



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΗ/ΠΡΟΓΗΡΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ»**

**«STUDY OF PLANT FACTORS WITH ANTI-AGEING/PRE-AGEING
ACTIVITY IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS»**

*Σαγάνη Ευαγγελία
Του Γεωργίου-Σταύρου*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (επιβλέπουσα): Αναπληρώτρια
Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας - Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (συνεπιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής
Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (μέλος): Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν ξεκινήσω με την ανάλυση του θέματος της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τα άτομα που με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας, ο καθένας με τον τρόπο του.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, την κυρία Τραχανά, που με δέχτηκε στην ομάδα του εργαστηρίου καθώς και με καθοδηγούσε και με συμβούλευε κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής διαδικασίας και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα, Ζωζώ Ουτσκούνη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια, Χριστίνα Χριστοδούλου, για την ανεκτίμητη βοήθεια και τη συντροφικότητα στο εργαστήριο. Η καθοδήγησή τους και η προθυμία τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους ήταν πολύτιμη.

Επιπλέον είμαι ευγνώμων στους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Στάγκο και τον κύριο Δήμα, για τις συμβουλές και την υποστήριξή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένειά μου για τη συνεχή υποστήριξη, την υπομονή και την ενθάρρυνσή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική γήρανση είναι μία σταθερή και γενικά μη αναστρέψιμη έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο. Επάγεται ως απόκριση στο στρες που μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες όπως οξειδωτικό και γενotoξικό στρες, βράχυνση των τελομερών, ενεργοποίηση ογκογονιδίων, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ακτινοβολία ή χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Η γήρανση μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά ως αντικαρκινικός μηχανισμός που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των προνεοπλασματικών κυττάρων. Ωστόσο, η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων οδηγεί στη γήρανση του οργανισμού και τις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Η γήρανση των βλαστικών κυττάρων οδηγεί σε δυσλειτουργία της ομοιόστασης των ιστών, παρεμβαίνοντας στην ικανότητα των ιστών να επιδιορθώνονται και να αναγεννώνονται. Τα κύτταρα που εισέρχονται σε γήρανση υφίστανται διάφορες αλλαγές όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η αυξημένη λυσοσωμική δραστηριότητα, μορφολογικές και δομικές αλλαγές και, όπως αναφέρθηκε, η έκκριση ενός σύνθετου μείγματος κυρίως προφλεγμονωδών παραγόντων που ονομάζεται φαινότυπος έκκρισης που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype-SASP).

Η Τιλιροσίδη είναι ένα γλυκοζιτικό φλαβονοειδές που περιέχεται σε πολλά φαρμακευτικά και διατροφικά φυτά. Σύμφωνα με τη μελέτη των Chatzigeorgiou και συνεργατών (2017), υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η Τιλιροσίδη μπορεί να έχει αντιγηραντικές ιδιότητες. Η μελέτη τους πραγματοποιήθηκε σε μύγες *Drosophila melanogaster* και ανθρώπινους ινοβλάστες.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης της Τιλιροσίδης στην κυτταρική γήρανση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων της γέλης του Wharton. Η ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό δεικτών της γήρανσης, όπως της δραστηριότητας της β γαλακτοζιδάσης (προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal με μικροσκοπία) και την μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p16 και p21 (μέσω ανασοαποτύπωσης κατά Western).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως οι περισσότεροι δείκτες της γήρανσης βρίσκονταν σε χαμηλότερα επίπεδα στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία Τιλιροσίδης σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν με κανονικό θρεπτικό μέσο. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, εξάγεται το συμπέρασμα πως η Τιλιροσίδη δρα αποτρεπτικά στην εγκαθίδρυση της γήρανσης των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες προκειμένου να αποσαφηνιστεί η πιθανή αντιγηραντική της δράση.

ABSTRACT

Cellular senescence is a stable and generally irreversible exit from the cell cycle. It is induced in response to stress that may be caused by external or internal factors such as oxidative and genotoxic stress, telomere depletion, oncogene activation, mitochondrial dysfunction, radiation or chemotherapeutic agents. Senescence may act protectively as an anti-cancer mechanism that limits proliferation of preneoplastic cells. However, the accumulation of senescent cells leads to aging and age-related diseases. Stem cell senescence leads to dysfunction of tissue homeostasis, interfering with the ability of tissues to repair and regenerate. Cells entering senescence undergo various changes such as chromatin remodeling, increased lysosomal activity, morphological and structural changes and, as mentioned, secretion of a complex mixture of mainly pro-inflammatory factors called the senescence-associated secretory phenotype (SASP).

Tiliroside is a glucoside flavonoid contained in many medicinal and food plants. According to Chatzigeorgiou et al. (2017), there is evidence to support that Tiliroside may have anti-aging properties. However, their study was conducted on *Drosophila melanogaster* flies and human fibroblasts.

This thesis aims to study the effect of Tiliroside on cellular senescence of Wharton's jelly human mesenchymal stem cells. The detection of senescent cells was performed by detecting markers of senescence, such as β -galactosidase activity (determination of SA- β -gal activity by microscopy) and measuring protein levels of cell cycle inhibitors, p16 and p21 (by Western blotting).

The results of these methods revealed that most markers of senescence were at lower levels in cells cultured with Tiliroside solution than those cultured without. Based on these results, it is concluded that Tilirosid acts as a preventive agent in the establishment of senescence in human mesenchymal stem cells. However, more studies are needed to clarify its potential anti-ageing effect.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Εισαγωγή

1. Βλαστοκύτταρα

- 1.1 Είδη Βλαστοκυττάρων
- 1.2 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (MSCs)
- 1.3 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα γέλης Wharton (WJ-MSCs)

2. Κυτταρική Γήρανση

- 2.1 Είδη κυτταρικής γήρανσης
- 2.2 Αναστολή κυτταρικού κύκλου (σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης)
- 2.3 Φαινότυπος έκκρισης που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP)
- 2.4 Μεταβολικές προσαρμογές
- 2.5 Β γαλακτοζιδάση- Λυσοσώματα
- 2.6 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης
- 2.7 Αλλαγές στη μορφολογία
- 2.8 Βιοδείκτες

3. Τιλιοροσίδη

- 3.1 Φλαβονοειδή
- 3.2 Βιοδραστικές και φαρμακολογικές ιδιότητες της Τιλιοροσίδης
- 3.3 Βιοσύνθεση της Τιλιοροσίδης
- 3.4 Σχέση δομής-δραστικότητας της Τιλιοροσίδης

4. Σκοπός

B. Πειραματικό Μέρος

5. Υλικά και μέθοδοι

- 5.1 Κυτταρικό μοντέλο
- 5.2 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων γέλης του Wharton (WJ-MSCs)
 - 5.2.1 Υλικά καλλιέργειας
 - 5.2.2 Πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας
 - 5.2.3 Διαχείριση καλλιεργειών
- 5.3 Παρασκευή διαλύματος Τιλιοροσίδης
- 5.4 Μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal
- 5.5 Μέθοδος χρώσης trypan blue
- 5.6 Απομόνωση πρωτεϊνών
- 5.7 Μέθοδος Bradford
- 5.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

- 5.8.1 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE
- 5.8.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF
- 5.8.3 Επώαση μεμβράνης με πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα
- 5.8.4 Αποτύπωση σήματος αντισωμάτων

6. Αποτελέσματα

- 6.1 Προδιορισμός κυτταροτοξικότητας του διαλύματος Τιλιροσίδης
- 6.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal
- 6.3 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνών-δεικτών γήρανσης

7. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Γ. Βιβλιογραφία

A. Εισαγωγή

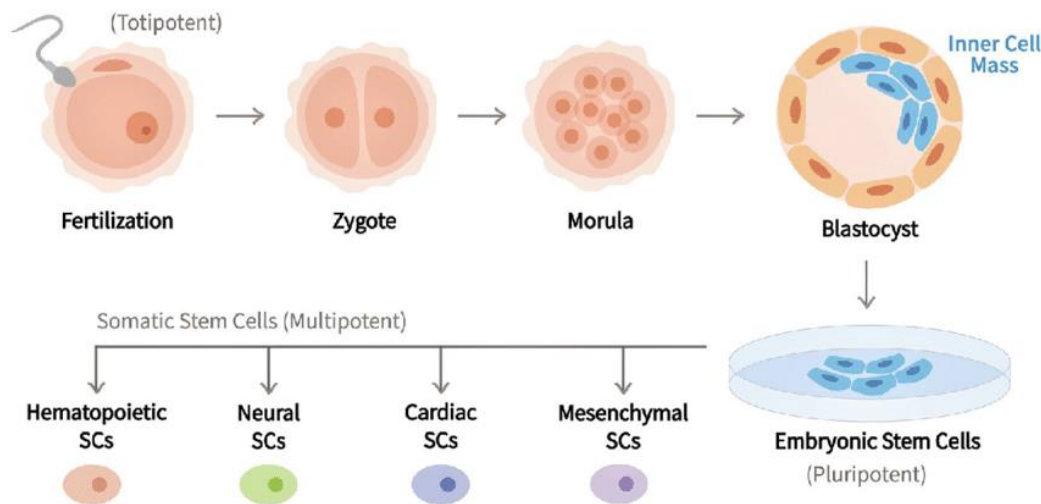
1. Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστικά κύτταρα είναι μη εξειδικευμένα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε οποιοδήποτε κύτταρο ενός οργανισμού και να αυτοανανεώνονται. Βλαστοκύτταρα υπάρχουν τόσο στο έμβρυο όσο και στους ενήλικους ανθρώπους (Zakrzewski et al., 2019).

1.1 Είδη βλαστοκυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησής τους (potency) δηλαδή το εύρος των κυτταρικών τύπων που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν. Υπάρχουν διάφορα στάδια δυναμικού διαφοροποίησης, το οποίο μειώνεται με κάθε βήμα (Zakrzewski et al., 2019).

- Τα παντοδύναμα βλαστοκύτταρα (totipotent) μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που σχηματίζουν όλο το έμβρυο και τις εξω-εμβρυακές δομές όπως τον πλακούντα και την τροφοβλάστη (Alison et al., 2002). Παντοδύναμο κύτταρο είναι, για παράδειγμα, το ζυγωτό (Zakrzewski et al., 2019).
- Τα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (pluripotent) σχηματίζουν τα κύτταρα και των τριών βλαστικών στρωμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα). Προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα του εμβρύου στο στάδιο πριν την εμφύτευσή του στη μήτρα.
- Τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (multipotent) εξειδικεύονται σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Για παράδειγμα, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν στα διάφορα κύτταρα του αίματος.
- Τα олиγοδύναμα βλαστοκύτταρα (oligopotent) μπορούν να σχηματίσουν μερικούς κυτταρικούς τύπους της κυτταρικής τους σειράς. Τα μυελοειδή βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε λευκά και ερυθρά κύτταρα του αίματος.
- Τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την μικρότερη ικανότητα διαφοροποίησης και την ιδιότητα να διαιρούνται επανειλημμένα. Μπορούν να σχηματίσουν μόνο έναν κυτταρικό τύπο (Zakrzewski et al., 2019).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της ιεραρχίας των βλαστοκυττάρων (Estrada-Meza et al., 2022)

Τα βλαστοκύτταρα διαχωρίζονται επίσης σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs), σε ενήλικα βλαστοκύτταρα (Adult Stem Cells, ASCs) (Ding et al., 2011), βλαστοκύτταρα προερχόμενα από περιγεννητικούς ιστούς και επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) (Taghizadeh et al., 2011; Zakrzewski et al., 2019).

- Εμβρυικά βλαστοκύτταρα απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης του εμβρύου, η οποία σχηματίζεται περίπου 5 μέρες μετά την γονιμοποίηση. Αυτά τα βλαστοκύτταρα είναι ολοδύναμα (pluripotent). Μπορούν επίσης να διαιρούνται για αρκετές εκατοντάδες ανακαλλιέργειες διατηρώντας την αδιαφοροποίητη κατάσταση τους και φυσιολογική χρωμοσωμική σύσταση (Chagastelles et al., 2011).
- Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ των διαφοροποιημένων κυττάρων σε όλο το ανθρώπινο σώμα. Προωθούν την επούλωση, την ανάπτυξη και την αντικατάσταση των κυττάρων που χάνονται καθημερινά. Τα ASCs είναι πολυδύναμα (multipotent) (Taghizadeh et al., 2011) και, ανάλογα τις κυτταρικές σειρές που μπορούν να σχηματίσουν, χωρίζονται σε μεσεγχυματικά, κύτταρα νευρικού συστήματος, αιμοποιητικά και δερματικά κύτταρα (Zakrzewski et al., 2019).
- Τα βλαστοκύτταρα προερχόμενα από περιγεννητικούς ιστούς είναι κύτταρα που λήφθηκαν από εξω-εμβρυικούς ιστούς όπως ο πλακούντας, η αμνιακή μεμβράνη και ο ομφάλιος λώρος (Marino et al., 2019). Είναι πολυδύναμα και κατέχουν χαρακτηριστικά και από τα εμβρυικά και από τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (Taghizadeh et al., 2011).
- Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) είναι τεχνητά αναπρογραμματισμένα ενήλικα βλαστοκύτταρα και λειτουργούν σαν ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (Zakrzewski et al., 2019). Οι Takahashi και Yamanaka (2006) εντόπισαν έναν συνδυασμό τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων που ήταν επαρκής για την επαγωγή πολυδυναμίας σε εμβρυϊκούς

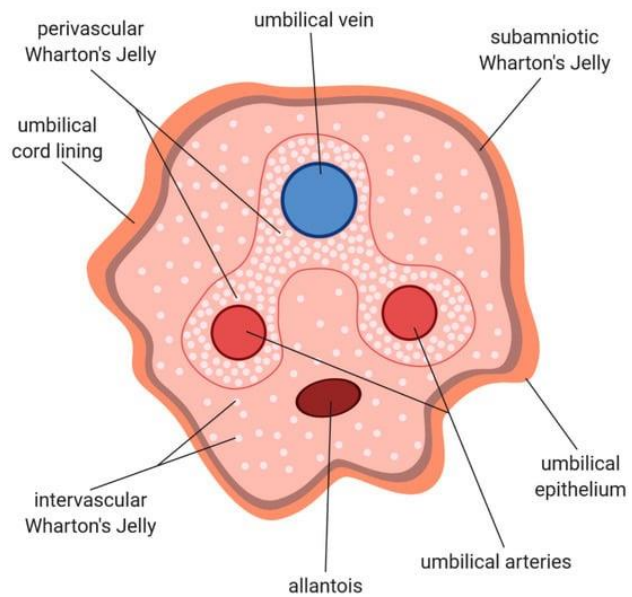
ινοβλάστες ποντικού: Oct4, Sox2, Klf4 και Myc (μαζί γνωστοί ως παράγοντες OSKM ή Yamanaka).

1.2 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (MSCs)

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα στρωματικά κύτταρα που διαφοροποιούνται κυρίως σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και αδιποκύτταρα (Lan et al., 2021) αλλά και σε κύτταρα μυών, ήπατος, πνευμόνων, νεύρων (Fortier 2005) και ινοβλαστών (Marino et al., 2019). Μορφολογικά τα MSCs στην αδιαφοροποίητη τους φάση έχουν σχήμα ατράκτου και μοιάζουν με ινοβλάστες (Campagnoli et al., 2001). Τα MSCs μπορούν να απομονωθούν από μια ποικιλία διάφορων ιστών, συμπεριλαμβανομένων του ομφάλιου λώρου, του μυελού των οστών, του λιπώδους ιστού (Ding et al., 2011) καθώς και του αμνιακού υγρού, του πλακούντα και του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Li et al., 2019). Οι ιστοί αυτοί αποτελούν πρακτικές πηγές για πειραματικές και κλινικές εφαρμογές λόγω της ποσότητας και ευκολίας στη συγκομιδή (Ding et al., 2011). Τα MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε κλινικές εφαρμογές, όπως η επούλωση χόνδρων, οστών και δερματικών τραυμάτων, νευρωνική και καρδιακή αναγέννηση και θεραπεία ανοσοποιητικών διαταραχών (Li et al., 2019).

1.3 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα γέλης Wharton (WJ-MSCs)

Η γέλη του Wharton είναι ο αρχέγονος βλεννώδης, συνδετικός ιστός του ομφάλιου λώρου που βρίσκεται μεταξύ του αμνιακού επιθηλίου και των ομφάλιων αγγείων (Taghizadeh et al., 2011). Είναι η ζελατινώδης μήτρα που περιβάλλει και προστατεύει τα αιμοφόρα αγγεία του ομφάλιου λώρου (Goyal et al., 2018). Τα κύτταρα που βρέθηκαν στη γέλη του Wharton είναι αρχέγονα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, πιθανότατα παγιδευμένα στη μήτρα του συνδετικού ιστού καθώς μετανάστευαν μέσω του αναπτυσσόμενου ομφάλιου λώρου, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Taghizadeh et al., 2011). Τα WJ-MSCs είναι περιγεννητικά βλαστοκύτταρα οπότε παρουσιάζουν ιδιότητες εμβρυικών βλαστοκυττάρων όπως συντομότερο χρόνο διπλασιασμού σε σχέση με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα και μια πιο εκτεταμένη ικανότητα επέκτασης ex vivo (Marino et al., 2019). Ήταν επίσης θετικά για τους μεσεγχυματικούς δείκτες CD (CD105, CD90, CD44), αρνητικά για CD34 και HLA, και παρόλο που εννέα από τους 10 γονιδιωματικούς δείκτες εμβρυικών βλαστικών κυττάρων ήταν ανιχνεύσιμοι, εκφράζονταν σε χαμηλά επίπεδα (Fong et al., 2007). Επίσης έχουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, που αφορούν τόσο τις έμφυτες όσο και τις προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα WJ-MSCs μπορούν να συλλεχθούν με ευκολία και δεν εγείρουν νομικά ή ηθικά ζητήματα (Marino et al., 2019).



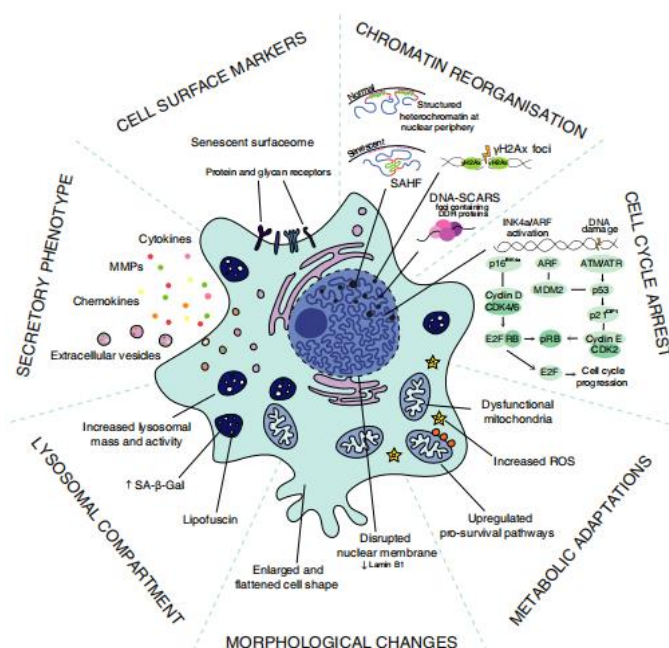
Εικόνα 2: Η σχηματική διατομή του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου που καλύπτεται από ένα εξωτερικό στρώμα ομφαλικού επιθηλίου και τρία ομφαλικά αγγεία ενσωματωμένα στη γέλη Wharton (Stefańska et al., 2020).

2. Κυτταρική γήρανση

Κυτταρική γήρανση είναι μία σταθερή και γενικά μη αναστρέψιμη έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο που προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού (Ruchi & Parmjit, 2021). Επάγεται ως απόκριση στο στρες που μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες όπως οξειδωτικό και γενετοξικό στρες, ενεργοποίηση ογκογονιδίων, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ακτινοβολία ή χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (Herranz & Gil, 2018). Τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν βιώσιμα με αλλαγές στη μεταβολική δραστηριότητα και είναι συνήθως ανθεκτικά στην απόπτωση (Zhu et al., 2015).

Η γήρανση και η απόπτωση είναι εναλλακτικές κυτταρικές μοίρες που συχνά μπορούν να πυροδοτηθούν από τους ίδιους στρεσογόνους παράγοντες. Ενώ δεν έχουμε πλήρη κατανόηση του τι κάνει το κύτταρο να αποφασίσει μεταξύ του ενός και του άλλου προγράμματος, πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί που να κλειδώνουν αυτές τις αποφάσεις (Herranz & Gil, 2018).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, τα γηρασμένα κύτταρα υπόκεινται σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης και σε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Chandra et al., 2015). Χαρακτηριστικά επίσης γνωρίσματα των γηρασμένων κυττάρων είναι η αυξημένη λυσοσωμική δραστηριότητα, βλάβες μακρομορίων, και έκκριση ενός σύνθετου μείγματος κυρίως προφλεγμονωδών παραγόντων που ονομάζεται φαινότυπος έκκρισης που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype - SASP) (Herranz & Gil, 2018). Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν επίσης να αναπτύξουν μορφολογικές και δομικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης μιας πεπλατυσμένης, πολυπύρρνης μορφολογίας με διευρυμένα κενά, διεύρυνση του πυρήνα, αλλοιωμένη σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης και τροποποίηση των πρωτεϊνών της (Ruchi & Parmjit, 2021).

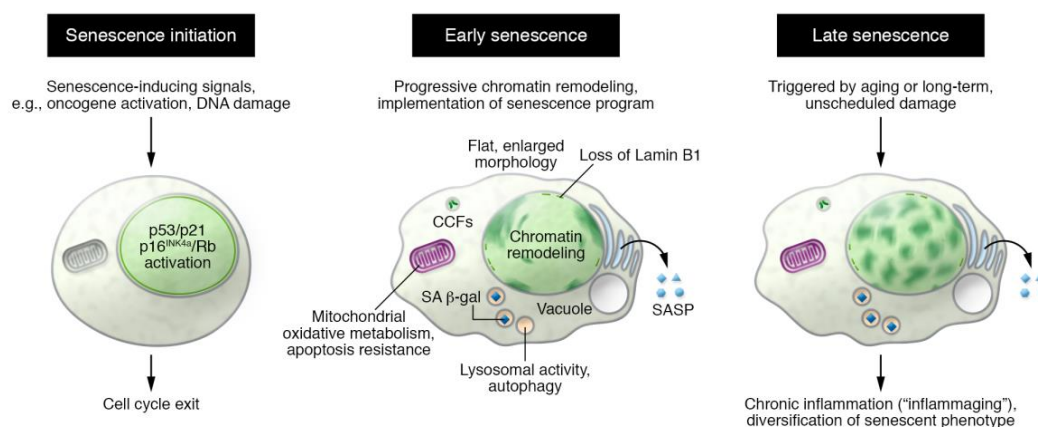


Εικόνα 3: Γενικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης (González-Gualda et al., 2021)

Τα γηρασμένα κύτταρα επηρεάζουν την έκβαση πολλών φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία (Huang et al., 2022). Η γήρανση εμπλέκεται στην ανάπτυξη, την αναδιαμόρφωση και την ομοιοστάση των ιστών. Η γήρανση μπορεί επίσης να λειτουργεί προστατευτικά ως αντικαρκινικός μηχανισμός που αποτρέπει τις κακοήθειες περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των προνεοπλασματικών κυττάρων (Aravinthan, 2015). Ωστόσο, η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων οδηγεί στη γήρανση του οργανισμού και τις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Η γήρανση των βλαστικών και προγονικών κυττάρων θα μπορούσε να εμποδίσει την ομοιοστάση των ιστών παρεμβαίνοντας στην ικανότητα των ιστών να επιδιορθώνονται και να αναγεννώνται (Herranz & Gil, 2018).

