



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΥΠΟ
ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΥΠΟ
ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

ΚΑΙ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΓΗΡΑΝΣΗΣ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΥΠΟ
ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ**

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Δ. Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ινστιτούτο Βιολογίας, Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Δ. Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος
- Α. Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

Περιεχόμενα

Πρόλογος	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Το δέρμα.....	8
1.2. Η γήρανση.....	9
1.2.1. Η κυτταρική γήρανση.....	10
1.2.2. Η αναδιπλασιαστική γήρανση.....	11
1.2.3. Η Πρόωρα Επαγόμενη Γήρανση λόγω Στρες (SIPS).....	13
1.3. Το οξειδωτικό στρες.....	13
1.3.1. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες.....	13
1.3.2. Παραγωγή ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου.....	14
1.3.3. Το αντιοξειδωτικό σύστημα έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου.....	15
1.4. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες.....	16
1.4.1. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α).....	17
1.4.2. Ο ρόλος των κυτοκινών στην επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης ανθρώπινου ινοβλαστών.....	18
Σκοπός διπλωματικής εργασίας	20
2. Υλικά και Μέθοδοι	21
2.1. Υλικά.....	21
2.2. Κυτταρικά στελέχη.....	22
2.3. Όργανα.....	22
2.4. Μέθοδοι.....	23
2.4.1. Αποστείρωση.....	23
2.4.2. Κυτταροκαλλιέργειες.....	23
2.4.3. Αποθήκευση κυττάρων – Αρχείο γενεών.....	24
2.4.4. Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων.....	25
2.4.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT.....	27

2.4.6. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω της δοκιμασίας DCFH-DA.....	28
2.4.7. Ακτινοβόληση κυττάρων από πηγή γ-ακτινοβολίας.....	30
2.4.8. Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU).....	30
2.4.9. Επισημάνση κυττάρων με τη χαρακτηριστική για τα γηρασμένα κύτταρα χρώση senescence associated beta-galactosidase (SA-β-Gal).....	32
2.4.10. Απομόνωση ολικού RNA από δερματικούς ινοβλάστες.....	34
2.4.11. Σύνθεση cDNA.....	34
2.4.12. PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	35
3. Αποτελέσματα.....	36
3.1. Επίδραση του TNF-α στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS και τη βιωσιμότητα ανθρώπινων ινοβλαστών.....	36
3.1.1. Μελέτη επίδρασης του οξειδωτικού στρες στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS.....	36
3.1.2. Μελέτη της επίδρασης του TNF-α στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS.....	38
3.1.3. Μελέτη της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στη βιωσιμότητα των κυττάρων...39	
3.1.4. Μελέτη επίδρασης του TNF-α στη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	41
3.1.5. Μελέτη της επίδρασης του αντιοξειδωτικού NAC στη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	44
3.1.6. Μελέτη της επίδρασης της ερυθροποιητίνης (EPO) στη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	45
3.1.7. Μελέτη της πιθανότητας άρσης της επαγόμενης από το H ₂ O ₂ αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS με τη χρήση της NAC και της EPO.....	47
3.2 Κυτταρική γήρανση.....	49
3.2.1 Επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης από το οξειδωτικό στρες.....	49
3.2.2 Μελέτη επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον TNF-α.....	52
3.3 Μοριακός χαρακτηρισμός γηρασμένων κυττάρων.....	54
3.3.1 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένα κύτταρα μετά από έκθεση σε γ-ακτινοβολία.....	55

3.3.2 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα μέσω οξειδωτικού στρες.....	57
3.3.3 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένα μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον TNF-α κύτταρα.....	58
3.3.4 Έκφραση δεικτών της γήρανσης σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα μέσω οξειδωτικού στρες και ύστερα από χορήγηση ερυθροποιητίνης.....	60
Συζήτηση.....	62
Βιβλιογραφία.....	65
Περίληψη.....	69
Abstract.....	70

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Εθνικού Κέντρου Ερευνών Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρ. Δημήτρη Κλέτσα και διήρκησε από το Σεπτέμβριο του 2015 μέχρι και τον Οκτώβριο του 2016.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Διαμάντη Σίδηρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος αυτής της μελέτης, καθώς επίσης και τον Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα, για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Επιτροπή.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της εργασίας, τον Δρ. Δημήτρη Κλέτσα, με τον οποίο νιώθω τυχερή που συνεργάστηκα και έλαβα την επιστημονική καθοδήγηση του, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της εργασίας μου, όσο και κατά τη συγγραφή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρα Ελένη Μαυρογονάτου (Μετά-διδακτορική συνεργάτης) για την διαρκή στήριξη, τις συμβουλές και τη συνεχή καθοδήγηση της.

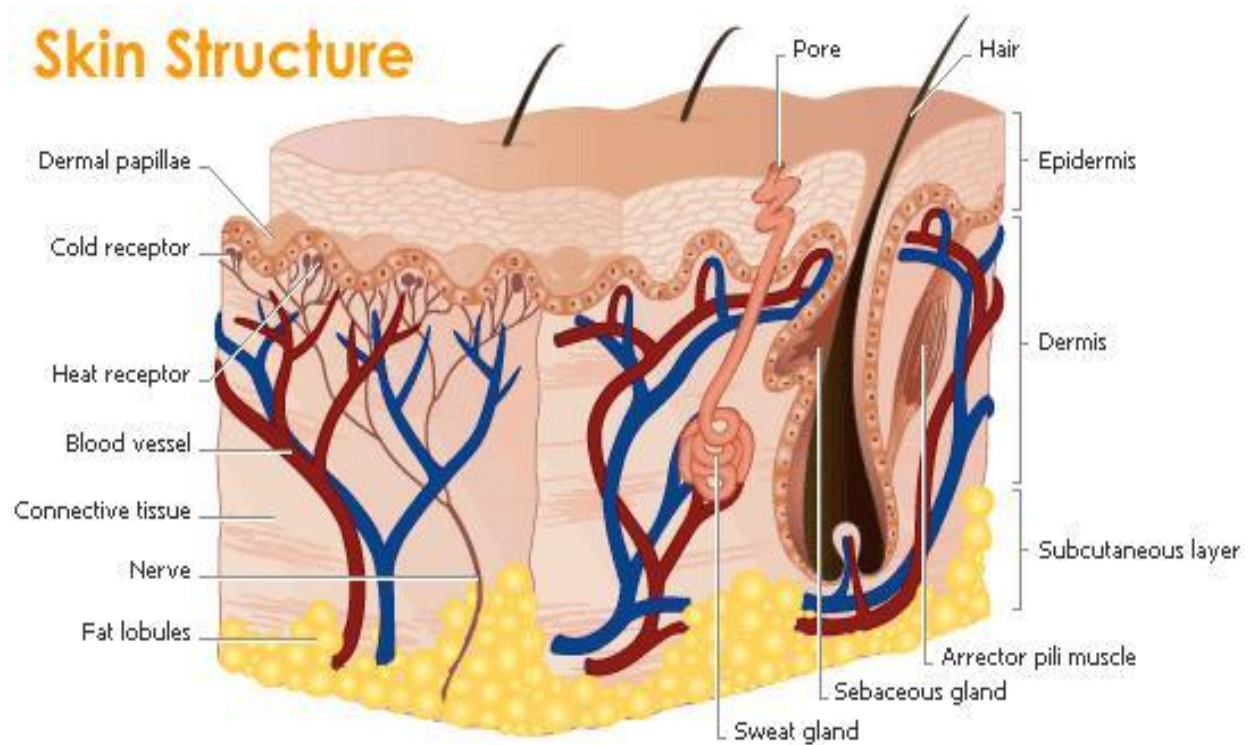
Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Δρ. Χαράλαμπο Πρατσίνη (Ερευνητής Β'), Αδαμαντία Παπαδοπούλου (Μετά-διδακτορική Συνεργάτης), Ελένη Λιάκου (Υποψήφια Διδάκτωρ), Μαρία Αγγελοπούλου (Υποψήφια Διδάκτωρ) και Αναστάση Κουρούμαλη (Υποψήφιος Διδάκτωρ), για την βοήθεια και καθημερινή υποστήριξη τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους ανθρώπους που είναι δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια.

1. Εισαγωγή

1.1 Το δέρμα

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος. Ανατομικά διακρίνεται σε τρεις διακριτές στιβάδες: την επιδερμίδα (epidermis), το εξωτερικό μέρος του δέρματος, τη δερμίδα ή χόριο (dermis) και τον υποδόριο ή λιπώδη ιστό (subcutaneous tissue) (**Εικόνα 1.1**). Κάθε στιβάδα αποτελείται από διαφορετικό τύπο κυττάρων και έτσι επιτελεί και διαφορετική λειτουργία.



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση της δομής του ανθρώπινου δέρματος (iym-health.blogspot.co.uk).

Η επιδερμίδα έχει πάχος 0,05-0,1 mm. Αποτελεί πολύστιβο, πλακώδες, κερατινοποιημένο επιθήλιο και περιέχει κερατινοκύτταρα και μελανοκύτταρα. Η επιδερμίδα είναι η στιβάδα του δέρματος η οποία είναι περισσότερο εκτεθειμένη σε διάφορα ερεθίσματα. Η εξωτερική κεράτινη

στιβάδα (στρώμα νεκρών κυττάρων) της επιδερμίδας δημιουργεί ασπίδα προστασίας για το δέρμα και την είσοδο μικροοργανισμών. Επίσης μέσω της επιδερμίδας ελέγχονται και η διάχυση και διείσδυση χημικών ουσιών. Η δερμίδα έχει πάχος περίπου 1-5 mm και ο κύριος τύπος κυττάρων της είναι οι ινοβλάστες. Περιέχει συνδετικό ιστό (ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης) και έχει στηρικτικό ρόλο για την επιδερμίδα, καθώς επίσης διατηρεί και την ελαστικότητα του δέρματος. Ο υποδόριος ιστός μπορεί να έχει πάχος μέχρι και μερικά εκατοστά. Αιμοφόρα αγγεία εισχωρούν και στη δερμίδα και στον υποδόριο ιστό, σε μικρότερο βαθμό, γεγονός που συμβάλλει στη θερμορύθμιση του δέρματος και την παροχή θρεπτικών συστατικών.

Το δέρμα υπόκειται σε φθορά και οδηγείται σε γήρανση με το πέρασμα των χρόνων, λόγω της συσσωρευμένης έκθεσής του σε περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες (Herlling T. et al., 2006).

1.2 Η γήρανση

Η γήρανση παρατηρείται σε όλα τα βιολογικά βασίλεια. Η λέξη "γήρανση" μπορεί να αναφέρεται είτε σε κυτταρική γήρανση, είτε στη γήρανση του συνόλου του οργανισμού.

Επειδή ο αριθμός των γηρασμένων κυττάρων αυξάνει με την ηλικία, έχει ευρέως θεωρηθεί ότι αυτή η αύξηση αυτή συμβάλλει στην γήρανση του οργανισμού. Ωστόσο, αυτή η άποψη υποτιμά τον πρωταρχικό ρόλο της γήρανσης, ο οποίος είναι να αποτραπεί η εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων και να προκληθεί ο θάνατός τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η γήρανση επομένως είναι μία ευεργετική αντισταθμιστική απόκριση, που συμβάλλει στην απαλλαγή των ιστών από κατεστραμμένα και ενδεχομένως ογκογόνα κύτταρα. Αυτή η ρύθμιση ωστόσο απαιτεί ένα αποτελεσματικό σύστημα αντικατάστασης κυττάρων, που περιλαμβάνει την απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων και την ενεργοποίηση των προγονικών κυττάρων με σκοπό την αποκατάσταση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Σε ηλικιωμένους οργανισμούς, αυτό το σύστημα κύκλου εργασιών μπορεί να γίνει αναποτελεσματικό ή μπορεί να εξαντλήσει την αναγεννητική ικανότητα των προγονικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων και την γήρανση ολόκληρου του οργανισμού (Lopez-Otin C. et al., 2013).

1.2.1 Η κυτταρική γήρανση

Ως κυτταρική γήρανση ορίζεται η μόνιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και προκύπτει ως απόκριση σε διάφορες καταστάσεις, όπως είναι οι βλάβες του DNA και η μείωση του μήκους των τελομερών (Campisi J. and d'Adda di Fagagna F., 2007 and Collado M. et al., 2007). Γηρασμένα κύτταρα έχουν βρεθεί μέσα σε όγκους και σε ηλικιωμένους ιστούς (Campisi J. and d'Adda di Fagagna F., 2007 and Collado M. et al., 2007). Αυτό το φαινόμενο περιγράφηκε αρχικά από τον Hayflick σε ανθρώπινους ινοβλάστες *in vitro* (Hayflick L. and Moorhead P., 1961). Σήμερα γνωρίζουμε ότι η γήρανση που παρατηρήθηκε από το Hayflick προκαλείται από τη μείωση του μήκους των τελομερών (Bodnar A. et al. 1998), αλλά υπάρχουν και άλλα ερεθίσματα που σχετίζονται και πυροδοτούν τη διαδικασία της γήρανσης.

Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Storer et al., 2013) και εμφανίζουν αλλαγές τόσο σε μορφολογικό όσο και βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Αν και τα γηρασμένα κύτταρα δεν μπορούν πλέον να αντιγραφούν, παραμένουν μεταβολικά ενεργά, με μόνιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και υιοθετούν ένα φαινότυπο που περιλαμβάνει μια χαρακτηριστική πεπλατυσμένη μορφολογία κυττάρου, τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, προ-φλεγμονώδη εκκριτική απόκριση, μειωμένη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, αύξηση των επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου, αντοχή στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου και επίσης είναι θετικά στη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA-β-Gal (Senescence-associated beta galactosidase) σε pH 6.0 (Campisi J. and Judith L., 2013). Επίσης, χαρακτηρίζονται από έναν εκκριτικό φαινότυπο που συνδέεται με την γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype, SASP) και περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση κυτοκινών, χυμοκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεασών (Campisi J. and Judith L., 2013 and Kulman et al., 2010).

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, σύμφωνα με την αιτία πρόκλησής της:

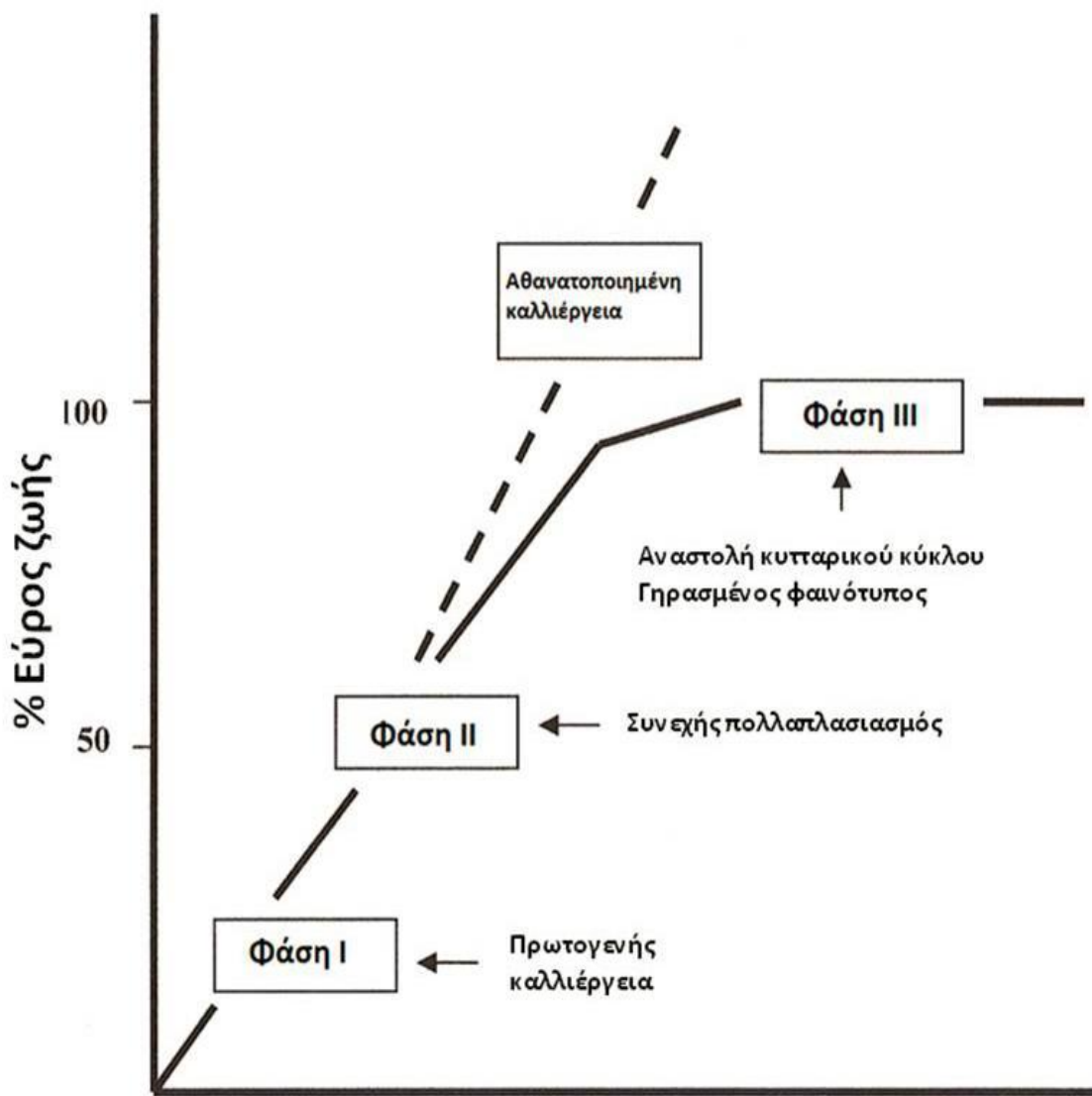
- α. Αναδιπλασιαστική γήρανση (replicative senescence) που οφείλεται στη μείωση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων

β. Πρόωρα Επαγόμενη Γήρανση λόγω Στρες (SIPS) που οφείλεται σε εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες.

1.2.2 Η αναδιπλασιαστική γήρανση

Το φαινόμενο της αναδιπλασιαστικής κυτταρικής γήρανσης περιγράφηκε για πρώτη φορά πειραματικά σε ανθρώπινους ινοβλάστες από τους Hayflick και Moorhead το 1961 (Hayflick and Moorhead, 1961), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Οι ινοβλάστες, καθώς και τα περισσότερα είδη μη μεταλλαγμένων κυττάρων, χάνουν την ικανότητα αντιγραφής και πολλαπλασιασμού ύστερα από ένα πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και εισέρχονται στη φάση της κυτταρικής γήρανσης (**Εικόνα 1.2**). Ο αριθμός αυτός (περίπου 50 για τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες) είναι γνωστός και ως όριο του Hayflick (Hayflick limit) και είναι αρκετά σταθερός κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, αλλά μπορεί και να διαφοροποιηθεί αυξάνοντας ή μειώνοντας τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα (von Zglinicki T. et al., 2001).

Η αναδιπλασιαστική γήρανση έχει δείχθει ότι οφείλεται στην προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών στο τέλος κάθε κυτταρικού κύκλου (Harley C.B. et al., 1990), σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου τελομεράση (Levy M.Z. et al., 1992 and Bodnar A.G. et al., 1998). Τέτοια είναι τα σωματικά κύτταρα των περισσότερων θηλαστικών (Campisi J., 2001), όπου η μείωση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων αναγνωρίζεται ως γενετική βλάβη και επάγει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, όπως την ενεργοποίηση των μονοπατιών p53-p21^{WAF1}-pRb και p16^{INK4a}-pRb (Moiseeva O. et al., 2006 και Alcorta D.A. et al., 1996). Τα μονοπάτια αυτά αποτελούν την πρώτη γραμμή προστασίας από σοβαρές βλάβες στο γενετικό υλικό, που θα ήταν πιθανές ογκογόνες μεταλλάξεις.



Διαιρέσεις πληθυσμού

Εικόνα 1.2: Γραφική παράσταση των φάσεων καλλιέργειας των φυσιολογικών διπλοειδών ινοβλαστών (Kletsas, 2003). Η φάση I εκπροσωπεί την πρωτογενή καλλιέργεια. Στη φάση II παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός των κυττάρων, μέχρι να σταματήσουν να διαιρούνται μπαίνοντας στη φάση III. Εξαίρεση στον κανόνα της αναδιπλασιαστικής γήρανσης αποτελούν τα αθανάτοιοιημένα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται αέναα.

1.2.3 Η Πρόωρα Επαγόμενη Γήρανση λόγω Στρες (SIPS)

Ο τύπος αυτός της κυτταρικής γήρανσης που ονομάζεται επαγόμενη από στρες γήρανση (Stress-Induced Premature Senescence, SIPS) είναι δυνατόν να προκληθεί από μία σειρά άλλων σημάτων, όπως υπερέκφραση ογκογονιδίων, ογκογόνα ή μιτογόνα σήματα, μη επιδιορθώσιμες βλάβες στο DNA ή αλλαγές στη χρωματίνη. Επίσης, μπορεί να επαχθεί από οξύ ή χρόνιο στρες και συσσώρευση βλαβών στο πυρηνικό ή μιτοχονδριακό DNA. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί SIPS έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά που έχουν υποστεί αναδιπλασιαστική γήρανση, τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω.

