ποσοστό που δεν ξεπερνά σε οποιαδήποτε περίπτωση το 4 %, ενώ μεγάλο μέρος του πληθυσμού των κυττάρων παρουσιάζει μια πιο ήπιας έντασης χρώση που δεν είναι αντιπροσωπευτική της γήρανσης. Με βάση μελέτες γηρασμένων κυττάρων, το χαρακτηριστικό της γήρανσης κυανό χρώμα της SA-β-Gal που εμφανίζεται περιπυρηνικά των γηρασμένων κυττάρων είναι πιο έντονο. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ότι ο χαρακτηρισμός των κυττάρων ως γηρασμένων με την ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal βασίζεται κυρίως στην υποκειμενική άποψη του καθενός. Η μη-ύπαρξη γήρανσης σε αυτή την περίπτωση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού που περιγράφηκαν παραπάνω και τα οποία θερείται ότι παρέχουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν στις υπερτονικές συνθήκες για δεκατρείς και για δεκαοχτώ ημέρες παρουσίασαν αναστολή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού, γεγονός που αποτελεί ισχυρό δείκτη κυτταρικής γήρανσης. Ορισμένες μελέτες (Xu et al., 2019) έχουν στηριχτεί σε όμοια αποτελέσματα, κάνοντας λόγο για την πρόκληση κυτταρικής γήρανσης λόγω ωσμωτικού στρες. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη (Xu et al., 2019) πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών κυτταρικής γήρανσης, ενώ

τα κύτταρα βρίσκονταν σε υπερτονικό περιβάλλον. Δεδομένου όμως ότι η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται από τη μη-αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της πιθανής παρουσίας κυτταρικής γήρανσης έπειτα από επαναφορά των κυττάρων στις ισοτονικές συνθήκες και αποδείχτηκε μια αυξητική τάση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων, συγκριτικά με αυτή που εμφανίζουν παρουσία ωσμωτικού στρες. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η επαναλαμβανόμενη υψηλή ωσμωμοριακότητα μειώνει τον πολλαπλασιασμό των βόειων και ανθρώπινων κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα, όμως δεν ευθύνεται για την πρόκληση πρώιμα επαγόμενης γήρανσης, καθώς δεν πρόκειται για ένα μη αντιστρεπτό φαινόμενο.

Τα αποτελέσματα αυτά πυροδότησαν την ιδέα του δεύτερου κύκλου πειραμάτων, όπου μελετήθηκε εκτενέστερα η πιθανότητα πρόκλησης πρόωρης γήρανσης των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα λόγω επαναλαμβανόμενου και παρατεταμένου ωσμωτικού στρες, έπειτα από απομάκρυνση του στρεσογόνου παράγοντα, έτσι ώστε να διερευνηθεί σε βάθος αν πρόκειται για πραγματικό μη-αντιστρεπτό φαινόμενο. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υψηλή ωσμωμοριακότητα 36 διαδοχικές φορές, με μία ημέρα να μεσολαβεί από τη μία έκθεση στην άλλη και σε κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων, πραγματοποιούνταν έλεγχος της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω ενσωμάτωσης BrdU και της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης μετά την απομάκρυνση του ωσμωτικού στρες. Τα μεν βόεια κύτταρα παρουσίασαν κατά 95 ± 1 % ενσωμάτωση BrdU και καθόλου ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal, δηλαδή διατηρούν την ικανότητά τους να συνθέτουν το DNA τους και να πολλαπλασιάζονται, ενώ ταυτόχρονα δεν ενσωματώνουν τη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA-β-Gal, όμοια με τα κύτταρα-μάρτυρες, τα οποία παρουσίασαν κατά 89 ± 5 % ενσωμάτωση BrdU και καθόλου ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal. Τα δε ανθρώπινα κύτταρα παρουσίασαν κατά 30 ± 8 % ενσωμάτωση BrdU και πολύ μικρή ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal, δηλαδή και αυτά διατηρούν την ικανότητά τους να συνθέτουν το DNA τους και να πολλαπλασιάζονται, ενώ ταυτόχρονα ενσωματώνουν τη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA-β-Gal σε μικρό ποσοστό, όμοια με τα κύτταρα-μάρτυρες, τα οποία παρουσίασαν κατά 34 ± 4 % ενσωμάτωση BrdU και επίσης πολύ χαμηλή ενσωμάτωση της χρώσης SA-β-Gal. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων ελέγχθηκε και μέσω της ικανότητάς τους να δημιουργούν αποικίες μέσω χρώσης με Crystal Violet. Τα παραπάνω αποτελέσματα

επιβεβαιώθηκαν, καθώς τόσο τα βόεια όσο και τα ανθρώπινα κύτταρα εμφανίζουν όμοιο πρότυπο δημιουργίας των αποικιών, δηλαδή όμοια πολλαπλασιαστική ικανότητα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση και σε μοριακό επίπεδο της πιθανότητας πρόκλησης πρόωρης γήρανσης των ανθρώπινων κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα λόγω επαναλαμβανόμενου και παρατεταμένου ωσμωτικού στρες, μέσω ελέγχου της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης με PCR. Τα γονίδια, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία, είναι οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών $p21^{CIP1/WAF1}$ και $p16^{INK4A}$, καθώς και η μεταλλοπρωτεάση 1 (MMP1), μια εξωκυτταρική πρωτεάση, που αποτελούν βασικούς παράγοντες, που προσδίδουν στα γηρασμένα κύτταρα τον ιδιαίτερο προ-φλεγμονώδη φαινότυπο (Senescence-Associated Secretory Phenotype - SASP). Τα αποτελέσματα της qRT-PCR έδειξαν ότι τα κύτταρα που εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες (400 και 550 mOsm / kg H₂O) 24 διαδοχικές φορές παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *mmp1*, ενώ αντίθετα μια μικρή αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *p16* και *p21*, που αποτελούν αναστολείς πολλαπλασιασμού και των οποίων η αυξημένη έκφραση έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες γηρασμένων κυττάρων (Mavrogonatou et al., 2018; Stein et al., 1998; Zhao et al., 2017).