2.1 Είδη κυτταρικής γήρανσης

Η γήρανση είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων. Τα αρχικά σήματα που προκαλούν γήρανση, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίου ή βλάβη στο DNA, αρκούν για την έναρξη της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο. Έπειτα τα γηρασμένα κύτταρα αναδιαμορφώνουν σταδιακά την χρωματίνη και επάγουν άλλες πτυχές του προγράμματος γήρανσης, όπως το SASP, για να εισέλθουν σε ένα δεύτερο στάδιο "πλήρους γήρανσης". Αν αυτά τα κύτταρα παραμείνουν σε γήρανση για μεγάλο χρονικό διάστημα, εισέρχονται στο τρίτο στάδιο, την "όψιμη γήρανση", η οποία μπορεί να περιλαμβάνει προσαρμογή και διαφοροποίηση του φαινοτύπου γήρανσης. Οι αντιδράσεις στη γήρανση που συμβαίνουν *in vivo* μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους. Η οξεία γήρανση φαίνεται να είναι μια διαδικασία που ενεργοποιείται ως απάντηση σε διακριτούς στρεσογόνους παράγοντες, εγκαθίσταται με γρήγορη κινητική και κανονικά συμβάλλει στην ομοιοστάση των ιστών. Αντίθετα, η χρόνια γήρανση μπορεί να είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας απρογραμματίστης βλάβης και συχνά συνδέεται με τη γήρανση του οργανισμού. Μόνο η χρόνια γήρανση σχετίζεται με την παρουσία κυττάρων σε κατάσταση όψιμης γήρανσης (Herranz & Gil, 2018).



Εικόνα 4: Φαινοτυπικές μεταβολές που σχετίζονται με την έναρξη της γήρανσης, την πρώιμη και την όψιμη φάση της γήρανσης (Herranz & Gil, 2018)

Τα κύτταρα μπορούν να υποστούν γήρανση ως απόκριση σε διάφορα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της προοδευτικής συντόμευσης των τελομερών, των αλλαγών στην τελομερική δομή, των μιτογόνων σημάτων, της ογκογόνου ενεργοποίησης, του οξειδωτικού και γενοτοξικού στρες, των επιγενετικών αλλαγών, της αποδιοργάνωσης της χρωματίνης, της διαταραγμένης πρωτεόστασης, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, της φλεγμονής και/ή των σημάτων ιστικής βλάβης, της ακτινοβολίας ή των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, της στέρσης θρεπτικών συστατικών (Ruchi & Parmjit, 2021). Αυτοί οι διαφορετικοί τύποι σημάτων στρες προκαλούν διαφορετικούς τύπους γήρανσης, όπως αναδιπλασιαστική γήρανση εξαρτώμενη από τα τελομερή, προγραμματισμένη γήρανση, επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση (SIPS), επαγόμενη από ογκογονίδια γήρανση (OIS), γήρανση επαγόμενη από βλάβη του DNA, γήρανση που προκαλείται από διαταραχή της χρωματίνης και γήρανση σχετιζόμενη με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Ruchi & Parmjit, 2021; Campisi et al., 2007). Μια εκτεταμένη μελέτη των Petrova et al. (2016) εντόπισε περισσότερες από 50 μικρές χημικές ενώσεις που μπορούν να προκαλέσουν πρόωρη γήρανση και καταστάσεις που μοιάζουν με γήρανση. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία με ορισμένους αντικαρκινικούς παράγοντες, χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί "γήρανση που προκαλείται από τη θεραπεία (TIS)" στα καρκινικά κύτταρα (Petrova et al., 2016).

Αναδιπλασιαστική γήρανση εξαρτώμενη από τα τελομερή

Τα τελομερή είναι τμήματα επαναλαμβανόμενου DNA και σχετικές πρωτεΐνες που καλύπτουν τα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων και τα προστατεύουν από την αποικοδόμηση ή τη σύντηξη από τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA (Gorgoulis et al., 2019). Η ακριβής τελομερική δομή δεν είναι γνωστή, αλλά πιστεύεται ότι τα τελομερή των θηλαστικών καταλήγουν σε μια μεγάλη κυκλική δομή, που ονομάζεται tloop (Campisi et al., 2007). Επειδή οι DNA πολυμεράσες δεν μπορούν να αντιγράψουν πλήρως τα άκρα του DNA, ένα φαινόμενο που ονομάζεται πρόβλημα της αντιγραφής των άκρων, τα κύτταρα χάνουν 50-200 ζεύγη βάσεων τελομερικού DNA κατά τη διάρκεια κάθε φάσης S (Rossiello et al., 2022; Campisi et al., 2007). Το μήκος των ανθρώπινων τελομερών κυμαίνεται από μερικές χιλιοβάσεις έως 10-15 kb, οπότε είναι δυνατές πολλές κυτταρικές διαιρέσεις προτού το πρόβλημα της τελικής αντιγραφής καταστήσει τα τελομερή δυσλειτουργικά. Μόνο ένα ή λίγα τέτοια τελομερή αρκούν για να πυροδοτήσουν τη γήρανση. Το πρόβλημα της αντιγραφής των τελομερών είναι ένας σημαντικός (αλλά όχι ο μοναδικός) λόγος για τον οποίο τα φυσιολογικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται επ' άπειρον (Campisi et al., 2007). Τα δυσλειτουργικά τελομερή πυροδοτούν μια κλασική απόκριση βλάβης του DNA (DDR). Η DDR επιτρέπει στα κύτταρα να αντιλαμβάνονται το κατεστραμμένο DNA, ιδίως τις ρήξεις διπλής έλικας, και να αντιδρούν σταματώντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και επιδιορθώνοντας τη βλάβη, αν είναι δυνατόν (Huang et al., 2022). Το πρόβλημα της αντιγραφής των τελομερών μπορεί να παρακαμφθεί με την τελομεράση. Αυτό το ένζυμο περιέχει ένα καταλυτικό πρωτεϊνικό συστατικό (αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης-

TERT) και ένα συστατικό RNA-πρότυπο και προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις DNA απευθείας στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα δεν εκφράζουν την TERT ή την εκφράζουν σε επίπεδα που είναι πολύ χαμηλά για να αποτρέψουν τη μείωση των τελομερών. Αντίθετα, τα γεννητικά κύτταρα και πολλά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την TERT (Collins & Mitchell, 2002). Επιπλέον, η έκφραση της TERT σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα αποτρέπει ταυτόχρονα τη συντόμευση των τελομερών και τη γήρανση που προκαλείται από το πρόβλημα της τελικής αντιγραφής. Ωστόσο, η τελομεράση δεν μπορεί να αποτρέψει τη γήρανση που προκαλείται από μη τελομερική βλάβη του DNA ή άλλους επαγωγείς γήρανσης (Campisi et al., 2007).

Γήρανση που προκαλείται από βλάβη του DNA

Το οξειδωτικό στρες, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η γ-ακτινοβολία και πολλά φάρμακα χημειοθεραπείας προκαλούν σοβαρές βλάβες στο DNA (Herranz & Gil, 2018). Η σοβαρή βλάβη του DNA που εμφανίζεται οπουδήποτε στο γονιδίωμα προκαλεί γήρανση σε πολλούς τύπους κυττάρων, ιδίως οι βλάβες που δημιουργούν σπασίματα διπλών αλυσίδων. Τόσο η γήρανση που προκαλείται από βλάβες όσο και η γήρανση που ξεκινά από τελομερή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την p53 και συνήθως συνοδεύεται από έκφραση της p21 (Ruchi & Parmjit, 2021). Ωστόσο, σε πολλά κύτταρα, η βλάβη του DNA και τα δυσλειτουργικά τελομερή επάγουν επίσης την p16. Η p16, λοιπόν, παρέχει ένα δεύτερο εμπόδιο για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης κυττάρων με σοβαρά κατεστραμμένο DNA ή δυσλειτουργικά τελομερή και όπως είναι αναμενόμενο επάγουν γήρανση στα φυσιολογικά κύτταρα (Campisi et al., 2007).

Γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια

Η ενεργοποίηση της ογκογένεσης είναι γνωστή ως κρίσιμος μηχανισμός για την έναρξη και την ανάπτυξη του καρκίνου. Παρόλο που η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μπορεί να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ο οποίος αναγνωρίζεται ως γεγονός που προάγει τον όγκο σε πολλούς τύπους καρκίνου, μπορεί να λειτουργήσει ως γενετικό στρες και να προκαλέσει μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης σε καλλιεργημένα κύτταρα και ιστούς όγκων (Liu et al., 2018). Η απόκριση στην βλάβη του DNA έχει ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στη διατήρηση της γήρανσης που προκαλείται από ογκογονίδια (Campisi et al., 2007). Η γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια (Oncogene-induced senescence, OIS) μπορεί επίσης να προκληθεί από την ενεργοποίηση άλλων ογκογονιδίων, όπως τα BRAF, AKT, E2F1 και κυκλίνη E, και από την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των PTEN και NF1. Το επίπεδο έκφρασης των ογκογονιδίων φάνηκε να είναι σημαντικό για την επαγωγή της OIS, καθώς μελέτες αποκάλυψαν ότι η γήρανση που προκαλείται από το ογκογόνο Ras συνέβη μόνο όταν το Ras υπερεκφράζεται (Liu et al., 2018).

Επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση

Η επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση (SIPS) μπορεί να οριστεί ως οι παρατεταμένες επιδράσεις υποκυτταροτοξικού στρες σε πολλαπλασιαστικούς τύπους κυττάρων, με αποτέλεσμα την μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης της πλειονότητας του κυτταρικού πληθυσμού (Toussaint et al., 2002). Τα κύτταρα σε αναδιπλασιαστική γήρανση έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα σε SIPS: μορφολογία, δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με τη γήρανση, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, γονιδιακή έκφραση και μείωση των τελομερών (Toussaint et al., 2000). Πολλές πειραματικές μελέτες που έχουν σκοπό τη μελέτη της γήρανσης, χρησιμοποιούν πρωτόκολλα χρόνιου και οξέος οξειδωτικού στρες για την επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης *in vitro*. Υποκυτταροτοξικό στρες μπορεί να προκληθεί στα κύτταρα μέσω έκθεσης τους σε UV, tert-βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο (t-BHP), H₂O₂, αιθανόλη, μιτομυκίνη C, υπεροξία, γ-ακτινοβολίες, ομοκυστεΐνη, υδροξυουρία κ.λπ. (Toussaint et al., 2002; Toussaint et al., 2000).

Προγραμματισμένη κυτταρική γήρανση

Η προγραμματισμένη κυτταρική γήρανση έχει προταθεί ότι εξυπηρετεί αναπτυξιακές και μορφογενετικές λειτουργίες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Da Silva-Álvarez et al., 2020; de Lope et al., 2023). Οι παράγοντες του SASP μπορούν να βελτιστοποιήσουν τη μορφογένεση ορισμένων δομών στο έμβρυο και να δρομολογήσουν τον πλακούντα στον τοκετό (Wiley & Campisi, 2021). Η προγραμματισμένη κυτταρική γήρανση συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και έχει παρατηρηθεί σε εξελικτικά απομακρυσμένους οργανισμούς όπως τα θηλαστικά, τα αμφίβια, τα πτηνά και τα ψάρια. Η προγραμματισμένη κυτταρική γήρανση είναι ένας φαινότυπος παρόμοιος με αυτόν της γήρανσης επαγόμενης από το στρες (Domínguez-Bautista et al., 2021).

Η γήρανση που προκαλείται από διαταραχή της χρωματίνης

Η κατάσταση της χρωματίνης καθορίζει τον βαθμό στον οποίο τα γονίδια είναι ενεργά (ευχρωματίνη) ή σιωπηλά (ετεροχρωματίνη) και εξαρτάται κυρίως από τις τροποποιήσεις των ιστονών (ακετυλίωση και μεθυλίωση) (Chandra et al., 2012). Η χημική αναστολή της αποακετυλάσης των ιστονών (HDAi), προάγει το σχηματισμό ευχρωματίνης και επάγει τη γήρανση. Ωστόσο, η γήρανση που προκαλείται από την αναστολή της HDAi φαίνεται να έρχεται σε σύγκρουση με το εύρημα ότι η υπορύθμιση μιας ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών προάγει το σχηματισμό ετεροχρωματίνης και προκαλεί γήρανση. Δεν είναι γνωστό πώς η γήρανση μπορεί να προκληθεί τόσο από τη διαταραχή της ετεροχρωματίνης όσο και από δραστηριότητες που σχετίζονται με το σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Η κατανόηση αυτού του παραδόξου θα μπορούσε να είναι σημαντική, επειδή η HDAi υπόσχεται τη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου (Campisi et al., 2007).

Γήρανση σχετιζόμενη με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Πολλοί παράγοντες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας οδηγούν επίσης σε κυτταρική γήρανση. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, αναστολές της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, απώλεια της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης HSPA9, απώλεια της μιτοχονδριακής πρωτεϊνικής αποακετυλάσης SIRT3 και της SIRT5 και διαταραχές στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος I (Wiley et al., 2016; Wiley & Campisi, 2021). Αυτός ο φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση που σχετίζεται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (MiDAS) δεν διαθέτει αρκετά από τα προφλεγμονώδη μέρη του SASP, αλλά αντίθετα περιλαμβάνει το δικό του ξεχωριστό σύνολο παραγόντων SASP (Wiley & Campisi, 2021). Η MiDAS οδηγείται κυρίως από τη συσσώρευση του κυτταρικού NADH, το οποίο κανονικά οξειδώνεται από τα μιτοχόνδρια σε NAD⁺ (Wiley et al., 2016). Αυτή η μείωση του λόγου NAD⁺/NADH αναστέλλει το βασικό γλυκολυτικό ένζυμο, GAPDH, με αποτέλεσμα την εξάντληση του ATP, την ενεργοποίηση της AMPK και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν πηγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) (Wiley & Campisi, 2021). Η απώλεια της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD2) σε ποντίκια οδηγεί στην κυτταρική γήρανση (Velarde et al., 2012). Παρομοίως, τα μιτοχονδριακά ROS μπορούν να ενεργοποιήσουν την N-τελική κινάση JUN, η οποία με τη σειρά της προάγει την απελευθέρωση κυτταροσωλικών θραυσμάτων χρωματίνης και την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών συστατικών του SASP. Επομένως, πολλές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα ROS που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια μπορεί να αποτελούν βασικό παράγοντα της κυτταρικής γήρανσης (Wiley & Campisi, 2021).

Άλλοι παράγοντες που προκαλούν γήρανση

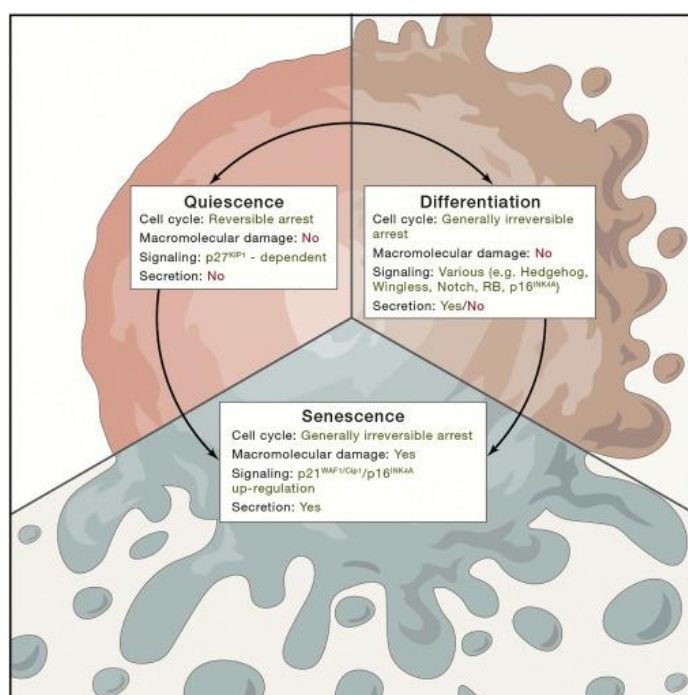
Η συνεχής σηματοδότηση από ορισμένες αντιπολλαπλασιαστικές κυτταροκίνες, όπως η ιντερφερόνη-β, προκαλεί επίσης γήρανση. Η οξεία διέγερση της ιντερφερόνης-β αναστρέφει αντιστρέφτα την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά η χρόνια διέγερση αυξάνει τις ενδοκυττάριας ρίζες οξυγόνου και προκαλεί μια απόκριση στη βλάβη του DNA και γήρανση (Moiseeva et al., 2006). Ομοίως, η χρόνια σηματοδότηση από τον μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β), έναν αναστολέα του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων, προκαλεί γήρανση προωθώντας τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης (Zhang & Cohen, 2004). Τέλος, το φαινόμενο που αναφέρεται ως στρες κυτταρικής καλλιέργειας ή "σοκ καλλιέργειας" οφείλεται σε ανεπαρκείς συνθήκες ανάπτυξης και μπορεί επίσης να προκαλέσει γήρανση, ανεξάρτητα από τα τελομερή (Campisi et al., 2007).

2.2 Αναστολή κυτταρικού κύκλου (σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης)

Πολύπλοκοι οργανισμοί όπως τα θηλαστικά περιέχουν τόσο μιτωτικά όσο και μεταμιτωτικά κύτταρα. Η κυτταρική γήρανση περιορίζεται στα μιτωτικά κύτταρα, από τα οποία μπορεί να προκύψει καρκίνος (Campisi et al., 2007). Αν και τα μιτωτικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται, μπορούν επίσης να περάσουν μεγάλα χρονικά διαστήματα σε μια αναστρέψιμη κατάσταση παύσης που ονομάζεται ηρεμία ή G0 (Ruchi & Parmjit, 2021). Τα κύτταρα ηρεμίας μπορούν να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό σε απόκριση σε κατάλληλα σήματα, συμπεριλαμβανομένης της ανάγκης για επιδιόρθωση ή αναγέννηση ιστών (Gorgoulis et al., 2019). Αντίθετα, τα μεταμιτωτικά κύτταρα χάνουν μόνιμα την ικανότητα να διαιρούνται λόγω διαφοροποίησης (Campisi et al., 2007).

Τα μιτωτικά κύτταρα μπορούν να γεράσουν όταν συναντήσουν δυνητικά ογκογόνα γεγονότα (Campisi et al., 2007). Όταν συμβαίνει αυτό, τα κύτταρα σταματούν τον πολλαπλασιασμό μη αναστρέψιμα, γνωστό ως αναστολή του κυτταρικού κύκλου η οποία συμβαίνει στη φάση G1 ή ενδεχομένως G2 (Huang et al., 2022). Τα γηρασμένα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σε μιτογόνους ή αναπτυξιακούς παράγοντες. Γι' αυτό δεν μπορούν να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο ακόμα και σε ευνοϊκές συνθήκες (Herranz & Gil, 2018). Συχνά γίνονται ανθεκτικά στα σήματα κυτταρικού θανάτου (αντίσταση στην απόπτωση) και αποκτούν εκτεταμένες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Μαζί, αυτά τα χαρακτηριστικά συνθέτουν τον φαινότυπο γήρανσης (Campisi et al., 2007).

Τα γηρασμένα κύτταρα διαφέρουν επίσης από τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία επίσης αποσύρονται μη αναστρέψιμα από τον κυτταρικό κύκλο (Gorgoulis et al., 2019). Η πλήρης διαφοροποίηση είναι το αποτέλεσμα ενός καθορισμένου αναπτυξιακού προγράμματος ενώ η γήρανση εφαρμόζεται κυρίως ως κυτταρική απόκριση στο στρες. Τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν επίσης να υποστούν γήρανση. (Herranz & Gil, 2018).



Εικόνα 5: Αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα σε γήρανση, ηρεμία και τελική διαφοροποίηση (Gorgoulis et al., 2019)

Η έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο ελέγχεται από την ενεργοποίηση των p53/p21^{CIP1} και p16^{INK4a}/RB μονοπατιών (Herranz & Gil, 2018). Και στα δύο μονοπάτια, ο τελικός στόχος είναι η πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (RB), η οποία στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή προσδένεται στον E2F, έναν μεταγραφικό παράγοντα που προωθεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τη μετάβαση στη φάση S. Ωστόσο, όταν ο E2F είναι συνδεδεμένος με τον RB, δεν μπορεί να στοχεύσει τους υποκινητές των γονιδίων που στοχεύει φυσιολογικά, το οποίο αποτρέπει την μεταγραφή των γονιδίων και ως αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται (González-Gualda et al., 2021).

Μονοπάτι p16^{INK4a}/RB

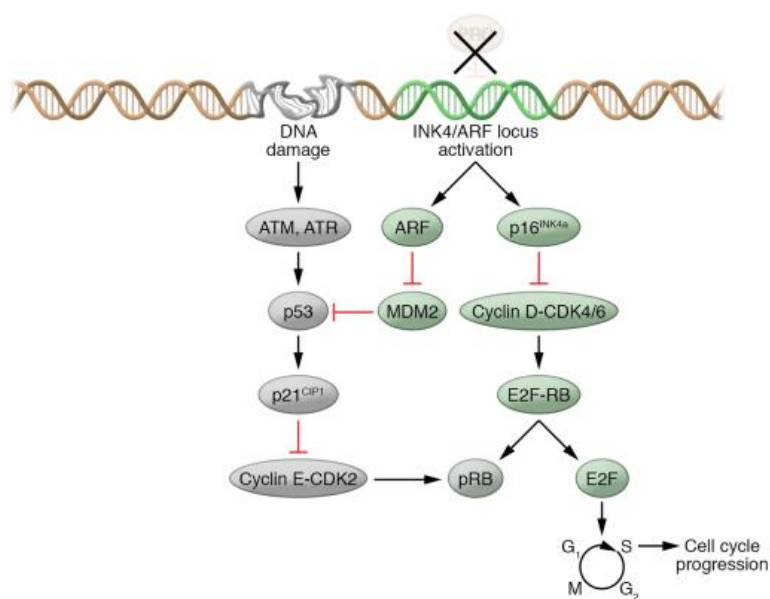
Ο γενετικός τόπος INK4/ARF κωδικοποιεί για τρεις καταστολείς όγκων: ARF (p14^{ARF} στους ανθρώπους και p19^{ARF} στα ποντίκια) και p16^{INK4a} (Herranz & Gil, 2018). Κατά την ενεργοποίηση της του γενετικού τόπου INK4a/ARF, η πρωτεΐνη p16^{INK4a}, ένας αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CDKI), αναστέλλει επιλεκτικά τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες 4 ή 6 (CDK4 και CDK6), οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο με την CyclinD (Herranz & Gil, 2018; González-Gualda et al., 2021). Το σύμπλοκο CDK4/6-CyclinD επιτρέπει την αποφωσφορυλίωση και τη σταθεροποίηση του RB-E2F και, συνεπώς, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (González-Gualda et al., 2021).

Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της p16^{INK4a} είναι από τις συχνότερες στους κακοήθεις καρκίνους του ανθρώπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απώλεια της p16^{INK4a} επιτρέπει την παράκαμψη της γήρανσης και την εξέλιξη του όγκου. Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο τόπος INK4/ARF αποσιωπάται από τα κατασταλτικά σύμπλοκα Polycomb PRC1 και PRC2 (Bracken et al., 2007). Έτσι, η αναστολή των PRC1 ή PRC2, αρκεί για να ενεργοποιήσει την p16^{INK4a} και να προκαλέσει γήρανση. Η p16^{INK4a} ξεχωρίζει ως ένας από τους πιο ειδικούς δείκτες γήρανσης in vivo. Ενώ η έκφραση της p16^{INK4a} είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη σε νεαρούς υγιείς οργανισμούς, αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και της γήρανσης (Herranz & Gil, 2018).

Μονοπάτι p53/p21^{CIP1}

Στο μονοπάτι p53/ p21^{CIP1}, το p53 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης (p-p53) μετά από ένα επιβλαβές για το DNA ερέθισμα και στη συνέχεια ρυθμίζει την παροδική έκφραση του αναστολέα κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης p21^{CIP1} (Herranz & Gil, 2018). Η p21^{CIP1} αναστέλλει στη συνέχεια το συμπλόκου CDK2-κυκλίνη E, η οποία επιτρέπει την αποφωσφορυλίωση της RB που οδηγεί στην πρόσδεσή της στον E2F για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (González-Gualda et al., 2021). Εάν το στρες που πυροδοτεί τη γήρανση είναι παροδικό, η επαγωγή του p53 μπορεί να

θέσει σε ισχύ κατάσταση ηρεμίας και να ενεργοποιήσει τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Μετά την επίλυση του στρες, τα κύτταρα μπορούν να συνεχίσουν την κυκλική λειτουργία (Aravinthan, 2015). Έχει προταθεί ότι ο ρόλος της p21^{CIP1} μπορεί να περιορίζεται στην έναρξη της γήρανσης, ενώ η p16^{INK4a} διατηρεί μια διαρκή αναπτυξιακή αναστολή, γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικά ρυθμιζόμενων φάσεων γήρανσης (Childs et al., 2015). Αν και η επαγωγή της p21^{CIP1} είναι σημαντική για την έναρξη της γήρανσης, η έκφρασή της δεν επιμένει απαραίτητως στα γηρασμένα κύτταρα (Herranz & Gil, 2018).



Εικόνα 6: Τα μονοπάτια p16^{INK4a}/Rb και p53/p21^{CIP1} (Herranz & Gil, 2018)

2.3 Φαινότυπος έκκρισης που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP)

Ο φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP), μπορεί να οριστεί ως ένα εξαιρετικά μεταβλητό, δυναμικό και μακροχρόνιο πρόγραμμα των γηρασμένων κυττάρων, το οποίο περιλαμβάνει την άφθονη έκκριση παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό και τη διαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) στο μικροπεριβάλλον των ιστών (Cuollo et al., 2020; Salama et al., 2014). Έρευνες σχετικά με τον SASP έχουν καταδείξει την παρουσία πολυάριθμων κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και μεταλλοπρωτεϊνών (Herranz & Gil, 2018). Το φάσμα των εκκρινόμενων μορίων φαίνεται να είναι τόσο ευρύ και διαφοροποιημένο, ώστε έχουν προταθεί αντιφατικές ερμηνείες σχετικά με το ρόλο του SASP στην παθοφυσιολογία των χρόνιων ασθενειών.

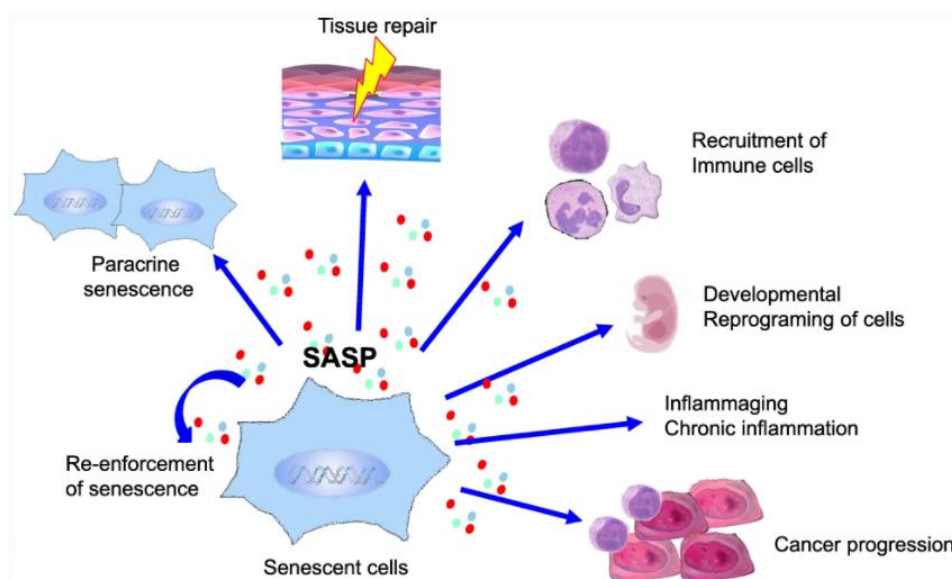
Ο τύπος και η ισχύς του ερεθίσματος που προκαλεί τη γήρανση και η ταυτότητα του κυττάρου που υφίσταται γήρανση καθορίζουν τη σύνθεση του εκκρίματος. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εντοπίζονται σχεδόν πάντα, και συγκεκριμένα οι ιντερλευκίνες 1, 6 και 8 (IL-1, IL-6, IL-8), η GROα/β, ο παράγοντας

διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), οι μεταλλοπρωτεϊνάσες 1, 3 και 10 (MMP-1, MMP-3, MMP-10), το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1), ο αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1) και πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον αυξητικό παράγοντα που μοιάζει με ινσουλίνη (IGFBPs) (Cuollo et al., 2020).

Πολλά μέλη του SASP παράγονται ως διαλυτές πρωτεΐνες που μπορούν να μεταφερθούν απευθείας στο εξωκυττάριο περιβάλλον, αλλά ορισμένοι παράγοντες εκφράζονται αρχικά ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και πρέπει να απελευθερωθούν στον εξωκυττάριο χώρο με αποκόλληση του εξωτερικού τμήματος (Hernandez-Segura et al., 2018). Η ADAM17 είναι ένα ένζυμο που συνδέεται με τη μεμβράνη και διασπά εξωκυτταρικά τμήματα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και ρυθμίζει την αποκόλληση του εξωτερικού τμήματος αρκετών παραγόντων SASP από την κυτταρική μεμβράνη (Effenberger et al., 2014). Επιπλέον, ορισμένα μέλη του SASP εκκρίνονται μέσω μικρών εξωκυτταρικών κυστιδίων που, αφού απελευθερωθούν από γηρασμένα κύτταρα, μπορούν να ασκήσουν μια πιο απομακρυσμένη λειτουργία, για παράδειγμα ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Takasugi et al., 2017). Ειδικότερα, η βιογένεση αυτών των κυστιδίων εξαρτάται από το p53 (Hernandez-Segura et al., 2018).

Ο SASP μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις σε καταστάσεις όπως ο καρκίνος και οι διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία, αλλά είναι επίσης υπεύθυνος για την ανοσολογική απόκριση η οποία έχει προστατευτικό ρόλο. Πράγματι, ο SASP έχει τη δυνατότητα να προσελκύει κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κοντά σε καρκινικά κύτταρα και προ-κακοήθεις βλάβες ή να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων που προκαλούνται από φάρμακα (Cuollo et al., 2020). Υπάρχουν ποικίλες επιδράσεις του SASP που εξαρτώνται από το πλαίσιο και τη θέση του κυττάρου που λαμβάνει το σήμα. Αυτές οι επιδράσεις περιλαμβάνουν την προογκογένεση (παρακρινής), την ανοσοδιαμόρφωση (παρακρινής), την ενίσχυση της γήρανσης (παρακρινής και αυτοκρινής) και τη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των ιστών (παρακρινής) (Salama et al., 2014). Η διακυτταρική επικοινωνία μέσω της σηματοδότησης NOTCH είναι απαραίτητη για τις επιδράσεις των γηρασμένων κυττάρων στο μικροπεριβάλλον (Cuollo et al., 2020; Hernandez-Segura et al., 2018). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι οι παράγοντες SASP προάγουν την αναδιοργάνωση των εμβρυϊκών δομών και συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση και επιδιόρθωση των ιστών. Αντίθετα, η χρόνια παρουσία ορισμένων προφλεγμονωδών και ιστικής αναδιαμόρφωσης παραγόντων, όπως οι ιντερλευκίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs), έχει συσχετιστεί με καταστάσεις ασθενειών και φαινότυπους γήρανσης (Hernandez-Segura et al., 2018).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης του SASP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον ορισμό διαφορετικών προγραμμάτων γήρανσης. Για παράδειγμα, τα γηρασμένα κύτταρα που σχετίζονται με την επιδιόρθωση των ιστών εκφράζουν αρκετές MMPs και αυξητικούς παράγοντες, όπως ο PDGF-A και ο VEGF, ενώ τα γηρασμένα κύτταρα που σχετίζονται με την ηλικία ή επάγονται από τη χημειοθεραπεία σχετίζονται κυρίως με φλεγμονώδεις παράγοντες (Hernandez-Segura et al., 2018).



Εικόνα 7: Η επίδραση των παραγόντων του SASP (Ohtani, 2022)

Οι μηχανισμοί πίσω από την ρύθμιση και την εγκαθίδρυση του SASP φαίνονται εξαιρετικά πολύπλοκοι και δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Ωστόσο, είναι σίγουρα γνωστό ότι ο SASP ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της μετάφρασης, της σταθερότητας του mRNA και της έκκρισης. Είναι επίσης σαφές ότι ο SASP βασίζεται σε αυτοκρινείς και παρακρινείς βρόχους θετικής ανατροφοδότησης που προκαλούν ισχυρή ενίσχυση του σήματος (Cuollo et al., 2020).

Η επίμονη σηματοδότηση της απόκρισης βλάβης του DNA, όταν δεν καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο, επάγει τη κυτταρική γήρανση και οδηγεί στην ανάπτυξη φαινοτύπων που σχετίζονται με τη γήρανση, συμπεριλαμβανομένου του SASP. Ωστόσο, η απόκριση στην βλάβη του DNA δεν είναι ο μοναδικός ρυθμιστής, δεδομένου ότι η παροδική βλάβη του DNA δεν επάγει τη γήρανση και το SASP. Επιπλέον, η απόκριση στην βλάβη του DNA ενεργοποιείται λίγο μετά τη βλάβη, ενώ ο SASP αναπτύσσεται συνήθως αρκετές ημέρες αργότερα (Rodier et al., 2009).

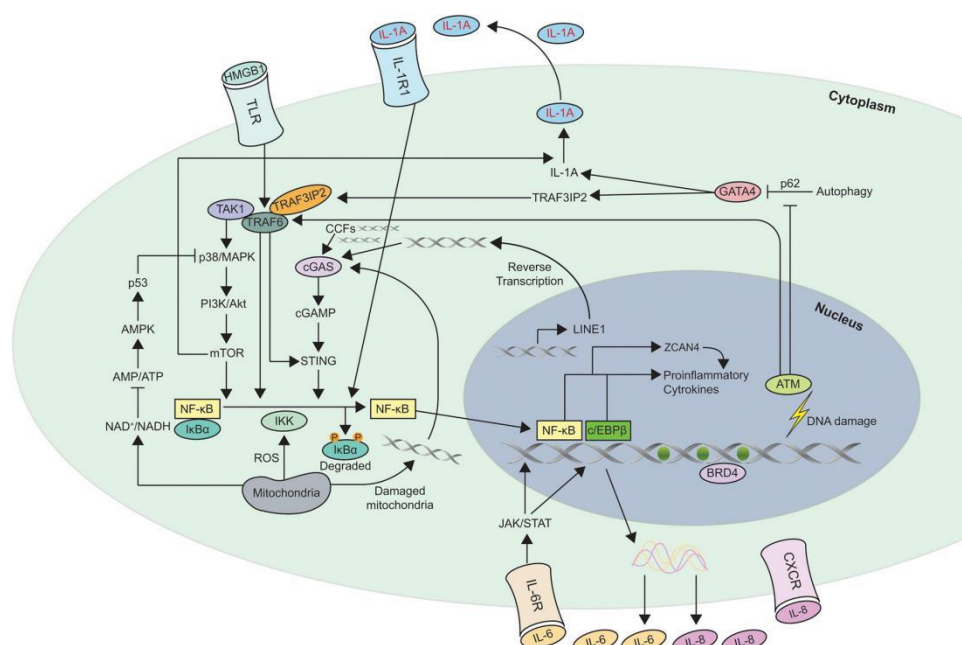
Τα σύμπλοκα NF-κB και CCAAT/ενισχυτική-δεσμευτική πρωτεΐνη (C/EBPβ), τα οποία αποτελούν μεταγραφικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αποκρίσεις, αναγνωρίζονται σήμερα ως οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση της SASP (Huang et al., 2022).

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της γήρανσης που προκαλείται από βλάβη του DNA και της ρυθμιζόμενης από τον NF-κB SASP. Σε απόκριση σε γενετοξικό στρες, η κίνηση Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του NEMO που είναι κρίσιμες για την ενεργοποίηση του NF-κB, με αποτέλεσμα την πυρηνική μετατόπιση του NF-κB και τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με το SASP (Cuollo et al., 2020).

Νέα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο κυτταρολογικός αισθητήρας DNA cGAS συνδέει την απόκριση στην βλάβη του DNA με την έναρξη της SASP (Huang et al., 2022). Σε απόκριση στη συσσώρευση κυτταροπλασματικού DNA, όπως θραύσματα κυτταροπλασματικής χρωματίνης και μιτοχονδριακό DNA, ο cGAS συνθέτει τον δεύτερο αγγελιοφόρο 2'3'-cGAMP, ο οποίος ενεργοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογέα STING, έναν ενεργοποιητή του NF-κB (Cuollo et al., 2020).

Πολλοί από τους μηχανισμούς που συζητήθηκαν μέχρι στιγμής ρυθμίζουν το SASP συγκλίνοντας στον NF-κB- ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBPβ είναι επίσης κρίσιμος για το SASP. Τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια αυξορρυθμίζουν το C/EBPβ και εκκρίνουν διάφορες χημειοκίνες με τρόπο που εξαρτάται τόσο από τον NF-κB όσο και από τον C/EBPβ. Ο τελευταίος στη συνέχεια συνεργάζεται με την IL-6 για να ενισχύσει την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους δικτύου, το οποίο περιλαμβάνει την IL-8 (Acosta et al., 2008). Περιέργως, η C/EBPβ αναστέλλεται από την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του ίδιου του mRNA της, γεγονός που μειώνει τις κυτταροστατικές και προγηραντικές λειτουργίες της C/EBPβ επιλεκτικά σε αθάνατα και μετασχηματισμένα κύτταρα (Cuollo et al., 2020).

Εκτός αυτών, η ενεργοποίηση των NF-κB και C/EBPβ ρυθμίζεται και από διάφορα άλλα μονοπάτια και αξίζει να σημειωθεί ότι, αν και ο NF-κB επάγει κυρίως την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών, άλλα μονοπάτια, όπως το μονοπάτι Jak2/Stat3, ρυθμίζουν ένα διαφορετικό σύνολο κυτοκινών, κυρίως ανοσοκατασταλτικών, όπως οι CXCL1/CXCL2, GM-CSF, M-CSF, IL-10 και IL-13 (Hernandez-Segura et al., 2018).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του SASP. Τα περισσότερα από τα μονοπάτια συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και c/EBPβ στα γηρασμένα κύτταρα (Ruchi & Parmjit, 2021)

2.4 Μεταβολικές προσαρμογές

Τα κύτταρα σε γήρανση υποβάλλονται σε μεταβολικό επαναπρογραμματισμό προκειμένου να διατηρήσουν τη βιώσιμη κατάσταση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και να εκφράσουν τα γονίδια και τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη διατήρηση του SASP (Wiley & Campisi, 2021). Οι μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα είναι η αλλαγή του ρυθμού γλυκόλυσης, μιτοχονδριακού μεταβολισμού και αυτοφαγίας (Herranz & Gil, 2018). Η p53 μπορεί να ρυθμίσει περαιτέρω τον κυτταρικό μεταβολισμό προωθώντας τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων (Hernandez-Segura et al., 2018). Η παραγωγή των συστατικών του SASP βασίζεται στην αυξημένη παραγωγή ATP από τη γλυκόλυση και στις μεγάλες ποσότητες ανακυκλωμένων αμινοξέων που παράγονται από την αυτοφαγία και την πρωτεϊνολύση (Rajendran et al., 2019; Herranz & Gil, 2018). Ωστόσο, ο ρόλος του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και της αυτοφαγίας στη γήρανση παραμένει αμφιλεγόμενος (Herranz & Gil, 2018).

Η αυξημένη παραγωγή και έκκριση του SASP οδηγούν σε πρωτεοτοξικό στρες το οποίο μπορεί να αμβλυνθεί με την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (Herranz & Gil, 2018). Η αυτοφαγία που ανταποκρίνεται στο στρες μπορεί να επιδράσει θετικά για την επιβίωση του κυττάρου. Ωστόσο, η αυτοφαγία έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ένας μηχανισμός εκφυλισμού των κυττάρων και αυτό εγείρει το ερώτημα πώς τόσο η κυτταρική προστασία όσο και ο κυτταρικός θάνατος μπορούν να προκληθούν από τον ίδιο μηχανισμό (Rajendran et al., 2019).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του SASP (Correia-Melo et al., 2016). Είναι ενδιαφέρον ότι ο αριθμός των μιτοχονδρίων αυξάνεται επίσης λόγω της μείωσης της μιτοχονδριακής αυτοφαγίας κατά τη γήρανση, ενώ αυτά μεγαλώνουν παρουσιάζοντας διακριτές αλλαγές στις αναδιπλώσεις τους (Vasileiou et al., 2019). Έχουν περιγραφεί επίσης αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης, με μελέτες που δείχνουν τόσο αυξημένο όσο και μειωμένο δυναμικό σε γηρασμένους ινοβλάστες (González-Gualda et al., 2021). Οι δομικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια οδηγούν επίσης σε μεταβολές όπως η αύξηση των ROS, η οποία θεωρείται άλλο ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης (Aravintan, 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι τα ROS που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια μπορούν να πυροδοτήσουν τη γήρανση τόσο με αυτοκρινή όσο και με παρακρινή τρόπο, όταν απελευθερώνονται από γηρασμένα κύτταρα (González-Gualda et al., 2021).

2.5 Β γαλακτοζιδάση- Λυσοσώματα

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης γήρανσης είναι η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με τη γήρανση (SA β-gal) (Herranz & Gil, 2018). Η SA-β-Gal είναι μια υδρολάση που καταλύει την υδρόλυση των β-γαλακτοσιδών σε μονοσακχαρίτες (González-Gualda et al., 2021). Σε φυσιολογικά κύτταρα υπό

φυσιολογικές συνθήκες, η ενζυμική δραστηριότητά της απαντάται σε pH 4,0-4,5, ενώ σε γηρασμένα κύτταρα ενισχύεται σημαντικά ως αποτέλεσμα της αυξημένης λυσοσωμικής περιεκτικότητας. Εξαιτίας αυτού, η δραστηριότητα της β-gal ανιχνεύεται σε pH 6,0 και επιτρέπει την ταυτοποίηση των γηρασμένων κυττάρων (Aravintan, 2015).

Ένα άλλο λυσοσωμικό ένζυμο, η α-φουκοσιδάση, έχει προταθεί ως εναλλακτικός βιοδείκτης γήρανσης. Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη λυσοσωμική περιεκτικότητα, η οποία μπορεί να αντανakλά την αυξημένη αυτοφαγία (Herranz & Gil, 2018).

2.6 Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης

Τα κύτταρα σε γήρανση μεταβάλλουν την οργάνωση της ετεροχρωματίνης και τις σχετικές δομικές πρωτεΐνες. Στα μη γηρασμένα διαιρούμενα κύτταρα, η ετεροχρωματίνη είναι δομικά λιγότερο πυκνή. Ωστόσο, στη γήρανση, σε μια προσπάθεια να σιγήσουν τα γονίδια που προάγουν τον πολλαπλασιασμό, η χρωματίνη αναδιατάσσεται και σχηματίζει πυκνές δομές που είναι γνωστές ως Senescence-Associated Heterochromatin Foci ή SAHFs (González-Gualda et al., 2021). Οι SAHFs χρησιμοποιούνται συνήθως για την ταυτοποίηση της OIS των ανθρώπινων κυττάρων με τη χρήση χρώσης DAPI και απεικόνιση με συνεστιακή μικροσκοπία (Herranz & Gil, 2018). Αυτές οι εστίες χαρακτηρίζονται από γνωστές πρωτεΐνες που σχηματίζουν ετεροχρωματίνη, όπως η τριμεθυλιωμένη H3K9 (H3K9me3), η πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 (HP1) και η παραλλαγή της ιστόνης H2A macroH2A (González-Gualda et al., 2021).

Οι μεταβολές στις τροποποιήσεις της χρωματίνης εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των παραγόντων του SASP (Cuollo et al., 2020). Οι κατασταλτικοί δείκτες, όπως η H3K9me2, μειώνονται στους υποκινητές των IL-6 και IL-8, δύο σημαντικών συστατικών του SASP, πιθανώς λόγω της αποδόμησης της μεθυλοτρανσφεράσης G9a μέσω πρωτεασωμικής αποδόμησης μετά από ένα σήμα απόκρισης σε βλάβη του DNA. Αντίθετα, η σιρτουΐνη 1 (SIRT1), μια αποακετυλάση των ιστονών, μειρρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της γήρανσης και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των IL-6 και IL-8 μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών στις περιοχές υποκινητών (Hernandez-Segura et al., 2018). Η παραλλαγή ιστόνης macroH2A1 απαιτείται για την επίμονη απόκριση στη βλάβη DNA που σχετίζεται με τη γήρανση και αποτελεί κρίσιμο σημείο ελέγχου στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών παραγόντων SASP, συμπεριλαμβανομένων των IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8 και MMP-1, μεταξύ άλλων (Hernandez-Segura et al., 2018; Cuollo et al., 2020). Τέλος η παραλλαγή ιστόνης H2A.J ρυθμίζει επίσης θετικά τη μεταγραφή των παραγόντων SASP (Hernandez-Segura et al., 2018).