1.3 Το οξειδωτικό στρες

1.3.1 Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζονται μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι κύριοι αντιπρόσωποι των ROS είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το νιτρικό οξείδιο (NO^{\bullet}), η υπεροξειδική ρίζα (OH^{\bullet}), το υδροξυλικό ανιόν και το μονήρες οξυγόνο ($^{\bullet}O_2$).

Οι ROS είναι μόρια ασταθή. Στα βιολογικά συστήματα, προσθέτουν ηλεκτρόνια σε γειτονικά τους μόρια, με σκοπό να απελευθερώσουν ενέργεια και να αποκτήσουν σταθερότερη μορφή. Φυσιολογικά οι ROS συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η μεταγραφή και η απόπτωση και λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια ενεργοποιώντας διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Παράγονται από όλους τους αερόβιους οργανισμούς, είτε σε φυσιολογικές για την κυτταρική λειτουργία συγκεντρώσεις, είτε σε υψηλότερες, που τελικά καταλήγουν τοξικές για την επιβίωση του κυττάρου. Σε παθολογικές

καταστάσεις, οι ROS προκαλούν προβλήματα στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού του κυττάρου και τελικά στην ομοιοστασία ολόκληρου του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, οι βλάβες που μπορεί να υποστεί το γενετικό υλικό του κυττάρου από τη συσσώρευση ROS είναι ο κατακερματισμός της διπλής έλικας, η σύζευξη DNA-DNA και DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις βάσεων (von Zglinicki T. et al., 2001 και Halliwell B. and Aruoma O., 1991).

Το οξειδωτικό stress μπορεί να οριστεί ως η ανισορροπία μεταξύ των ενδοκυτταρικά παραγόμενων ROS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου, που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, γήρανση και καταστροφή του κυττάρου (Poljsak, 2000). Η "θεωρία των ελευθέρων ριζών" (free radical theory), διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Harman το 1956. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από υψηλές συγκεντρώσεις ROS ευθύνεται, στο μεγαλύτερο βαθμό, για το φαινότυπο της κυτταρικής γήρανσης (Toussaint E. et al., 2000). Οξειδωτικό στρες παρατηρείται και σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπου τα μακροφάγα παράγουν ROS και προκαλούν την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών, το φλεγμονώδη φαινότυπο των ιστών (Schreck R. and Baeuerle P., 1991) και οξειδωτικές αλλοιώσεις στους παρακείμενους ιστούς (Bertram C. and Hass R., 2008 και Bauerova K. and Bezek A., 1999).

Το οξειδωτικό στρες είναι ο πιο συχνός τρόπος επαγωγής SIPS *in vitro*. SIPS προκαλείται μετά από ποικίλες μη κυτταροτοξικές δόσεις οξειδωτικού στρες, π.χ. H_2O_2 (Toussaint O. et al., 2000).

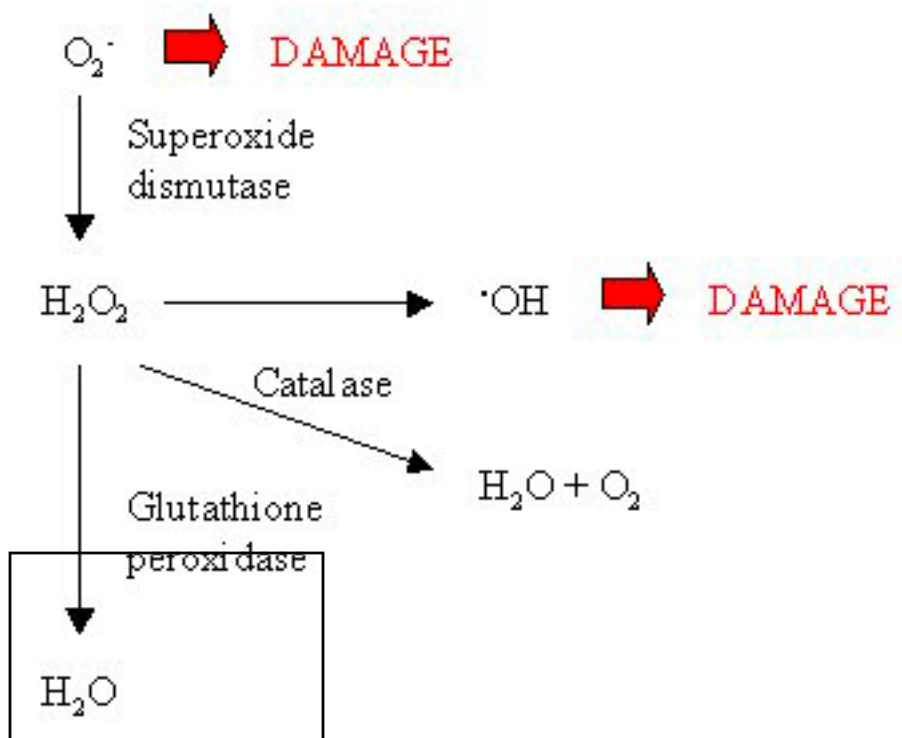
1.3.2 Παραγωγή ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου

Οι ROS παράγονται από το κύτταρο και ως παραπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού (Ames B. et al., 1993 και Wagner J. et al., 1992), ως επί το πλείστον, κατά την αερόβια αναπνοή των μιτοχονδρίων και την παραγωγή ATP (Chance B. et al., 1979). Η κύρια δραστική μορφή οξυγόνου που παράγεται κατά την παραγωγή ATP είναι το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2\cdot^-$), το οποίο μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης 2 (Superoxide dismutase 2, SOD2) μετατρέπεται σε H_2O_2 . Το H_2O_2 που παράγεται είτε διαχέεται στο κυτοσόλιο μέσω της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, είτε μετατρέπεται σε H_2O , μέσω των ενζύμων καταλάση και γλουταθειονική υπεροξειδάση (Glutathione peroxidase, GSH). Σε περίπτωση αυξημένης παραγωγής ROS ή

ανεπάρκειας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, προκύπτει συσσώρευση των $O_2^{\cdot-}$ ή παραγωγή OH^{\cdot} από το H_2O_2 , με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγηθεί σε γήρανση (Sena L. et al., 2012 και Murphy M., 2009).

1.3.3 Το αντιοξειδωτικό σύστημα έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου

Το κύτταρο έχει αναπτύξει διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, ώστε να προστατεύεται από τις οξειδωτικές βλάβες και να μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS (Sies H., 1991). Οι μηχανισμοί αυτοί αποτελούνται από ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα. Το ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα περιλαμβάνει τα ένζυμα καταλάση (Catalase, CAT) και υπεροξειδική δισμουτάση και το σύστημα της γλουταθειονικής υπεροξειδάσης, το βασικότερο



αντιοξειδωτικό σύστημα στα κύτταρα των θηλαστικών (Wang G. et al., 1998 και Spector A. et al., 1996) (Εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.3: Γραφική αναπαράσταση του ενζυμικού αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου.

Παράλληλα, το κύτταρο χρησιμοποιεί και πολλές μη ενζυμικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Τέτοιες είναι η βιταμίνη Α, η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη), το β-καροτένιο, οι πολυαμίνες, η μελατονίνη, η NADPH, η αδενοσίνη, οι πολυφαινόλες, τα

φλαβονοειδή. Τα μόρια αυτά μπορούν να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο από μία ρίζα ή να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο για το σχηματισμό σταθερότερων παραπροϊόντων, τα οποία δεν είναι επικίνδυνα για το κύτταρο (Γιαννακοπούλου Ε., 2009).

Τέλος, στην άμυνα του κυττάρου έναντι της συσσώρευσης ROS, εμπλέκονται και οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί του, με το πρωτεάσωμα να κατέχει τον κυρίαρχο ρόλο. Στο πρωτεάσωμα λαμβάνει χώρα η πρωτεόλυση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων. Πρωτεόλυση οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων γίνεται επίσης στα μιτοχόνδρια μέσω ειδικών πρωτεασών και στο κυτταρόπλασμα μέσω των λυσοσωμάτων και των καλπαϊνών (Ballmaier D. et al., 1997).

1.4 Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι μια ομάδα μικρού μοριακού βάρους γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών με πλειοτροπική, ρυθμιστική δράση σε πλήθος κυτταρικών τύπων που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού και στις επουλωτικές διεργασίες (Thomson J.A. et al., 1998). Η αρχική ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των μακροφάγων, τα οποία διαθέτουν την ιδιότητα να απελευθερώνουν μεσολαβητές της φλεγμονής, κυτοκίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας μήτρας. Η βασική λειτουργία των κυτοκινών είναι η σηματοδότηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που τις εκκρίνουν ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Έτσι, η παρουσία τους αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και της διατήρησης της ομοιοστασίας του.

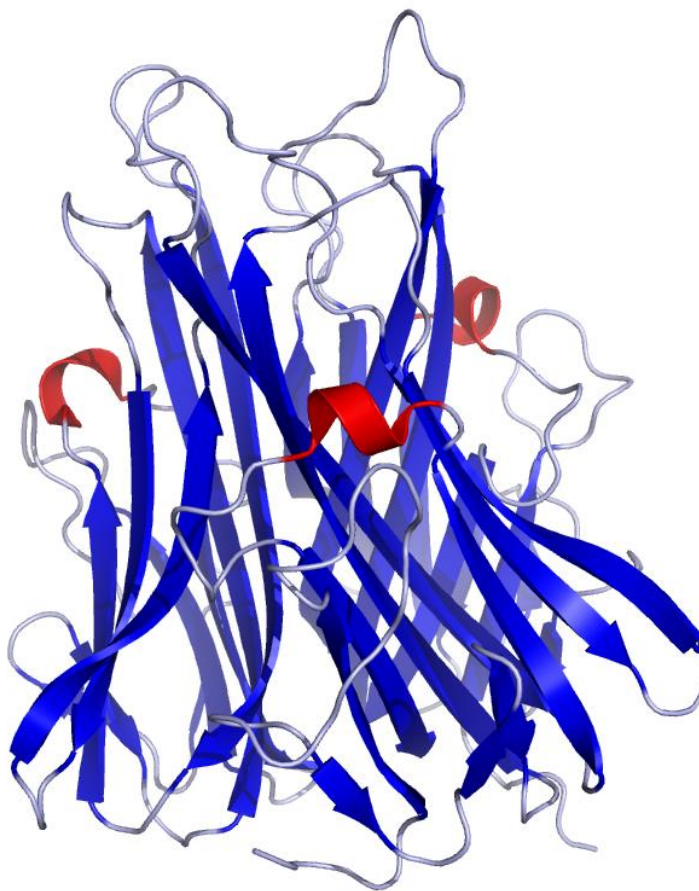
Η ομάδα των κυτοκινών περιλαμβάνει ιντερλευκίνες (IL-1 – 31), χημοκίνες, ιντερφερόνες (IFN-α, IFN-β και IFN-γ), λεμφοκίνες και παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNF-α και TNF-β).

Η δράση των κυτοκινών ρυθμίζεται με κατάλληλους αναστολείς και ανταγωνιστές, έτσι ώστε να διατηρούνται σε συγκεκριμένα επίπεδα (Dinarello C.A., 2000). Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των κυτοκινών, που με τη σειρά τους εντείνουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

1.4.1 Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) είναι σημαντικός διαμεσολαβητής της φλεγμονής. Η υπέρ-οικογένεια του TNF αποτελείται από δύο μέλη, τον TNF- α και τον TNF- β .

Ο TNF- α είναι μία κυτοκίνη που αναγνωρίστηκε αρχικά από τις κυτταροτοξικές του ιδιότητες και τη δυνατότητά του να αποτρέπει την ανάπτυξη των όγκων. Ο TNF- α παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, κυρίως από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, στα οποία δρα αυτοκρινώς. Επίσης παράγεται από τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες (NK), τα T-λεμφοκύτταρα και τα αστεροειδή κύτταρα. Αρχικά παράγεται ως ένα προπεπτίδιο 26 kDa, ενώ μέσω συγκεκριμένων μεταλλοπρωτεασών μετατρέπεται στη βιολογικά ενεργή του μορφή, η οποία αποτελείται από τρεις υπομονάδες και έχει μέγεθος 17 kDa (**Εικόνα 1.4**).



Εικόνα 1.4: Η κρυσταλλική δομή του TNF- α .

Ο TNF-α και άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παράγονται από τα κύτταρα που ενεργοποιούνται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες παίζουν ευεργετικό ρόλο στα πρώτα στάδια της επούλωσης των πληγών και στην επιδιόρθωση των ιστών. Οι δερματικοί ινοβλάστες παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στην επιδιόρθωση των ιστών λόγω της παραγωγής πρωτεϊνών την εξωκυττάριας μήτρας όπως κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, ιντεγκρίνες κ.α. Το περιβάλλον της φλεγμονώδους αντίδρασης επηρεάζει δυσμενώς τους ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ινοβλάστες και προκαλεί την πρόωρη γήρανσή τους. Σε αυτή τη διαδικασία φαίνεται να παίζει ρόλο και η παρουσία προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α, στο μικροπεριβάλλον της περιοχής της φλεγμονής (Mendez MV. et al., 1999).

Ινοβλάστες που απομονώνονται από φλεβικά έλκη έχει αποδειχθεί ότι έχουν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και είναι μεγαλύτεροι από τους φυσιολογικούς. Εμφανίζουν χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων, όπως μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης και διαφορετική μορφολογία. Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στο περιβάλλον του έλκους μπορεί να συσχετιστεί με την εξασθενημένη επούλωση στο σημείο αυτό (Mendez MV. et al., 1998).

1.4.2 Ο ρόλος των κυτοκινών στην επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης ανθρώπινων ινοβλαστών

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία επίδραση TNF-α ή IL-α σε ινοβλάστες μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων ROS, με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εμφανίζονται θετικά στη χρώση SA-β-Gal (από το 30% στο 54%) (Dumont P. et al., 2000). Η παροδική ενδοκυτταρική αύξηση των ROS από τον TNF-α και την IL-α μπορεί, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, να λειτουργήσει σηματοδοτικά (Emmendorffer A. et al., 1993 and Meier B. et al., 1993). Με αυτόν τον τρόπο οι κυτοκίνες θα μπορούσαν να οδηγήσουν τους ινοβλάστες σε πρόωρη γήρανση (Dumont P. et al., 2000).

Πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε κύτταρα που επώαστηκαν με TNF-α ή IL-α παρουσία του αντιοξειδωτικού N-ακετυλοκυστεΐνη επιβεβαίωσαν την ενδοκυτταρική αύξηση των ROS από τις συγκεκριμένες κυτοκίνες. Η N-ακετυλοκυστεΐνη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία επάγει το ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό δυναμικό, αυξάνοντας τη συγκέντρωση κυστεΐνης και γλουταθιόνης στα κύτταρα (Dumont P. et al., 2000).

Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Με βάση τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης επίδρασης του TNF-α σε δερματικούς ινοβλάστες, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε ένα γνωστό οξειδωτικό παράγοντα, το H₂O₂. Μελετήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση του TNF-α, οι πιθανές μεταβολές των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS υπό την παρουσία του και η πιθανότητα πρόκλησης πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στον παράγοντα αυτό. Τέλος, έγινε προσπάθεια μοριακού χαρακτηρισμού των πρόωρα γηρασμένων κυττάρων μετά από παρατεταμένη έκθεση σε H₂O₂ και TNF-α.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό και διττανθρακικό νάτριο (όλα από την εταιρεία Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Βόειος εμβρυϊκός ορός (fetal bovine serum, FBS) (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK)
- Διάλυμα θρυψίνης που παρασκευάζεται από 10 φορές συμπυκνωμένο διάλυμα (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) μετά από αραίωση και προσθήκη κιτρικού νατρίου σε συγκέντρωση 10 mM
- Πλαστικοί φυγοκεντρικοί σωλήνες και τρυβλία διαμέτρου 35 mm (Greiner Bio-one, Frankfurt, Germany)
- Φιάλες 75 cm² και τρυβλία διαμέτρου 10 cm (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA)
- Ανθρώπινος TNF- α (Human Tumor Necrosis Factor- α) (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων (Greiner, Bio-one, Frankfurt, Germany)
- Χρωστική MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (MERCK, Damstadt, Germany)
- Ισοπροπανόλη (MERCK, Damstadt, Germany)
- Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- DCFH-DA (2',7'-dichlorfluorescein-diacetate) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Ερυθροποιητίνη (Remedor Biomed, Nazareth Illit, Israel)
- Διάλυμα τριζόλης (Trizol) (Invitrogen, Paisley, UK)
- Διάλυμα φορμαλδεΰδης 36.5% (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Υπόστρωμα X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Αντίσωμα έναντι της βρωμοδεοξουριδίνης (Roche, Basel, Switzerland)

- Διάλυμα ζελατίνης (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Χρωστική DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Κιτ αντιδραστηρίων για τη σύνθεση cDNA PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Tokyo, Japan)
- Κιτ αντιδραστηρίων για PCR πραγματικού χρόνου KAPA SYBR universal fast master mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA)

2.2 Κυτταρικά στελέχη

Για τα πειράματα της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές δερματικών ινοβλαστών: 1. Το εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος δερματικών ινοβλαστών ακροποσθίου από νεογνό AG01523c (Corriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). 2. Το στέλεχος δερματικών ινοβλαστών από άτομο 22 ετών (DSF22) από πρωτογενή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

2.3 Όργανα

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8 (Bioair Instruments, Siziano, Italy)
- Δεξαμενές υγρού αζώτου Dewar LS750 (Lab Systems, Taylor Wharton, USA)
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ (Thermo Forma Series II, Ohio, USA)
- Σωματιδιακός αναλυτής Beckman Coulter Counter (Wild Leitz, Wetzlar, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο Improved Neubauer (Bright Line – Hausser Scientific, Horsham, PA, USA)
- Αντίστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (Wild Leitz, Wetzlar, Germany)

- Μετρητής απορρόφησης και φθορισμού μικροπλακών Infinite® M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)
- Μικροσκόπιο φθορισμού (AxioPlan 2, Carl Zeiss, Germany)
- Μικροφυγόκεντρος Hermle Z233 M-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Sanyo Harrier 18/80R (MSE Ltd., London, UK)
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE)
- Θερμικός κυκλοποιητής MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

2.4 Μέθοδοι

2.4.1 Αποστείρωση

Οι μέθοδοι αποστείρωσης, για την αποφυγή μολύνσεων, που εφαρμόστηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας, ήταν οι εξής:

- Οι πιπέτες αναρρόφησης pasteur, οι γυάλινες πιπέτες και τα μεταλλικά σκεύη αποστειρώνονταν σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης σε θερμοκρασία 180°C για 90 min.
- Τα γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα και τα πλαστικά δοχεία αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121°C για 30 min.
- Το νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού των κυτταροκαλλιιεργειών και τα διάφορα θερμοάντοχα διαλύματα αποστειρώνονταν σε γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121°C για 30 min.

Τα υπόλοιπα σκεύη και δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μιας χρήσης.

2.4.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι καλλιέργειες των ινοβλαστών διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη (2 mM), NaHCO₃ (3,75 mg/L), πυροσταφυλικό νάτριο (110,04 mg/L), πενικιλίνη

(50,000 IU/L) και στρεπτομυκίνη (50,000 IU/L) σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37°C. Το θρεπτικό υλικό ήταν εμπλουτισμένο με βόειο εμβρυϊκό ορό (FBS) 10% (v/v). Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές φιάλες επιφάνειας 75 cm² και πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 10 cm.

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονταν μέχρι να καλύψουν το 100% της επιφάνειας του πυθμένα της φιάλης ή του τρυβλίου, σχηματίζοντας ένα μονόστιβο ταπήτιο και όταν γίνονταν πλήρεις (τα κύτταρα κάλυπταν το 100% της επιφάνειας) τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν ως εξής: Αφού είχε αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση, στη φιάλη/τρυβλίο γινόταν προσθήκη 3 ml διαλύματος θρυψίνης-κιτρικού νατρίου (θρυψίνη 0,25% (w/v), κιτρικό νάτριο 10 mM, NaCl 110 mM, pH 7,2), ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού. Ακολουθούσε αναρρόφηση της θρυψίνης και προσθήκη 4 ml από το διάλυμα θρυψίνης-κιτρικού νατρίου, για να καλυφθεί πλήρως το ταπήτιο των κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονταν για λίγα λεπτά στους 37°C, μέχρι να διαπιστωθούν μικροσκοπικά μορφολογικές αλλαγές. Όταν τα κύτταρα συρρικνώνονταν ελαφρά και το περίγραμμα της πλασματικής τους μεμβράνης φαινόταν εντονότερα ξεκινούσε η αποκόλλησή τους από τον πυθμένα της φιάλης/τρυβλίου. Σε αυτό το σημείο απομακρυνόταν η περίσσεια της θρυψίνης. Η αποκόλληση των κυττάρων ολοκληρωνόταν μηχανικά και στη συνέχεια αυτά επαναιωρούνταν σε 8 ml DMEM εμπλουτισμένα με 10% FBS με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων ισομοιραζόταν σε νέες φιάλες/τρυβλία, με λόγο κατανομής (split ratio) 1:2. Ακολουθούσε προσθήκη επιπλέον θρεπτικού υλικού (6 ml), εμπλουτισμένου με 10% FBS, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της φιάλης/τρυβλίου και τα κύτταρα αναπτύσσονταν μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

2.4.3 Αποθήκευση κυττάρων – Αρχείο γενεών

Τα διάφορα κυτταρικά στελέχη φυλάσσονται στους -196°C για μεγάλο χρονικό διάστημα και αφού αποψυχθούν ανακαλλιεργούνται και διατηρούν στο ακέραιο τις ιδιότητές τους (Hayflick and Moorhead, 1961). Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν τον αριθμό αναδιπλασισμών που θα συμπλήρωναν, αν δεν μεσολαβούσε η ψύξη/απόψυξη (Herrling et al., 2006).