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση του ωσμωτικού στρες στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών p38, p53 και p21, που διεγείρουν μονοπάτια που επάγουν την πρόωρη κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα με πειράματα ανάλυσης Western. Η p38 κινάση ανήκει στην οικογένεια των MAP κινασών, οι οποίες συνδέονται με την απόκριση των κυττάρων σε καταστάσεις στρες και έχει συσχετιστεί με βάση τη βιβλιογραφία με τον φαινότυπο των γηρασμένων κυττάρων (SASP), ενώ οι p53 και p21 εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με αρκετά δεδομένα (Dimozi et al., 2015; Han and Sun, 2007; Mavrogonatou et al., 2018; Zhao et al., 2017) οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου κατά την κυτταρική γήρανση. Έπειτα από την έκθεση των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες (400 και 550 mOsm / kg H₂O) 24 διαδοχικές φορές, δεν παρατηρείται ενεργοποίηση καμίας από τις παραπάνω πρωτεΐνες, καθώς τα επίπεδα έκφρασής τους είναι όμοια με αυτά που εμφανίζουν τα κύτταρα-μάρτυρες, τα οποία δεν εκτίθενται στο ωσμωτικό στρες. Μία μικρή μόνο αύξηση παρατηρείται στα επίπεδα έκφρασης της p21.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης, το ωσμωτικό στρες στο οποίο υπόκειται ο μεσοσπονδύλιος δίσκος, και ιδιαίτερα ο πηκτοειδής πυρήνας, καθημερινά προκαλεί μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων, η οποία είναι αναστρέψιμη όταν οι συνθήκες γίνουν και πάλι ισοτονικές. Παρότι η μελέτη των Xu et al. κάνει λόγο για την πρόκληση πρόωρης γήρανσης στα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα μετά από έκθεσή τους σε ωσμωτικό στρες, κάτι τέτοιο δεν αποδεικνύεται σαφώς στη παρούσα εργασία, η ιδιαιτερότητα της οποίας εντοπίζεται στην επαναφορά των κυττάρων στις φυσιολογικές συνθήκες, ένα τεχνικό κομμάτι που αγνοούν άλλες μελέτες, αλλά σημαντικό προκειμένου να αξιολογηθεί εάν πρόκειται για μια μη-αναστρέψιμη κατάσταση όπως είναι η κυτταρική γήρανση. Η μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων που είναι αναστρέψιμη κατά την επαναφορά των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες [όπως αποδείχτηκε με τη μέτρηση της αύξησης (%) των κυττάρων, με τα ποσοστά ενσωμάτωσης της βρωμοδεοξουριδίνης και με τη δημιουργία αποικιών], το χαμηλό ποσοστό ενσωμάτωσης της χαρακτηριστικής της γήρανσης χρώσης SA- β -Gal, η μικρή μόνο αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων p21 και p16, που δρουν ως αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και η αυξημένη έκφραση της εξωκυτταρικής μεταλλοπρωτεάσης MMP1, και η απουσία ενεργοποίησης των πρωτεϊνών p38 και p53, που εμπλέκονται στην παύση του κυτταρικού κύκλου κατά την κυτταρική γήρανση σηματοδοτούν ένα φαινότυπο με κάποια στοιχεία κοινά με αυτά της κυτταρικής γήρανσης, όμως δεν πρόκειται για γήρανση. Πρόκειται για μια παρατεταμένη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων λόγω παρατεταμένου ωσμωτικού στρες, η οποία συνοδεύεται από στοιχεία γήρανσης που πιθανόν να σηματοδοτούνται από μοριακά μονοπάτια διαφορετικά από αυτά της γήρανσης.

Η παρούσα διατριβή φιλοδοξεί να αποτελέσει ένα ακόμη βήμα προς τη διασαφήνιση της πιθανής πρόκλησης πρόωρης γήρανσης των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου λόγω ωσμωτικού στρες και κίνητρο για την περαιτέρω μελέτη της.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acharyya S, Villalta S A, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen P M L, Carathers M, Li Z-W, Beg A A, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner K L, Rafael-Fortney J A, Karin M, Tidball J G, Baldwin A S and Guttridge D C. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 117: 889-901, 2007.

Acosta J C, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton J P, Athineos D, Kang T W, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris K J, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders A P, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman G J, Longerich T, Sansom O J, Benitah S A, Zender L and J Gil. A complexsecretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 15: 978-990, 2013.

Adams M A and Roughley P J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine*, 31: 2151-2161, 2006.

Adams M A, Stefanakis M and Dolan P. Healing of a painful intervertebral disc should not be confused with reversing disc degeneration: implications for physical therapies for discogenic back pain. *Clin Biomech*, 25: 961-971, 2010.

Adler A S, Sinha S, Kawahara T L A, Zhang J Y, Segal E and Chang H Y. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev*, 21: 3244-3257, 2007.

Akeda K, An H, Gemba T, Okuma M, Miyamoto K, Chujo T, Kitahara S, Masuda K. A new gene therapy approach: In vivo transfection of naked NF-kB decoy oligonucleotide restored disc degeneration in the rabbit annular needle puncture model. *Trans Orthop Res Soc*, 30: 45, 2005.

Alfieri R R and Petronini P G. Hyperosmotic stress response: Comparison with other cellular stresses. *Pflugers Arch*, 454: 173-185, 2007.

Allsopp R C, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V, Futcher A B, Greider, C W and Harley C B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10114-10118, 1992.

Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, Kaneko M, Okuda S, Uchiyama Y and Yoshikawa H. Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs. *Spine*, 26: 2666-2672, 2001.

Bachmeier B E, Nerlich A G, Weiler C, Paesold G, Jochum M, Boos N. Analysis of tissue distribution of TNF-alpha, TNF-alpha-receptors, and the activating TNF-alpha-converting enzyme suggests activation of the TNF-alpha system in the aging intervertebral disc. *Ann N Y Acad Sci*, 1096: 44-54, 2007.

Baker D J and Sedivy J M. Probing the depths of cellular senescence. *J Cell Biol*, 202: 11-13, 2013.

Baker D J, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur N K, Childs B G, van de Sluis B, Kirkland J L and van Deursen J M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479: 232-236, 2011.

Bakkenist C J and Kastan M B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421: 499-506, 2003.

Baeuerle P A and Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12: 141-179, 1994.

Beausejour C M, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe S W, Yaswen P and Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*, 22: 4212-4222, 2003.

Bernick S and Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. *Spine*, 7: 97-102, 1982.

Bibby S R S, Fairbank J C, Urban M R and Urban J P. Cell viability in scoliotic discs in relation to disc deformity and nutrient levels. *Spine*, 27: 2220-2228, 2002.

Bibby S R S, Jones D A, Lee R B, Yu J and Urban J P G. The pathophysiology of the intervertebral disc. *Joint Bone Spine*, 68: 537-542, 2001.

Bibby S R S, Jones D A, Ripley R M and Urban J P G. Metabolism of the intervertebral disc: effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells. *Spine*, 30: 487-496, 2005.

Blackburn E H. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350: 569-573, 1991.

Blackburn E H. Telomerases. *Annu Rev Biochem*, 61: 113-129, 1992.

Blagosklonny M V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO*, 4: 358-362, 2003.

Bodner A G, Ouellette M, Frolkis M, Holt S E, Chiu C-P, Morin G B, Harley C B, Shay J W, Lichtsteiner S, Wright W E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352, 1998.

Bonner W M, Redon C E, Dickey J S, Nakamura A J, Sedelnikova O A, Solier S and Pommier Y. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*. 8: 957-967, 2008.

Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt K F and Nerlich A G. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs. *Spine* 27: 2631-2644, 2002.

Borenfreund E and Puerner J A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*, 9, 7-9, 1984.

Borenfreund E and Puerner J A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett*, 24, 119-124, 1985.

Boutros T, Chevet E and Metrakos P. Mitogenactivated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60: 261-310, 2008.

Bubici C, Papa S, Dean K and Franzoso G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene*, 25: 6731-6748, 2006.

Buckwalter J A. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine*. 20: 1307-1314, 1995.

Buckwalter J A. Fine structural studies of the human intervertebral disc. *Idiopathic Low Back Pain*, 108-143, 1982.

Buckwalter J A and Martin J. Intervertebral disk degeneration and back pain. In: Gordon S L (Ed.), Low Back Pain: A Scientific and Clinical Overview. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Rosemont, IL: 607-624, 1996.

Buckwalter J A, Roughley P J and Rosenberg L C. Age-related changes in cartilage proteoglycans: Quantitative electron microscopic studies. *Microscopy Research and Techniques*, 28: 398-408, 1994.

Buckwalter J A, Woo SL-Y, Goldberg V M, et al. Soft tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg*, 75: 1533-1548, 1993.

Bulavin D V, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower L O, Anderson C W, Appella E and Fornace A J. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet*, 36: 343-50, 2004.

Burg B M, Ferraris D J and Dmitrieva I N. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*, 87: 1441-1474, 2007.

Burg B M. Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, 661-666, 2002.

Burke J G, Watson R W, McCormack D, Dowling F E, Walsh M G and Fitzpatrick J M. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J Bone Joint Surg Br*, 84: 196-201, 2002.

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

Campisi J and Vijg J. Does Damage to DNA and Other Macromolecules Play a Role in Aging? If So, How? *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*, 64: 175-178, 2009.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120: 513-522, 2005.

Campisi J. The Biology of Replicative Senescence. *Eur J Cancer*, 33: 703-709, 1997.

Campisi J. The role of cellular senescence in skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 3: 1-5, 1998.

Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Brauninger M, Eilken H M, Rieger M A, Schroeder T T, Huttner W B. The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*, 9: 1099-1107, 2006.

Chambard J C, Lefloch R, Pouyssegur J and Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1299-1310, 2007.

Chang F, Steelman L S and McCubrey J A. Raf-induced cell cycle progression in human TF-1 hematopoietic cells. *Cell Cycle*, 1: 220-226, 2002.

Chelberg M K, Banks G M, Geiger D F and Oegema T R. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat*, 186:43-53, 1995.

Chen Q, Fischer A, Reagan J D, Yan L J and Ames B N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4337-4341, 1995.

Chiu C P and Harley C B. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 214: 99-106, 1997.

Coppe J P, Desprez P Y, Krtolica A, and Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5: 99-118, 2010.

Coppe J P, Patil C K, Rodier F, Sun Y, Munoz D P, Goldstein J, Nelson P S, Desprez, P Y and Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6: 2853-2868, 2008.

Court C, Colliou O K, Chin J R, Liebenberg E, Bradford D S and Lotz J C. The effect of static in vivo bending on the murine intervertebral disc. *Spine J*, 1: 239-245, 2001.

Cristofalo V J, Lorenzini A, Allen R G, Torres C and Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing*, 125: 827-848, 2004.

Cuervo A M. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet*, 24: 604-612, 2008.

Dai S M, Shan Z Z, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K and Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 54: 818-831, 2006.

Demaria M, Desprez P Y, Campisi J, Velarde M C. Cell autonomous and non-autonomous effects of senescent cells in the skin. *J Invest Dermatol*, 135: 1722-1726, 2015.