2.7 Αλλαγές στη μορφολογία

Στην κυτταρική καλλιέργεια, η γήρανση συνοδεύεται συνήθως από σημαντικές μορφολογικές αλλαγές. Τα κύτταρα σε γήρανση γίνονται επίπεδα, διευρυμένα, σχηματίζονται κενोटόπια και μερικές φορές εμφανίζονται με πολλαπλούς ή διευρυμένους πυρήνες. Η λειτουργική σημασία των περισσότερων μορφολογικών αλλαγών που σχετίζονται με τη γήρανση δεν είναι σαφής (Herranz & Gil, 2018).

Ο σχηματισμός κοκκίων αυξάνεται επίσης στα γηρασμένα κύτταρα. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των λυσοσωμάτων. Ωστόσο, αυτή η αύξηση δεν παρατηρείται σε όλους τους τύπους γήρανσης, ακόμη και όταν ανιχνεύεται η δραστηριότητα SA-β-gal (González-Gualda et al., 2021). Επίσης, αυτή η αύξηση του μεγέθους μπορεί να συμβάλει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που παρατηρείται στα γηρασμένα κύτταρα, επειδή η διάχυση και η δέσμευση των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη μετάφραση καθυστερεί λόγω αυτής της κυτταροπλασματικής αραίωσης (González-Gualda et al., 2021; Neurohr et al., 2019).

Η διεύρυνση του πυρήνα σχετίζεται με την μείωση της ρύθμισης της πρωτεΐνης λαμίνη B1, ενός κύριου συστατικού του πυρηνικού ελάσματος. Η λαμίνη B1 είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του πυρήνα (Ruchi & Parmjit, 2021). Ωστόσο, αυτή η ακεραιότητα χάνεται στα γηρασμένα κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την απελευθέρωση κυτταροπλασματικών θραυσμάτων χρωματίνης εκτός του πυρήνα, τα οποία πιστεύεται ότι τροφοδοτούν το SASP (González-Gualda et al., 2021). Αυτά τα κυτταροπλασματικά θραύσματα χρωματίνης, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού cGAS/STING, επάγει την έναρξη της προφλεγμονώδους απόκρισης του SASP (Herranz & Gil, 2018).

Η πιο σταθερή αλλαγή στη σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης στα γηρασμένα κύτταρα είναι η ρύθμιση της καβεολίνης-1, ενός σημαντικού συστατικού των εμπλουτισμένων με χοληστερόλη μικροπεριοχών που ονομάζονται caveolae (Hernandez-Segura et al., 2018). Οι αλλαγές στο σχήμα της πλασματικής μεμβράνης εξαρτώνται από την κατάσταση της πρωτεΐνης σκαλωσιάς Καβεολίνη-1 και των Rho GTPασών Rac1 και CDC42, ενώ ο σχηματισμός κενοτοπίων έχει συσχετιστεί με το stress του ενδοπλασματικού δικτύου που προκαλείται από την απόκριση των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Herranz & Gil, 2018).

Επίσης οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και η μεταβολή της σύνθεσης των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης έχουν επίσης προταθεί ως χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης. Η γλυκοζυλίωση είναι ένας τύπος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που έχει συνδεθεί στενά με την κυτταρική γήρανση. Μάλιστα, έχουν περιγραφεί συγκεκριμένα προφίλ γλυκανών της κυτταρικής επιφάνειας που σχετίζονται με την αναδιπλασιαστική γήρανση *in vitro* και σε ιστούς από γηρασμένα άτομα. Η οξειδωση, ένας διαφορετικός τύπος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, είναι ένα χαρακτηριστικό που έχει περιγραφεί πρόσφατα στην πρωτεΐνη βιμεντίνη σε γηρασμένα κύτταρα (González-Gualda et al., 2021).

Τα κύτταρα σε γήρανση σχηματίζουν επίσης κυτταροπλασματικές γέφυρες που τους επιτρέπουν να δίνουν σήματα σε γειτονικά κύτταρα μέσω άμεσης διακυτταρικής

μεταφοράς πρωτεϊνών (Biran et al., 2015). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί *in vitro* ορισμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς που διακρίνουν τα γηρασμένα κύτταρα από τα φυσιολογικά κύτταρα, όπως οι NOTCH1, DPP4, B2MG, SCAMP4 και uPAR (González-Gualda et al., 2021).

2.8 Βιοδείκτες

Ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες γήρανσης είναι τα αυξημένα επίπεδα της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με τη γήρανση (SA-β-Gal) (González-Gualda et al., 2021). Το 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-d-γαλακτοπυρανοσίδιο (X-Gal), είναι το πιο κοινό υπόστρωμα για τη SA-β-Gal, καθώς καταλύεται από την SA-β-Gal σε γαλακτόζη και 5-βρωμο-4-χλωρο-3-υδροξυινδόλη-1, η οποία στη συνέχεια διμερίζεται και σχηματίζει ίζημα μπλε χρώματος. Χρησιμοποιώντας το X-Gal ως χρωμογόνο υπόστρωμα, αυτή η ενζυμική δοκιμασία παρακολουθεί την αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα αυτής της λυσοσωμικής πρωτεΐνης σε γηρασμένα κύτταρα και παρέχει επίσης ένδειξη αυξημένης λυσοσωμικής μάζας (Itahana et al., 2013).

Τέλος, έχουν καθιερωθεί πρόσθετες μέθοδοι για τον εντοπισμό γηρασμένων κυττάρων μέσω παρόμοιων ενζυμικών φαινοτύπων. Η χρώση με SA-α-φουκοσιδάση λειτουργεί με παρόμοια χημεία με την SA-β-γαλακτοσιδάση, αλλά με ένωση που περιέχει α-L-φουκόζη ως υπόστρωμα (X-Fuc), η οποία έχει πρόταθει ότι είναι πιο ειδική από την SA-β-gal. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν χρησιμοποιείται συνήθως, πιθανώς επειδή η X-Gal είναι ιστορικά πιο διαθέσιμη και ευρέως διαδεδομένη λόγω της δημοτικότητάς της στη μικροβιολογία (González-Gualda et al., 2021).

Ωστόσο, το αυξημένο λυσοσωμικό περιεχόμενο των γηρασμένων κυττάρων, είναι επίσης χαρακτηριστικό κυτταρικών τύπων με υψηλή εκκριτική ικανότητα όπως τα ενεργά μακροφάγα, τα κύτταρα Kupffer, οι οστεοκλάστες, κύτταρα που υφίστανται αυξημένη λυσοσωμική δραστηριότητα κατά την αυτοφαγία και ορισμένα καρκινικά κύτταρα. Αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη χρήσης πρόσθετων δεικτών σε συνδυασμό με τη δραστηριότητα SA β-gal για τον χαρακτηρισμό της γήρανσης (Herranz & Gil, 2018; González-Gualda et al., 2021).

Ο ανασταλμένος κυτταρικός κύκλος είναι ένα από τα πιο καθοριστικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης. Η ανίχνευση περισσότερων του ενός από τους δείκτες που αντιπροσωπεύουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να αποτελέσει καλή ένδειξη του φαινοτύπου γήρανσης *in vitro*. Οι πρωτεΐνες p16, p21, p53 και η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (pRB) αποτελούν αυτούς τους βιοδείκτες. Αυξημένα επίπεδα p16, p21, p53 και μειωμένα επίπεδα pRB χαρακτηρίζουν την γήρανση (González-Gualda et al., 2021).

Η χρήση της p16 ως βιοδείκτη γήρανσης έχει περιορισμούς. Πρώτον, μπορούν να εμφανιστούν μορφές γήρανσης ανεξάρτητες από την p16 *in vitro*. Ακόμη πιο σημαντικό είναι ότι η p16 μπορεί να εκφράζεται σε μη γηρασμένα κύτταρα (π.χ.

καρκινικά κύτταρα με αδρανοποιημένο Rb) και δεν είναι σαφές εάν η έκφραση της p16 σε μακροφάγα ή λεμφοκύτταρα αντανακλά φαινότυπο γήρανσης ή κυτταρικές μοίρες όπως η διαφοροποίηση ή η εξάντληση (Ruchi & Parmjit, 2021).

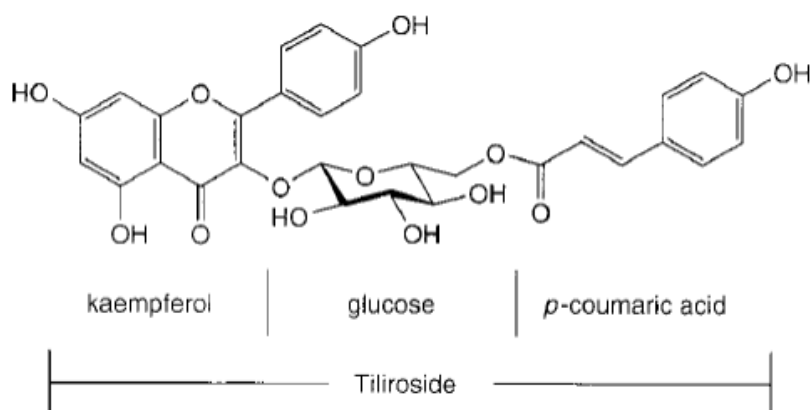
Παρόλο που η p21 μπορεί να αποτελέσει δείκτη γήρανσης σε ορισμένες περιπτώσεις, επάγεται επίσης κατά τη διάρκεια παροδικής διακοπής του κυτταρικού κύκλου ή σε απόκριση σε βλάβη του DNA και θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως δείκτης γήρανσης μόνο σε συνδυασμό με άλλους (Herranz & Gil, 2018).

Επιπλέον, οι RB και p53 μπορεί να είναι επίσης παρόντες σε άλλες μορφές παύσης του κυτταρικού κύκλου, όπως σε κύτταρα σε ηρεμία (González-Gualda et al., 2021). Επίσης, το p53 ενεργοποιείται σε απόκριση σε βλάβη του DNA και οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, επιτρέποντας την επιδιόρθωση του DNA, ή κατευθύνει την κυτταρική γήρανση ή την απόπτωση. Επομένως ένα κύτταρο με αυξημένα επίπεδα p53 μπορεί να μην βρίσκεται σε γήρανση (Mijit et al., 2020).

Η κυτταρική γήρανση εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή της είναι γενικά μη ειδικοί και δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος βιοδείκτης που να ανιχνεύεται σε όλους τους τύπους γήρανσης. Δεδομένης αυτής της ετερογένειας, συνιστάται η ανίχνευση διάφορων δεικτών που μπορούν να δώσουν πρόσθετες πληροφορίες για τον φαινότυπο (González-Gualda et al., 2021).

3. Τιλιοροσίδη

Η Τιλιοροσίδη (Kaempferol-3-β-D-(6''-O-p-coumaroyl)-glucopyranoside) είναι ένα γλυκοζιτικό флаβονοειδές που περιέχεται σε πολλά φαρμακευτικά φυτά, όπως το *Helichrysum italicum*, το *Geranium mexicanum* και το *Helianthemum glomeratum*, και σε πολλά διατροφικά φυτά, όπως το φλαμούρι (*Tilia argentea*), η αγριοτριανταφυλλιά (*Rosa rugosa*), η φράουλα (*Fragaria vesca*), το σμέουρο (*Rubus fruticosus*) και πολλά άλλα (Chatzigeorgiou et al., 2017; Goto et al., 2012). Η Τιλιοροσίδη αποτελείται από τρία διακριτά μέρη: ένα флаβονοειδές (καμπερόλη), ένα φαινυλικό προπανοειδές (p-κουμαρικό οξύ) και ένα σάκχαρο (γλυκόζη), όπως φαίνεται και στην εικόνα 1. (Luhata et al., 2017)



Εικόνα 9: Δομή Τιλιοροσίδης (Luhata et al., 2017)

3.1 Φλαβονοειδή

Τα флаβονοειδή ανήκουν σε μια υποκατηγορία των πολυφαινόλων και είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από διάφορα φυτά και βρίσκονται σε αφθονία στη φύση (Luhata et al., 2017). Τα περισσότερα флаβονοειδή (με εξαίρεση τις флаβονόλες) απαντούν στη φύση σε συζευγμένη μορφή κυρίως με υπολείμματα σακχάρων, δηλαδή ως γλυκοζίτες. Τα флаβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στα ανώτερα φυτά και ευρέως διαδεδομένα στα διατροφικά φυτά, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα βότανα, τα μπαχαρικά, τα στελέχη, τα άνθη, το τσάι και το κόκκινο κρασί. Συμβάλλουν στη γεύση και τον χρωματισμό των φρούτων και των λαχανικών, ενώ έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, την αναπαραγωγή και την αντίσταση σε παθογόνα και αρπακτικά. Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν τις ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις των διαιτητικών флаβονοειδών μέσω της μείωσης του κινδύνου καρκινογένεσης, υπέρτασης, φλεγμονής και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα флаβονοειδή δεν έχουν μόνο αντιοξειδωτική δράση αλλά ασκούν και πιο ειδικές επιδράσεις σε διάφορες κυτταρικές και μοριακές διεργασίες. (Goto et al., 2012;)

3.2 Βιοδραστικές και φαρμακολογικές ιδιότητες της Τιλιοροσίδης

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η Τιλιροσίδη μπορεί να έχει αντιγηραντικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινογόνες και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες (Goto et al., 2012; Chatzigeorgiou et al., 2017). Επίσης, μελέτες υποστηρίζουν πως έχει νευροπροστατευτική, αντιδιαβητική, αντιυπερλιπιδαιμική, αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση (Luhata et al., 2017; Alkholifi et al., 2023).

Οι Chatzigeorgiou και συνεργάτες (2017) μελέτησαν τη δυνητική αντιγηραντική βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος των καρπών του *Platanus orientalis* σε μύγες *Drosophila melanogaster* και σε καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών. Η Τιλιροσίδη αντιπροσωπεύει πιθανότατα ένα από τα σημαντικότερα βιοδραστικά μόρια στο εκχύλισμα, αν και άλλα μόρια μπορεί επίσης να ασκούν παρόμοιες δράσεις. Η εξαγνισμένη Τιλιροσίδη ενίσχυσε τις αντιοξειδωτικές αποκρίσεις των ιστών, ενεργοποίησε τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος και των λυσοσωμικών καθεψινών, βελτίωσε φαινότυπους που σχετίζονται με την ηλικία και παρέτεινε τη μακροζωία των μυγών. Επίσης, η Τιλιροσίδη δεν άσκησε καμία τοξικότητα σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες, ενίσχυσε ήπια τις δραστηριότητες του πρωτεασώματος και καθυστέρησε την κυτταρική γήρανση (Chatzigeorgiou et al., 2017).

Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της Τιλιροσίδης έχουν επιβεβαιωθεί από πολυάριθμες μελέτες οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μοντέλα. Η εξέταση *in vitro* απέδειξε ότι η Τιλιροσίδη μπορεί να αναστείλει σημαντικά και δόσοεξαρτώμενα την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων NO, TNF-α και IL-12 σε προενεργοποιημένα με LPS/IFN-γ περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού (Grochowski et al., 2018). Η Τιλιροσίδη που απομονώθηκε από το *Helichrysum italicum*, μελετήθηκε *in vitro* για τις αντιοξειδωτικές και/ή scavenger ιδιότητές τους και *in vivo* σε διάφορα μοντέλα φλεγμονής και βρέθηκε να αναστέλλει σημαντικά την ενζυμική και μη ενζυμική υπεροξειδωση των λιπιδίων. Είχε ιδιότητες scavenger και πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. *In vivo*, η Τιλιροσίδη ανέστειλε σημαντικά το οίδημα του ποδιού και τη φλεγμονή του αυτιού του ποντικού που προκλήθηκε από TPA. Μείωσε επίσης σημαντικά το οίδημα και τη διήθηση των λευκοκυττάρων (Sala et al., 2003). Η μελέτη των Corrêa και συνεργατών (2018), έδειξε επίσης τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του εκχυλίσματος του *Pfaffia Townsendii* καθώς και της Τιλιροσίδης που απομονώθηκε από αυτό. Η Τιλιροσίδη βρέθηκε να έχει θεραπευτικές δυνατότητες κατά των διαταραχών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τις φλεγμονές (Corrêa et al., 2018).

Μια πρόσφατη μελέτη των Alkholifi και συνεργατών (2023) διαπίστωσε ότι ο συνδυασμός της Τιλιροσίδης με τη Λισουρίδη έχει πιθανά οφέλη κατά του Πάρκινσον. Η μελέτη έδειξε σημαντικές βελτιώσεις στα συμπτώματα της νόσου όταν η Τιλιροσίδη και η Λισουρίδη χορηγήθηκαν μαζί. Αυτή η συνδυασμένη θεραπεία βελτίωσε σημαντικά την κινητική λειτουργία και προστάτευσε τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες σε αρουραίους με Πάρκινσον που προκλήθηκε από τη χορήγηση MPTP. Ενεργοποίησε επίσης σημαντικά μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τον έλεγχο της απόπτωσης. Η Τιλιροσίδη

και η Λισουρίδη μαζί αύξησαν την πρωτεΐνης λεμφώματος Β-κυττάρων 2 (Bcl-2), μείωσαν τη δραστηριότητα της κασπάσης 3 και ως αποτέλεσμα απέτρεψαν την αποσύνθεση των εγκεφαλικών κυττάρων. Η συγχορήγηση μείωσε επίσης τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF- α) και την ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Οι αντιοξειδωτικοί δείκτες όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση και η μειωμένη γλουταθειόνη βελτιώθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. (Alkoholifi et al., 2023)

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση της Τιλιροσίδης, στην μελέτη των Patel και συνεργατών (2024), το εκχύλισμα των φύλλων *Cordia macleodii*, που περιέχει τιλιροσίδη, έδειξε *in vitro* αντιβακτηριακή και αντιβιοφιλική δράση έναντι παθογόνων MDR. Η μεταγραφομική ανάλυση προσδιόρισε τη σημασία της Τιλιροσίδης στη μειωμένη έκφραση ορισμένων γονιδίων (*bssS* και *metE*), τα οποία εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοφίλμ στην *Klebsiella pneumoniae*. Επομένως, το εκχύλισμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση στα συμβατικά αντιβιοτικά για την καταπολέμηση των λοιμώξεων που προκαλούνται από MDR (Patel et al., 2024). Επίσης, σύμφωνα με τους Falcão-Silva και συνεργάτες (2009), η Τιλιροσίδη, αν και έχει φτωχή βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση, θα μπορούσε να βρει τη θέση της στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Ενδιαφέρουσες έρευνες πραγματοποιήθηκαν σε στέλεχος του *S. aureus*, το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο *norA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εκροής NorA. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, οι βακτηριακές καλλιέργειες υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αντιβιοτικά με ή χωρίς πιθανούς αναστολείς της βακτηριακής αντοχής, όπως η Τιλιροσίδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη Τιλιροσίδης μπορεί να μειώσει τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων αντιβιοτικών κατά 2 έως 128 φορές (Falcão-Silva et al., 2009). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η Τιλιροσίδη μπορεί πιθανώς επίσης να αναστέλλει τις πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης 2α και 4, που παράγονται από τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus* (Kuok et al., 2017). Εκτός από την αντιβακτηριακή δράση, η Τιλιροσίδη φαίνεται να έχει και αντιπρωτοζωική δράση, αλλά δεν έχει αποδειχθεί κάποια αντική δράση. Η μελέτη των Calzada και συνεργατών (2017) απέδειξε ότι η τιλιροσίδη *in vitro* είχε ισχυρή αντιπρωτοζωική δράση ενάντια των πρωτοζώων *E. histolytica* και *G. lamblia*. Διαπιστώθηκε ότι η Τιλιροσίδη μπορεί να δρα ως αναστολέας των γλυκολυτικών ενζύμων πυροσταφυλικού οξέως: οξειδοαναγωγή φερρεδοξίνης και αλδολάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (Grochowski et al., 2018).

Σύμφωνα με τους Matsuda και συνεργάτες (2002), το εκχύλισμα από τα άνθη της *Tilia argentea* (φλαμουριάς) βρέθηκε να παρουσιάζει ηπατοπροστατευτική δράση έναντι ηπατικής βλάβης που προκλήθηκε από d-γαλακτοζαμίνη (d-GalN) και λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σε ποντίκια. Στο εκχύλισμα ταυτοποιήθηκε η τιλιροσίδη μαζί με άλλους γλυκοζίτες φλαβονόλης και εμφάνισε την ισχυρότερη ηπατοπροστατευτική δράση. Η προστατευτική δράση της Τιλιροσίδης προτάθηκε να εξαρτάται από την αναστολή της παραγωγής του παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF- α), τη μειωμένη ευαισθησία των ηπατοκυττάρων στον TNF- α και την προστασία των ηπατοκυττάρων έναντι της d-GalN (Matsuda et al., 2002).

Σύμφωνα με τους Tsukamoto και συνεργάτες (2004), η Τιλιροσίδη, που απομονώθηκε από καρπούς φράουλας, ανέστειλε τη δραστηριότητα ενός ενζύμου κυτοχρώματος P450, του CYP3A4, υποδεικνύοντας τον πιθανό αντίκτυπό τους στον μεταβολισμό φαρμάκων όταν καταναλώνονται φράουλες.

Οι Da'í και συνεργάτες (2016) χρησιμοποίησαν εκχύλισμα των φύλλων *guazuma ulmifolia*, ώστε να προσδιοριστούν οι κυτταροτοξικές επιδράσεις και οι μηχανισμοί της Τιλιροσίδης σε T47D και MCF7 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η Τιλιροσίδη στις κυτταρικές σειρές T47D προκάλεσε απόπτωση η οποία διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 9 και τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 χωρίς να παρεμβαίνει στη γονιδιακή πρωτεΐνη p53. Στις κυτταρικές σειρές MCF7 προκάλεσε απόπτωση μέσω εξωγενών τρόπων λόγω της υποέκφρασης της p53 και της κασπάσης 9 και της αύξησης της έκφρασης της Bcl-2 και της κασπάσης 8 (Da'í et al., 2016). Επομένως απέδειξαν ότι η Τιλιροσίδη έχει κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική δράση και μπορεί να θεωρηθεί αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας (Da'í et al., 2016; Grochowski et al., 2018).