Η διαδικασία ψύξης των κυττάρων γινόταν ως εξής: Κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, αποκολλώνταν από τον πυθμένα. Σημειώνεται όμως, ότι δεν αφήνονταν καθόλου ίχνη θρυψίνης κατά την επώαση στους 37°C, για να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων κατά την απόψυξη. Αφού τα κύτταρα αποκολλώνταν από τον πυθμένα, επαναιωρούνταν σε 1,5 ml DMEM εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS και 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ο ρόλος του DMSO είναι η προστασία των κυττάρων από τις βλάβες που προκαλεί η ψύξη/απόψυξη, καθώς η μείωση του σημείου πήξης που προκαλεί εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων (Dilley et al., 2003; Adams, 1980). Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφερόταν σε αποστειρωμένη πλαστική αμπούλα η οποία έκλεινε ερμητικά. Μια άλλη σημαντική παράμετρος της διαδικασίας αυτής είναι η ταχύτητα ψύξης/απόψυξης.

Προκειμένου τα κύτταρα να προστατευτούν από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, πρέπει η ψύξη να είναι σταδιακή: 1 h στους -20°C, η οποία ακολουθείται από 24 h στους -80°C και τέλος βύθιση της αμπούλας σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Η απόψυξη πρέπει να είναι ταχεία ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων. Συγκεκριμένα, η αμπούλα με τα κύτταρα μεταφερόταν απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C. Μετά την απόψυξη της αμπούλας, γινόταν προσθήκη του περιεχόμενου της σε DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10% (v/v). Την επόμενη μέρα γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας, το οποίο περιείχε DMSO, σε νέο.

2.4.4 Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων

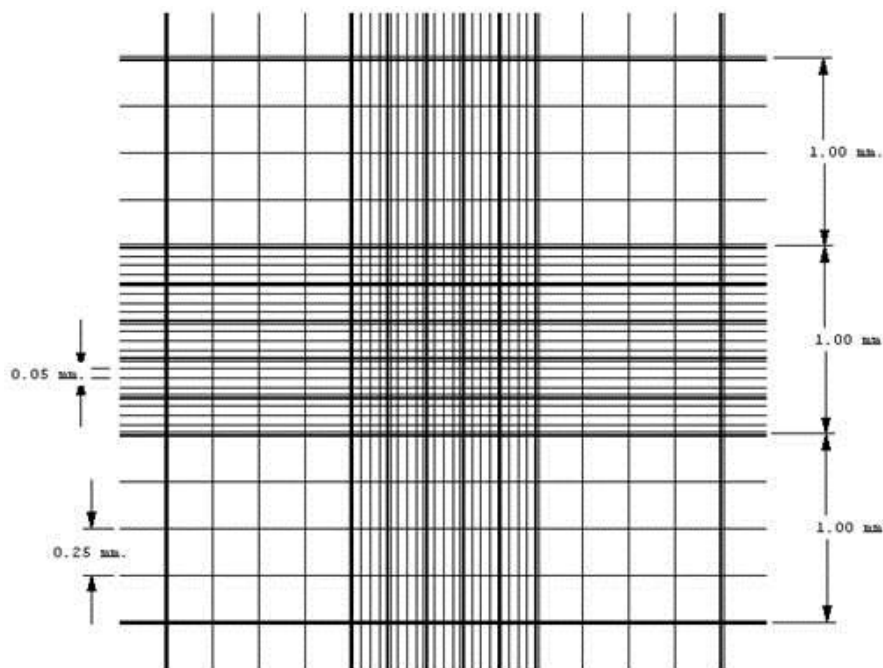
Η μέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων σε εναιώρημα έγινε με τη χρήση α. αιμοκυτταρόμετρου και β. σωματιδιακού αναλυτή Coulter Counter.

Αρχικά το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας απομακρυνόταν με αναρρόφηση. Ακολουθούσε αποκόλληση των κυττάρων με το διάλυμα θρυψίνης-κιτρικού νατρίου (σύμφωνα με τα αρχικά βήματα της ανακαλλιέργειας κυττάρων) και επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10%.

α. Μέτρηση των κυττάρων με τη χρήση Coulter Counter: Συγκεκριμένος όγκος εναιωρήματος των κυττάρων (0,5 ml) διαλυόταν σε 12 ml ισότονου αλατούχου διαλύματος IsoFlow Sheath Fluid. Το όργανο μετρά τον αριθμό σωματιδίων ορισμένου μεγέθους που περιέχονται στο

εναιώρημα, επιτρέποντας μας να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων της κυτταροκαλλιέργειας.

- β. Μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο: Τα κύτταρα παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο και μετρούνταν από τα 4 περιφερειακά από τα 9 συνολικά τετράγωνα (θέσεις μέτρησης) του αιμοκυτταρόμετρου (**Εικόνα 2.1**). Ο όγκος του διαλύματος στο οποίο επαναιωρούνταν τα κύτταρα ρυθμιζόταν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml (στο εναιώρημα) να ήταν στα όρια ανίχνευσης του αιμοκυτταρόμετρου, δηλαδή $1-10 \times 10^5$ κύτταρα ανά ml ή 10-100 κύτταρα σε κάθε τετράγωνο (Adams, 1980).



Εικόνα 2.1:

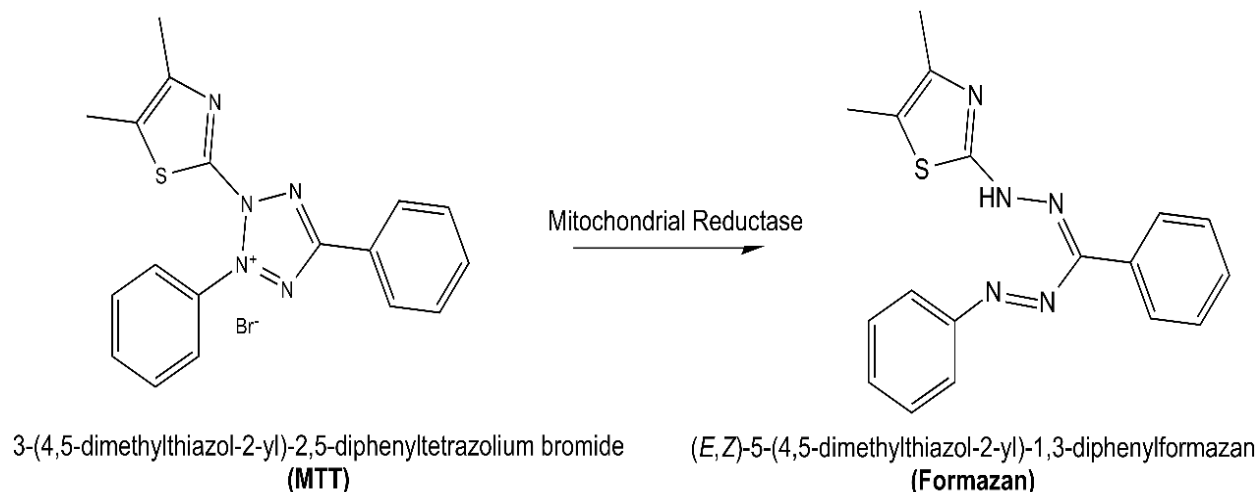
Απεικόνιση μιας από των δύο περιοχών μέτρησης του αιμοκυτταρόμετρου. Η κάθε περιοχή αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα ίσου μεγέθους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση με τον σωματιδιακό αναλυτή είναι ένας γρήγορος τρόπος μέτρησης κυττάρων και αρκετά ακριβής, όμως απαιτεί καλά επαναιωρούμενο κυτταρικό πληθυσμό, απελευθερωμένο από υπολείμματα, των οποίων η ύπαρξη αλλοιώνει τη μέτρηση του πραγματικού αριθμού των κυττάρων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου Neubauer είναι ότι με αυτή μπορούν να διακριθούν τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα ή από άλλα σωματίδια που βρίσκονται στο διάλυμα.

2.4.5 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT

Το MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας, το οποίο όταν προστεθεί σε μέσο από το οποίο απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης (phenol red) δίνει ένα διάλυμα κίτρινου χρώματος.

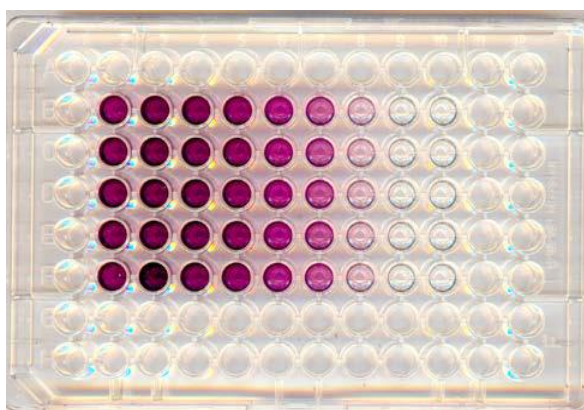
Το MTT μετατρέπεται στο αδιάλυτο στο νερό μωβ φορμαζάνιο στο εσωτερικό των ζωντανών μόνο κυττάρων, λόγω της διάσπασης ενός δακτυλίου του τετραζολίου, από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες (**Εικόνα 2.2**). Η διάσπαση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζανίου, οι οποίοι είναι ορατοί ακόμα και μακροσκοπικά. Το αδιάλυτο φορμαζάνιο διαλυτοποιείται χρησιμοποιώντας κάποιον οργανικό διαλύτη, όπως ισοπροπανόλη και μετράται φασματοφωτομετρικά.



Εικόνα 2.2: Απεικόνιση της μοριακής δομής του MTT και του φορμαζανίου.

Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Με τον τρόπο λοιπόν αυτό μπορούμε να προσδιορίσουμε την επίδραση κάποιου παράγοντα στη βιωσιμότητα και το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και να αποτιμήσουμε την κυτταροστατικότητα ή την κυτταροτοξικότητά του.

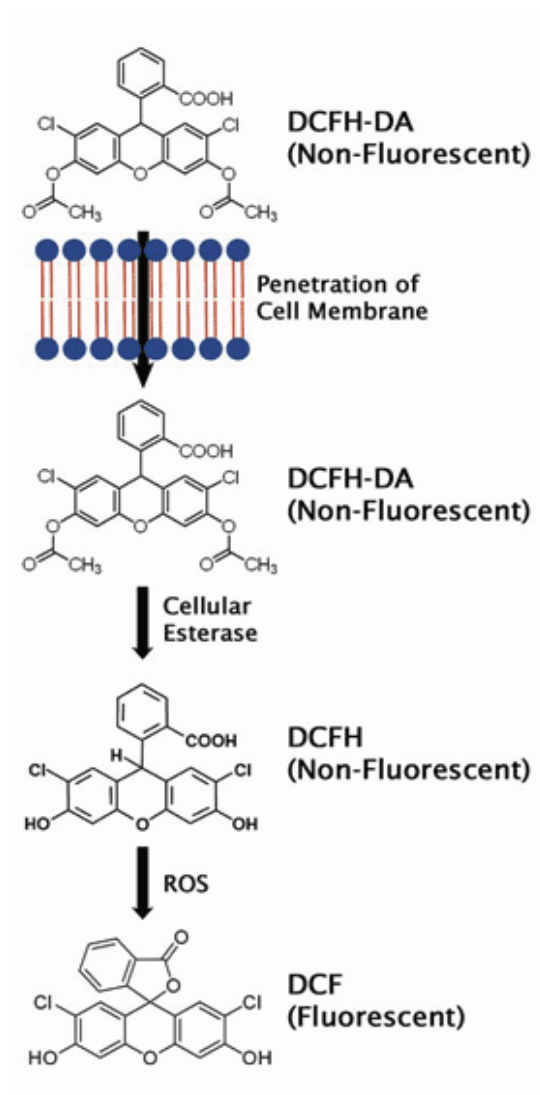
Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής: Την πρώτη ημέρα γινόταν η επίστρωση 100 μ l εναιωρήματος κυττάρων, σε πλήρες θρεπτικό, σε πλάκα 96 θέσεων. Τη δεύτερη ημέρα αλλάζόταν το αρχικό υλικό σε καινούργιο, παρουσία ορού, μαζί με τους υπό έλεγχο παράγοντες στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επωάζονταν στη συνέχεια στους 37°C για 3 ημέρες. Την τελευταία ημέρα γινόταν αφαίρεση του υλικού και προσθήκη του MTT διαλυμένου σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και ερυθρό της φαινόλης, σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Μετά από 4 h απομακρυνόταν με αναρρόφηση το υλικό, ακολουθούσε προσθήκη ισοπροπανόλης (100 μ l ανά θέση) και ανάδευση της πλάκας για περίπου 5 min, οπότε και γινόταν ορατό το φορμαζάνιο, που είχε σχηματιστεί από τα ζωντανά κύτταρα, εφόσον υπήρχαν (**Εικόνα 2.3**). Τέλος, γινόταν φωτομέτρηση της πλάκας, με μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και μήκος κύματος αναφοράς 630 nm.



Εικόνα 2.3: Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, μετά από διαλυτοποίηση του φορμαζανίου σε ισοπροπανόλη και ανάδευση (Pratsinis et al., 2013).

2.4.6 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω της δοκιμασίας DCFH-DA

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα βασικά επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου χρησιμοποιήθηκε η ένωση DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate). Η ένωση αυτή έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τη μεμβράνη των κυττάρων λόγω του λιπόφιλου προθέματος DA. Εκεί αποακετυλιώνεται από ειδικές κυτταροπλασματικές εστεράσες και αδυνατεί πλέον να εξέλθει από τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Στη συνέχεια οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου του κυτταροπλάσματος και παίρνει μια συγκεκριμένη δομή, η οποία φθορίζει (**Εικόνα 2.4**). Έτσι, προσδιορίζοντας φασματοφωτομετρικά τον φθορισμό της ένωσης, εκτιμώνται ποσοτικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS (Fischer et al., 2002).



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της ένωση DCFH-DA, η οποία είναι μη φθορίζουσα, στη φθορίζουσα DCF μέσω οξειδωσης από τις ενδοκυτταρικές δραστικές μορφές οξυγόνου.

Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται πλάκες 96 θέσεων με μαύρα τοιχώματα, έτσι ώστε κάθε θέση να μην επηρεάζεται από το φθορισμό των διπλανών θέσεων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Την πρώτη ημέρα τα κύτταρα επιστρώνονταν στην πλάκα σε 100 μl θρεπτικού υλικού ανά θέση εμπλουτισμένο με FBS 10%. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν την επιφάνεια της θέσης, το θρεπτικό υλικό απομακρυνόταν με αναρρόφηση και γινόταν προσθήκη 100 μl διαλύματος DCFH-DA συγκέντρωσης 10 μM ανά θέση. Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C για 90 min. Στη συνέχεια, γινόταν αλλαγή του υλικού (με την ένωση DCFH-DA) σε υλικό

με τους προς μελέτη παράγοντες σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (τελικός όγκος ανά θέση είναι κι εδώ τα 100 μ l). Στη συνέχεια προσδιοριζόταν ποσοτικά ο φθορισμός, άρα και τα σχετικά επίπεδα ROS των κυττάρων, με μήκος κύματος απορρόφησης 485 nm και αναφοράς 520 nm. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονταν στους 37°C, και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS προσδιορίζονταν τις επιθυμητές χρονικές στιγμές, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος.

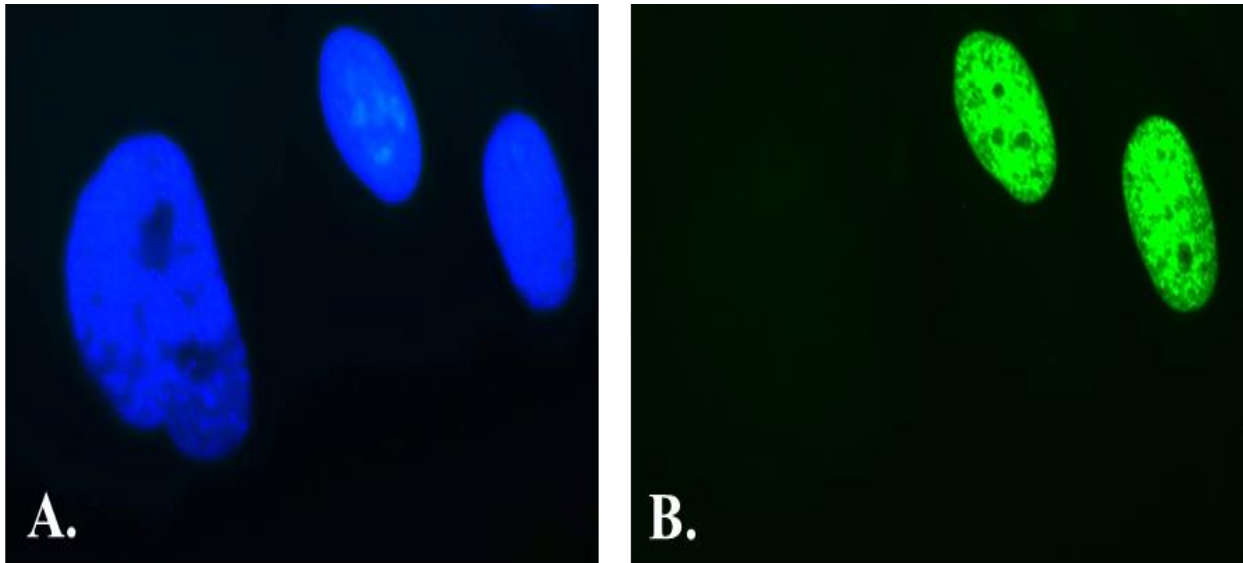
2.4.7 Ακτινοβόληση κυττάρων από πηγή γ-ακτινοβολίας

Καλλιέργειες της κάθε κυτταρικής σειράς επιστρώνονταν σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm και αφήνονταν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό παρουσία ορού, μέχρι να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου. Κατόπιν ακτινοβολούνταν με μη κυτταροτοξικές δόσεις ακτινοβολίας γ από πηγή Κοβαλτίου (Gamma Chamber 4000 A, Isotope Group, Bhadha Atomic Research Company, Trombay, Bombay, India), με ρυθμό ακτινοβόλησης 3 Gy/min. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν. Δύο ημέρες πριν από την συλλογή των δειγμάτων για απομόνωση ολικού RNA γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού των κυττάρων παρουσία ορού.

2.4.8 Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU)

Η σύνθεση του DNA μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά μέσω της ενσωμάτωσης της BrdU κατά τη σύνθεση νέου DNA στους πυρήνες των κυττάρων τα οποία είναι ικανά για πολλαπλασιασμό. Η BrdU αποτελεί ανάλογο της θυμιδίνης και την αντικαθιστά στην σύνθεση του νέου κλώνου της νεοσυντιθέμενης διπλής έλικας του DNA, κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στη μέθοδο που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της BrdU συζευγμένο με το φθοροφόρο ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), με αποτέλεσμα οι πυρήνες των κυττάρων που την ενσωματώνουν να επισημαίνονται με πράσινο χρώμα και να μπορούν να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να εκτιμηθεί το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων του συνολικού πληθυσμού.