Dent P, Yacoub A, Fisher P B, Hagan M P and Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22: 5885-5896, 2003.

Derby R, Lee S H and Kim B J. Discography. In: Slipman C W, Derby R, Simeone F A, Mayer T G. *Interventional Spine: an algorithmic approach*. Elsevier, 291-302, 2008.

Di Domenico E G, Romano E, Del Porto P and Ascenzioni F. Multifunctional Role of ATM/Tel1 Kinase in Genome Stability: From the DNA Damage Response to Telomere Maintenance. *Biomed Res Int*, 2014: 787404, 2014.

Dimozi A, Mavrogonatou E, Sklirou A and Kletsas D. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *European Cells and Materials*, 30: 89-103, 2015.

Dimri G P, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E E, Linskens M, Rubelj I and Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-9367, 1995.

Dmitrieva N, Bulavin D V, Fornace A J and Burg M B. Rapid activation of G₂/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *PNAS*, 99: 184-189, 2002.

Dmitrieva N, Michea L and Burg M. p53 Protects renal inner medullary cells from hypertonic stress by restricting DNA replication. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: 522-530, 2001.

Eyre D, Benya P, Buckwalter J, et al. The intervertebral disc: Basic science perspectives. *New Perspectives on Low Back Pain*, 147-207, 1989.

Feng Chencheng, Liu Huan, Yang Minghui, Zhang Yang, Huang Bo and Zhou Yue. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways. *Cell Cycle*, 15: 1674-1684, 2016.

Fisher G J, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho M K, He T, Varani J, Kang S and Voorhees J J. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin. *Am J Pathol*, 174: 101-114, 2009.

Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, Donnelly R, Coleman T and Kashanchi F. Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem*, 277: 4973-4980, 2002.

Gautieri A, Redaelli A, Buehler M J and Vesentini S. Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: candidate amino acids involved in Advanced Glycation Endproducts. *Matrix Biol*, 34: 89-95, 2014.

Gillies R J, Didier N and Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 159, 109-113, 1986.

Goldring M B and Goldring S R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213: 626-634, 2007.

Gruber H E and Hanley Jr E N. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine*, 23: 751-757, 1998.

Gruber H E, Hoelscher G L, Ingram J A, Zinchenko N and Hanley E N. Senescent vs. non-senescent cells in the human annulus in vivo: cell harvest with laser capture microdissection and gene expression studies with microarray analysis. *BMC Biotechnol*, 10: 5, 2010.

Gruber H E, Ingram J A, Davis D E and Hanley E N Jr. Increased cell senescence is associated with decreased cell proliferation in vivo in the degenerating human annulus. *The Spine Journal*, 9: 210-215, 2009.

Gruber H E, Ingram J A, Norton H J, and Hanley E N Jr. Senescence in Cells of the Aging and Degenerating Intervertebral Disc: Immunolocalization of Senescence-Associated β -Galactosidase in Human and Sand Rat Discs. *Spine*, 32: 321-327, 2007.

Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*, 132: 171-176, 2008.

Guzman C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J and Abankwa D. ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. *PLoS ONE*, 9, e92444, 2014.

Hacker H and Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci*, 357: 103-114, 2006.

Han J and Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32: 364-371, 2007.

Harley C B, Futcher A B and Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*, 345: 458-460, 1990.

Harley C B. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, 256: 271-282, 1991.

Hayden M S and Ghosh S. Shared principles in NFkappaB signaling. *Cell*, 132: 344-362, 2008.

Hayflick L and Moorhead P S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25: 585-621, 1961.

Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, Arai F, Nakajima D, Abe K and Mochida J. The relationship between the Wnt/beta-catenin and TGF-beta/BMP signals in the intervertebral disc cell. *J Cell Physiol*, 226: 1139-1148, 2011.

Hollander A. Enhanced denaturation of the $\alpha 1(\text{II})$ chains of type-II collagen in normal adult human intervertebral discs compared with femoral articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 1996.

Holm S, Maroudas A, Urban J P, Selstam G and Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res*, 8: 101-119, 1981.

Homma Y, Tsunoda M and Kasai H. Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 1063-1068, 1994.

Hormel S E and Eyre D R. Collagen in the ageing human intervertebral disc: an increase in covalently bound fluorophores and chromophores. *Biochim Biophys Acta*, 1078: 243-250, 1991.

Horner H A and Urban J P. Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*, 26: 2543-2549, 2001.

Hoyland J A, Le Maitre C and Freemont A J. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc. *Rheumatology*, 47: 809-814, 2008.

Huang P, Han J and Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell*, 1: 218-226, 2010.

Ishihara H and Urban J P G. Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *J Orthop Res*, 17: 829-835, 1999.

Ishii T, Tsuji H, Sano A, Katoh Y, Matsui H and Terahata N. Histochemical and ultrastructural observations on brown degeneration of human intervertebral disc. *J Orthop Res* 9: 78-90, 1991.

Jackson S P and Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 461: 1071-1078, 2009.

Jeong S W, Lee J S and Kim K W. In vitro lifespan and senescence mechanisms of human nucleus pulposus chondrocytes. *The Spine Journal*, 14: 499-504, 2014.

Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*, 1754: 253-262, 2005.

Karin M and Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 18: 621-663, 2000.

Karin M and Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol*, 3: 221-227, 2002.

Kim H J, Chang E-J, Kim H-M, Lee S B, Kim H-D, Kim G S and Kim H-H. Antioxidant α -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and tumor necrosis factor- α . *Free Radic Biol Med*, 40: 1483-1493, 2006.

Kim K W, Chung H N, Ha K Y, Lee J S and Kim Y Y. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *The Spine Journal*, 9: 658-666, 2009.

Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y and Yamaizumi M. Osmotic Shock Induces G₁ Arrest through p53 Phosphorylation at Ser³³ by Activated p38^{MAPK} without Phosphorylation at Ser¹⁵ and Ser²⁰. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 276, 39115-39122, 2001.

Konttinen Y T, Kemppinen P, Li T F, Waris E, Pihlajamäki H, Sorsa T, Takagi M, Santavirta S, Schultz G S and Humphreys-Beher M G. Transforming and epidermal growth factors in degenerated intervertebral discs. *J Bone Joint Surg Br*, 81: 1058-1063, 1999.

Kouroumalis A, Mavrogonatou E, Savvidou O D, Papagelopoulos P J, Pratsinis H and Kleitsas D. Major traits of the senescent phenotype of nucleus pulposus intervertebral disc cells persist under the specific microenvironmental conditions of the tissue. *Mechanisms of Aging and Development*, 177: 118-127, 2018.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld L C, Douma S, van Doorn R, Desmet C J, Aarden L A, Mooi W J, and Peeper D S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133: 1019-1031, 2008.

Kuilman T and Peeper D S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. 9: 81-94, 2009.

Kültz D and Chakravarty D. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 1999-2004, 2001.

Kumaresan S, Yoganandan N, Pintar FA, Macias M and Cusick J F. Morphology of young and old cervical spine intervertebral disc tissues. *Biomed Sci Instrum*, 36: 141-146, 2000.

Kyriakis J M and Avruch J. Mammalian mitogenactivated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81: 807-869, 2001.

Le Maitre C L, Freemont A J and Hoyland J A. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy*, 9: R45, 2007a.

Le Maitre C L, Freemont A J and Hoyland J A. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression. *Biotech Histochem*, 81: 125-131, 2006.

Le Maitre C L, Freemont A J and Hoyland J A. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol*, 204: 47-54, 2004.

Le Maitre C L, Freemont A J and Hoyland J A. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*, 7: 732-745, 2005a.

Le Maitre C L, Hoyland J A and Freemont A J. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile. *Arthritis Res Ther*, 9: 77, 2007b.

Le Maitre C L, Richardson S M, Baird P, Freemont A J and Hoyland J A. Expression of receptors for putative anabolic growth factors in human intervertebral disc: implications for repair and regeneration of the disc. *J Pathol*, 207: 445-452, 2005b.

Le Maitre C L, Pockert A, Buttle D J, Freemont A J and Hoyland J A. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans*, 35: 652-655, 2007b.

Levy M Z, Allsopp R C, Futcher A B, Greider C W and Harley C B. Telomere end-replication problem and cell aging. *Mol Biol*, 225: 951-960, 1992.

Lotz J C and Chin J R. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading. *Spine*, 25: 1477-1483, 2000.

Lotz J C, Colliou O K, Chin J R, Duncan N A and Liebenberg E. 1998. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. *Spine* 23: 2493-2506, 1998.

Lowe S W, Cepero E and Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432: 307-315, 2004.

Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, and Rodier F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet*, 6: 94, 2015.

Malaquin N, Martinez A and Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*, 82: 39-49, 2016.

Maroudas A, Muir H and Wingham J. The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 177: 492-500, 1969.

Maroudas A, Stockwell R A, Nachemson A and Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat*, 120: 113-130, 1975.

Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80: 179-185, 1995.

Martin J A, Brown T D, Heiner A D and Buckwalter J A. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, 427: 96-103, 2004.

Mavrogonatou E and Kletsas D. High osmolality activates the G1 and G2 cell cycle checkpoints and affects the DNA integrity of nucleus pulposus intervertebral disc cells triggering an enhanced DNA repair response. *DNA Repair*, 8: 930-943, 2009.

Mavrogonatou E and Kletsas D. Differential Response of Nucleus Pulposus Intervertebral Disc Cells to High Salt, Sorbitol, and Urea. *J Cell Physiol*, 227: 1179-1187, 2011.

Mc Connell B B, Gregory F J, Stott F J, Hara E and Peters G. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 19: 1981-9, 1999.

Miller J A, Schmatz C and Schultz A B. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine*, 13: 173-178, 1998.

Miyamoto H, Saura R, Harada T, Doita M and Mizuno K. The role of cyclooxygenase-2 and inflammatory cytokines in pain induction of herniated lumbar intervertebral disc. *Kobe J Med Sci*, 46: 13-28, 2000.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth*, 65, 55-63, 1983.

Nasto L A, Seo H-Y, Robinson A R, Tilstra J S, Clauson C L, Sowa G A, Ngo K, Dong Q, Pola E, Lee J Y, Niedernhofer L J, Kang J D, Robbins P D and Vo N V. ISSLS prize winner: inhibition of NF- κ B activity ameliorates age-associated disc degeneration in a mouse model of accelerated aging. *Spine*, 37:1819-1825 2012.

Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J and von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signaling. *Mechanisms of Ageing and Development*, 170: 30-36, 2018.

Nerlich A G, Bachmeier B E, Schleicher E, Rohrbach H, Paesold G and Boos N. Immunomorphological analysis of RAGE receptor expression and NF-kappaB activation in tissue samples from normal and degenerated intervertebral discs of various ages. *Ann N Y Acad Sci*, 1096: 239-248, 2007.

Niedernhofer L J and Robbins P D. Signaling mechanisms involved in the response to genotoxic stress and regulating lifespan. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 176-180, 2008.

O' Hare D, Winlove C P and Parker K H. Electrochemical method for direct measurement of oxygen concentration and diffusivity in the intervertebral disc: electrochemical characterization and tissue-sensor interactions. *J Biomed Eng*, 13: 304-312, 1991.

Ohshima H and Urban J P G. The effect of lactate and pH on proteoglycan. *Spine*, 17: 1079-1082, 1992.

Pardee A B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71: 1286-1290, 1974.

Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, Joyner A H, Schork N J, Hsueh W-C, Reiner A P, Psaty B M, Atzmon G, Barzilai N, Cummings S R, Browner W S, Kwok P Y and Ziv E. Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell*, 8: 460-472, 2009.

Pazzaglia U E, Salisbury J R and Byers P D. Development and involution of the notochord in the human spine. *J R Soc Med*, 82: 413-415, 1989.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B E, Karandikar M, Berman K and Cobb M H. Mitogenactivated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183, 2001.

Phelip X. Why the back of the child? *Eur Spine J*, 8: 426-428, 1999.

Pockert A J, Richardson S M, Le Maitre C L, Lyon M, Deakin J A, Buttle D J, Freemont A J and Hoyland J A. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue

inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum*, 60: 482-491, 2009.

Pokharna H K and Phillips F M. Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging. *Spine*, 23:1645-1648, 1998.

Pratsinis H and Kletsas D. PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur Spine J*, 16:1858-1866, 2007.

Prescher A. Anatomy and pathology of the aging spine. *Eur J Radiol*, 27: 181-195, 1998.

Ramana K V, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava S K. Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes*, 53: 2910-2920, 2004.

Rannou F, Lee T S, Zhou R H, Chin J, Lotz J C, Mayoux-Benhamou M A, Barbet J P, Chevrot A and Shyy J Y. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol*, 164: 915-924, 2004.

Risbud M V and Shapiro I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*, 10: 44-56, 2014.

Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans E H, Jaffray D C and Eisenstein S M. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine*, 25: 3005-3013, 2000.

Roberts S, Evans E H, Kletsas D, Jaffray D C and Eisenstein S M. Senescence in human intervertebral discs. *Eur Spine J*, 15: 312-S316, 2006a.

Roberts S, Evans E H, Trivedi J and Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 88: 10-14, 2006b.

Roberts S, Urban J P, Evans H and Eisenstein S M. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine*, 21: 415-420, 1996.

Rodier F and Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192: 547-556, 2011.

Rodier F, Coppé J P, Patil C K, Hoeijmakers W A M, Muñoz, Raza S R, Freund A, Campeau E, Davalos A R and Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11: 973-979, 2009.

Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, Ivanova V S and Bonner W M. DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273: 5858-5868, 1998.

Roughley P J and Alini M A J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*. 30: 869-874, 2002.

Sardy M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. *Connect Tissue Res*, 50: 132-138, 2009.

Setton L A and Chen J. Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc. *Spine*, 29: 2710-2723., 2004.

Setton L A and Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am*, 88: 52-7, 2006.

Sewing A, Wiseman B, Lloyd A C and Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 17: 5588-5597, 1997.

Shapiro I M, Vresilovic E J and Risbud M V. Is the spinal motion segment a diarthrodial polyaxial joint: what a nice nucleus like you doing in a joint like this? *Bone*. 50: 771-776, 2012.

Shay J W and Wright W E. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*, 1071: 1-7, 1991.

Shiloh Y and Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 197-210, 2013.

Shirazi-Adl A, Taheri M and Urban J P G. Analysis of cell viability in intervertebral disc: Effect of endplate permeability on cell population. *J Biomech*, 43: 1330-1336, 2010.

Singh K, Masuda K, Thonar E J, An H S and Cs-Szabo G. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and anulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine*, 34: 10-16, 2009.

Sivan S S, Hayes A J, Wachtel E, Caterson B, Merkher Y, Maroudas A, Brown S, Roberts S. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*, 23: 344-353, 2014.

Specchia N, Pagnotta A, Toesca A and Greco F. Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine. *Eur Spine J*, 11: 145-151, 2002.

Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser B A, Li Y, Liao R, Xie C, Chen J, Deng Q, Yamout M, Dong M-Q, Frangou C G, Yates J R, Wright P E and Han J. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, 128: 295-308, 2007.

Thompson J P, Pearce R H, Schechter M T, Adams M E, Tsang I K and Bishop P B. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine*, 15: 411-415, 1990.

Tolonen J, Gronblad M, Vanharanta H, Virri J, Guyer R D, Rytomaa T and Karaharju E O. Growth factor expression in degenerated intervertebral disc tissue. An immunohistochemical analysis of transforming growth factor-b, fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *Eur Spine J*, 15: 588-596, 2006.

Trout J J, Buckwalter J A and Moore K C. Ultrastructure of human intervertebral disc II. Cells of the nucleus pulposus. *Anat Rec*, 204: 307-314, 1982b.

Trout J J, Buckwalter J A, Moore K C and Landis S K. Ultrastructure of human intervertebral disc I. Changes in notocordal cells with age. *Tissue and Cell*, 14:359-369, 1982a.

Ulrich J A, Liebenberg E C, Thuillier D U and Lotz J C. ISSLS prize winner: repeated disc injury causes persistent inflammation. *Spine*, 32: 2812-2819, 2007.

Urban M R, Fairbank J C, Bibby S R and Urban J P. Intervertebral disc composition in neuromuscular scoliosis: changes in cell density and glycosaminoglycan concentration at the curve apex. *Spine*, 26: 610-617, 2001a.

Urban J P G and Maroudas A. Measurement of fixed charge density in the intervertebral disc. *Biochimica et Biophysica acta*, 585: 166-178, 1979.

Urban J P G and McMullin, J F. Swelling pressure of the intervertebral disc: Influence of proteoglycan and collagen contents. *Biorheology*, 22, 145-157, 1985.

Urban J P G and Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*, 5: 120-130, 2003.

Urban J P G and Winlove C P. Pathophysiology of the intervertebral disc and the challenges for MRI. *J Magn Reson Imaging*, 25: 419-432, 2007.

Urban J P G, Holm S, Maroudas A and Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: effect of fluid flow on solute transport. *Clin Orthop Relat Res*, 170: 296-302, 1982.