Στην μελέτη των Nagatomo και συνεργατών (2023) διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της τρανς-Τιλιροσίδης, που βρίσκεται στους σπόρους της *Rosa canina*, στον μεταβολισμό της χοληστερόλης χρησιμοποιώντας κύτταρα HepG2 και ποντίκια που προέρχονται από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η τρανς-τιλιροσίδη μείωσε την έκκριση χοληστερόλης στα κύτταρα HepG2 και μείωσε την έκκριση της αποπρωτεΐνης B (apoB)-100, ενός δείκτη της λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Η τρανς-τιλιροσίδη ανέστειλε επίσης τη δραστηριότητα των μικροσωμικών πρωτεϊνών μεταφοράς τριγλυκεριδίων, οι οποίες μεσολαβούν στο σχηματισμό VLDL από χοληστερόλη και τριγλυκερίδια στο ήπαρ. In vivo, η trans-Τιλιροσίδη ανέστειλε τη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων που προκλήθηκαν από το Triton WR-1339 στο αίμα νηστικών ποντικών και διατήρησε χαμηλά επίπεδα apoB-100. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η τρανς-τιλιροσίδη αναστέλλει την έκκριση χοληστερόλης ως VLDL από το ήπαρ και έχει τη δυνατότητα χρήσης για την πρόληψη της δυσλιπιδαιμίας. (Nagatomo et al., 2023)

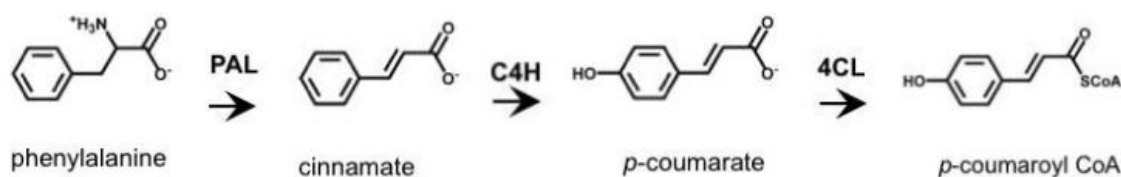
Οι Ninomiya και συνεργάτες (2007) χρησιμοποίησαν επίσης εκχύλισμα από τους σπόρους της *Rosa canina* για τη μελέτη της trans-Τιλιροσίδης. Η trans-Τιλιροσίδη αύξησε την έκφραση του mRNA του ηπατικού υποδοχέα PPAR-α σε ποντίκια, γεγονός που υποδηλώνει ενισχυμένο μεταβολισμό των λιπιδίων. Επομένως, αποδείχθηκε ότι η trans-Τιλιροσίδη ανέστειλε την αύξηση του σωματικού βάρους, τη συσσώρευση σπλαχνικού λίπους και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μετά από φόρτιση με γλυκόζη (Ninomiya et al., 2007).

3.3 Βιοσύνθεση της Τιλιροσίδης

Η βιοσύνθεση της Τιλιροσίδης πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια: (1) τη σύνθεση της αγλυκόνης, (2) τη γλυκοζυλίωση και (3) την προσθήκη του παρακουμαρικού οξέος. (Luhata et al., 2017)

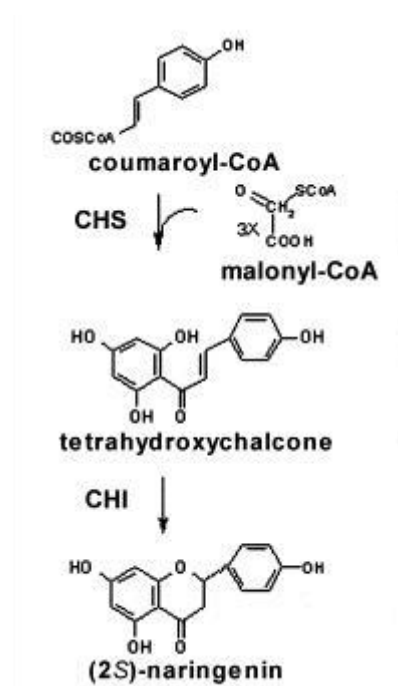
Βήμα 1: Σύνθεση της αγκυκόνης

Αγκυκόνη είναι ένα φλαβονοειδές ελεύθερης μορφής, που δηλαδή δεν είναι συζευγμένο με μονοσακχαρίτη. Στη περίπτωση της Τιλιροσίδης, η αγκυκόνη είναι η καμφερόλη. Το μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών στα φυτά είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση σημαντικού αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών που προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη (Luhata et al., 2017). Στο πρώτο στάδιο, η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε *p*-κουμαρυλ-CoA από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), την 4-υδροξυλάση του κινναμικού οξέος (C4H) και τη λιγάση του 4-κουμαρικού οξέος (4CL) (Duan et al., 2017).



Εικόνα 10: Η βιοσυνθετική οδός από τη φαινυλαλανίνη στο *p*-κουμαρυλ-CoA (Fraser et al., 2011)

Στη συνέχεια, η ναρινγενίνη, μία χαλκόνη, παράγεται με αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ ενός μορίου *p*-κουμαρυλ-CoA και τριών μορίων μηλονυλ-CoA από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS) και την ισομεράση της χαλκόνης (CHI) (Duan et al., 2017). Οι χαλκόνες δρουν ως πρόδρομες ουσίες για ένα ευρύ φάσμα φλαβονοειδών παραγώγων που απαντώνται σε όλο το φυτικό βασίλειο (Luhata et al., 2017).



Εικόνα 11: Η βιοσυνθετική οδός από το *p*-κουμαρυλ-CoA στην ναρινγενίνη (Leonard et al., 2006)

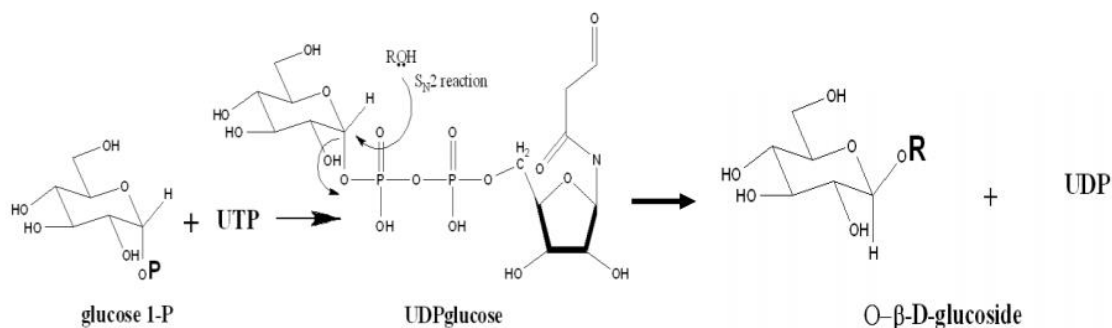
Τέλος, η ναρινγενίνη μετατρέπεται σε καμφερόλη μέσω της διυδροκαμφερόλης από την 3β-υδροξυλάση της φλαβανόνης (F3H) και τη συνθάση της φλαβονόλης (FLS) (Duan et al., 2017).



Εικόνα 12: Η βιοσυνθετική οδός από τη ναρινγενίνη στην καεμπφερόλη (Duan et al., 2017)

Βήμα 2: Ο-γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών

Η ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDPγλυκόζη) χρησιμοποιείται ως μέσο για τη γλυκοζυλίωση. Δεδομένου ότι η UDPγλυκόζη έχει την αποχωρούσα ομάδα της στη διαμόρφωση α, το προϊόν έχει τη διαμόρφωση β. Το γεγονός ότι μια ποικιλία γλυκοζιτών έχει την ίδια αγλυκόνη σε ένα συγκεκριμένο φυτικό είδος υποστηρίζει έντονα την καθιερωμένη υπόθεση ότι η γλυκοζυλίωση λαμβάνει χώρα συνήθως σε ένα προχωρημένο στάδιο της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Η καμφερόλη, που είναι αγλυκόνη, είναι γλυκοζυλιωμένη στη θέση 3 χρησιμοποιώντας UDPγλυκόζη για να σχηματίσει ένα γλυκοζιτικό φλαβονοειδές (Luhata et al., 2017).

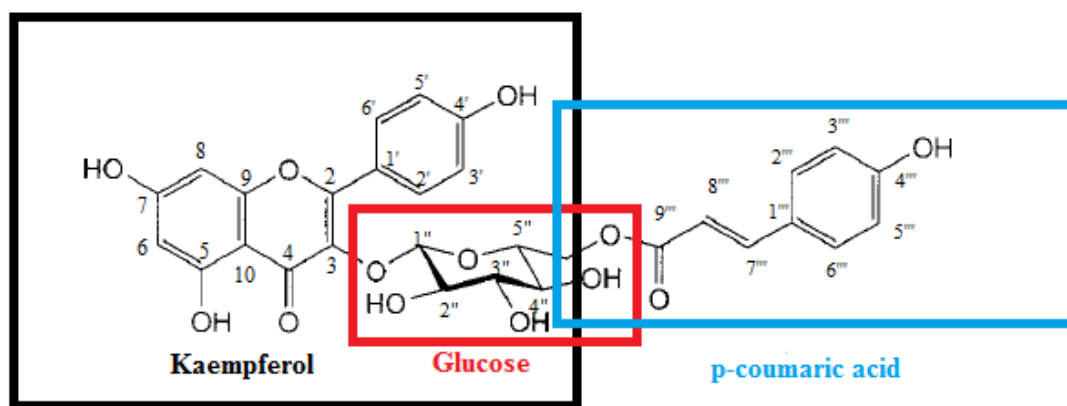


Εικόνα 12: Ο-γλυκοζυλίωση φλαβονοειδών με χρήση UDP ως παράγοντα γλυκοζυλίωσης. (Luhata et al., 2017)

Βήμα 3: προσθήκη του κουμαροϋλικού τμήματος

Μια αντίδραση SN2 λαμβάνει χώρα για την προσθήκη του κουμαροϋλικού συστατικού στο στο γλυκοζιτικό φλαβονοειδές που συντέθηκε στο βήμα 2. Το παρακουμαρικό οξύ προσβάλλεται (SN2) από το υδροξύλιο στη θέση 6' για να ληφθεί η Τιλιροσίδη. (Luhata et al., 2017)

3.4 Σχέση δομής-δραστικότητας της Τιλιροσίδης



Εικόνα 13: Απεικόνιση των τριών κύριων στοιχείων της Τιλιροσίδης. (Luhata et al., 2017)

Η πορεία βιοσύνθεσης της Τιλιροσίδης δείχνει ότι το στάδιο της γλυκοζυλίωσης μεταβάλλει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και το τοξικό δυναμικό των φαινυλοπροπανοειδών, καθώς και ότι επηρεάζει τη διαμερισματοποίηση και τη βιολογική δραστηριότητα. Στην πραγματικότητα, η γλυκοζυλίωση μπορεί όχι μόνο να αποτρέψει την τοξικότητα των φαινυλοπροπανοειδών, αλλά μπορεί επίσης να συμβάλει στην παραγωγή προστατευτικών μορίων έναντι των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) (Le Roy et al., 2016). Η καμφερόλη ενισχύει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυξάνοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, όπως η μεταλλοθειονίνη, η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) (Luhata et al., 2017).

Μια αξιολόγηση του ρόλου του τμήματος κουμαροϋλίου στην αντιοξειδωτική δράση της αστραγαλίνης και της Τιλιροσίδης πραγματοποιήθηκε από τους Li και συνεργάτες (2017). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Τιλιροσίδη που φέρει τμήμα 6''-Ο-ρ-κουμαροϋλίου παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση από την Αστραγαλίνη. Η ρ-κουμαροϋλίωση του τμήματος 6''-ΟΗ των γλυκοζιτικών φλαβονοειδών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών παραγόντων για τη θεραπεία εμφύτευσης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (Li et al., 2017). Το κουμαροϋλικό τμήμα της trans-Τιλιροσίδης θεωρείται ότι είναι ο κρίσιμος παράγοντας για την αύξηση των αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών επιδράσεων των γλυκοζιτικών φλαβονοειδών (Sala et al., 2003). Επιπλέον, η ίδια μελέτη αποκάλυψε ότι η αστραγαλίνη και η Τιλιροσίδη απορρόφησαν και οι δύο αποτελεσματικά τις ρίζες 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζυλίου (DPPH), ωστόσο η Τιλιροσίδη παρουσίασε υψηλότερη ικανότητα απορρόφησης ριζών DPPH από την αστραγαλίνη, υποδεικνύοντας ότι το ρ-κουμαροϋλικό τμήμα της ενισχύει την αποτελεσματικότητα των μονοπατιών που βασίζονται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) (Li et al., 2017).

4. Σκοπός

Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της φυτικής ουσίας Τιλιροσίδη στην κυτταρική γήρανση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων της γέλης του Wharton. Η ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση γίνεται με τον προσδιορισμό δεικτών της γήρανσης, όπως της δραστηριότητας της β γαλακτοζιδάσης που σχετίζεται με τη γήρανση και τη μέτρηση των επιπέδων των δεικτών p16 και p21. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal και η ανασοαποτύπωση κατά Western.

Η αναγεννητική ιατρική με βάση τα βλαστοκύτταρα είναι μια ιατρική θεραπεία που αποσκοπεί στην αποκατάσταση των χαμένων λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος με την αναγέννηση ελλειπόντων ή δυσλειτουργικών οργάνων και ιστών με τη χρήση βλαστοκυττάρων. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) είναι ένας από τους τύπους βλαστικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται σε αυτή (Yamagishi & Shigematsu, 2022). Ωστόσο, η επιτυχής θεραπεία με MSC χρειάζεται κυτταροκαλλιέργεια μεγάλης κλίμακας και απαιτεί παρατεταμένη καλλιέργεια *in vitro* κυττάρων, η οποία στη συνέχεια οδηγεί σε γήρανση των κυττάρων και επομένως αναστολή του πολλαπλασιασμού. Η χορήγηση γηρασμένων MSCs οδηγεί σε αναποτελεσματική κυτταρική διαφοροποίηση στην κλινική πράξη (Khademi-Shirvan et al., 2020).

Ως εκ τούτου, ουσίες με αντιγηραντικές ιδιότητες ίσως να αποτελούν λύση σε αυτό το πρόβλημα. Βάσει ερευνών, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Τιλιροσίδη μπορεί να έχει θετική επίδραση στη γήρανση των κυττάρων. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην εξαγωγή συμπεράσματος για την επίδραση της Τιλιροσίδης στη κυτταρική γήρανση και επιβεβαίωση των δεδομένων που υποστηρίζουν τις αντιγηραντικές ιδιότητές της.

B. Πειραματικό Μέρος

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1 Κυτταρικό μοντέλο

Στα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας, τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα γέλης Wharton (WJ-MSCs). Τα κύτταρα αυτά είχαν απομονωθεί από ομφάλιο λώρο νεογνών, μετά τη γραπτή συγκατάθεση των γονέων. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τρεις διαφορετικούς δότες και ανακαλλιεργήθηκαν μέχρι να δώσουν κύτταρα μεσαίας ηλικίας (passage 20-27). Τα WJ-MSCs παρουσίασαν δύο τύπους μορφολογίας (επιθηλιοειδές και κοντό ινοβλαστικό) στην πρωτογενή καλλιέργεια, ανάλογα με το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε, και μόνο ινοβλαστική μορφολογία όταν καλλιεργήθηκαν περαιτέρω (Fong et al., 2007). Επιπλέον, τα WJ-MSCs καλλιεργούνται σε φλάσκες πολυστυρενίου, προσκολλώνται στην επιφάνεια τους και αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδα. Ωστόσο, τα WJ-MSCs σταματούν να διαιρούνται όταν φτάσουν καλύψουν την επιφάνεια της καλλιέργειας λόγω της αναστολής της επαφής κυττάρου-κυττάρου και στη συνέχεια διαφοροποιούνται (contact inhibition) (Chen et al., 2023). Για αυτό, αφού καλύψουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, χρειάζεται να ανακαλλιεργηθούν.

5.2 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων γέλης του Wharton (WJ-MSCs)

5.2.1 Υλικά καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό:

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose της εταιρίας Biowest, το οποίο είναι κατάλληλο για τον πολλαπλασιασμό κυττάρων με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Σε αυτό προστίθεται 10% v/v βόειος εμβρυϊκός ορός (FBS, Fetal Bovine Serum) και 1% v/v Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Pen – Strep), ώστε να είναι πλήρες και έτοιμο για χρήση. Το FBS περιέχει πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες που επιτρέπουν τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των ευκαρυωτικών κυττάρων in vitro. Περιέχει επίσης παράγοντες προσκόλλησης που δημιουργούν ένα φαινόμενο "επικάλυψης" στο πλαστικό της φλάσκας, αυξάνοντας έτσι την κυτταρική προσκόλληση. Τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη-πενικιλίνη εμποδίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων στο θρεπτικό μέσο. Το DMEM διατηρείται στους 4°C, αλλά για χρησιμοποιηθεί πρέπει να βρίσκεται στην θερμοκρασία επώασης των κυττάρων (37°C).

Διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS):

Το διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) της εταιρίας Biowest είναι ρυθμιστικό διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και φωσφορικό κάλιο. Η ωσμωτικότητα και οι συγκεντρώσεις ιόντων των διαλυμάτων είναι μη τοξικές για τα περισσότερα κύτταρα. Χρησιμοποιείται για την πλύση των κυττάρων και ως ρυθμιστικό διάλυμα σε πολλές βιοχημικές/κυτταρικές αναλύσεις. Το PBS διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)

Διάλυμα Θρυψίνης:

Το διάλυμα Θρυψίνης (10x) της εταιρίας Biowest περιέχει 0,5% v/v Θρυψίνη διαλυμένη σε EDTA. Έπειτα αραιώνεται σε PBS σε συγκέντρωση 1x ώστε να είναι έτοιμο για χρήση. Η Θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που προέρχεται από το πάγκρεας χοίρων και χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, καθώς διασπά τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων και του πολυστυρενίου και μεταξύ των κυττάρων. Διατηρείται στους 4°C, αλλά για χρησιμοποιηθεί πρέπει να βρίσκεται στην θερμοκρασία επώασης των κυττάρων (37°C).

5.2.2 Πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των WJ-MSCs πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες πολυστυρενίου των 25cm² (T25) με φίλτρο. Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης των κυττάρων αυτών είναι στους 37°C σταθερά. Αυτό επιτυγχάνεται σε κλίβανο επώασης με σταθερή παροχή 5% CO₂. Εκτός από την θερμοκρασία και τη συγκέντρωση CO₂, ο κλίβανος διατηρεί σταθερά τα επίπεδα υγρασίας και το περιβάλλον στείρο, ώστε οι συνθήκες της καλλιέργειας να είναι ιδανικές. Το στείρο περιβάλλον επιτυγχάνεται με το φιλτράρισμα του αέρα με τη χρήση φίλτρου HEPA. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιούταν με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Όλες οι διαδικασίες που αφορούν τις καλλιέργειες γίνονται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος παρέχει έναν ασηπτικό χώρο εργασίας για την αποφυγή μολύνσεων.

5.2.3 Διαχείριση καλλιεργειών

- Ανακαλλιέργεια

Τα κύτταρα, όταν πολλαπλασιασθούν αρκετά και καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας, πρέπει να αραιωθούν είτε με μεταφορά τους σε μεγαλύτερη φλάσκα είτε με την διατήρηση ενός μέρους των κυττάρων σε φλάσκα ίδιου εμβαδόν και έπειτα συμπλήρωση με φρέσκο μέσο, ώστε να είναι δυνατός ο συνεχής πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας. Με κάθε ανακαλλιέργεια τα κύτταρα αυξάνουν τα περάσματα τους (passages).

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας σε φλάσκα T25:

Αφαίρεση του παλαιού θρεπτικού υλικού

Πλύση με 2,5ml PBS

Προσθήκη 1ml Θρυψίνης 1x

Επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 3 λεπτά
Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να βεβαιωθούμε ότι έχει δράσει η θρυψίνη
Προσθήκη 4ml θρεπτικού υλικού πλήρους DMEM το οποίο απενεργοποιεί τη θρυψίνη
Μοίρασμα του περιεχομένου της φλάσκας σε δύο φλάσκες
Συμπλήρωμα θρεπτικού υλικού μέχρι τον τελικό όγκο των 5ml
Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο

- Πάγωμα

Η μέθοδος της κρυοσυντήρησης των κυττάρων χρησιμοποιείται για την διατήρησή τους μακροχρόνια εκτός καλλιέργειας. Μπορούν να αποθηκευτούν σε κατάψυξη στους -80°C μέχρι έξι μήνες και μετά μεταφέρονται σε υγρό άζωτο στους -196°C. Η καλλιέργεια είναι προτιμότερο να βρίσκεται στην εκθετική της φάση και τα κύτταρα να μην καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας πριν καταψυχθούν. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε cryovials σε FBS/DMSO σε αναλογία 9/1 και αυτά σε ειδικό δοχείο ρυθμιζόμενης ψύξης που περιέχει ισοπροπανόλη, το οποίο είναι σχεδιασμένο να επιτυγχάνει ρυθμό ψύξης πολύ κοντά στους -1°C/λεπτό, καθώς η απότομη πτώση της θερμοκρασίας δημιουργεί κρυστάλλους που είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα. Ο παράγοντας DMSO, που προστίθεται στα κύτταρα, είναι οργανικός διαλύτης και λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για τα κύτταρα, οπότε μετά την προσθήκη του, τα cryovials τοποθετούνται αμέσως στο δοχείο ρυθμιζόμενης ψύξης και στην κατάψυξη.

Πρωτόκολλο παγώματος κυττάρων:

Αφαίρεση του παλαιού θρεπτικού υλικού
Πλύση με 2,5ml PBS
Προσθήκη 1ml θρυψίνης 1x
Επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 3 λεπτά
Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να βεβαιωθούμε ότι έχει δράσει η θρυψίνη
Προσθήκη 4ml θρεπτικού υλικού πλήρους DMEM το οποίο απενεργοποιεί τη θρυψίνη
Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon
Φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
Απόρριψη υπερκειμένου
Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε FBS
Διαμοιρασμός 900μl του περιεχομένου του falcon σε κάθε cryovial
Προσθήκη 100μl DMSO σε κάθε cryovial
Μεταφορά των cryovials σε ειδικό δοχείο ρυθμιζόμενης ψύξης, ο οποίος πρέπει να βρίσκεται σε RT
Μεταφορά του δοχείου ρυθμιζόμενης ψύξης στην κατάψυξη στους -80°C
Αφαίρεση των cryovials από το δοχείο ρυθμιζόμενης ψύξης μετά από μία μέρα και διατήρηση τους στους -80°C μέχρι 6 μήνες

- Απόψυξη κυττάρων

Με την απόψυξη τα περισσότερα κύτταρα επαναφέρονται στη φυσιολογική τους λειτουργία. Η απόψυξη γίνεται σε σύντομο χρόνο ώστε το DMSO να μην προκαλέσει στρες στα κύτταρα.

Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων:

Μεταφορά του cryovial στο υδατόλουτρο (37°C) όπου όπου γίνεται ανάδευση με γρήγορες κινήσεις για 1 λεπτό

Μεταφορά του περιεχομένου του cryovial σε falcon με 5ml θρεπτικού υλικού

Φυγοκέντρωση στις 1.500 στροφές για 5 λεπτά σε RT

Απόρριψη του υπερκειμένου

Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml θρεπτικού υλικού

Μεταφορά του περιεχομένου του falcon σε φλάσκα T25

Επώαση της φλάσκας στον κλίβανο

5.3 Παρασκευή διαλύματος Τιλιροσίδης

Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε καθαρή Τιλιροσίδη σε σκόνη η οποία διαλύθηκε σε καθαρό DMSO με σκοπό την παραγωγή διαλύματος συγκέντρωσης 1mM. Σύμφωνα με έρευνες, το DMSO αποτελεί κατάλληλο διαλύτη για την Τιλιροσίδη (Jin et al., 1016; Velagarudi et al., 2014). Ποσότητες από το διάλυμα αυτό, αναμείχθηκαν με πλήρες θρεπτικό υλικό για την δημιουργία διάφορων συγκεντρώσεων, με σκοπό την επώαση κυττάρων με αυτές. Διάφορες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα που ταυτόχρονα να μην προκαλεί τοξικότητα λόγω του DMSO. Αρχικά δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 50μM, 40μM, 25μM, 10μM, 5μM και έπειτα οι συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM, 0.5μM. Η τοξικότητα των διαφορετικών συγκεντρώσεων Τιλιροσίδης αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία χρώσης trypan blue ενώ η πιθανή αντιγηραντική τους δράση αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal.

5.4 Μέθοδος χρώσης trypan blue

Η χρώση με Trypan blue είναι μια τεχνική για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας και του αριθμού των κυττάρων. Περιλαμβάνει τη χρήση της χρωστικής Trypan blue, η οποία χρωματίζει επιλεκτικά νεκρά ή κατεστραμμένα κύτταρα με κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες. Τα βιώσιμα κύτταρα διαθέτουν άθικτες μεμβράνες και αποκλείουν τη χρωστική, εμφανιζόμενα άβαφα στο μικροσκόπιο, ενώ τα μη βιώσιμα κύτταρα προσλαμβάνουν τη χρωστική, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μπλε.

Πρωτόκολλο χρώσης:

Καλλιέργεια κυττάρων σε 6-well plate
 Κάθε well περιέχει θρεπτικό υλικό με διαφορετική συγκέντρωση Τιλιροσίδης
 Επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες
 Προσθήκη 0,5ml θρυψίνης σε κάθε well
 Επώαση του 6-well plate στον κλίβανο για 3 λεπτά
 Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να βεβαιωθούμε ότι έχει δράσει η θρυψίνη
 Προσθήκη 1ml θρεπτικού υλικού σε κάθε well
 Μεταφορά του περιεχομένου κάθε well σε ξεχωριστό erpendorf
 Φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές για 5 λεπτά σε RT
 Απόρριψη του υπερκειμένου
 Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1ml PBS
 Προετοιμασία διαλύματος trypan blue 0,4% (w/v) σε PBS
 Μίξη 1ml από το κυτταρικό εναιώρημα και 1ml από το διάλυμα trypan blue
 Επώση για 3 λεπτά σε RT
 Προσθήκη μίας σταγόνας σε πλακίδιο Neubauer
 Μέτρηση των βαμμένων (νεκρών) και άβαφων (ζωντανών) κυττάρων στο μικροσκόπιο
 Υπολογισμός του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων με τον εξής τύπο:

$$\text{viable cells (\%)} = \frac{\text{total number of viable cells per ml of aliquot}}{\text{total number of cells per ml of aliquot}} \times 100$$

5.5 Μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SA-β-gal γίνεται με την επώαση των κυττάρων με το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal (5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοζίτης). Η διάσπαση του X-gal από το ένζυμο σε αυτές τις συνθήκες προσδίδει στα γηρασμένα κύτταρα ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που τα καθιστά ορατά σε οπτικό μικροσκόπιο.

Πρωτόκολλο X-gal:

- Αντιδραστήρια:
 - A. Διάλυμα μονιμοποίησης: μείγμα 2 % φορμαλδεΰδη με 0,2 % γλουτεράλδεΰδη διαλυμένα σε PBS.
 - B. Διάλυμα χρώσης:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό Νάτριο
 - 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$
 - 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM MgCl_2
 - 1mg/ml Xgal
 - Διαλυμένα σε H_2O

- Διαδικασία:
 - Καλλιέργεια κυττάρων σε 6-well plate
 - Κάθε well περιέχει θρεπτικό υλικό με διαφορετική συγκέντρωση Τιλιροσίδης
 - Επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες
 - Απομάκρυνση παλαιού θρεπτικού υλικού
 - Διπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
 - Προσθήκη 1ml διαλύματος μονιμοποίησης ανά well
 - Επώαση κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5 λεπτά
 - Διπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
 - Προσθήκη 1ml διαλύματος χρώσης ανά well
 - Επώαση σε κλίβανο απουσία CO₂ για 16-24 ώρες
 - Απομάκρυνση διαλύματος χρώσης
 - Τριπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
 - Λήψη φωτογραφιών με οπτικό μικροσκόπιο
 - Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων μπλε χρώματος επί του συνόλου των κυττάρων

5.6 Απομόνωση πρωτεϊνών

Κύτταρα περάσματος p22 επώαστηκαν σε δύο φλάσκες T25 με θρεπτικό υλικό με Τιλιροσίδα σε συγκέντρωση 5μM και 2,5μM ενώ μία φλάσκα επώαστηκε μόνο με θρεπτικό υλικό (NT) για 48 ώρες. Από τα κύτταρα αυτών των φλακών, έγινε απομόνωση πρωτεϊνών. Το διάλυμα λύσης κυττάρων RIPA/PI περιέχει 30mM Tris, 10% Γλυκερόλη, 150mM NaCl, 1% NP40 και αναστολείς πρωτεασών (PI). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας το διάλυμα λύσης και τα δείγματα διατηρούνται στο πάγο.

Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών:

- Αφαίρεση παλαιού θρεπτικού υλικού
- Πλύση με 2,5ml PBS
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης
- Επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 3 λεπτά
- Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να βεβαιωθούμε ότι έχει δράσει η θρυψίνη
- Προσθήκη 4ml θρεπτικού υλικού πλήρους DMEM το οποίο απενεργοποιεί τη θρυψίνη
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon
- Φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές για 5 λεπτά σε RT
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1ml PBS
- Μεταφορά του περιεχομένου του falcon σε erpendorf
- Φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη lysis buffer (RIPA/PI)
- Ανάδευση με vortex κάθε 5 λεπτά για 1 ώρα
- Φυγοκέντρηση 14.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C

Προσεκτική συλλογή υπερκλειμένου και μεταφορά του σε νέο eppendorf tube
Αποθήκευση στους -20°C

5.7 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Η Bradford βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε ένα πρωτεϊνικό δείγμα και στη σύγκριση αυτής της δέσμευσης με μια πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται από την αντίδραση γνωστών ποσοτήτων μιας πρότυπης πρωτεΐνης, συνήθως της αλβουμίνης βόειου ορού (BSA). Η αρχή αυτής της ανάλυσης είναι ότι η σύνδεση των πρωτεϊνών με τη χρωστική υπό όξινες συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από καφέ σε μπλε. Η μέθοδος αυτή μετρά στην πραγματικότητα την παρουσία των βασικών αμινοξικών καταλοίπων, αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης, τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής (He, 2011). Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

Πρωτόκολλο μεθόδου Bradford:

Πραγματοποιείται σε 96-well plate

Αραίωση BSA συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διάλυμα RIPA/PBS αναλογίας 1/3 (1ml RIPA και 2ml PBS)

Δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων BSA με συγκεντρώσεις 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125

Προσθήκη 25 μl από κάθε αραιώση BSA και 25μl σκέτο RIPA/PBS ως blank σε 96-well plate

Προσθήκη 20 μl PBS και 5 μl από κάθε δείγμα

Προσθήκη 200 μl διαλύματος Bradford σε κάθε well που τοποθετήθηκαν αραιώσεις BSA και δείγματα

Επώαση δείγματος για 30 λεπτά στον κλίβανο

Ανάδευση δειγμάτων για 1 λεπτό

Επώαση για 5 λεπτά σε RT

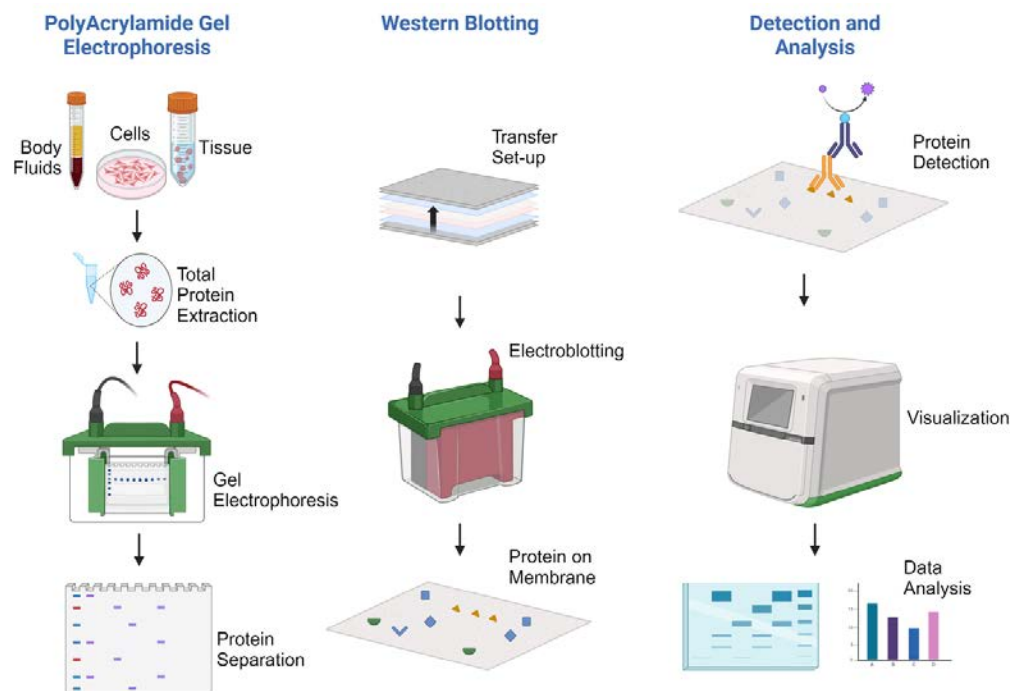
Φωτομέτρηση του 96-well plate στα 595 nm

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης (OD) των γνωστών συγκεντρώσεων της BSA

Υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων με τη χρήση excel

5.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Η Western blotting είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών που απομονώνονται από κύτταρα. Η τεχνική πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια: (1) ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, (2) μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη, (3) επισήμανση της πρωτεΐνης-στόχου με τη χρήση κατάλληλου πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος και (4) οπτικοποίηση (Mahmood & Yang, 2012).



Εικόνα 14: Τα στάδια της ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Patel, 2024)

5.8.1 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE το μείγμα των πρωτεϊνών διαχωρίζεται με βάση το μοριακό βάρος σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η διαδικασία περιλαμβάνει την αρχική μετουσίωση των πρωτεϊνών με την εφαρμογή SDS (Sodium dodecyl-sulfate), το οποίο τις κάνει να χάνουν τις δομές ανώτερης τάξης και να γίνονται γραμμικές. Δεδομένου ότι το SDS είναι αρνητικά φορτισμένο, συνδέεται με όλα τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης, προσδίδοντας σε όλες τις πρωτεΐνες ένα αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μοριακή τους μάζα. Το στάδιο αυτό ακολουθείται από ηλεκτροφόρηση μέσω μιας πορώδους μήτρας πηκτής πολυακρυλαμίδης που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με εξαιρετική ανάλυση με βάση τη μοριακή μάζα. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης διαχωρίζει τις πρωτεΐνες επιτρέποντας τις πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους να διέλθουν ταχύτερα από τους πόρους της σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες που μετακινούνται με πιο αργό ρυθμό (Nowakowski et al., 2014).

- Προετοιμασία πηκτής:

Η πηκτή στην SDS-PAGE έχει δύο διακριτά στρώματα, που ονομάζονται πηκτή "στοίβαξης" (stacking gel) στο ανώτερο τμήμα και πηκτή "διαχωρισμού" (separating gel) στο κατώτερο στρώμα. Η πηκτή στοίβαξης αποτελείται από 3,9% ακρυλαμίδη και σε αυτή τοποθετούνται τα δείγματα πρωτεϊνών έτσι ώστε όλα τα δείγματα να ξεκινήσουν την ηλεκτροφόρηση ταυτόχρονα. Η πηκτή διαχωρισμού μπορεί να περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις ακρυλαμίδης. Στη συγκεκριμένη εργασία

χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 12% καθώς οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν έχουν σχετικά μικρό μοριακό βάρος (16-53kDa).

Αντιδραστήρια πηκτής στοίβαξης:

0,65 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide

1,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8

3,05 mL ddH₂O

25 µL 10%(w/v) ammonium persulfate

7,5 µL TEMED

Αντιδραστήρια πηκτής διαχωρισμού:

4 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide

2,5 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8

3,5 mL H₂O

50µl 10%(w/v) ammonium persulfate

15µl TEMED

Πρωτόκολλο παρασκευής της πηκτής πολυακρυλαμίδης:

Συναρμολόγηση της βάσης για τη στερεοποίηση δύο γυάλινων τζαμιών (ένα μεγάλο και ένα μικρό) ενδιάμεσα από τα οποία θα πήξει η πηκτή

Προσθήκη του διαλύματος πηκτής διαχωρισμού έως ότου η στάθμη είναι ίση με την πράσινη γραμμή που συγκρατεί τα γυάλινα τζάμια

Προσθήκη H₂O απο πάνω

Αναμονή 15-30 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί η πηκτή

Απομάκρυνση του νερού

Προσθήκη της πηκτής στοίβαξης

Τοποθέτηση της χτένας, εξασφαλίζοντας ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα

Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί η πηκτή

- Προετοιμασία δειγμάτων:

Σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής “φορτώνονται” 24µl δείγματος. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών των αρχικών δειγμάτων γίνεται μετά τη μέθοδο Bradford. Με βάση την μέθοδο φωτομέτρησης Bradford, υπολογίζεται επίσης ο όγκος που πρέπει να ληφθεί από το αρχικό δείγμα ώστε να περιέχεται σε αυτό 20 µg πρωτεΐνης. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 4µl διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (Sample Loading Buffer 6x) το οποίο περιέχει 60mM Tris-HCl pH 6.8, 20% γλυκερόλη, 2% SDS, 4% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.01% μπλε της βρωμοφαινόλης. Το διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών περιέχει SDS και έναν αναγωγικό παράγοντα όπως τη β-μερκαπτοαιθανόλη έτσι ώστε να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και να αποδιαταχθούν οι τρισδιάστατες δομές τους. Η χρωστική φόρτωσης μπλε της βρωμοφαινόλης προστίθεται στα δείγματα την παροχή χρώματος για την οπτικοποίηση και την παρακολούθηση της μετανάστευσης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Η γλυκερόλη αποτελεί έναν παράγοντα πυκνότητας για να βοηθήσει τα δείγματα να βυθιστούν στα πηγαδάκια (Patel, 2024). Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O. Τέλος γίνεται θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C περίπου για 5 λεπτά η

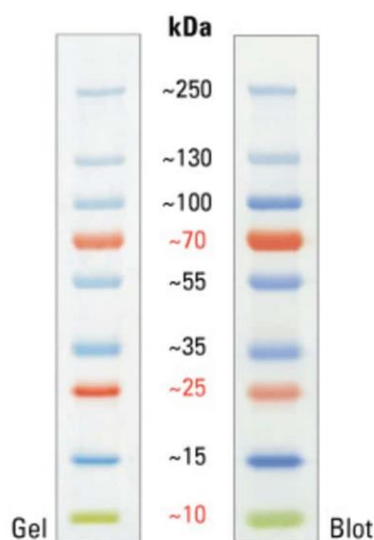
οποία βοηθά στην πλήρη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Μαζί με τα δείγματα, σε ένα από τα πηγαδάκια “φορτώνεται” ένας μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), ο οποίος περιέχει ένα μείγμα εξαιρετικά καθαρισμένων πρωτεϊνών καθορισμένου ή γνωστού μοριακού βάρους και λειτουργεί ως σημείο αναφοράς για τις πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση και την ανοσοαποτύπωση.

Αντιδραστήρια:

4 μ l Sample Loading Buffer 6x

x μ l πρωτεΐνης για να επιτευχθεί συγκέντρωσή 20 μ g

(20-x) μ l ddH₂O



Εικόνα 15: Ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) (Thermo Fisher Scientific, n.d.)

- Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης:

Τοποθέτηση της βάσης με τις πηκτές πολυακρυλαμίδης στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού αφαιρεθούν οι χτένες από τις πηκτές

Παρασκευή διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer): Μίξη 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x και 900 ml ddH₂O

Προσθήκη του διαλύματος ηλεκτροφόρησης στη συσκευή ώστε να καλύπτει πλήρως τις πηκτές

Φόρτωμα των δειγμάτων και του μάρτυρα

Σύνδεση με την πηγή τροφοδοσίας

Ενεργοποίηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στα 70 Volt για 15 λεπτά και στη συνέχεια στα 180 Volt για 40 λεπτά

5.8.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Κατά το στάδιο αυτό γίνεται μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene difluoride) με βάση τις αρχές

της απλής διάχυσης και της ροής διαλύτη με τη βοήθεια κενού. Σε αυτή τη μεμβράνη θα γίνει στη συνέχεια η πρόσδεση πρώτου και δεύτερου αντισώματος.

Πρωτόκολλο μεταφοράς:

Παρασκευή διαλύματος μεταφοράς 1x (Transfer Buffer 1x): 100 ml Transfer Buffer 10x, 200 ml Μεθανόλη, 700 ml ddH₂O

Μετά από την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, επώαση της πηκτής πολυακρυλαμίδης, διηθητικών χαρτιών Whitman και των σφουγγαράκιων στο διάλυμα μεταφοράς για 10 λεπτά

Ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF με επώαση σε μεθανόλη για 30'' με ανάδευση και επώαση της για 10 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς

Δημιουργία "sandwich" τοποθετώντας τα υλικά στο ειδικό καλούπι με την εξής σειρά: σφουγγαράκι στη μαύρη πλευρά του καλουπιού, 2 χαρτάκια Whitman, πηκτή πολυακρυλαμίδης, μεμβράνη PVDF, 2 χαρτάκια Whitman, σφουγγαράκι

Τοποθέτηση του "sandwich" στη συσκευή μεταφοράς με σωστή κατεύθυνση (μαύρη στο μαύρο και άσπρο στο κόκκινο)

Σύνδεση με την πηγή τροφοδοσίας

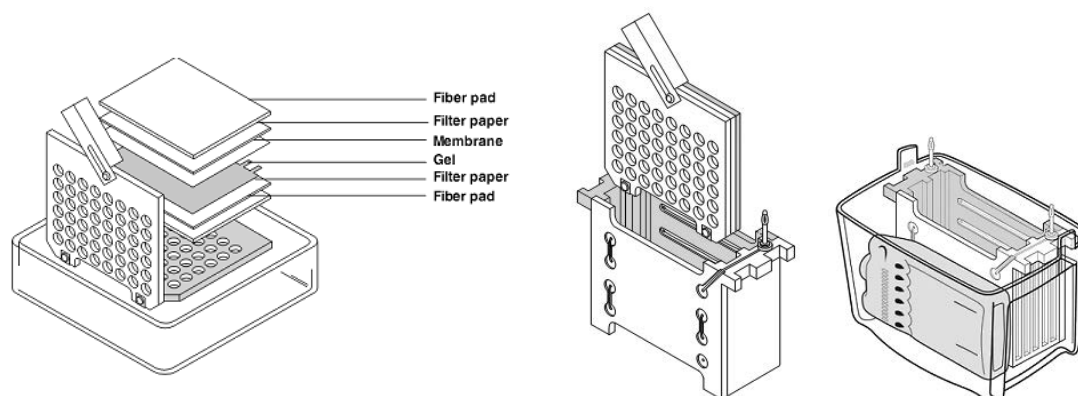
Ενεργοποίηση της συσκευής στα 400 mA για 90 λεπτά

Μετά από την ολοκλήρωση της μεταφοράς, αποσυναρμολόγηση του "sandwich" και προσεκτική αφαίρεση της μεμβράνης

Χρώση της μεμβράνης με χρωστική Ponceau, μια κόκκινη χρωστική που θα εμφανίσει τις «μπάντες» των πρωτεϊνών στην μεμβράνη

Παρασκευή διαλύματος πλύσης TBS-T (Tris-Buffered Saline, 0,1 % Tween-20): 100 ml TBS 10x, 900 ml H₂O, 1ml Tween-20

Τρεις πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία υπό ανάδευση



Εικόνα 16: Δημιουργία του "sandwich" και τοποθέτησή του στη συσκευή μεταφοράς με σωστή κατεύθυνση (Lodish et al., 2012)

5.8.3 Επώαση μεμβράνης με πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα

Πριν την επώαση με πρωτοταγή αντισώματα, γίνεται blocking της μεμβράνης προκειμένου να καλυφθούν όλες οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος. Το διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (Blocking buffer) παρασκευάζεται με 2,5 g άπαχο

αποξηραμένο γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε 50 ml διαλύματος TBS-T. Η επώαση γίνεται για 60 λεπτά. Έπειτα γίνεται επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα που αφορά την πρωτεΐνη που μελετάται μέχρι την επόμενη μέρα στους 4°C. Οι πρωτεΐνες που μελετώνται στη συγκεκριμένη εργασία είναι οι p16 και p21 που αποτελούν δείκτες γήρανσης και η β-ακτίνη ως ιδιοσυστατικό γονίδιο με βάση το οποίο θα γίνει η ποσοτικοποίηση των υπόλοιπων πρωτεϊνών. Τέλος γίνεται επώαση της μεμβράνης με δευτεροταγή αντισώματα για 60 λεπτά υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Το πρωτοταγές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ενώ το δευτεροταγές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρωτοταγές μη ειδικά. Τα δευτεροταγή αντισώματα προέρχονται από κουνέλι ή ποντίκι και επιλέγονται ανάλογα με την προέλευση του πρωτοταγούς αντισώματος. Η συγκέντρωση του δευτεροταγούς αντισώματος εξαρτάται από τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αντισώματα διαλύθηκαν σε non fat dry milk powder blocking buffer σε TBS-T 5%.