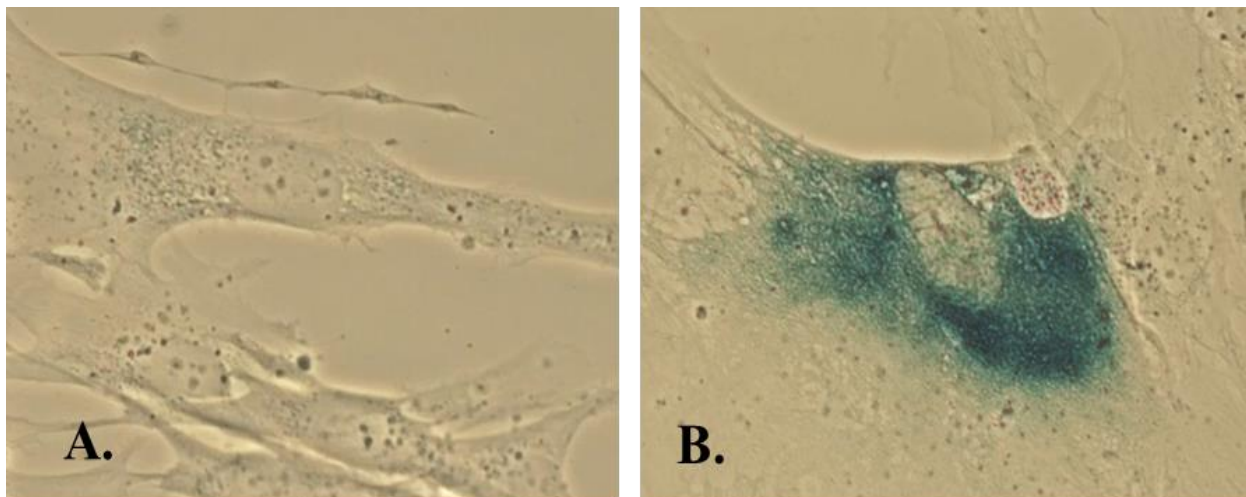
Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής: Αρχικά αποστειρωμένες καλυπτρίδες τοποθετούνταν σε πλάκα 6 θέσεων και σε κάθε θέση επιστρώνονταν 2 ml εναιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10%. Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε πυκνότητα τέτοια, ώστε να μην προκύψουν πυκνές καλλιέργειες στο τέλος του πειράματος. Ύστερα από 48 h γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού παρουσία FBS 10% και BrdU σε συγκέντρωση 50 μ M. Τα κύτταρα επωάζονταν για 48 h. Ακολουθούσε η μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% (v/v) φορμαλδεΐδη σε PBS για 10 min. Στο στάδιο αυτό η πλάκα μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C μέχρι την επεξεργασία της. Στη συνέχεια της διαδικασίας γίνονταν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με 2 ml PBS/θέση για 10 min η κάθε μία και επώαση με διάλυμα 0,2% (v/v) Triton X-100 (2 ml/θέση) για 10 min. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Έπειτα γίνονταν 2 ακόμα εκπλύσεις με 2 ml PBS/θέση και για τα επόμενα 30 min τα κύτταρα επωάζονταν με 2 ml/θέση 2 N HCl σε PBS. Έτσι επιτυγχάνεται η διάνοιξη της διπλής έλικας του DNA. Αφού απομακρυνόταν το διάλυμα HCl, τα κύτταρα επωάζονταν 3 φορές με διάλυμα 0,5% ζελατίνης σε PBS (από 10 min η κάθε επώαση και 2 ml/θέση). Η ζελατίνη χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος έναντι της BrdU. Τα κύτταρα επωάζονταν για 16 h με το ειδικό αντίσωμα έναντι της BrdU, το οποίο αραιωνόταν 1:25 σε διάλυμα 0,5% ζελατίνης (40 μ l διαλύματος/καλυπτρίδα θέσης) στους 4°C. Την επόμενη ημέρα γίνονταν 2 επώσεις με 2 ml/θέση 0,5% ζελατίνη για 10 min η κάθε μία και ύστερα 2 εκπλύσεις με 2 ml/θέση PBS για 10 min η κάθε μία. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονταν για 20 min στο σκοτάδι με διάλυμα DAPI σε συγκέντρωση 5 μ g/ml σε θερμοκρασία δωματίου (40 μ l διαλύματος/καλυπτρίδα θέσης). Τέλος πραγματοποιούνταν 2 ακόμα εκπλύσεις με 2 ml/θέση PBS και οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πάνω σε μια σταγόνα διαλύματος 90% γλυκερόλης με φαινυλενδιαμίνη για την προστασία του δείγματος. Οι καλυπτρίδες στεγανοποιούνταν και παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Έτσι, προσδιοριζόταν ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, τα οποία ενσωμάτωσαν την BrdU (πράσινοι πυρήνες), προς τον αριθμό των συνολικών κυττάρων που επισημάνθηκαν με DAPI (μπλε πυρήνες) (**Εικόνα 2.5**).



Εικόνα 2.5: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού. Η φωτογραφία A παρουσιάζει πυρήνες που επισημάνθηκαν με DAPI (μπλε πυρήνες) και η φωτογραφία B τους αντίστοιχους που ενσωμάτωσαν την BrdU (πράσινοι πυρήνες).

2.4.9 Επισημάνση κυττάρων με τη χαρακτηριστική για τα γηρασμένα κύτταρα χρώση senescence associated beta-galactosidase (SA-β-Gal)

Τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα έχουν ένα πεπερασμένο εύρος ζωής στις *in vitro* καλλιέργειες και επιτελούν έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, μετά τον οποίο ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται. Γηρασμένοι ανθρώπινοι ινοβλάστες εφράζουν β-γαλακτοσιδάση, η οποία είναι ανιχνεύσιμη μέσω της υδρόλυσης του υποστρώματος X-Gal σε pH 6,0. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται ένα μπλε προϊόν, σε μεγάλη έκταση και ένταση στο κυτταρόπλασμα των γηρασμένων κυττάρων (**Εικόνα 2.6**). Έτσι, η χρώση της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταρικής γήρανσης και βασίζεται στο αυξημένο λυσοσωματικό περιεχόμενο των γηρασμένων κυττάρων (Dimri et al., 1995).



Εικόνα 2.6: Στην πρώτη φωτογραφία (A) απεικονίζονται νεαροί ινοβλάστες. Τα κύτταρα έχουν ατρακτοειδή μορφή. Στην δεύτερη φωτογραφία (B) παρουσιάζονται γηρασμένοι ινοβλάστες. Τα κύτταρα έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, πεπλατυσμένη μορφολογία και είναι θετικά στη χρώση SA-β-Gal (μπλε περιοχές), η οποία αποτελεί δείκτη της κυτταρικής γήρανσης.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλάκα 6 θέσεων τοποθετούνταν αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Σε καθέ θέση επιστρώνονταν 2 ml εναιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10%, σε πυκνότητα τέτοια, ώστε να μην προκύψουν πυκνές καλλιέργειες στο τέλος του πειράματος. Τα κύτταρα επωάζονταν για 48 h ή και περισσότερες, αρκεί οι καλλιέργειες κάθε καλυπτρίδας να παραμένουν διάσπαρτες και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% (v/v) σε PBS για 3-5 min. Έπειτα γινόταν μία έκπλυση με 2 ml/θέση διαλύματος PBS και τα κύτταρα επωάζονταν για 24-48 h με το διάλυμα χρώσης SA-β-Gal: 1 mg/ml X-Gal, 40 mM κιτρικό οξύ/φωσφορικό νάτριο (pH 6,0), 5 mM σιδηροκυανιούχο κάλιο, 5 mM σιδηρικούανιούχο κάλιο, 150 mM χλωριούχο νάτριο, 2 mM χλωριούχο μαγνήσιο, στους 37°C και απουσία CO₂. Τέλος, το διάλυμα χρώσης απομακρυνόταν με αναρρόφηση και η αντίδραση σταματούσε με την προσθήκη διαλύματος PBS (2 ml/θέση). Τα κύτταρα που ήταν θετικά στη χρώση SA-β-Gal παρατηρούνταν στο οπτικό μικροσκόπιο και έτσι γινόταν η εκτίμηση του ποσοστού των γηρασμένων κυττάρων της καλλιέργειας.

2.4.10 Απομόνωση ολικού RNA από δερματικούς ινοβλάστες

Το ολικό RNA απομονωνόταν από κύτταρα τα οποία αναπτύσσονταν σε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm, σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS 10%, μέχρι να καλύψουν περίπου το 70% της επιφάνειας του τρυβλίου. Δύο ημέρες πριν τη διαδικασία απομόνωσης γινόταν αλλαγή του θρεπτικού τους υλικού παρουσία ορού.

Η πειραματική διαδικασία ήταν η εξής: Αρχικά με αναρρόφηση απομακρυνόταν πλήρως από τα κύτταρα το θρεπτικό υλικό και γινόταν προσθήκη 800 μl διαλύματος Trizol. Τα κύτταρα συλλέγονταν γρήγορα με απόξυση και μεταφέρονταν σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες. Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα μπορούν να φυλαχθούν στους -80°C μέχρι την επεξεργασία τους. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 160 μl χλωροφορμίου και μετά από ανακίνηση (περίπου 15 sec) τα δείγματα αφήνονταν για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 12000 g για 15 min σε θερμοκρασία 4°C. Το δείγμα έτσι διαχωριζόταν σε τρεις διακριτές φάσεις (η υδατική περιέχει το RNA). Η υδατική φάση μεταφερόταν προσεκτικά σε νέο eppendorf. Ύστερα γινόταν προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA στους -20°C για 16 h. Την επόμενη ημέρα τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στα 12000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρυνόταν και γινόταν προσθήκη 800 μl 75% αιθανόλης. Ακολουθούσε ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5 min σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα όλο το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα δείγματα αφήνονταν για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να απομακρυνθούν τα ίχνη της αιθανόλης. Το ίζημα επαναδιαλύοταν σε 50 μl νερού ελεύθερο RNασών (RNase free water). Η συγκέντρωση και ποιότητα του RNA προσδιοριζόταν φασματοφωτομετρικά με το φασματοφωτόμετρο Nanodrop.

2.4.11 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA γινόταν από 500 ng RNA σε μια αντίδραση 10 μl με τη χρήση του kit PrimeScript RT Reagent Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε ένα διάλυμα με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και έναν εκκινητή oligodT, την κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος RNA

μέχρι τα 500 ng και H₂O χωρίς RNάσες. Ύστερα από καλή ανάδευση, ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 30 min και μετά στους 85°C για 5 sec, ώστε το ένζυμο να απενεργοποιηθεί.

2.4.12 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Τα πειράματα της ποσοτικής PCR γίνονταν με τη χρήση 100 φορές αραιωμένων δειγμάτων από τα cDNAs που προέκυπταν από το προηγούμενο στάδιο. Η πειραματική διαδικασία γινόταν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit KAPA SYBR universal fast master mix της KAPA Biosystems: Σε μια αντίδραση τελικού όγκου 20 μl περιέχονταν τα παρακάτω: το μίγμα με την DNA πολυμεράση, το φθοροφόρο SYBR Green, το MgCl₂ και τα dNTPs, οι δύο εκκινητές (forward και reverse), σχεδιασμένοι για την ενίσχυση του εκάστοτε υπό έλεγχο γονιδίου σε τελική συγκέντρωση 100 nM ο καθένας, το φθοροφόρο αναφοράς (Rox), το cDNA και H₂O χωρίς ίχνη RNάσης. Η PCR πραγματοποιούνταν με τις ακόλουθες συνθήκες:

95 °C : 3 min	}	40-50 κύκλοι
95 °C : 3 sec		
60 °C : 20 sec		
72 °C : 10 sec		

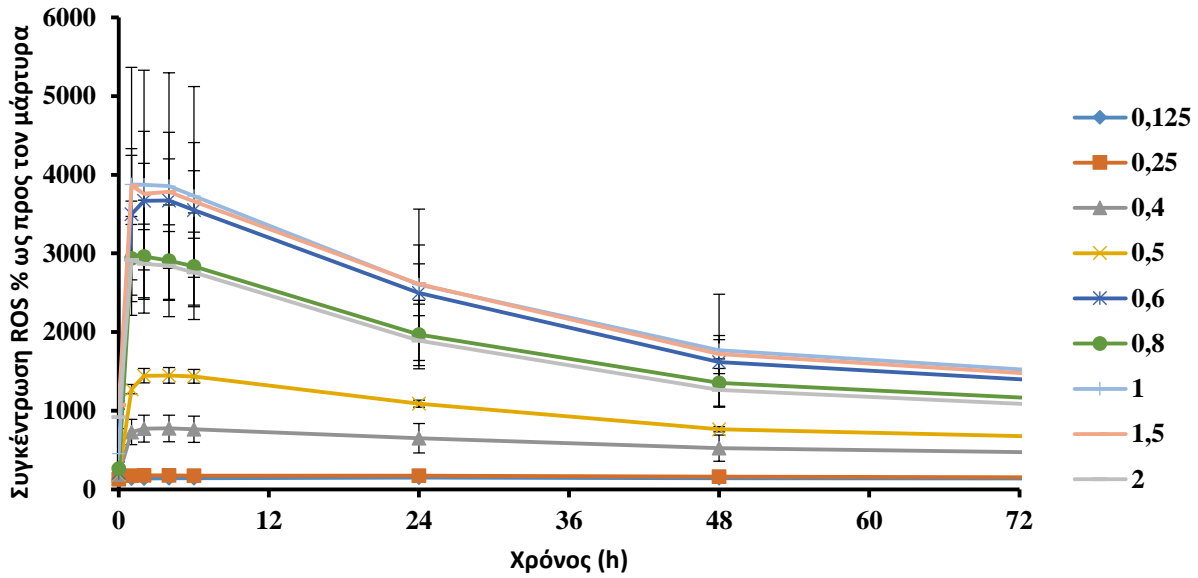
3. Αποτελέσματα

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της παροδικής έκθεσης δύο κυτταρικών σειρών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών στον TNF- α και πιο συγκεκριμένα η επίδραση του παράγοντα στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS και στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ως θετικός μάρτυρας στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο γνωστός οξειδωτικός παράγοντας H₂O₂. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η πιθανότητα επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις των κυττάρων σε υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις TNF- α . Το H₂O₂ χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση ως θετικός μάρτυρας, καθώς είναι γνωστή η επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης από το οξειδωτικό στρες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Τέλος, έγινε μοριακός χαρακτηρισμός των πρόωρα γηρασμένων κυττάρων με έλεγχο της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών κυτταρικής γήρανσης.

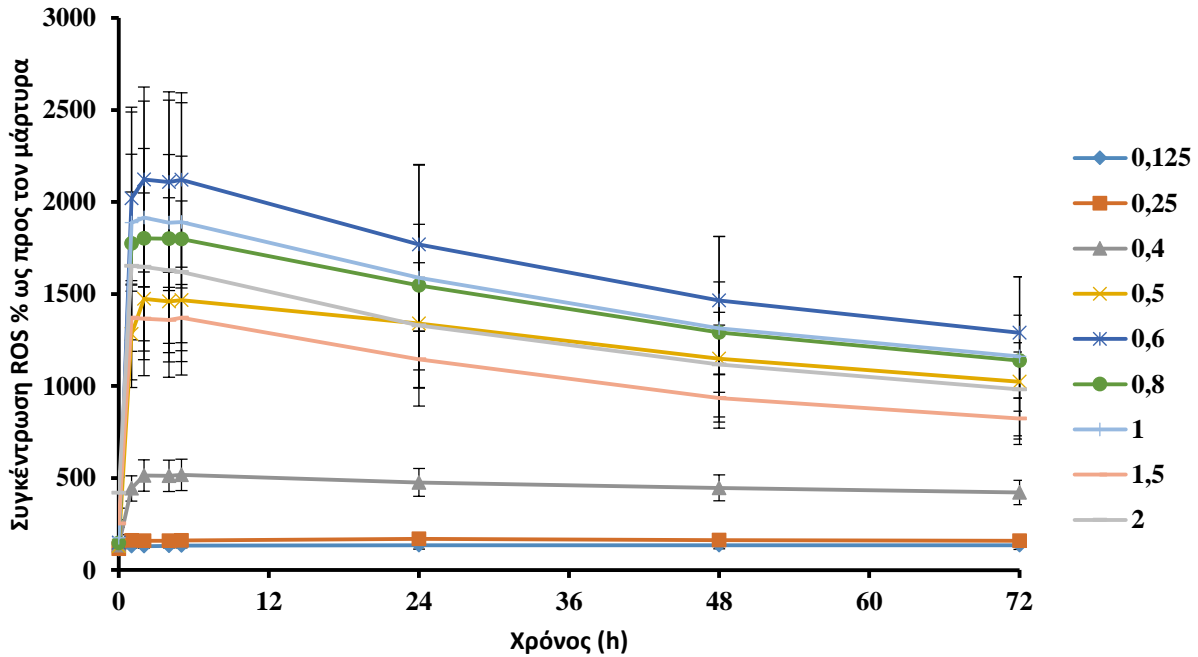
3.1 Επίδραση του TNF- α στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS και τη βιωσιμότητα ανθρώπινων ινοβλαστών

3.1.1 Μελέτη επίδρασης του οξειδωτικού στρες στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS

Η εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές μετά από την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων H₂O₂ έγινε με τη δοκιμασία DCFH-DA (Σχήματα 3.1 και 3.2).



Σχήμα 3.1: Εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 (mM) σε κύτταρα AG01523c. Εδώ παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τα 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με παρόμοια αποτελέσματα.

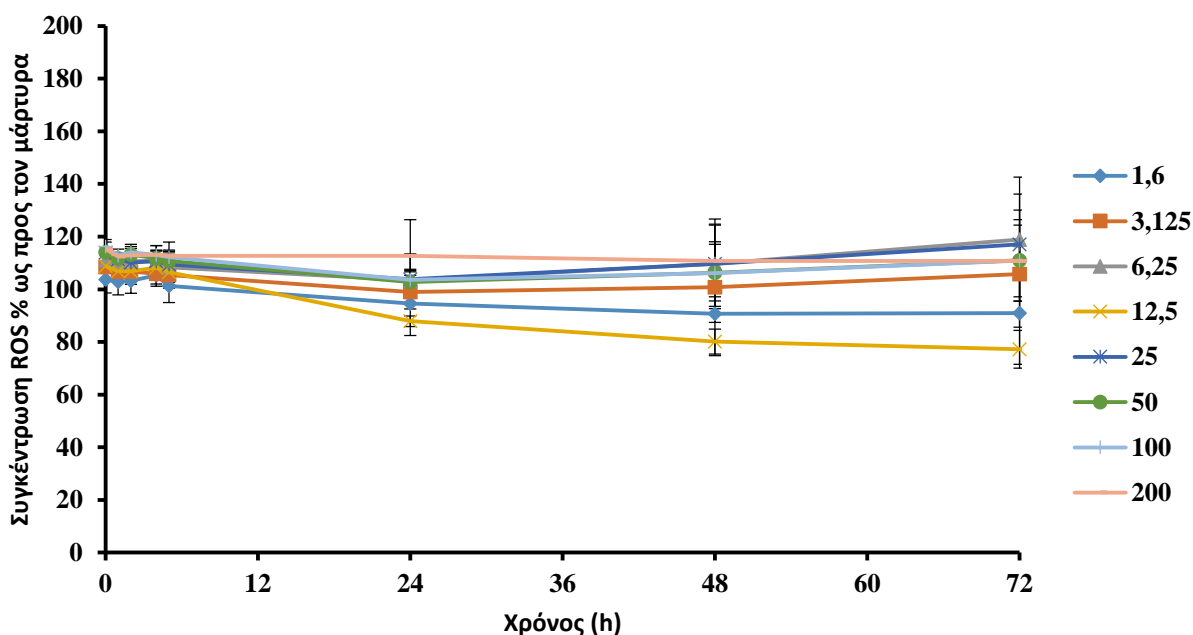


Σχήμα 3.2: Εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 (mM) σε κύτταρα DSF22. Εδώ παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

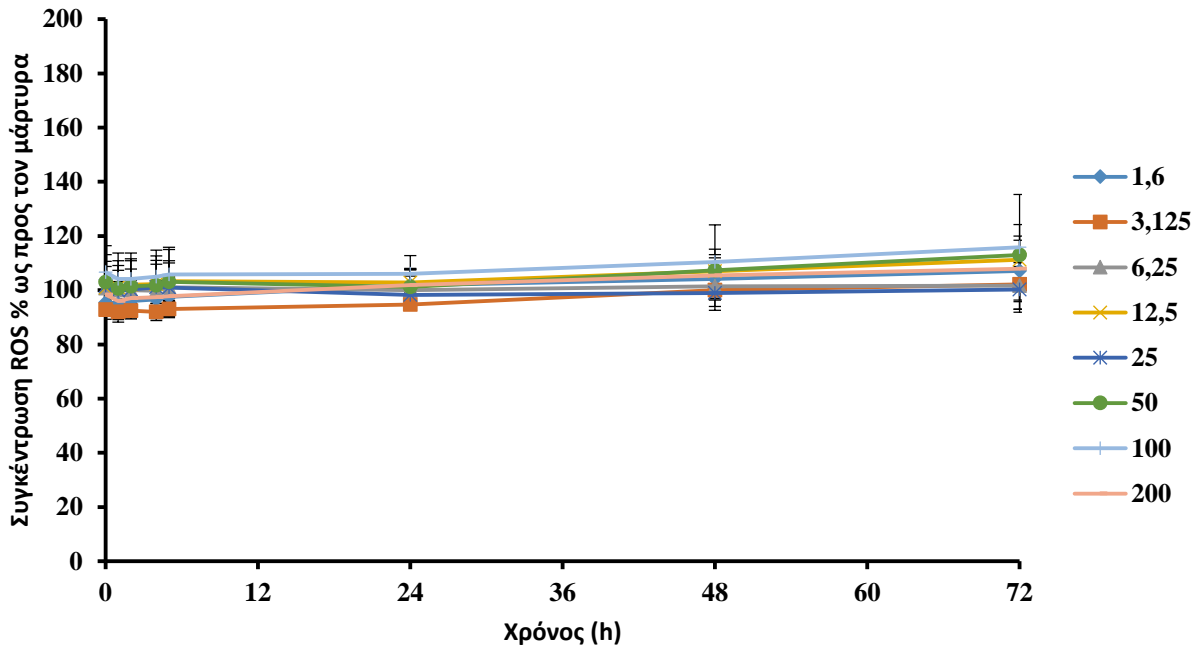
Το H₂O₂ φαίνεται να προκαλεί άμεση και έντονη αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS από τις πρώτες ώρες επώασης, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS τείνουν να πλησιάσουν τα βασικά επίπεδα μετά από 48 h έκθεσης.