Urban J P G, Smith S and Fairbank J C T. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine*, 29: 2700-2709, 2004.

Urban J P G. The effect of physical factors on disc cell metabolism. *American Academy of Orthopedic Surgeons*, 391-412, 1993.

Urban J P G. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochem Soc Trans*, 30: 858-864, 2002.

Vandersickel V, Slabbert J, Thierens H and Vra A. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measurements*, 46, 72-75, 2011.

Varani J, Warner R L, Gharaee-Kermani M, Phan S H, Kang S, Chung J H, Wang Z Q, Datta S C, Fisher G J, Voorhees J J. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol*, 114: 480-6, 2000.

Verzijl N, DeGroot J, Ben Z C, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank R A, Mizrahi J, Schalkwijk C G, Thorpe S R, Baynes J W, Bijlsma J W J, Lefeber F P J G, TeKoppele J M. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: A possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 114-123, 2002.

Vo N V, Hartman R A, Patil P R, Risbud M V, Kletsas D, Iatridis J C, Hoyland J A, Le Maitre C L, Sowa G A, and Kang J D. Molecular Mechanisms of Biological Aging in Intervertebral Discs. *J Orthop Res*, 34: 1289-1306, 2016.

Vo N V, Niedernhofer L J, Nasto L A, Jacobs L, Robbins P D, Kang J, Evans C H. An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints. *J Orthop Res*, 31:831-837, 2013.

Wagner E F and Nebreda A R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549, 2009.

Walsh A J, Bradford D S and Lotz J C. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine*, 29: 156-163, 2004.

Wang D L, Jiang S D and Dai L Y. Biologic response of the intervertebral disc to static and dynamic compression in vitro. *Spine*, 32: 2521-2528, 2007.

Wang W, Chen J X, Liao R, Deng Q, Zhou J J, Huang S, and Sun P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*, 22: 3389-3403, 2002.

Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N and ara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci*, 108: 563-569, 2017.

Wolfe H J, Putschar W G and Vickery A L. Role of the Notochord in human intervertebral disk. I. Fetus and infant. *Clin Orthop Relat Res*, 39: 205-212, 1965.

Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E and McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 17: 5598-5611, 1997.

Wuertz K, Vo N, Kletsas D and Boos N. Inflammatory and catabolic signalling in intervertebral discs: the roles of nf- κ b and map kinases. *European Cells and Materials*, 23: 103-120, 2012.

Xu J, Li H, Yang K, Guo S, Wang J, Feng C and Chen H. Hyper-osmolarity environment-induced oxidative stress injury promotes nucleus pulposus cell senescence in vitro. *Biosci Rep*, 39(9): BSR20191711, 2019.

Yasuma T, Koh S, Okamura T and Yamauchi Y. Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses. *J Bone Joint Surg Am*, 72: 220-229, 1990.

Zhao C-Q, Wang L-M, Jiang L-S, Dai L-Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Research Reviews*, 6: 247-261, 2007.

Zhu Q, Gao X and Gu W. Temporal changes of mechanical signals and extracellular composition in human intervertebral disc during degenerative progression. *J Biomech*, 47: 3734-3743, 2014.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι αποτελούν ινο-χόνδρινες δομές, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γειτονικών σωμάτων των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης και κάθε δίσκος αποτελείται από τον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο, τη μεταβατική ζώνη και τον κεντρικό πηκτοειδή πυρήνα. Οι δίσκοι περιέχουν αραιό πληθυσμό κυττάρων και άφθονη εξωκυττάρια μήτρα, η οποία σχηματίζεται από ένα περίπλοκο δίκτυο ινών κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών. Στον ινώδη δακτύλιο περιέχεται κυρίως κολλαγόνο τύπου I, ενώ στον πηκτοειδή πυρήνα περιέχονται κυρίως κολλαγόνο τύπου II και πρωτεογλυκάνες, με κύριο εκπρόσωπο την αγκρεκάνη. Η υψηλή συγκέντρωση της αγκρεκάνης συμβάλλει στο υψηλό αρνητικό φορτίο της εξωκυττάριας μήτρας, ένας παράγοντας που σε συνδυασμό με άλλους (έλλειψη αγγείωσης, μειωμένη παροχή θρεπτικών και οξυγόνου, μειωμένο pH) συμβάλλει στο ιδιαίτερο από φυσικοχημικής άποψης περιβάλλον του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η υψηλή συγκέντρωση των κατιόντων, οι μηχανικές δυνάμεις και η μειωμένη ενυδάτωση του δίσκου οδηγούν σε συνθήκες υπερωσμωμοριακότητας. Πιο συγκεκριμένα, η ωσμωμοριακότητα αυξάνεται απότομα από τον εξωτερικό δακτύλιο προς τον πηκτοειδή πυρήνα, του οποίου η ωσμωμοριακότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ημέρας από τα 400 mOsm / kg H₂O μέχρι και τα 550 mOsm / kg H₂O, σε αντίθεση με τους περισσότερους ιστούς όπου η ωσμωμοριακότητα είναι σταθερή στα 300 mOsm / kg H₂O.

Στο παρελθόν έχουμε δείξει ότι σε εκφυλισμένους και γηρασμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους παρατηρείται υψηλό ποσοστό γηρασμένων κυττάρων. Από την άλλη, έχουμε επίσης δείξει ότι η έκθεση των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου σε υψηλή ωσμωμοριακότητα είναι γενωτοξική, δηλαδή προκαλεί βλάβες στο DNA, ενώ πλήθος μελετών συνηγορούν στο ότι η πρόκληση βλαβών στο DNA μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη κυτταρική γήρανση. Σε αυτή την κατεύθυνση, έχει πρόσφατα αναφερθεί, ότι η βραχύχρονη έκθεση κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα αρουραίου σε συνθήκες υπερωσμωμοριακότητας μπορεί να προκαλέσει πρόωρη κυτταρική γήρανση *in vitro*. Στην παρούσα εργασία, θελήσαμε να εξετάσουμε εάν το φαινόμενο αυτό επαναλαμβάνεται σε κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα βοός και ανθρώπου.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του ωσμωτικού στρες στη βιωσιμότητα βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα και βρέθηκε ότι καθώς αυξάνεται η

ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου από τα 300 έως και τα 600 mOsm / kg H₂O, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, ενώ τιμές ωσμωμοριακότητας μεγαλύτερες των 600 mOsm / kg H₂O καθίστανται κυτταροτοξικές.