3.1.2 Μελέτη της επίδρασης του TNF-α στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS

Η δράση του TNF-α στις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν μελετήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS έγινε με τη δοκιμασία DCFH-DA (Σχήματα 3.3 και 3.4).



Σχήμα 3.3: Εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του TNF-α (ng/ml) σε κύτταρα AG01523c. Εδώ παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα, από αυτά που έγιναν και παρουσίαζαν παρόμοια αποτελέσματα.

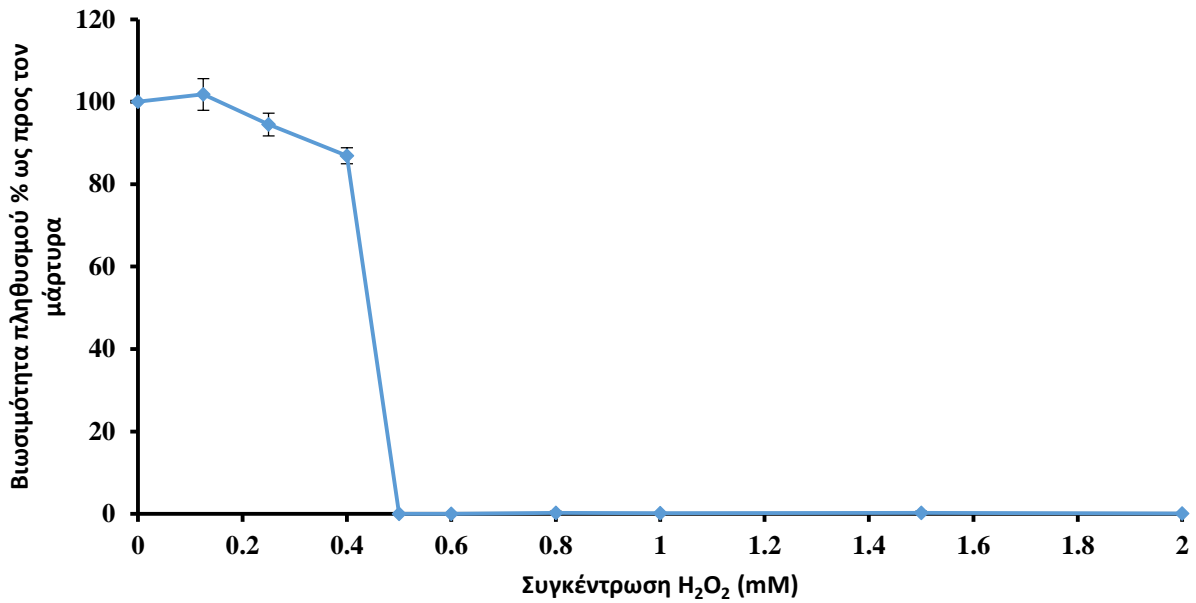


Σχήμα 3.4: Εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του TNF-α (ng/ml) σε κύτταρα DSF22. Εδώ παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα, από αυτά που έγιναν με παρόμοια αποτελέσματα.

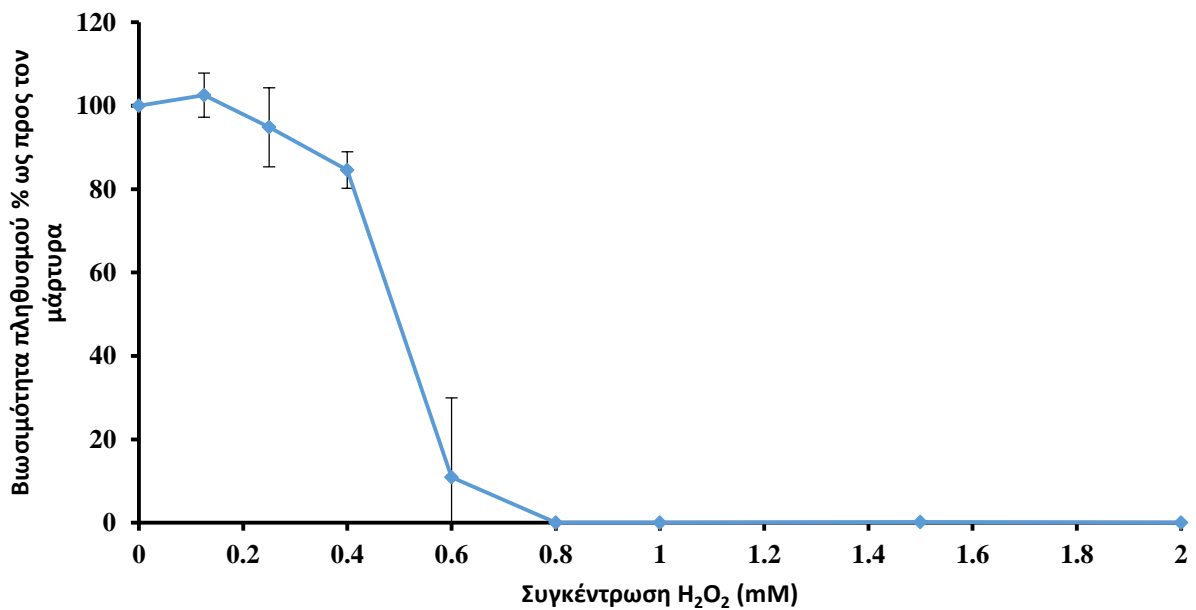
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως ο TNF-α δεν προκαλεί αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μέχρι και τις 72 h επώασης, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (200 ng/ml). Οι δύο κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν και εδώ παρόμοιο πρότυπο απόκρισης.

3.1.3 Μελέτη της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Η εκτίμηση της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 στη βιωσιμότητα των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών έγινε με τη δοκιμασία MTT (Σχήματα 3.5 και 3.6).



Σχήμα 3.5: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων AG01523c υπό την επίδραση του H₂O₂. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

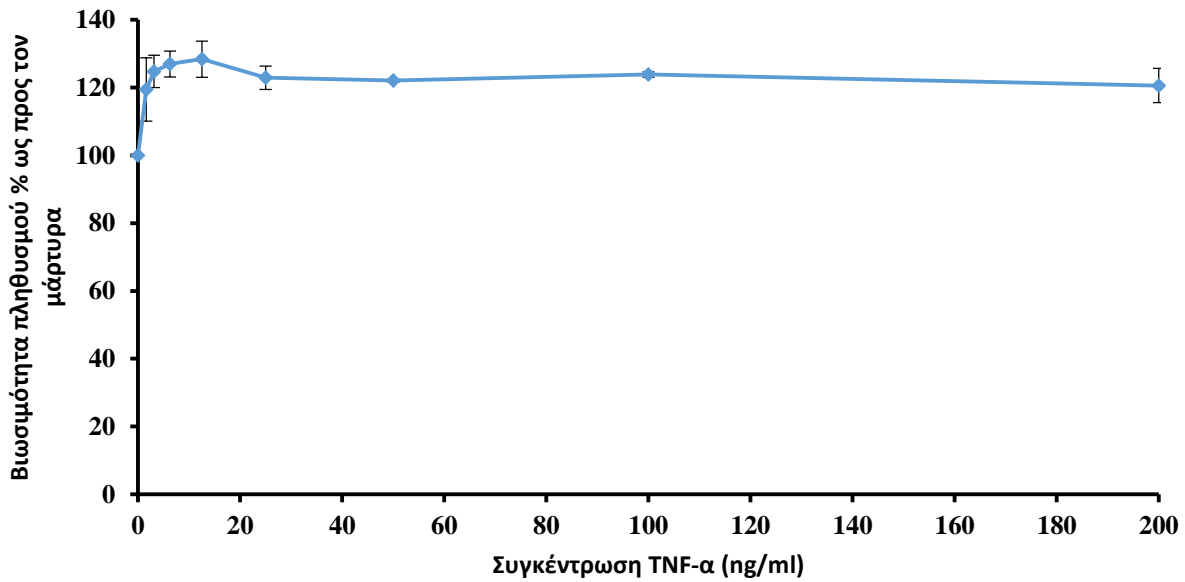


Σχήμα 3.6: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων DSF22 υπό την επίδραση του H₂O₂. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και είχαν παρόμοια αποτελέσματα.

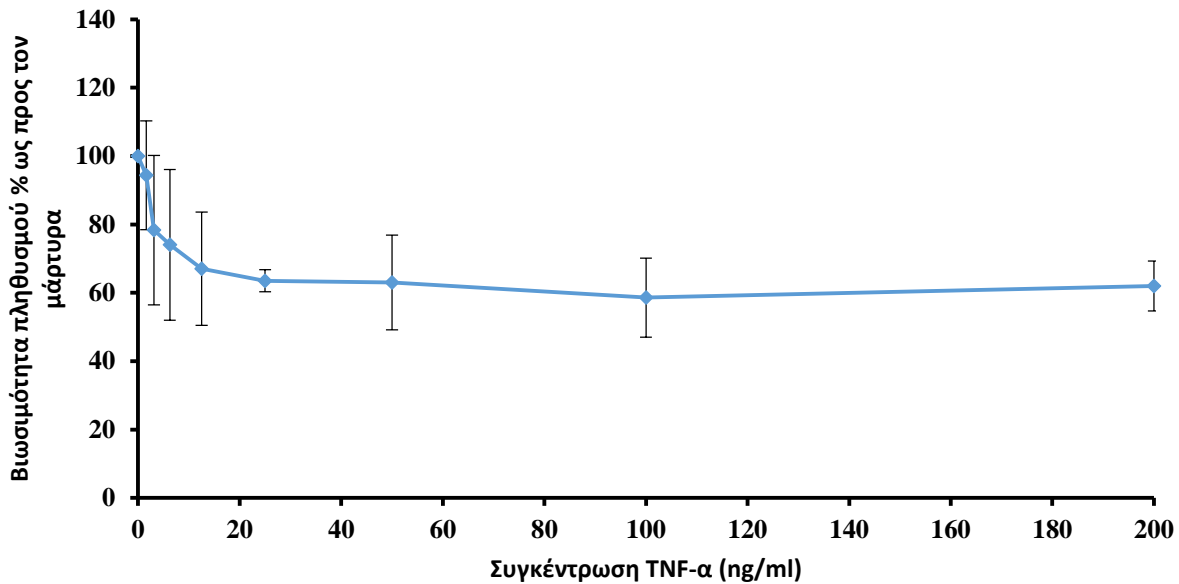
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το H₂O₂ είναι κυτταροτοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις και για τις δύο κυτταρικές σειρές.

3.1.4 Μελέτη επίδρασης του TNF-α στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Η επίδραση του TNF-α σε διάφορες συγκεντρώσεις στη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών που εξετάζονται έγινε με τη δοκιμασία MTT (Σχήματα 3.7 και 3.8).

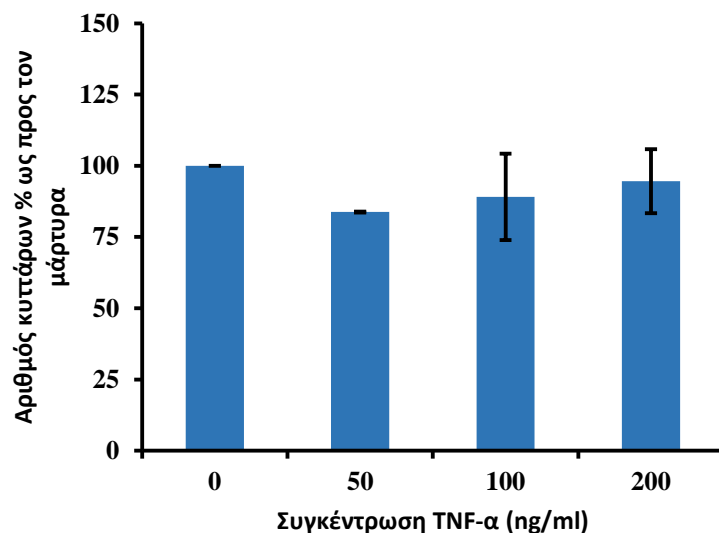


Σχήμα 3.7: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων AG01523c υπό την επίδραση του TNF-α. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

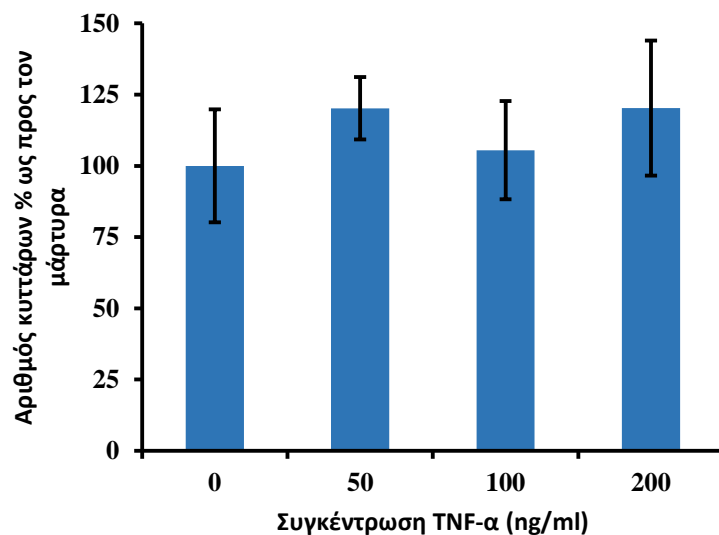


Σχήμα 3.8: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων DSF22 υπό την επίδραση του TNF-α. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (200 ng/ml) ο TNF-α δεν είναι κυτταροτοξικός, για καμία από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Στα κύτταρα AG01523c παρατηρήθηκε μία αύξηση της απορρόφησης, ενώ στα DSF22 μια μείωση. Για να διαπιστωθεί αν αυτές οι μεταβολές σχετίζονται με αύξηση ή μείωση της βιωσιμότητας αντίστοιχα, έγινε μέτρηση του ολικού αριθμού κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή, ύστερα από έκθεση σε 50, 100 και 200 ng/ml TNF-α για 2 ημέρες (**Σχήματα 3.9 και 3.10**).



Σχήμα 3.9: Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων AG01523c υπό την επίδραση του TNF-α. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 ανεξάρτητα πειράματα.



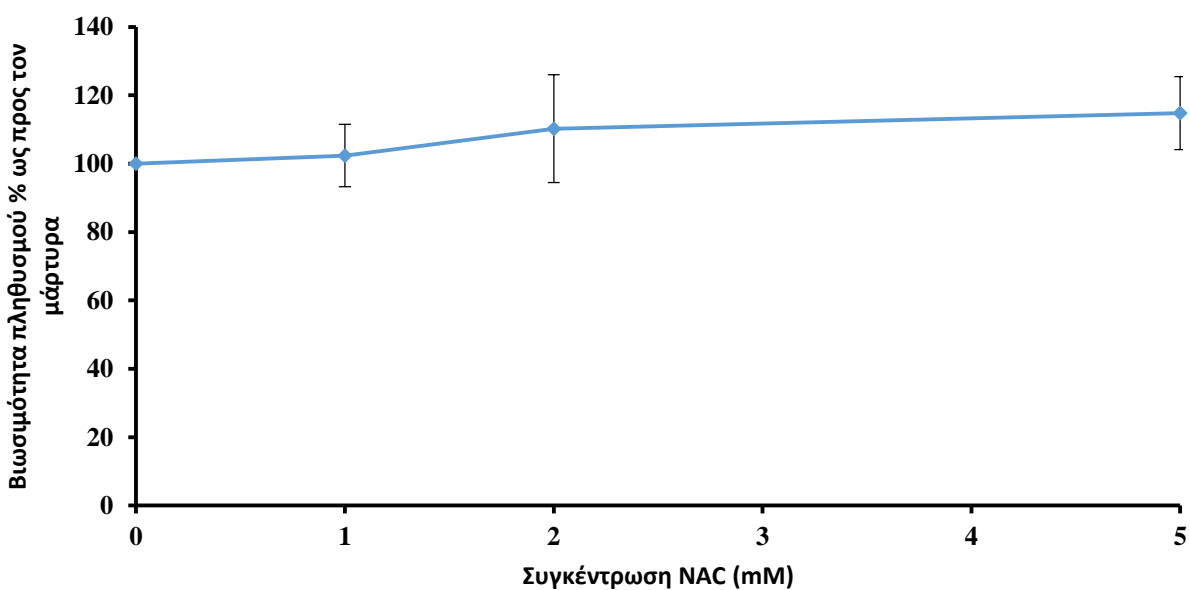
Σχήμα 3.10: Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων DSF22 υπό την επίδραση του TNF-α.

Σύμφωνα με τα τελευταία αποτελέσματα, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές του αριθμού των κυττάρων σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές. Η αύξηση της απορρόφησης

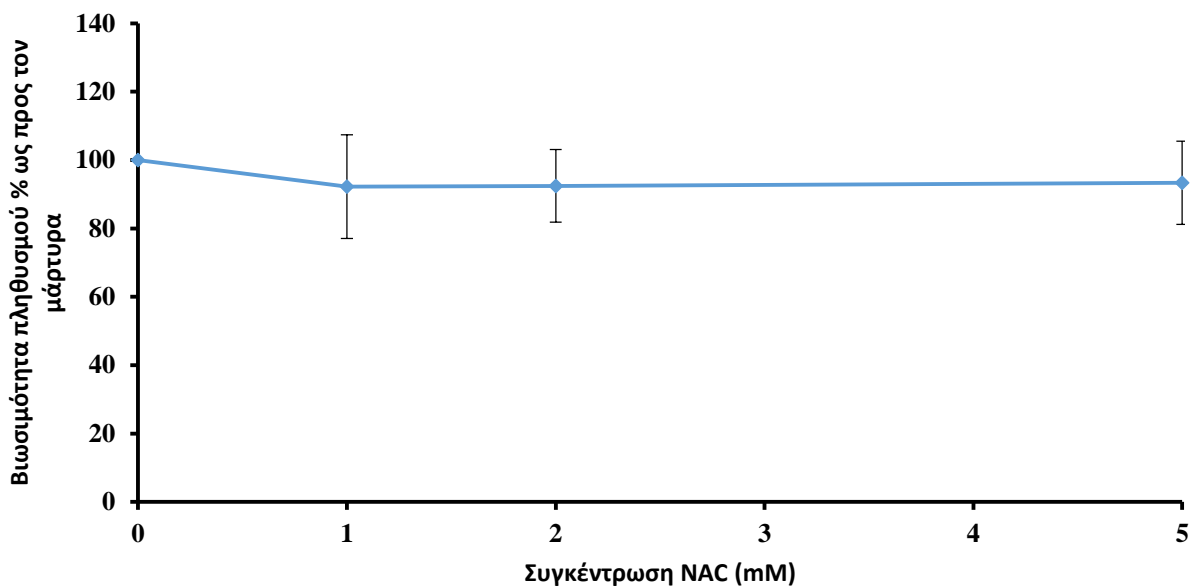
στα κύτταρα AG01523c και η μείωση στα DSF22 αποδίδεται σε πιθανή επίδραση της μεθοδολογίας στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

3.1.5 Μελέτη της επίδρασης του αντιοξειδωτικού NAC στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Αρχικά ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση της NAC σε διάφορες συγκεντρώσεις, μέσω της δοκιμασίας MTT (Σχήματα 3.11 και 3.12).



Σχήμα 3.11: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων AG01523c υπό την επίδραση της NAC. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

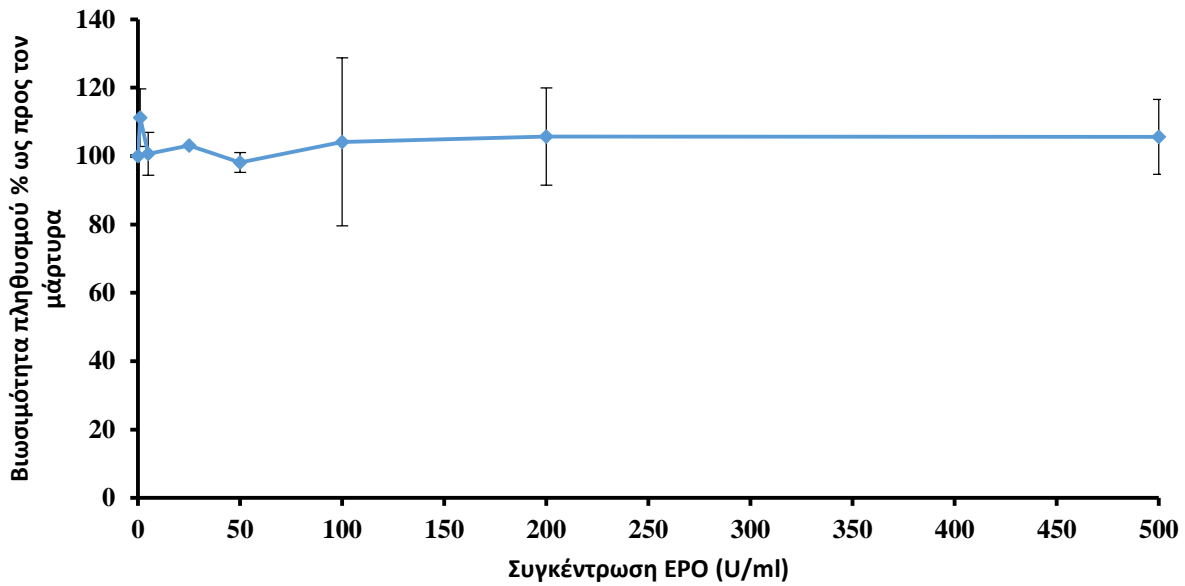


Σχήμα 3.12: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων DSF22 υπό την επίδραση της NAC. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

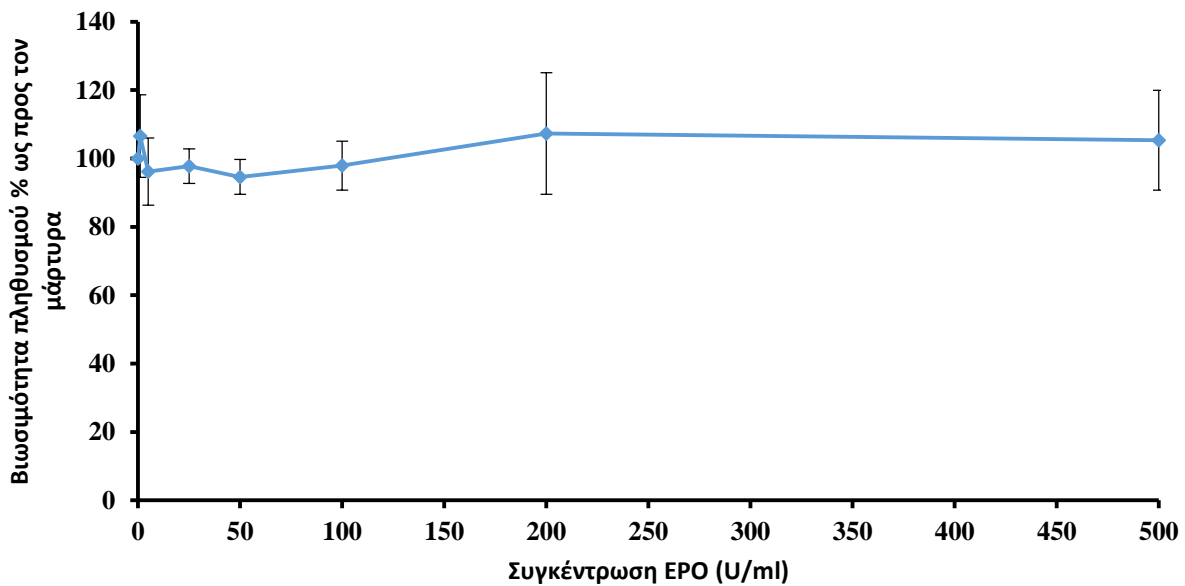
Η NAC δεν είναι κυτταροτοξική για τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν μέχρι και τη συγκέντρωση 5 mM.

3.1.6 Μελέτη της επίδρασης της ερυθροποιητίνης (EPO) στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Για να εξεταστεί η πιθανή προστατευτική δράση της EPO, έγινε πρώτα έλεγχος ως προς την κυτταροτόξικότητα της με τη δοκιμασία MTT και στις δύο κυτταρικές σειρές (**Σχήματα 3.13 και 3.14**).



Σχήμα 3.13: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων AG01523c υπό την επίδραση της EPO. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

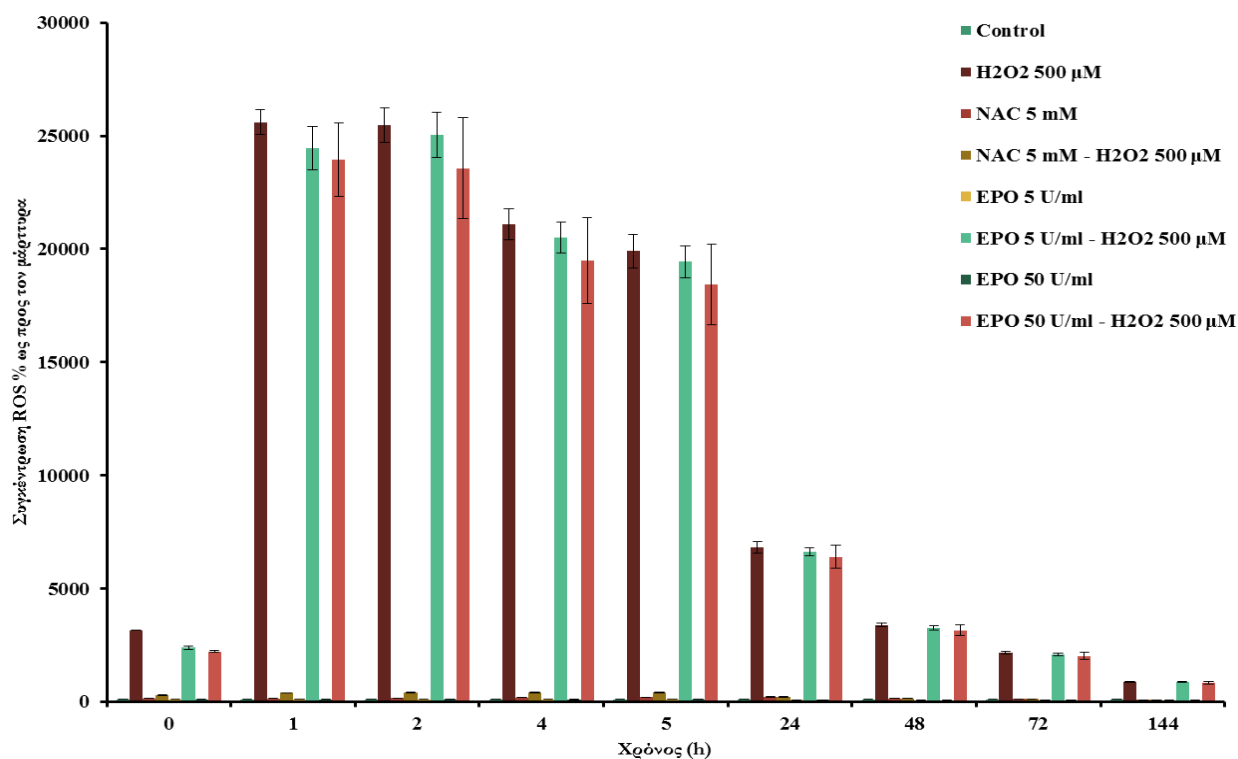


Σχήμα 3.14: Καμπύλη βιωσιμότητας των κυττάρων DSF22 υπό την επίδραση της EPO. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

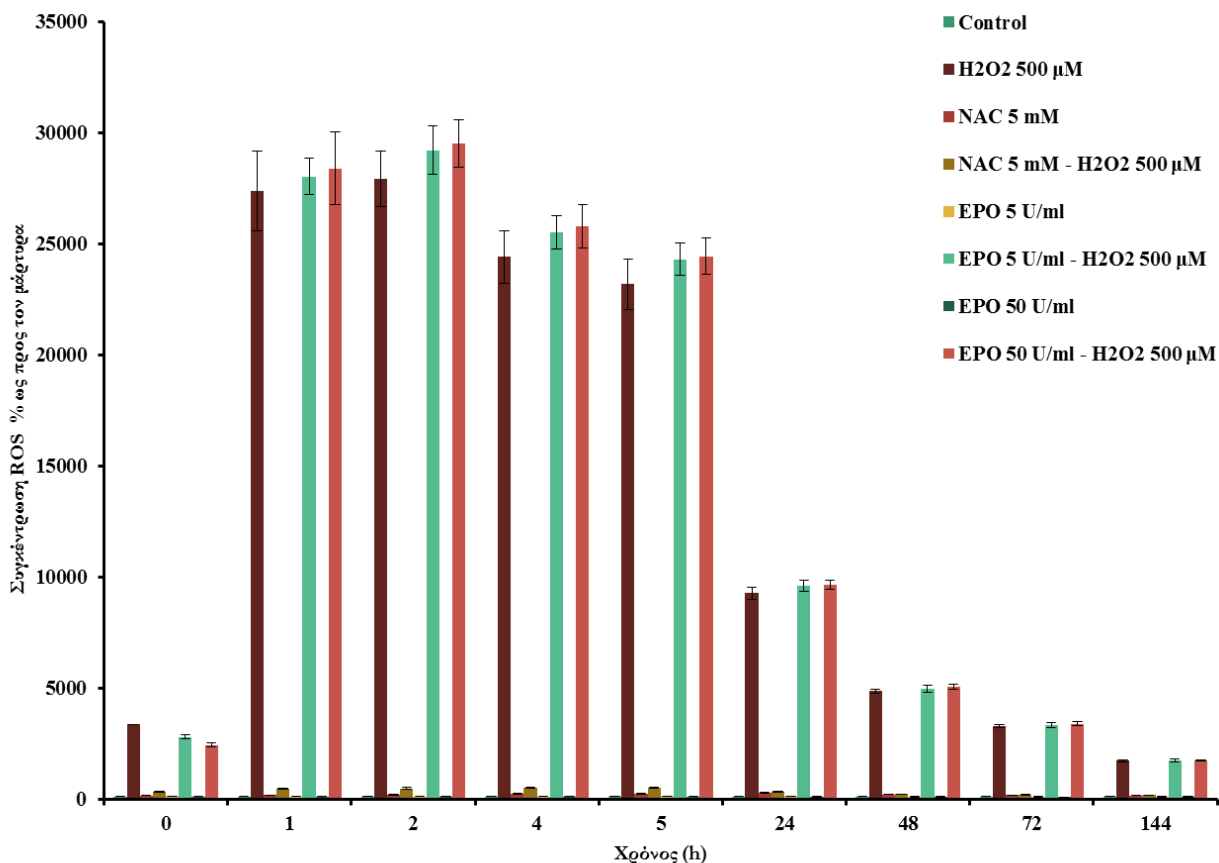
Καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν και επιλέχθηκαν βάσει της διαθέσιμης βιβλιογραφίας δεν είναι κυτταροτοξική για αυτές τις κυτταρικές σειρές.

3.1.7 Μελέτη της πιθανότητας άρσης της επαγόμενης από το H₂O₂ αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS με τη χρήση της NAC και της EPO

Τέλος, η μελέτη της πιθανότητας άρσης της επαγωγής των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μετά από την επίδραση H₂O₂ (500 μM), με την χρήση της NAC (5 mM) και της EPO (5 και 50 U/ml) στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, έγινε με τη δοκιμασία DCFH-DA (Σχήματα 3.15 και 3.16). Με την NAC ή την EPO τα κύτταρα επωάζονταν πριν την έναρξη της δοκιμασίας για 2 h.



Σχήμα 3.15: Μελέτη της πιθανότητας άρσης της επαγωγής των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μετά από την επίδραση H₂O₂ (500 μM), με την χρήση της NAC (5 mM) και της EPO (5 και 50 U/ml) σε κύτταρα AG01523c.



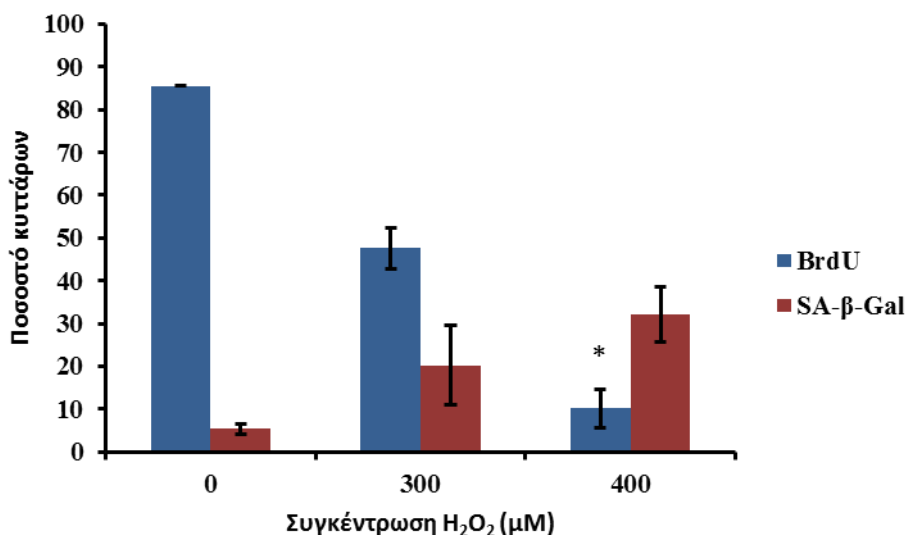
Σχήμα 3.16: Μελέτη της πιθανότητας άρσης της επαγωγής των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μετά από την επίδραση H₂O₂ (500 μM), με την χρήση της NAC (5 mM) και της EPO (5 και 50 U/ml) σε κύτταρα DSF22.

Το H₂O₂, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προκαλεί άμεσα την έντονη αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS. Μετά την επίδραση του H₂O₂, σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με το αντιοξειδωτικό NAC, παρατηρείται πως τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, και στις δύο κυτταρικές σειρές, μειώνονται και πλησιάζουν τα βασικά επίπεδα. Αντίθετα μετά την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ερυθροποιητίνης δεν παρατηρείται καμία σημαντική μείωση ούτε των βασικών επιπέδων των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS, ούτε και των επαγόμενων από το οξειδωτικό στρες ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS, σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές.

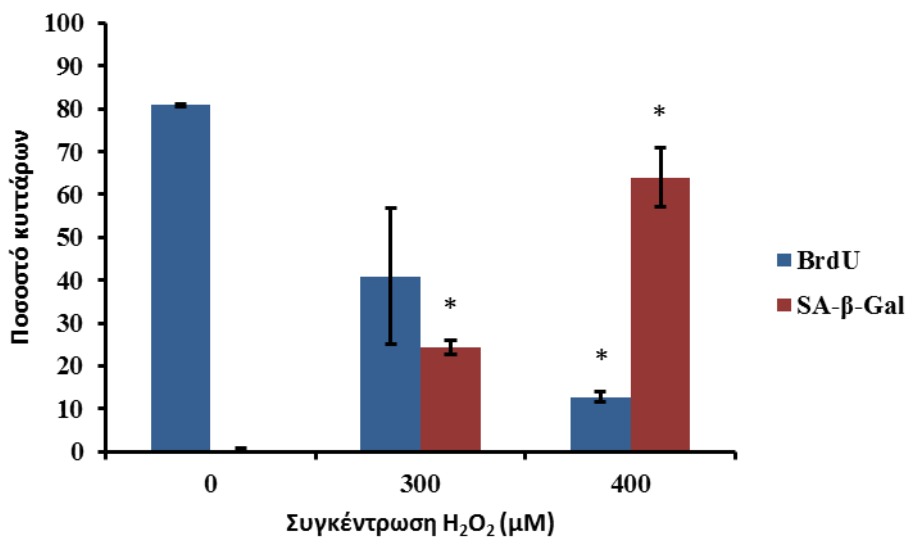
3.2 Κυτταρική γήρανση

3.2.1 Επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης από το οξειδωτικό στρες

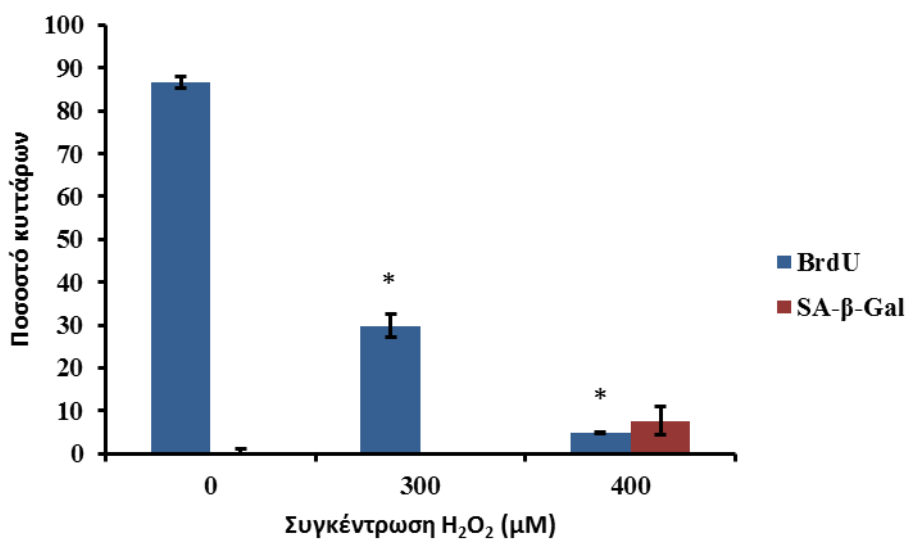
Η εκτίμηση της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε δύο υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις H_2O_2 που επιλέχθηκαν (300 και 400 μM), έγινε με τη μέθοδο ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) στο DNA των κυττάρων και με επισήμανση των κυττάρων με τη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA- β -Gal (Σχήματα 3.17, 3.18, 3.19 και 3.20). Τα κύτταρα εκτέθηκαν επαναλαμβανόμενα σε 300 και 400 μM H_2O_2 ανά 2 μέρες και ανακαλλιεργήθηκαν μετά την 4^η ή την 6^η έκθεση στο H_2O_2 .



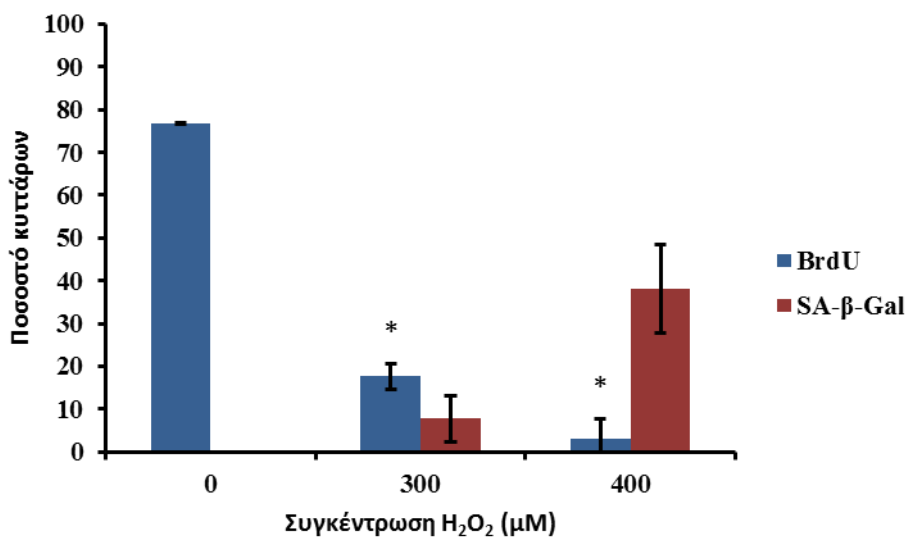
Σχήμα 3.17: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA- β -Gal ύστερα από 4 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις H_2O_2 . Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για κάθε συγκέντρωση H_2O_2 .



Σχήμα 3.18: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 6 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις H₂O₂. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για κάθε συγκέντρωση H₂O₂.



Σχήμα 3.19: Ποσοστό κυττάρων DSF22 που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 4 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις H₂O₂. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση H₂O₂.

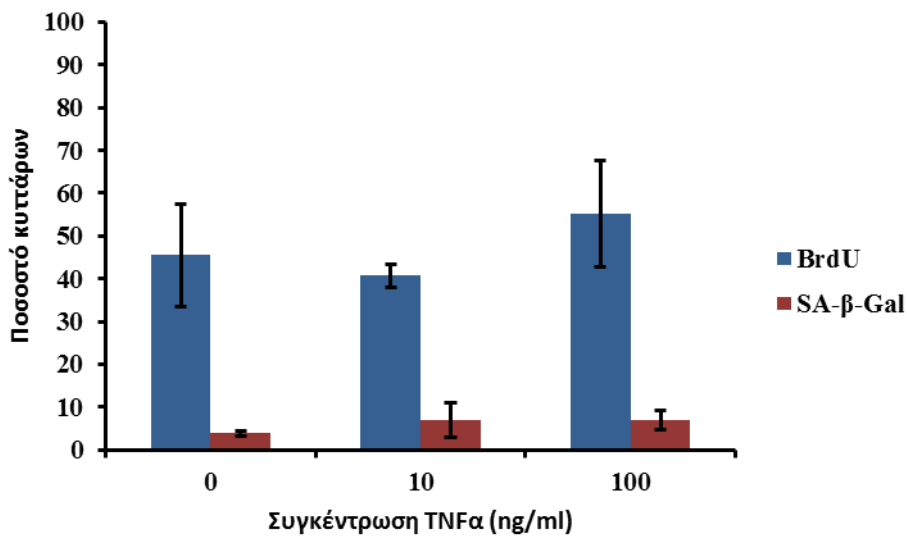


Σχήμα 3.20: Ποσοστό κυττάρων DSF22 που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 6 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις H₂O₂. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση H₂O₂.