Ακολούθως, διερευνήθηκε η επαναλαμβανόμενη επίδραση του ωσμωτικού στρες στον πολλαπλασιασμό βόειων και ανθρώπινων κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα και παρατηρήθηκε ότι όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες, ενώ όταν τα κύτταρα τοποθετηθούν και πάλι σε ισοωσμωτικό περιβάλλον, επαναφέρουν την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό, χωρίς όμως να την επαναφέρουν στα αρχικά της επίπεδα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μέσω επαναλαμβανόμενου και παρατεταμένου ωσμωτικού στρες στον πηκτοειδή πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου, χρησιμοποιώντας ως δείκτες την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης, την ειδική της γήρανσης χρώση SA-β-Gal και την έκφραση μοριακών και βιοχημικών δεικτών της γήρανσης [δηλαδή τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21^{CIP1/WAF1} και p16^{INK4A}, τη μεταλλοπρωτεάση 1 (MMP1) και τις πρωτεΐνες p38 MAPK και p53]. Εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα έκθεσης των κυττάρων σε συνθήκες υπερωσμωμοριακότητας: μία σύντομη έκθεση και μία μακροχρόνια έκθεση. Με τη χρήση και των δύο πρωτοκόλλων, παρατηρήθηκε μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, η οποία είναι αναστρέψιμη σε μεγάλο βαθμό κατά την επαναφορά των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες, χαμηλό ποσοστό ενσωμάτωσης της χρώσης SA-β-Gal, μια μικρή μόνο αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21 και p16, απουσία ενεργοποίησης των πρωτεϊνών-δεικτών της κυτταρικής γήρανσης p38 MAPK και p53. Αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στην έκφραση της μεταλλοπρωτεάσης MMP1.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το ωσμωτικό στρες μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα του δίσκου, όμως δεν οδηγεί σε πρόωρη κυτταρική γήρανση. Η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης υπερωσμωμοριακών συνθηκών σε κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι υπό μελέτη στο εργαστήριό μας.

ABSTRACT

Intervertebral disc (IVD) is a fibrous-cartilaginous tissue, which lies between the adjacent vertebral bodies of the spine and each one consists of the outer annulus fibrosus (AF), the transition zone and the central nucleus pulposus (NP). IVD contain a sparse cell population and abundant extracellular matrix (ECM), which is formed by a complex network of collagen fibers and proteoglycans. AF contains mainly collagen type I, while NP contains mainly collagen type II and proteoglycans, the main component of which is aggrecan. The high concentration of aggrecan contributes to the negatively charged ECM, which in combination with others (lack of vascularity, reduced nutrients and oxygen supply, reduced pH) contributes to a very unusual physicochemical environment of the IVD. High concentrated cations, mechanical forces and reduced hydration of the IVD lead to hyperosmotic conditions. More specifically, osmolality increases sharply from the outer AF to the central NP. NP osmolality ranges between 400 mOsm / kg H₂O and 550 mOsm / kg H₂O during a day, in contrast to most tissues where osmolality is constant at 300 mOsm / kg H₂O.

In the past we have observed a high percentage of senescent cells in degenerated or aged discs. We have also shown that exposure of IVD cells to high osmolality is genotoxic, i.e. it causes DNA damage, while a number of studies suggest that DNA damage can lead to Stress-Induced Premature Senescence (SIPS). In this regard, it has recently been reported that short-term exposure to hyperosmotic conditions can cause SIPS in rat NP cells *in vitro*. In the present study, we wanted to examine whether this phenomenon is repeated in bovine and human nucleus pulposus cells.

The role of hyperosmotic stress on the viability of bovine and human NP cells was first examined. Cells' proliferation declined in a dose-dependent manner, with increasing osmolality. Medium osmolality that exceeded the value of 600 mOsm / kg H₂O was found to be cytotoxic.

Then, the role of hyperosmotic stress on the proliferation of bovine and human NP cells was examined. Results showed that hyperosmotic stress significantly suppressed NP cell proliferation compared with normal conditions. NP cells that transferred from hyperosmotic to isosmotic conditions restore their proliferation ability, but not to its original levels.

Next, the effects of the continuous exposure to hyperosmolality on NP cell senescence was investigated. NP cell senescence was evaluated by cell proliferation potency by the BrdU incorporation, senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) and senescence markers' expression [cyclin dependent kinase inhibitors p21^{CIP1} / WAF1 and p16^{INK4A}, metalloprotease 1 (MMP1), p38 MAPK and p53]. We used two protocols of cell exposure in hyperosmotic conditions: a short exposure (according to an already published protocol) and a long exposure. The results showed a decrease in cell proliferative capacity, which is largely reversible when cells return to normal conditions, a low rate of SA- β -Gal-positive NP cells, only a small up-regulation of p21 and p16 genes, lack of activation of p38 and p53 proteins-senescence markers, and only a significantly up-regulation of extracellular MMP1.

In conclusion, the results of the present study showed that hypersmotic stress reduces the IVD NP cell proliferation rate, but does not promote SIPS. The study of the long-term effect of hyperosmotic conditions on NP disc cells is under research in our laboratory.