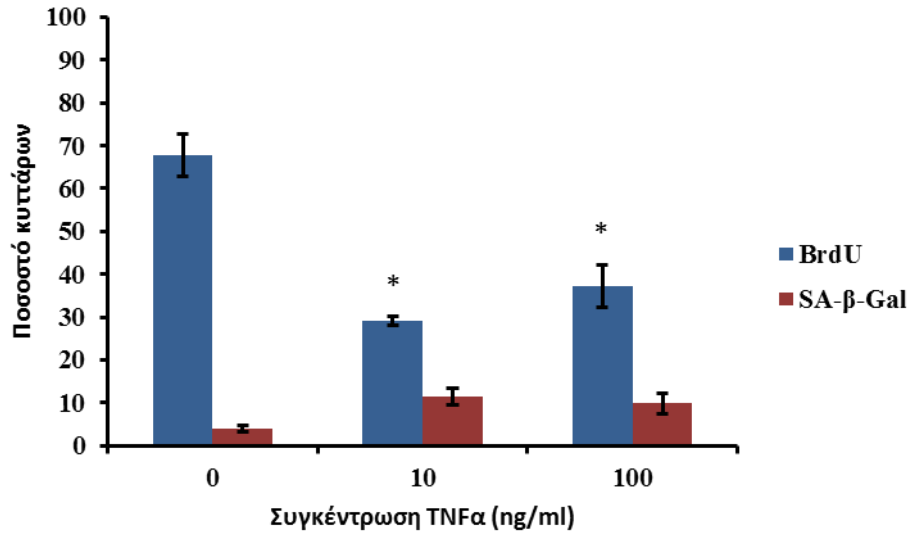
Ήδη από τις 4 πρώτες εκθέσεις στα 400 μM H₂O₂, το ποσοστό των κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσε την BrdU ήταν 10%. Επίσης το ποσοστό των κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ήταν πάνω από 30%, ενώ στις 6 εκθέσεις ξεπερνούσε το 60% του συνολικού πληθυσμού. Τα κύτταρα DSF22, μετά από 6 εκθέσεις στην ίδια συγκέντρωση H₂O₂, είχαν ποσοστό κυττάρων που ενσωμάτωνε BrdU κάτω από το 5% και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal σχεδόν 40% του πληθυσμού. Επομένως παρατηρούμε ότι επαναλαμβανόμενες δόσεις H₂O₂ προκαλούν πρόωρη γήρανση στους δερματικούς ινοβλάστες που μελετήθηκαν, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

3.2.2 Μελέτη επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον TNF- α

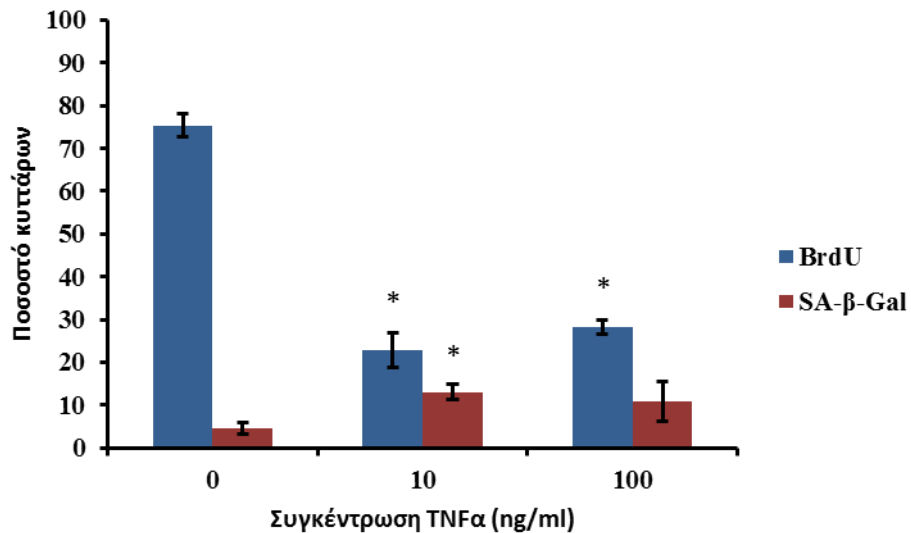
Η εκτίμηση της επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις των κυττάρων σε δύο υποκυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του TNF- α (10 και 100 ng/ml), έγινε και πάλι με τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU στο DNA των κυττάρων και με επισήμανση των κυττάρων με τη χαρακτηριστική για τη γήρανση χρώση SA- β -Gal (Σχήματα 3.21 – 3.24). Οι εκθέσεις σε 10 και 100 ng/ml TNF α γίνονταν ανά 2 μέρες και τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν μετά από 5 εκθέσεις στον TNF- α .



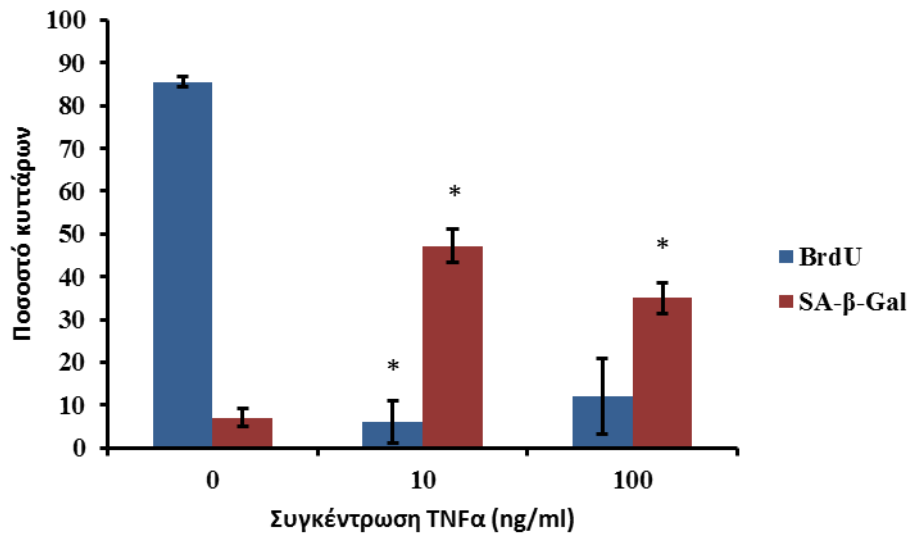
Σχήμα 3.21: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA- β -Gal ύστερα από 5 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις TNF- α (10 και 100 ng/ml). Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση TNF- α .



Σχήμα 3.22: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 10 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις TNF-α (10 και 100 ng/ml). Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση TNF-α.



Σχήμα 3.23: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 15 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις TNF-α (10 και 100 ng/ml). Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση TNF-α.



Σχήμα 3.24: Ποσοστό κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσαν BrdU και ποσοστό κυττάρων θετικά στη χρώση SA-β-Gal ύστερα από 20 διαδοχικές εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις TNF-α (10 και 100 ng/ml). Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 2 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση TNF-α.

Παρατηρήσαμε λοιπόν πως το ποσοστό των κυττάρων AG01523c που ενσωμάτωσε BrdU μετά από τις 10 πρώτες εκθέσεις σε 10 ng/ml TNF-α ήταν σχεδόν 30%. Μετά από 20 εκθέσεις στην ίδια συγκέντρωση TNF-α το ποσοστό κυττάρων που ενσωμάτωσε BrdU ήταν κάτω από 10% και το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά στη χρώση SA-β-Gal ήταν σχεδόν το 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού.

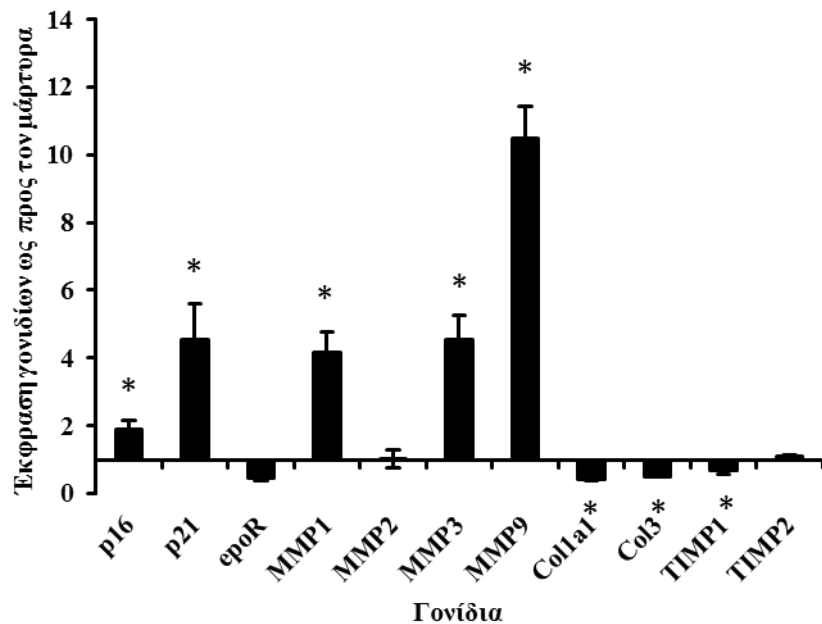
3.3 Μοριακός χαρακτηρισμός γηρασμένων κυττάρων

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας αυτής έγινε ο μοριακός χαρακτηρισμός των πρόωρα γηρασμένων κυττάρων με έλεγχο της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης με ποσοτική PCR. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γηρασμένα μετά

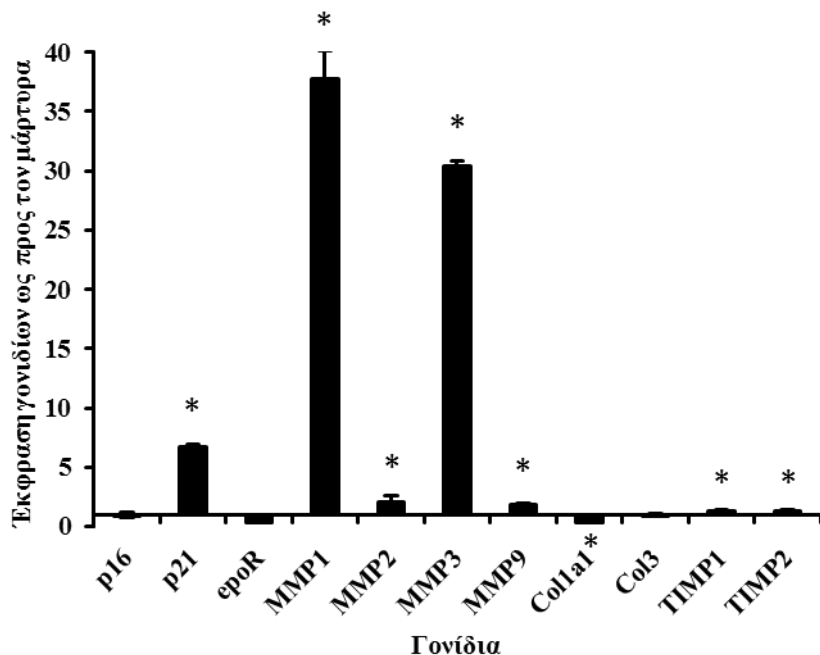
από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε H₂O₂ και κύτταρα γηρασμένα μετά από έκθεση σε γ-ακτινοβολία, καθώς είναι γνωστή η επαγωγή της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης από τους παράγοντες αυτούς σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

3.3.1 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένα κύτταρα μετά από έκθεση σε γ-ακτινοβολία

Η μελέτη της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών γήρανσης στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές έγινε αρχικά μετά από έκθεση των κυττάρων σε γ-ακτινοβολία (Σχήματα 3.25 και 3.26).



Σχήμα 3.25: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένους, μετά από ακτινοβολία, δερματικούς ινοβλάστες (AG01523c). Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα νεαρά κύτταρα.

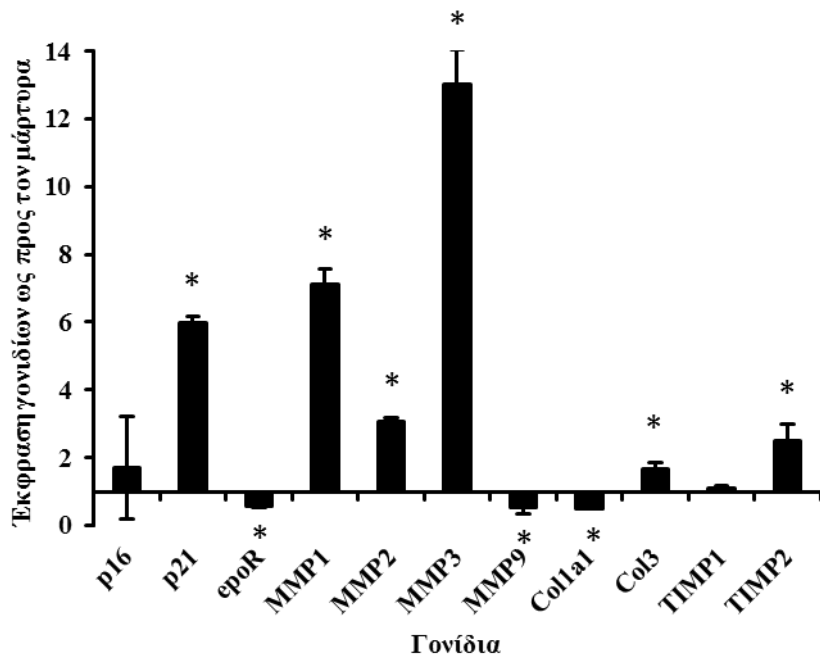


Σχήμα 3.26: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένους, ύστερα από ακτινοβολήση, δερματικούς ινοβλάστες (DSF22). Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα νεαρά κύτταρα.

Και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Η έκφραση του γονιδίου της p21 παρουσίασε αύξηση στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα, ενώ μείωση παρατηρήθηκε στα γονίδια που κωδικοποιούν το κολλαγόνο τύπου I και τύπου III. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταλλοπρωτεάσες 1, 3 και 9 είχαν ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση και αντίστοιχα τα γονίδια που κωδικοποιούν τους αναστολείς τους (TIMP1 και TIMP2) παρουσίασαν μείωση στα γηρασμένα κύτταρα. Το γονίδιο του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές είχε μειωμένη έκφραση στα γηρασμένα κύτταρα.

3.3.2 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα μέσω οξειδωτικού στρες

Ο έλεγχος της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών γήρανσης στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές έγινε και ύστερα από διαδοχικές εκθέσεις στο H₂O₂ στην υποκυτταροτοξική συγκέντρωση 400 μM (Σχήμα 3.27). Οι εκθέσεις πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με αλλαγή κάθε φορά του θρεπτικού υλικού των κυττάρων και παρουσία ορού FBS 10%. 2 ημέρες πριν από την συλλογή των δειγμάτων για απομόνωση ολικού RNA γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού των κυττάρων παρουσία ορού.

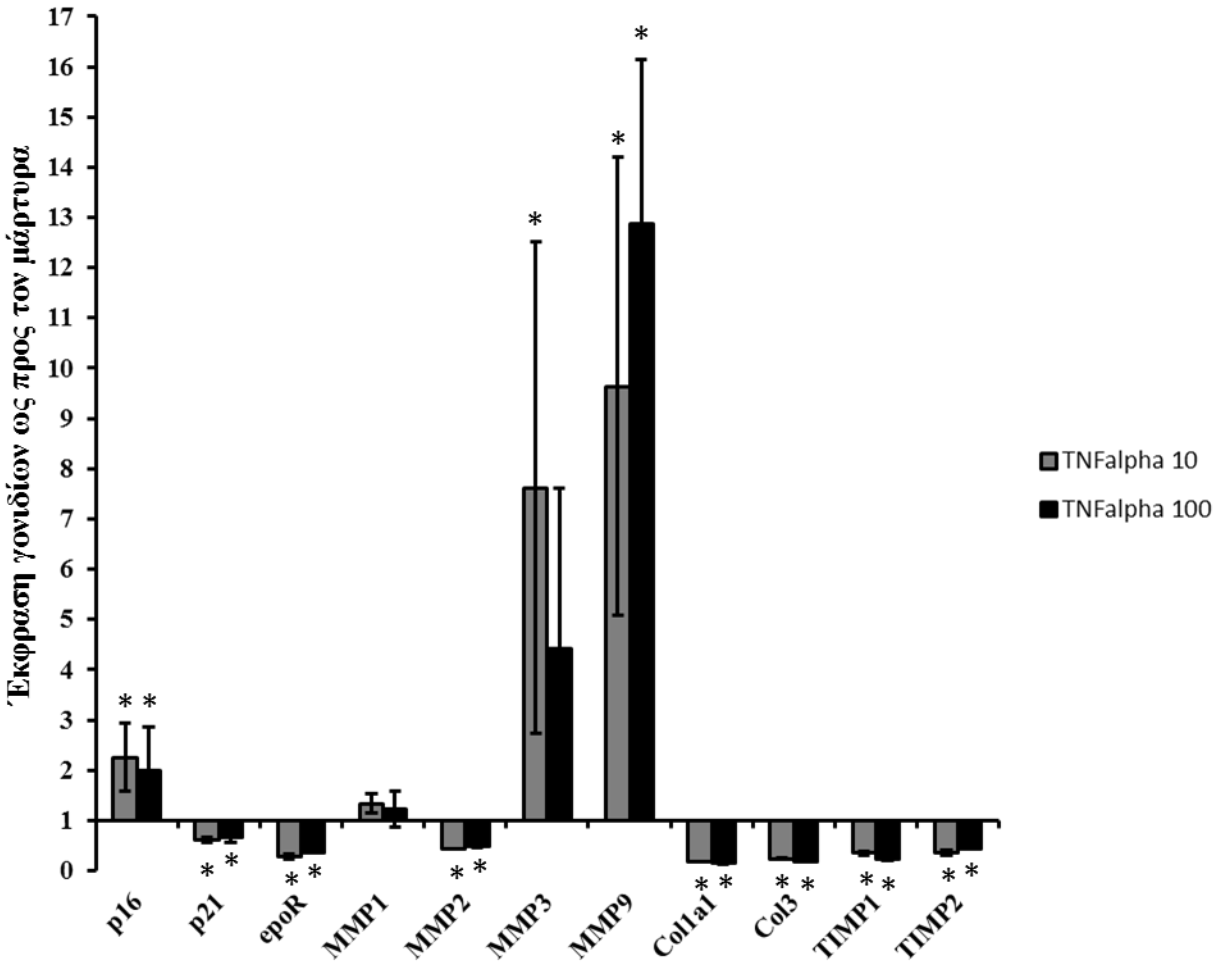


Σχήμα 3.27: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένους, μετά από διαδοχικές εκθέσεις σε H₂O₂, δερματικούς ινοβλάστες. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα νεαρά κύτταρα.

Η έκφραση του γονιδίου της p21 παρουσίασε αύξηση στα γηρασμένα κύτταρα, όπως και τα γονίδια των μεταλλοπρωτεασών 1, 2 και 3. Μείωση στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά παρατηρήθηκε στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου I. Το γονίδιο του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης είχε και πάλι μειωμένη έκφραση.

3.3.3 Έκφραση δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένα μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον TNF-α κύτταρα

Η μελέτη της έκφρασης των δεικτών γήρανσης στα κύτταρα AG01523c έγινε και μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε 2 συγκεντρώσεις TNF-α (10 και 100 ng/ml) (**Σχήμα 3.28**). Οι εκθέσεις πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με αλλαγή κάθε φορά του θρεπτικού υλικού των κυττάρων και παρουσία ορού FBS 10% και κάθε 5 δόσεις TNFα τα κύτταρα ανακαλλιεργούνταν. 2 ημέρες πριν από την συλλογή των δειγμάτων για απομόνωση ολικού RNA έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού των κυττάρων παρουσία ορού.

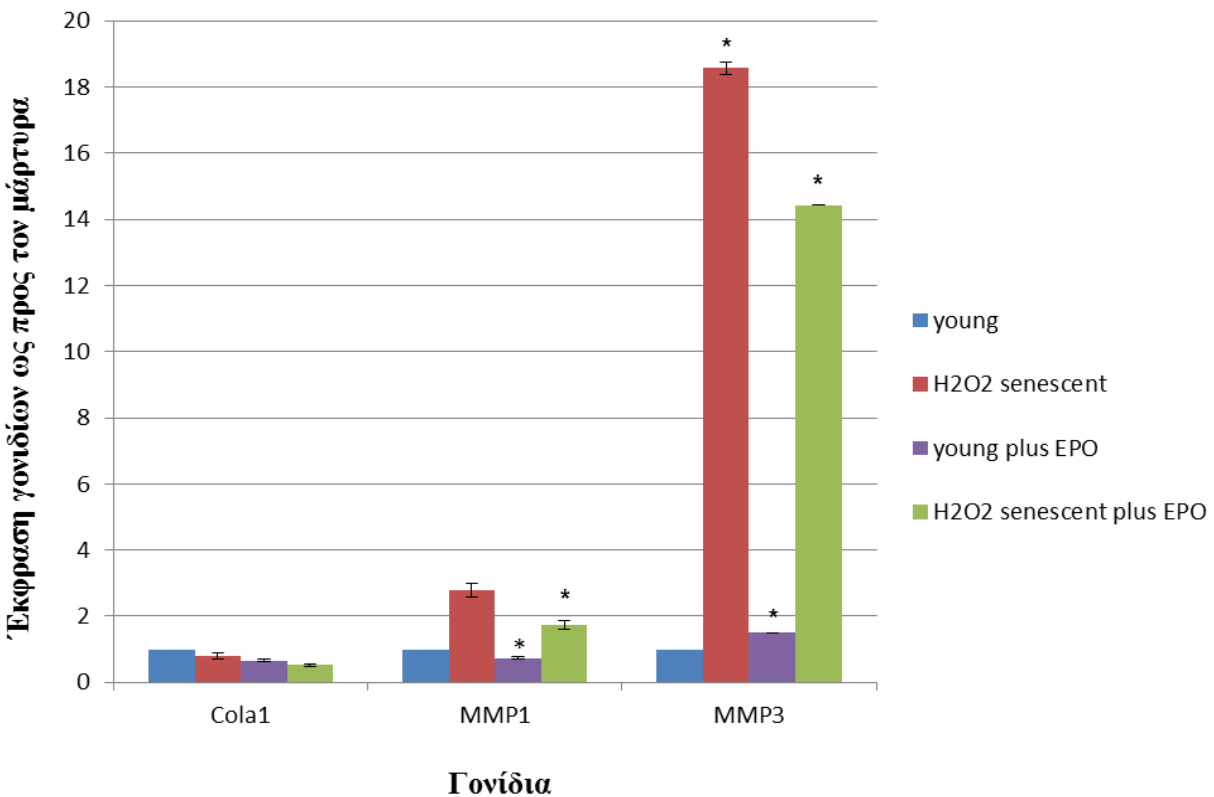


Σχήμα 3.28: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (epoR) σε γηρασμένα, μετά από διαδοχικές εκθέσεις σε TNFα, κύτταρα AG01523c. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος από 3 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα νεαρά κύτταρα.

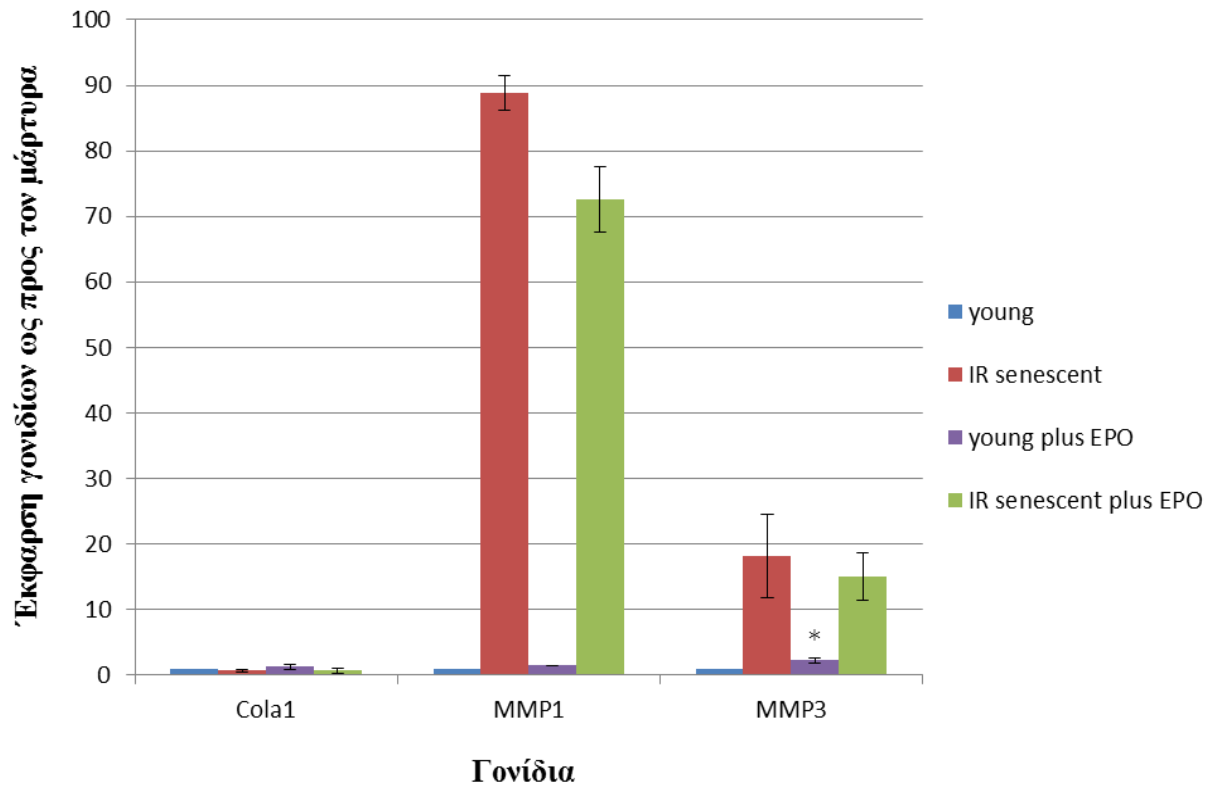
Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, το γονίδιο της p16 και των μεταλλοπρωτεασών 3 και 9 παρουσίασαν ιδιαίτερη αύξηση και στις 2 συγκεντρώσεις TNFα που δοκιμάστηκαν. Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το κολλαγόνο τύπου I και το κολλαγόνο τύπου III ήταν μειωμένη, όπως και των γονιδίων των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών TIMP1 και TIMP2. Το γονίδιο του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης είχε και σε αυτήν την περίπτωση μειωμένη έκφραση.

3.3.4 Έκφραση δεικτών της γήρανσης σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα μέσω οξειδωτικού στρες και ύστερα από χορήγηση ερυθροποιητίνης

Έλεγχος της έκφρασης μερικών χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης έγινε σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα και μετά από χορήγηση μίας δόσης EPO σε τελική συγκέντρωση 50 U/ml (Σχήματα 3.29 και 3.30). Τα κύτταρα AG01523c ήταν πρόωρα γηρασμένα ύστερα από διαδοχικές εκθέσεις στο H₂O₂ σε μη κυτταροτοξική συγκέντρωση (400 μM), με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και τα κύτταρα DSF22 μετά από ακτινοβόληση.



Σχήμα 3.29: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης σε γηρασμένα, μετά από διαδοχικές εκθέσεις σε H₂O₂, κύτταρα AG01523c και ύστερα από μία δόση EPO (50 U/ml). Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν τους χορηγήθηκε EPO.



Σχήμα 3.30: Έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών της γήρανσης σε γηρασμένα, μετά από ακτινοβόληση, κύτταρα DSF22 και ύστερα από μία δόση EPO (50 U/ml). Ο αστερίσκος συμβολίζει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν τους χορηγήθηκε EPO.

Συζήτηση

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) δρουν ως σηματοδοτικά μόρια ή προκαλούν βλάβες και συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η κυτταρική γήρανση και η απόπτωση (Mates J.M. et al., 2008).

Αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS είναι δυνατόν να προκύψει είτε από ανισορροπία μεταξύ των παραγόμενων ROS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού συστήματος, είτε από εξωγενή στρες. Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS προκαλεί την οξείδωση κυτταρικών συστατικών, π.χ. το DNA και τελικά μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε κυτταρική γήρανση (Toussaint O. et al., 1991). Πιο συγκεκριμένα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι από τις πιο γνωστές αιτίες πρόκλησης βλαβών στο DNA (Moody C.S. and Hassan H.M., 1982). Ο τύπος γήρανσης που οφείλεται σε εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες καλείται «πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες» (stress-induced premature senescence, SIPS). Το οξειδωτικό στρες είναι ο πιο συχνός τρόπος πρόκλησης SIPS (Toussaint O. et al., 2000).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ανθράπινι ινοβλάστες οι οποίοι έχουν εκτεθεί κατ' επανάληψη σε μη κυτταροτοξικές δόσεις διαφόρων ειδών οξειδωτικού στρες υφίστανται SIPS, με αποτέλεσμα την αλλαγή στη μορφολογία τους, τη μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης και τη θετική αντίδραση στη χαρακτηριστική στη γήρανση χρώση SA-β-Gal (Toussaint O. et al., 2000).

Μία άλλη αιτία επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης σε διάφορα κύτταρα και ιστούς είναι και οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Πολλές προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες προκαλούν οξειδωτικό στρες ενώ και το οξειδωτικό στρες μπορεί να επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α (Dumont P. et al., 2000). Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ανθράπινι ινοβλάστες, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από φλεβικά έλκη που χαρακτηρίζονται από έντονη φλεγμονή έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τους φυσιολογικούς και μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, χαρακτηριστικά δηλαδή των γηρασμένων κυττάρων (Mendez M.V. et al., 1999).

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την επίδραση του TNF-α σε δερματικούς ινοβλάστες βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες ινοβλάστες που εκτέθηκαν

στον γνωστό οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 , και την πιθανότητα πρόκλησης πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από επανειλημμένες εκθέσεις στον TNF- α . Για τους σκοπούς αυτούς αρχικά εξετάσαμε την πιθανότητα κυτταροτοξικότητας του παράγοντα αυτού, έως την συγκέντρωση 200 ng/ml, χρησιμοποιώντας την μέθοδο MTT. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως ο TNF- α δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των ανθρωπίνων ινοβλαστών, μέχρι και την συγκέντρωση που δοκιμάσαμε. Για επιβεβαίωση του συμπεράσματος αυτού, μετρήσαμε και τον ολικό κυτταρικό αριθμό, ώστε να απορριφθεί η πιθανή αλληλεπίδραση TNF- α και μιτοχονδρίων. Τελικά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν, συμπέρασμα που είναι σύμφωνο και με την βιβλιογραφία (Mavrogonatos E. et al., 2014).

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του H_2O_2 και του TNF- α στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS των δερματικών ινοβλαστών με την μέθοδο DCFH-DA. Το H_2O_2 φάνηκε να παρουσιάζει άμεση επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS προκαλώντας την αύξηση τους από τα πρώτα κίολα λεπτά έκθεσης. Αντίθετα ο TNF- α , σε καμία συγκέντρωση, ακόμα και μετά από παρατεταμένη έκθεση, δεν φάνηκε να έχει καμία επίδραση. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν δειχθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

Στο επόμενο κομμάτι της εργασίας εξετάσαμε την πιθανότητα πρόκλησης πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις των δερματικών ινοβλαστών στον TNF- α , χρησιμοποιώντας το H_2O_2 ως μάρτυρα. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων με την μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU και επίσης εκτιμήσαμε το ποσοστό των γηρασμένων κυττάρων στον πληθυσμό, μέσω χρώσης τους με την SA- β -Gal. Αυτά που παρατηρήσαμε είναι ότι επαναλαμβανόμενες δόσεις H_2O_2 οδηγούν σε πρόωρη γήρανση στους δερματικούς ινοβλάστες, όπως έχει δειχθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Οι επαναλαμβανόμενες δόσεις TNF- α οδήγησαν τα κύτταρα σε ένα ποσοστό ενσωμάτωσης BrdU κάτω από 10% και ταυτόχρονα το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζονταν θετικά στην χαρακτηριστική για την γήρανση χρώση SA- β -Gal ήταν σχεδόν 50%.

Τέλος, έγινε προσπάθεια μοριακού χαρακτηρισμού των πρόωρα γηρασμένων κυττάρων μετά από παρατεταμένη έκθεση σε H_2O_2 , TNF- α , αλλά και μετά από έκθεση των κυττάρων σε γ ακτινοβολία. Έκθεση των δερματικών ινοβλαστών σε H_2O_2 ή γ -ακτινοβολία οδήγησε σε επαγωγή όλων των χαρακτηριστικών δεικτών της κυτταρικής γήρανσης, π.χ. υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεάσες και μείωση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν

τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Οι δερματικοί ινοβλάστες που εκτέθηκαν παρατεταμένα στον TNF- α φάνηκε να παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης μερικών δεικτών γήρανσης και παράλληλα η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το κολλαγόνο τύπου I και το κολλαγόνο τύπου III ήταν μειωμένη. Τα ευρήματά μας λοιπόν στους δερματικούς ινοβλάστες φαίνεται να επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες όπου έχει δειχθεί ότι ο TNF- α μακροπρόθεσμα οδηγεί σε κυτταρική γήρανση.

Τα ίδια πειράματα μοριακού χαρακτηρισμού του κυττάρων έγιναν και παρουσία ερυθροποιητίνης. Η ερυθροποιητίνη σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχει αντιφλεγμονώδεις και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες και επιταχύνει και βελτιώνει την επούλωση των πληγών του δέρματος (Sorg H. et al., 2009). Στη δική μας μελέτη όμως, δεν παρατηρήθηκε προστατευτική δράση της ερυθροποιητίνης στους δερματικούς ινοβλάστες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την πρόκληση πρόωρης γήρανσης από τον TNF- α , αλλά υποδεικνύουν ότι αυτή δεν προκαλείται από άμεσο οξειδωτικό στρες όπως είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Dumont P. et al., 2000). Ο μηχανισμός πρόκληση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης από τον TNF- α βρίσκεται υπό μελέτη στο εργαστήριό μας.

Βιβλιογραφία

- Adams, R. L. P. (1980). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Cell culture for biochemists*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Alcorta D.A., et al., Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(24): p. 13742-7.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(17): p. 7915-22.
- Ballmaier D., Pflaum M., Kielbassa C., and Epc B. (1997). Oxidative DNA damage profiles in mammalian cells. *Recent Results Cancer Res* 143, 35-47.
- Bauerova K. and Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys*, 1999. 18 Spec No: p. 15-20.
- Bertram, C. and R. Hass, Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*, 2008. 389(3): p. 211-20.
- Bodnar A.G., et al., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998. 279(5349): p. 349-52.
- Campisi J., and d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Campisi J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology* 75: 685–705.
- Chance B., Sies H., and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979. 59(3): p. 527-605.
- Collado M., Blasco M.A., and Serrano M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223–233.
- Coriell L. L. (1979). Preservation, storage, and shipment. *Methods Enzymol* 58, 29-36.
- Dilley T. K., Bowden G. T. and Chen Q. M. (2003). Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: Induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp Cell Res* 290, 38-48.

Dimri G.P., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(20): p. 9363-9367.

Dinareello C.A. Biological basis for IL-1 in disease. *Blood*, 1996. 87:2095-2147.

Dumont P., Balbeur L., Rémacle J., Toussaint O. (2000). Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 α and TNF- α : senescence associated β -galactosidase activity and morphotype transition. *Journal of Anatomy*, Volume 197, Issue 4, 529–537.

Emmendorffer A., Roesler J., Eisner J., Raeder E., Lohmann-Matthes M. L., Meier B. (1993). Production of oxygen radicals by fibroblasts and neutrophils from a patient with x-linked chronic granulomatous disease. *European Journal of Haematology*, Vol 51 Issue 4, 223-227.

Fischer, T. W., Scholz, G., Knoll, B., Hipler, U. C., and Elsner, P. (2002). Melatonin suppresses reactive oxygen species in UV-irradiated leukocytes more than vitamin C and trolox. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 367-373.

Halliwell, B., and Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9-19.

Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-60.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.

Herrling, T., Jung, K., and Fuchs, J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 63, 840-845.

Joon Il Jun and Lester F. Lau (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, 2(9), 627-631.

Kletsas Dimitris (2003). Aging of Fibroblasts. *Aging of cells in and outside the body*, 27-46.

Levy, M.Z., et al., Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*, 1992. 225(4): p. 951-60.

López-Otín Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano and Guido Kroemer (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 1194–1217.

Mates J.M., et al., 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol*. 82(5): p. 273-99.

Mavrogonatou E., Angelopoulou M., Kletsas D. (2014). The catabolic effect of TNF α on bovine nucleus pulposus intervertebral disc cells and the restraining role of glucosamine sulfate in the TNF α -mediated up-regulation of MMP-3. *J Orthop Res.*, 2014 Dec;32(12):1701-7.

Meier B., Jesaitis A. J., Emmendörffer A., Roesler J., Quinn M. T. (1993). The cytochrome *b*-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochemical Journal*, 289 (2), 481-486.

Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY (1999). The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. 30(4):734-43.

Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO (1998). "Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence". 28(5):876-83.

Moiseeva O., et al., DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(4): p. 1583-92.

Moody C.S. and Hassan H.M. (1982). Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(9): p. 2855-9.

Murphy Michael P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.*, 417, 1-13.

Poljsak Borut and Dahmane Raja (2012). Free Radicals and Extrinsic Skin Aging, *Dermatology Research and Practice*, Article ID 135206, 4 pages.

Pratsinis H., Armatas A., Dimozi A., Lefaki M., Vassiliu P., Kletsas D. (2013). Paracrine anti-fibrotic effects of neonatal cells and living cell constructs on young and senescent human dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen*, 21(6):842-851.

Schreck, R. and P.A. Baeuerle, A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol*, 1991. 1(2-3): p. 39-42.

Sena Laura and Chandel Navdeep S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* 48.

Sies, H., Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 1991. 91(3C): p. 31S-38S.

Sies, H., Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, 1991. 69(21-23): p. 965-8.

Sorg Heiko, Krueger Christian, Schulz Torsten, Menger Michael D., Schmitz Frank and Vollmar Brigitte (2009). Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *The FASEB Journal*, vol. 23 no.9, 3049-3058.

Spector, A., et al., Variation in cellular glutathione peroxidase activity in lens epithelial cells, transgenics and knockouts does not significantly change the response to H₂O₂ stress. *Exp Eye Res*, 1996. 62(5): p. 521-40.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 6;282(5391):1145-7.

Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, *Experimental Gerontology*, 35, 927-945.

Toussaint O., Raes m., and Remacle J. (1991). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev.* **61**(1): p. 45-64.

von Zglinicki, T., Burkle, A., and Kirkwood, T. B. (2001). Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol* 36, 1049-1062.

Wagner, J.R., C.C. Hu, and B.N. Ames, Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(8): p. 3380-4.

Wang, G.M., et al. (1998). Thioltransferase is present in the lens epithelial cells as a highly oxidative stress-resistant enzyme. *Exp Eye Res.* 66(4): p. 477-85.

Γιαννακοπούλου Ε. (2009). Οξειδωτικό στρες- αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 26, 23-35.

Περίληψη

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS), που παράγονται στα κύτταρα ως συνέπεια πολλών βιοχημικών διεργασιών, αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της ομοιοστασίας. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση ή ο πολλαπλασιασμός, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες) προκαλούν βλάβες σε κυτταρικά μακρομόρια, προκαλώντας αναστολή του πολλαπλασιασμού ή και κυτταρικό θάνατο. Επίσης, επαναλαμβανόμενη έκθεση των κυττάρων σε υψηλά αλλά μη κυτταροτοξικά επίπεδα ROS μπορεί να προκαλέσει πρόωρη κυτταρική γήρανση. Παράλληλα, πολλές φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και πρόωρη κυτταρική γήρανση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε σε φυσιολογικούς δερματικούς ινοβλάστες η επίδραση της φλεγμονώδους κυτοκίνης tumor necrosis factor- α (TNF- α), σε σύγκριση με ένα κλασικό οξειδωτικό στρες, την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Βρέθηκε ότι το H_2O_2 σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικό και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση με τον TNF- α , ο οποίος δεν προκαλεί επαγωγή ROS, δεν είναι κυτταροτοξικός και δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των δερματικών ινοβλαστών. Το οξειδωτικό στρες, όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία, προκαλεί πρόωρη κυτταρική γήρανση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με έκθεση των κυττάρων στον TNF- α μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα γηρασμένα αυτά κύτταρα παρουσιάζουν τον κλασικό φαινότυπο των γηρασμένων κυττάρων και παρόμοιο προφίλ γονιδιακής έκφρασης, δηλ. εκφράζουν ένα καταβολικό φαινότυπο. Είναι όμως ενδιαφέρον το ότι η πρόκληση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από έκθεση στον TNF- α δεν οφείλεται σε οξειδωτικό στρες, όπως έχει υποτεθεί στη βιβλιογραφία. Ο ακριβής μηχανισμός επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης είναι υπό διερεύνηση.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS), produced in the cells as a byproduct of various biochemical reactions, represent pivotal regulators of homeostasis. Under normal conditions they control important cellular functions, such as cellular signaling and proliferation, while at higher concentrations (a condition termed oxidative stress) they provoke damage in cellular macromolecules, leading to an inhibition of proliferation or even cell death. In addition, continuous exposure to non-cytotoxic concentrations of ROS can lead to premature senescence. Finally, many inflammatory cytokines can provoke oxidative stress and premature senescence.

In this work we studied the effect of the inflammatory cytokine TNF- α on human dermal fibroblasts, in comparison with a classical oxidative stress, i.e. the exposure of cells to H₂O₂. We found that high H₂O₂ concentrations are cytotoxic and inhibits cell proliferation. In contrast, TNF- α does not provoke ROS induction, is not cytotoxic and does not inhibit fibroblast proliferation. Oxidative stress, as is already mentioned in the literature, provokes premature senescence. Premature senescence is also provoked after a long-term exposure to TNF- α . These senescent cells express the classical senescent phenotype and gene expression profile, i.e. a catabolic phenotype. However, the TNF- α induced senescence is not due to an oxidative stress, as has been hypothesized in the literature. This mechanism is currently under investigation.