Στον πίνακα παρουσιάζονται τα πρωτοταγή αντισώματα και τα αντίστοιχα δευτεροταγή που χρησιμοποιήθηκαν:

Πρωτοταγή αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
p16 INK4A, rabbit monoclonal #92803, 1:1000	Anti-rabbit (HRP), 1:10000
p21 WAF1/CIP1, rabbit monoclonal #2947, 1:1000	Anti-rabbit (HRP), 1:10000
β-actin, rabbit monoclonal, 1:3000	Anti-rabbit (HRP), 1:10000

Πρωτόκολλο:

Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (Blocking buffer) για 60 λεπτά σε RT υπό ανάδευση

Τρεις πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία υπό ανάδευση

Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα μέχρι την επόμενη μέρα στους 4°C

Τρεις πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία υπό ανάδευση

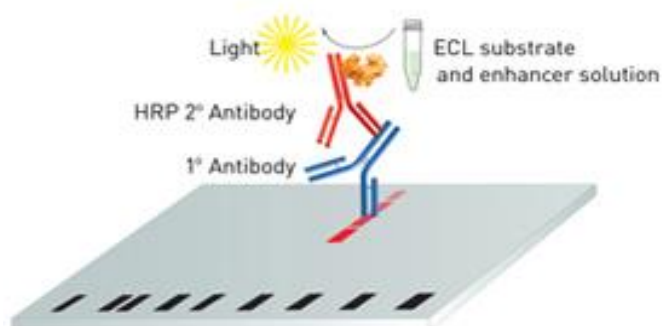
Επώαση της μεμβράνης με δευτεροταγή αντισώματα για 60 λεπτά υπό ανάδευση σε RT

Τρεις πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T για 10 λεπτά η κάθε μία υπό ανάδευση

5.8.4 Αποτύπωση σήματος αντισωμάτων

Η οπτικοποίηση και ο προσδιορισμός της παρουσίας συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην μεμβράνη γίνεται με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας. Σε αυτή τη μέθοδο, η μεμβράνη επωάζεται σε ενισχυτικό σήματος ECL που περιέχει υπεροξείδιο και

λουμινόλη. Το δευτεροταγές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP) και η λουμινόλη είναι ένα χημειοφωταυγές υπόστρωμα της HRP. Παρουσία υπεροξειδίου, η HRP οξειδώνει τη λουμινόλη σε ένα διεγερμένο προϊόν που ονομάζεται 3-αμινοφθαλικό άλας και εκπέμπει φως στα 425 nm. Η εκπομπή συνεχίζεται έως ότου το 3-αμινοφθαλικό διασπαστεί και εισέλθει στη βασική κατάσταση. Το εκπεμπόμενο φως μπορεί να καταγραφεί με έκθεση σε φιλμ ακτίνων X το οποίο δημιουργεί σκοτεινές γραμμές (Mahmood & Yang, 2012). Αυτές οι σκοτεινές γραμμές είναι αντιπροσωπευτικές της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση της.



Εικόνα 17: Αντίδραση της λουμινόλης με το HRP και παραγωγή προϊόντος που εκπέμπει φως (ABP Biosciences, 2024)

Πρωτόκολλο αποτύπωσης σήματος:

Επώαση της μεμβράνης PVDF σε ενισχυτικό σήματος ECL για 3 λεπτά

Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί

Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί

Μεταφορά της μεμβράνης PVDF σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή

Αναγνώριση του σήματος των ζωνών της πρωτεΐνης με χρήση του ανάλογου προγράμματος από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή

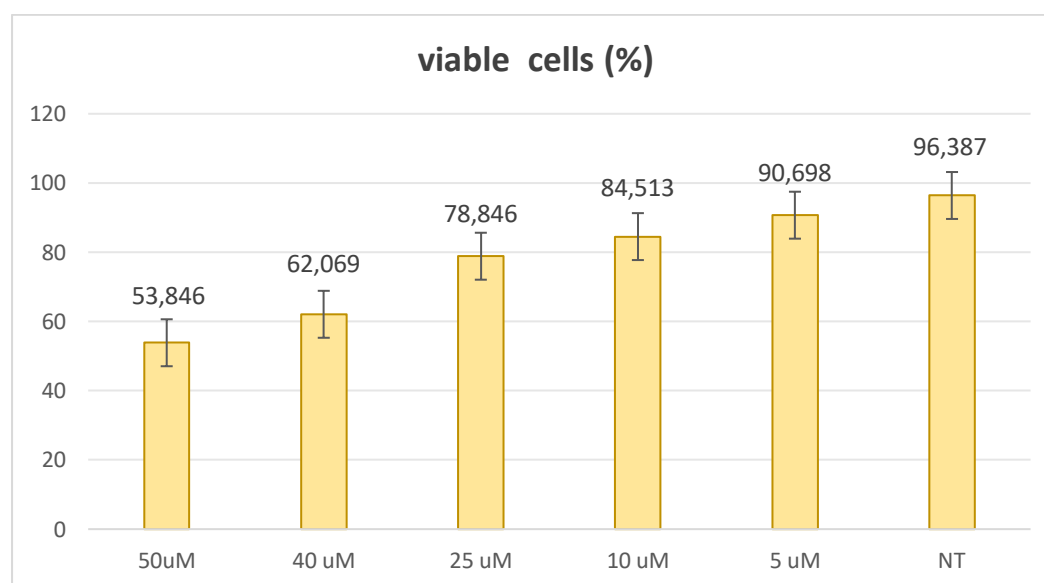
6. Αποτελέσματα

6.1 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας του διαλύματος Τιλιροσίδης

Ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας του διαλύματος Τιλιροσίδης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο χρώσης trypan blue. Το διάλυμα Τιλιροσίδης περιέχει σκόνη καθαρής Τιλιροσίδης που διαλύθηκε σε DMSO, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα. Μελετήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος Τιλιροσίδης σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ο σκοπός της χρήσης της μεθόδου είναι να διαπιστώσουμε ποιες συγκεντρώσεις διαλύματος Τιλιροσίδης δεν προκαλούν θάνατο στα κύτταρα και επομένως είναι κατάλληλες για χρήση.

Αρχικά δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 50μM, 40μM, 25μM, 10μM, 5μM και NT (no treatment, περιείχε μόνο θρεπτικό υλικό DMEM) σε κύτταρα περάσματος p20 και έγινε μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Ο υπολογισμός του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων γίνεται με τον τύπο:

$$\text{viable cells (\%)} = \frac{\text{total number of viable cells per ml of aliquot}}{\text{total number of cells per ml of aliquot}} \times 100$$

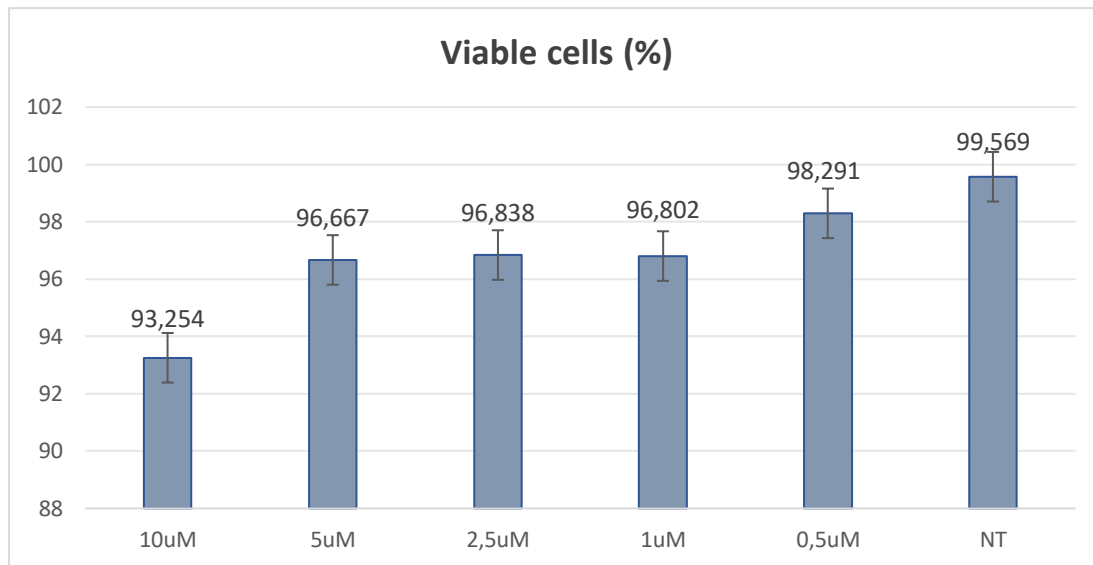


Διάγραμμα 1: Ποσοστά των ζωντανών κυττάρων για τις συγκεντρώσεις 50μM, 40μM, 25μM, 10μM, 5μM και NT

Παρατηρούμε ότι:

- Οι συγκεντρώσεις 50μM, 40μM και 25μM έχουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας κυττάρων οπότε δεν είναι κατάλληλες για το πείραμα.
- Οι συγκεντρώσεις 10μM και 5μM έχουν υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων οπότε είναι κατάλληλες για το πείραμα.
- Το NT προκάλεσε την μικρότερη τοξικότητα στα κύτταρα.

Η μέθοδος επαναλήφθηκε με τις συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM, 0.5μM και NT (no treatment, περιείχε μόνο θρεπτικό υλικό DMEM).



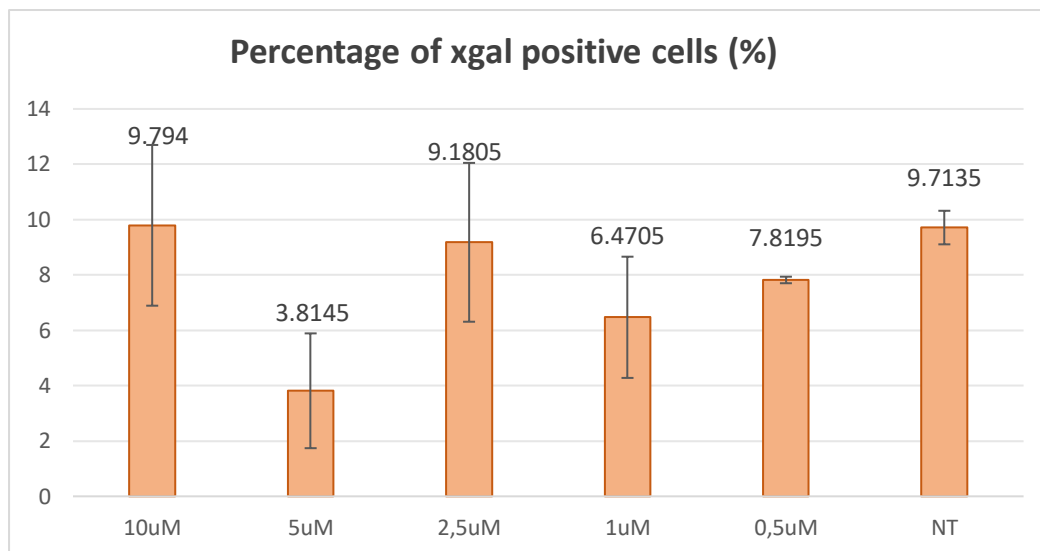
Διάγραμμα 2: Ποσοστά των ζωντανών κυττάρων για τις συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM, 0.5μM και NT

Παρατηρούμε ότι:

- Τα κύτταρα, στα οποία δεν έγινε καμία επίδραση (NT), είχαν το υψηλότερο ποσοστό ζωντανών κυττάρων όπως ήταν αναμενόμενο.
- Τα κύτταρα που επώαστηκαν με 10μM Τιλιοσίδης είχαν το χαμηλότερο ποσοστό ζωντανών κυττάρων.
- Τα κύτταρα που επώαστηκαν με 0.5μM Τιλιοσίδης είχαν ποσοστό λίγο χαμηλότερο από αυτό των κυττάρων χωρίς επίδραση (NT).
- Τα κύτταρα που επώαστηκαν με 5μM, 2.5μM και 1μM Τιλιοσίδης είχαν παρόμοιο ποσοστό ζωντανών κυττάρων.

6.2 Προσδιορισμός της δραστικότητας SA-β-gal

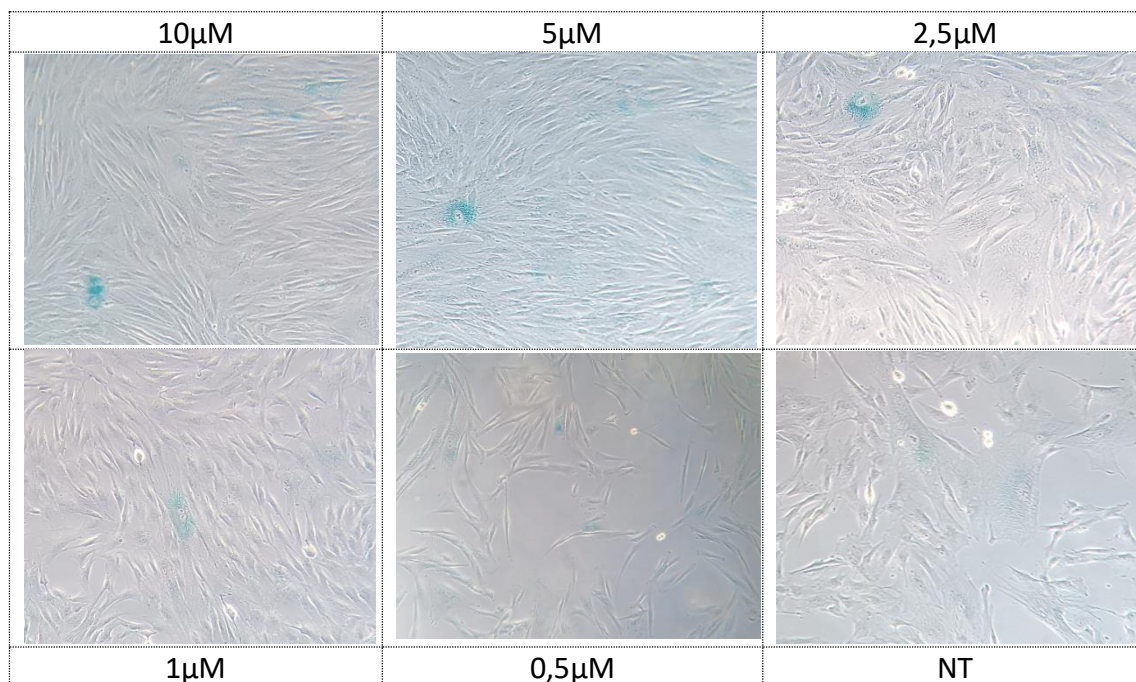
Ο προσδιορισμός της δραστικότητας SA-β-gal αποτελεί έναν από τους δείκτες κυτταρικής γήρανσης και πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η επίδραση της Τιλιοσίδης στη γήρανση των κυττάρων. Δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM και 0.5μM ώστε να βρεθεί αυτή με την μεγαλύτερη αντιγηραντική δράση. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις της μεθόδου. Στην πρώτη επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα περάσματος p27 και στην δεύτερη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα περάσματος p25.



Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ποσοστού θετικών στο x-gal κυττάρων για τις συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM, 0.5μM και NT

Παρατηρούμε ότι:

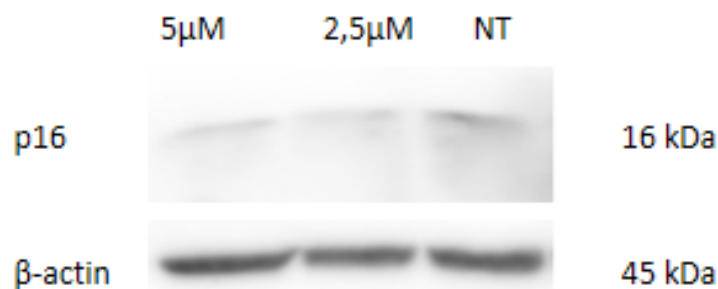
- Τα ποσοστά των κυττάρων που επώαστηκαν με 10μM και 2,5μM Τιλοροσίδης και των κυττάρων χωρίς επίδραση (NT) είχαν το υψηλότερο ποσοστό γηρασμένων κυττάρων.
- Τα κύτταρα που επώαστηκαν με 5μM Τιλοροσίδης είχαν το χαμηλότερο ποσοστό γηρασμένων κυττάρων.
- Τα ποσοστά των κυττάρων που επώαστηκαν με 1μM και 0.5μM Τιλοροσίδης είναι παρόμοια με ενδιάμεσες τιμές.



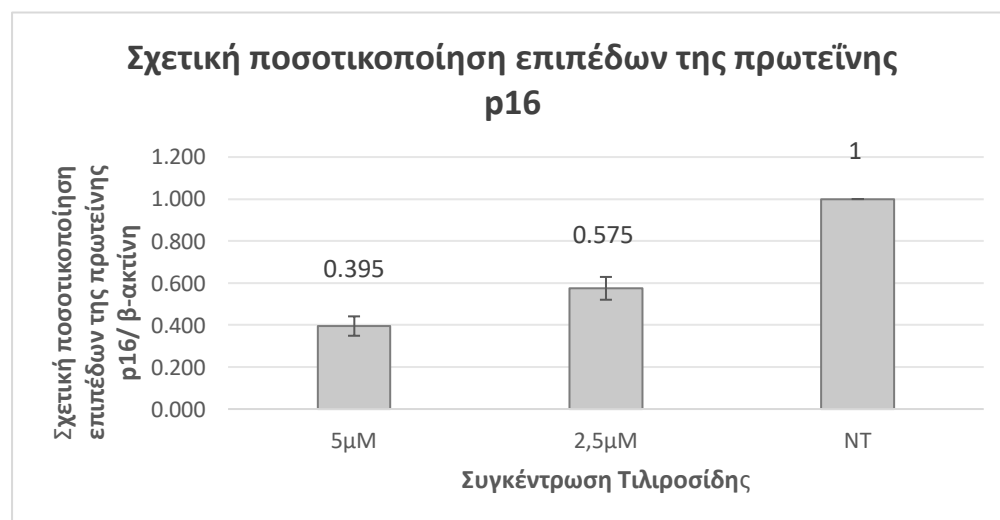
Εικόνα 18: Ενδεικτικές φωτογραφίες μικροσκοπίου από μέθοδο προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal για τις συγκεντρώσεις 10μM, 5μM, 2.5μM, 1μM, 0.5μM και NT

6.3 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνών-δεικτών γήρανσης

Μέσω της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες p16 και p21 στα 16kDa και 21kDa αντίστοιχα, οι οποίες αποτελούν δείκτες κυτταρικής γήρανσης. Επίσης ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη β-ακτίνη η οποία αποτελεί ιδιοσυστατική πρωτεΐνη και χρησιμοποιήθηκε ως control κατά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη p16 από κύτταρα που επώαστηκαν με συγκέντρωση Τιλιροσίδης 5μM και 2,5μM και από κύτταρα χωρίς επίδραση (NT). Χρήση β-ακτίνης ως control.



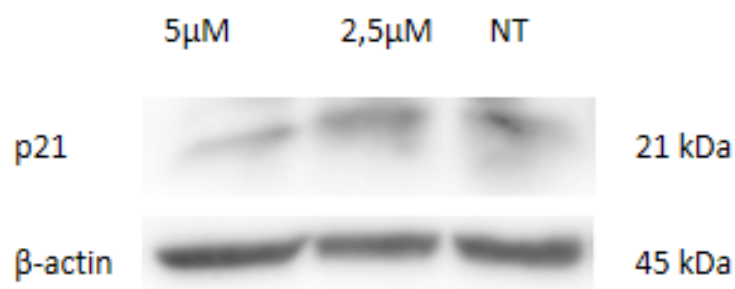
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα σχετικής ποσοτικοποίησης επιπέδων της πρωτεΐνης p16 σε σχέση με την β-ακτίνη από κύτταρα που επώαστηκαν με συγκέντρωση Τιλιροσίδης 5μM και 2,5μM και από κύτταρα χωρίς επίδραση (NT). Για την σύγκριση των σχετικών επιπέδων ορίζεται το NT ίσο με 1.

Παρατηρούμε ότι:

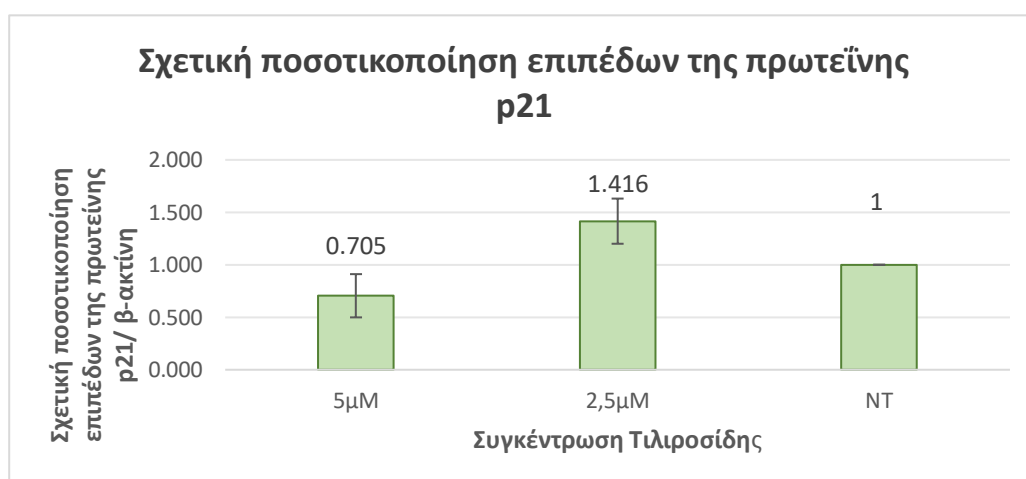
- Οι τιμή των σχετικών επιπέδων της p16 είναι χαμηλότερη στα κύτταρα που επώαστηκαν με 5μM Τιλιροσίδης σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση.
- Ενώ η τιμή των σχετικών επιπέδων της p16 στα κύτταρα που επώαστηκαν με 2,5μM Τιλιροσίδης είναι υψηλότερη από αυτή στα κύτταρα που επώαστηκαν με

5μM Τιλιροσίδης και χαμηλότερη από αυτή στα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση.

- Η συγκέντρωση της Τιλιροσίδης είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού των γηρασμένων κυττάρων και ανάλογη της αντιγηραντικής δράσης.



Εικόνα 20: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη p21 από κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση Τιλιροσίδης 5μM και 2,5μM και από κύτταρα χωρίς επίδραση (NT). Χρήση β-ακτίνης ως control.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα σχετικής ποσοτικοποίησης επιπέδων της πρωτεΐνης p21 σε σχέση με την β-ακτίνη από κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση Τιλιροσίδης 5μM και 2,5μM και από κύτταρα χωρίς επίδραση (NT). Για την σύγκριση των σχετικών επιπέδων ορίζεται το NT ίσο με 1.

Παρατηρούμε ότι:

- Οι τιμές των σχετικών επιπέδων της p21 δεν ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τις τιμές των σχετικών επιπέδων της p16.
- Η τιμή των σχετικών επιπέδων της p21 είναι χαμηλότερη στα κύτταρα που επωάστηκαν με 5μM Τιλιροσίδης σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση.
- Ενώ η τιμή των σχετικών επιπέδων της p21 στα κύτταρα που επωάστηκαν με 2,5μM Τιλιροσίδης είναι υψηλότερη από αυτή στα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση.

7. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της φυτικής ουσίας Τιλιροσίδη στην κυτταρική γήρανση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων γέλης Wharton. Η κυτταρική γήρανση είναι μία σταθερή και γενικά μη αναστρέψιμη έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο που επάγεται ως απόκριση στο ενδογενές ή εξωγενές κυτταρικό στρες και μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά ως αντικαρκινικός μηχανισμός που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των προνεοπλασματικών κυττάρων. Ωστόσο, η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων οδηγεί στη γήρανση του οργανισμού και τις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Η γήρανση των βλαστικών κυττάρων θα μπορούσε να εμποδίσει την ικανότητα των ιστών να επιδιορθώνονται και να αναγεννώνται. Βάσει ερευνών, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Τιλιροσίδη, ένα φυτικό γλυκοζιτικό φλαβονοειδές, μπορεί να έχει θετική επίδραση στη γήρανση των κυττάρων.

Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης πειραματικά, αρχικά προσδιορίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος Τιλιροσίδης με τις μεθόδους χρώσης trypan blue και δραστηρότητας του ενζύμου SA-β-γαλακτοζιδάση. Η μέθοδος χρώσης trypan blue, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας του διαλύματος Τιλιροσίδης, υπέδειξε ότι οι συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 10μM είχαν πολύ μικρό ποσοστό τοξικότητας. Τα αποτελέσματα της μεθόδου δραστηρότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση απέδειξαν πως η επώαση κυττάρων με διάλυμα Τιλιροσίδης 5μM είχε το χαμηλότερο ποσοστό γηρασμένων κυττάρων, χαμηλότερο από τα κύτταρα στα οποία δεν έγινε καμία επίδραση. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια πρώτη ένδειξη πως η Τιλιροσίδη μπορεί να έχει αντιγηραντική δράση. Βέβαια η δράση της Τιλιροσίδης σε συγκέντρωση 2,5μM δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς το ποσοστό των γηρασμένων κυττάρων είναι από τα μεγαλύτερα και παρόμοιο αυτό των κυττάρων χωρίς επίδραση.

Ακολουθώντας, έγινε ανίχνευση των δεικτών γήρανσης p16 και p21 οι οποίοι εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στα κύτταρα που βρίσκονται σε γήρανση. Επίσης έγινε ανίχνευση και της ιδιοσυστατικής πρωτεΐνης β-ακτίνης μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως control κατά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης δείχνουν τα σχετικά επίπεδα των δεικτών. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν πως οι τιμές των σχετικών επιπέδων των δύο δεικτών (p16, p21) είναι χαμηλότερες στα κύτταρα που επωάστηκαν με διάλυμα Τιλιροσίδης 5μM σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση, δεδομένα που υποστηρίζουν την αντιγηραντική δράση της Τιλιροσίδης. Επιπλέον, στα κύτταρα που επωάστηκαν με 2,5μM Τιλιροσίδης, η τιμή των σχετικών επιπέδων της p16 είναι υψηλότερη από αυτή στα κύτταρα που επωάστηκαν με 5μM Τιλιροσίδης και χαμηλότερη από αυτή στα κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση, γεγονός που υποδεικνύει πως η συγκέντρωση της Τιλιροσίδης είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσοστού των γηρασμένων κυττάρων και ανάλογη της αντιγηραντικής δράσης. Παρ' όλα αυτά, η τιμή των σχετικών επιπέδων της p21 στα κύτταρα που επωάστηκαν με 2,5μM Τιλιροσίδης είναι υψηλότερη από αυτή στα

κύτταρα στα οποία δεν είχε γίνει καμία επίδραση, το οποίο δεν συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματα και δεν υποδηλώνει αντιγηραντική δράση.

Σύμφωνα με το άρθρο των Chatzigeorgiou et al. (2017) το εκχύλισμα από τους καρπούς του *Platanus orientalis* άσκησε αντιοξειδωτικές επιδράσεις, ενεργοποίησε τους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς και παρέτεινε ήπια τη μακροζωία των μυγών *Drosophila Melanogaster*. Μετά τη χημική ανάλυση του εκχυλίσματος από τους καρπούς *Platanus Orientalis* διαπιστώθηκε ότι οι κυριότερες ενώσεις που περιείχονταν σε αυτό ήταν η Πλατανοσίδη και η Τιλιροσίδη, οι οποίες ανήκουν στους κουμαροϋλ-γλυκοζίτες της καεμφερόλης. Η μελέτη καθαρής Τιλιροσίδης που ακολούθησε έδειξε επίσης βιοδραστικότητα κατά των οξειδωτικών και της ενεργοποίησης πρωτεοστατικών μηχανισμών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Τιλιροσίδη πιθανότατα αντιπροσωπεύει ένα από τα σημαντικότερα βιοδραστικά μόρια στο συνολικό εκχύλισμα των καρπών *P. orientalis*. Συγκεκριμένα στις μύγες, η καθαρή Τιλιροσίδη ενίσχυσε τις αντιοξειδωτικές αποκρίσεις των ιστών, ενεργοποίησε τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος και των λυσοσωματικών καθεψινών, βελτίωσε φαινότυπους που σχετίζονται με την ηλικία και παρέτεινε τη μακροζωία τους. Επίσης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες, η Τιλιροσίδη δεν άσκησε τοξικότητα, ενίσχυσε ήπια τις δραστηριότητες του πρωτεασώματος και καθυστέρησε την κυτταρική γήρανση.

Επιπρόσθετα, σε προηγούμενη μεταπτυχιακή διατριβή που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο (Χριστοδούλου, 2023) μελετήθηκαν δέκα φυτικά εκχυλίσματα σε καλλιέργειες ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων απομονωμένα από την γέλη του Wharton, έξι από τα οποία προέρχονταν από το φυτό *Platanus Orientalis*. Το υδατικό εκχύλισμα από σπόρους του *Pl. Orientalis* σε συγκέντρωση 0,1% παρουσίασε την μεγαλύτερη αντιγηραντική δράση στη δοκιμασία δραστηριότητας του ενζύμου SA-β-γαλακτοζιδάση καθώς και χαμηλή τιμή των σχετικών επιπέδων της πρωτεΐνης-δείκτη $p16$. Επιπλέον η επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα παρουσίασε αμελητέο ποσοστό βλαβών στο DNA, μικρότερο και από το αντίστοιχο δείγμα NT στο οποίο δεν είχε προστεθεί κανένα εκχύλισμα, αποδεικνύοντας περαιτέρω την αντιγηραντική του δράση.

Συμπερασματικά, το μεγαλύτερο μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών και υποστηρίζουν πως η Τιλιροσίδη μπορεί να έχει αντιγηραντικές ιδιότητες. Η διαφωνία ορισμένων αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας σε σχέση με τις παραπάνω μελέτες μπορεί να οφείλεται στις άλλες ουσίες που περιέχονται στο εκχύλισμα και μπορεί να επηρεάζουν την δράση της Τιλιροσίδης. Επιπλέον οι διαφορές μεταξύ οργανισμών (*Drosophila Melanogaster* - άνθρωπος) και μεταξύ κυτταρικών τύπων (βλαστοκύτταρα - ινοβλάστες) μπορεί να είναι υπεύθυνες για την απόκλιση μεταξύ αποτελεσμάτων. Επίσης πρέπει να ληφθούν υπόψιν τυχόν σφαλμάτων που μπορεί να συνέβησαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Παρ' όλα αυτά, δεν μπορεί να διεξαχθεί ξεκάθαρο συμπέρασμα. Χρειάζεται να πραγματοποιηθούν περισσότερες επαναλήψεις του πειράματος σε περισσότερους δότες για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Επίσης μένουν ακόμα ερωτήματα

που πρέπει να απαντηθούν όπως ποιο είναι το εύρος και η σημαντικότητα της δράσης της Τιλιοσιδης καθώς και με ποιον τρόπο δρα η Τιλιοσιδη στη πρόληψη της γήρανσης.

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ABP Biosciences (2024). ECL Western Blot Reagent. Retrieved 9/2024, from <https://www.abpbio.com/product/ecl-western-blot/>

Acosta, J. C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., & Gil, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>

Alison, M., R., Poulsom, R., Forbes, S., Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology*, 197(4), 419-423. <https://doi.org/10.1002/path.1187>

Alkoholifi, F.K., Devi, S., Aldawsari, M.F., Foudah, A.I., Alqarni, M.H., Salkini, M.A., Sweilam, S.H. (2023) Effects of Tiliroside and Lisuride Co-Treatment on the PI3K/Akt Signal Pathway: Modulating Neuroinflammation and Apoptosis in Parkinson's Disease. *Biomedicines*, 11(10), 2735. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102735>

Aravinthan, A. (2015) Cellular senescence: a hitchhiker's guide. *Human Cell* 28, 51-64. <https://doi.org/10.1007/s13577-015-0110-x>

Biran, A., Perelmutter, M., Gal, H., Burton, D. G., Ovadya, Y., Vadai, E., Geiger, T., & Krizhanovsky, V. (2015). Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes & development*, 29(8), 791-802. <https://doi.org/10.1101/gad.259341.115>

Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J. C., Hansen, K. H., & Helin, K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development*, 21(5), 525-530. <https://doi.org/10.1101/gad.415507>

Calzada, F., Basurto, J. C., Barbosa, E., Velázquez, C., Hernández, N. G., Ordoñez Razo, R. M., Luna, D. M., & Mulia, L. Y. (2017). Antiprotozoal Activities of Tiliroside and other Compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Pharmacognosy research*, 9(2), 133-137. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204644>

Campagnoli, C., Roberts, I. A. G., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., & Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396-2402. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2396>

- Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chagastelles, P. C., Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J. Y., Pope, B. D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S. A., Salama, R., Carroll, T., Stark, R., Janky, R., Narita, M., Xue, L., Chicas, A., Núñez, S., Janknecht, R., Hayashi-Takanaka, Y., Wilson, M. D., Marshall, A., ... Narita, M. (2012). Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Molecular cell*, 47(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>
- Chatzigeorgiou, S., Thai, Q. D., Tchoumtchoua, J., Tallas, K., Tsakiri, E. N., Papassideri, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L., & Trougakos, I. P. (2017). Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 33, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.009>
- Chen, J. P., Li, R., Jiang, J. X., & Chen, X.-D. (2023). Autocrine factors produced by mesenchymal stem cells in response to cell–cell contact inhibition have anti-tumor properties. *Cells*, 12(17), 2150. <https://doi.org/10.3390/cells12172150>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Collins, K., & Mitchell, J. R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21(4), 564–579. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205083>
- Corrêa, W. R., Serain, A. F., Aranha Netto, L., Marinho, J. V. N., Arena, A. C., Figueiredo de Santana Aquino, D., Kuraoka-Oliveira, Â. M., Júnior, A. J., Bernal, L. P. T., Kassuya, C. A. L., Salvador, M. J. (2018). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Extract, Tiliroside, and Patuletin 3-O-β-D-Glucopyranoside from *Pfaffia townsendii* (Amaranthaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 6057579. <https://doi.org/10.1155/2018/6057579>
- Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M. D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S. W., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A. et al. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO journal*, 35(7), 724–742. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592862>
- Cuollo, L., Antonangeli, F., Santoni, A., & Soriani, A. (2020). The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy

and Age-Related Diseases. *Biology*, 9(12), 485.

<https://doi.org/10.3390/biology9120485>

Da'i, M., Wikantyasning, E. R., Wahyuni, A. S., Kusumawati, I. T. D., Saifudin, A., Suhendi, A. (2016). Antiproliferative properties of tiliroside from *Guazuma ulmifolia* Lamk on T47D and MCF7 cancer cell lines. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 6(6), 627-633. <https://njppp.com/fulltext/28-1467270799.pdf>

Da Silva-Álvarez, S., Guerra-Varela, J., Sobrido-Cameán, D., Quelle, A., Barreiro-Iglesias, A., Sánchez, L., & Collado, M. (2020). Developmentally-programmed cellular senescence is conserved and widespread in zebrafish. *Aging*, 12(18), 17895–17901. <https://doi.org/10.18632/aging.103968>

de Lope, C., García-Lucena, R., Magariños, M., León, Y., Casa-Rodríguez, N., Contreras, N., Escudero-Iriarte, C., Varela-Nieto, I., Maire, P., & Palmero, I. (2023). Dysfunction of programmed embryo senescence is linked to genetic developmental defects. *Development (Cambridge, England)*, 150(9), dev200903. <https://doi.org/10.1242/dev.200903>

Ding, D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. (2011) Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 20(1),5 - 14. <https://doi:10.3727/096368910X>

Domínguez-Bautista, J. A., Acevo-Rodríguez, P. S., Castro-Obregón, S. (2021). Programmed cell senescence in the mouse developing spinal cord and notochord. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.587096>

Duan, L., Ding, W., Liu, X., Cheng, X., Cai, J., Hua, E., Jiang, H. (2017). Biosynthesis and engineering of kaempferol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories*, 16(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0774-x>

Effenberger, T., von der Heyde, J., Bartsch, K., Garbers, C., Schulze-Osthoff, K., Chalaris, A., Murphy, G., Rose-John, S., & Rabe, B. (2014). Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(11), 4847–4856. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254565>

Estrada-Meza, C., Torres-Copado, A., González - Melgoza, L., Ruiz-Manriquez, L. M., De Donato, M., Sharma, A., Pathak, S., Banerjee, A., Paul, S. (2022). Recent insights into the microRNA and long non-coding RNA-mediated regulation of stem cell populations. *3 Biotech*, 12(10) <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03343-8>

Falcão-Silva, V. S., Silva, D. A., Souza, M. D. F. V., & Siqueira-Junior, J. P. (2009). Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol

glycoside from *herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phytotherapy Research*, 23(10), 1367–1370. <https://doi.org/10.1002/ptr.2695>

Fong, C. Y., Richards, M., Manasi, N., Biswas, A., & Bongso, A. (2007). Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(6), 708–718. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60539-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60539-1)

Fortier, L. A. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>

Fraser, C. M., Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The arabidopsis book*, 9, e0152. <https://doi.org/10.1199/tab.0152>

González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk L., Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS journal*, 288(1), 56–80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

Goto, T., Teraminami, A., Lee, J.Y., Ohyama, K., Funakoshi, K., Kim, Y.I., Hirai, S., Uemura, T., Yu, R., Takahashi, N., Kawada, T. (2012) Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese–diabetic mice, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23 (7), 768–776. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.04.001>

Goyal, U., Jaiswal, C., & Ta, M. (2018). Isolation and establishment of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Bio-protocol*, 8(4). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2735>

Grochowski, D. M., Locatelli, M., Granica, S., Cacciagrano, F., & Tomczyk, M. (2018). A Review on the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(5), 1395–1421. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12389>

He, F. (2011). Bradford protein assay. *Bio-protocol*, 1(6). <http://www.bio-protocol.org/e45>

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of cellular senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

- Herranz, N., Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., & Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature reviews. Nephrology*, 18(10), 611–627. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>
- Itahana, K., Itahana, Y., & Dimri, G. P. (2013). Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 965, 143–156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_8
- Jin, X., Song, S., Wang, J., Zhang, Q., Qiu, F., & Zhao, F. (2016). Tiliroside, the major component of *Agrimonia pilosa* Ledeb ethanol extract, inhibits MAPK/JNK/p38-mediated inflammation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(1), 499–505. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3305>
- Khademi-Shirvan, M., Ghorbaninejad, M., Hosseini, S., & Baghaban Eslaminejad, M. (2020). The importance of stem cell senescence in regenerative medicine. *Turksen, K. (eds) Cell Biology and Translational Medicine, 9. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1288, 87-102. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2020_489
- Kuok, C.-F., Hoi, S.-O., Hoi, C.-F., Chan, C.-H., Fong, I.-H., Ngok, C.-K., Meng, L.-R., & Fong, P. (2017). Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. *Experimental Biology and Medicine*, 242(7), 731-743. <https://doi.org/10.1177/1535370216689828>
- Lan, T., Luo, M., Wei, X. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01208-w>
- Leonard, E., Yan, Y., Koffas, M. A. G. (2006). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 8(2), 172-181. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.001>
- Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2016). Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in plant science*, 7, 735. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00735>
- Li, X., Tian, Y., Wang, T., Lin, Q., Feng, X., Jiang, Q., Liu, Y., Chen, D. (2017). Role of the p-Coumaroyl Moiety in the Antioxidant and Cytoprotective Effects of Flavonoid Glycosides: Comparison of Astragalin and Tiliroside. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(7), 1165. <https://doi.org/10.3390/molecules22071165>

Li, Z., Hu, X., Zhong, J. F. (2019). Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. *Stem cells international*, 2019, 8106818.

<https://doi.org/10.1155/2019/8106818>

Liu, X., Ding, J., & Meng, L. (2018). Oncogene-induced senescence: A double-edged sword in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39, 1553–1558.

<https://doi.org/10.1038/aps.2017.198>

Lodish et al. (2012). Western Blot. Retrieved 8/2024, from

<http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>

Luhata, L.P., Luhata, W.G. (2017). Tiliroside: Biosynthesis, Bioactivity and Structure activity relationship (SAR)- A review. *The Journal of Phytopharmacology*.

<https://doi.org/10.31254/phyto.2017.6607>

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434.

<https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *International journal of stem cells*, 12(2), 218–226.

<https://doi.org/10.15283/ijsc18034>

Matsuda, H., Ninomiya, K., Shimoda, H., Yoshikawa, M., (2002) Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10 (3), 707-712. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00321-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00321-2)

Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. (2020) Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, 10(3), 420.

<https://doi.org/10.3390/biom10030420>

Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A., & Ferbeyre, G. (2006). DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular biology of the cell*, 17(4), 1583–1592.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-09-0858>

Nagatomo, A., Kohno, M., Kawakami, H., Manse, Y., Morikawa, T. (2023) Inhibitory effect of trans-tiliroside on very low-density lipoprotein secretion in HepG2 cells and mouse liver. *Journal of Natural Medicine*, 78, 180–190.

<https://doi.org/10.1007/s11418-023-01756-0>

Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Pontano Vaites, L., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive

cell growth causes cytoplasm dilution and contributes to senescence. *Cell*, 176(5), 1083-1097.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>

Ninomiya, K., Matsuda, H., Kubo, M., Morikawa, T., Nishida, N., Yoshikawa, M. (2007). Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: Structural requirements and mode of action of trans-tiliroside. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(11), 3059-3064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.051>

Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>

Ohtani, N. (2022). The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): Can it be controlled by senolysis? *Inflammation and Regeneration*, 42, 11. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00197-8>

Patel, M., Agrawal, A., Patel, A. K. (2024). Antimicrobial efficacy of tiliroside derived from *Cordia macleodii* against *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 27(5), 268-276. <https://doi.org/10.9734/jabb/2024/v27i5786>

Patel, S. (2024). Experimental Protocol for Western Blotting, AAT Bioquest. Retrieved 8/2024, from https://www.aatbio.com/resources/application-notes/experimental-protocol-for-western-blotting#sec_8

Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging cell*, 15(6), 999–1017. <https://doi.org/10.1111/acer.12518>

Rao, Y.K., Geethangili, M., Fang, S.H., Tzeng, Y.M. (2007) Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study, *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1770-1776. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.012>

Rajendran, P., Alzahrani, A. M., Hanieh, H. N., Kumar, S. A., Ammar, R. B., Rengarajan, T., & Alhoot, M. A. (2019). Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (12), 21485-21492. <https://doi.org/10.1002/jcp.28895>

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>

Rossiello, F., Jurk, D., Passos, J. F., d’Adda di Fagagna, F. (2022). Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nature Cell Biology*, 24(2), 135-147. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00842-x>

Ruchi, K., Parmjit, J. (2021) Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>

Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G. R., Máñez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L. (2003) Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside, *European Journal of Pharmacology*, 461(1), 53-61.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02953-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02953-9)

Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, 28(2), 99-114.
<https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>

Stefańska, K., Ożegowska, K., Hutchings, G., Popis, M., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Pieńkowski, W., Gutaj, P., Shibli, J. A., & et al. (2020). Human Wharton's Jelly—Cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 1102.
<https://doi.org/10.3390/jcm9041102>

Taghizadeh, R.R., Cetrulo, K.J., Cetrulo, C.L. (2011) Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications, *Placenta*, 32(4), S311-S315,
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.010>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., & et al. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature Communications*, 8, 15729. <https://doi.org/10.1038/ncomms15728>

Thermo Fisher Scientific. (n.d.). Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa. Retrieved 8/2024, from
<https://www.fishersci.com/shop/products/pageruler-plus-prestained-protein-ladder-10-250-kda/p-4529974>

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(8), 927-945.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)

Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M., & Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 1007-1009.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01170-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01170-X)

Tsakamoto, S., Tomise, K., Aburatani, M., Onuki, H., Hirorta, H., Ishiharajima, E., Ohta, T. (2004). Isolation of Cytochrome P450 Inhibitors from Strawberry Fruit, *Fragaria ananassa*, *Journal of Natural Products*, 67 (11), 1839–1841.

<https://doi.org/10.1021/np0400104>

Vasileiou, P. V. S., Evangelou, K., Vlasits, K., Fildisis, G., Panayiotidis, M. I., Chronopoulos, E., Passias, P. G., Kouloukoussa, M., Gorgoulis, V. G., & Havaki, S. (2019). Mitochondrial Homeostasis and Cellular Senescence. *Cells*, 8(7), 686.

<https://doi.org/10.3390/cells8070686>

Velagapudi, R., Aderogba, M., & Olajide, O. A. (2014). Tiliroside, a dietary glycosidic flavonoid, inhibits TRAF-6/NF- κ B/p38-mediated neuroinflammation in activated BV2 microglia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(12), 3311–3319. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.08.008>

Velarde, M. C., Flynn, J. M., Day, N. U., Melov, S., Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging*, 4(1), 3–12. <https://doi.org/10.18632/aging.100423>

Wiley, C.D., Campisi, J. (2021) The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nature Metabolism*, 3, 1290–1301 .

<https://doi.org/10.1038/s42255-021-00483-8>

Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., Campisi, J. (2016). Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303–314.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>

Yamagishi, H., & Shigematsu, K. (2022). Perspectives on stem cell-based regenerative medicine with a particular emphasis on mesenchymal stem cell therapy. *JMA Journal*, 5(1), 36–43. <https://doi.org/10.31662/jmaj.2021-0080>

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. et al. (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 68

<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

Zhang, H., & Cohen, S. N. (2004). Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes & Development*, 18(24), 3028–3040.

<https://doi.org/10.1101/gad.1253004>

Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'Hara, S. P., LaRusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., LeBrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., Stout, M. B., Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging cell*, 14(4), 644–658. <https://doi.org/10.1111/acer.12344>

Χριστοδούλου Χ. (2023). Μελέτη φυτικών παραγόντων με αντιγηραντική/προγηραντική δράση επί της λειτουργίας της καβεολίνης-1 σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα [Master Dissertation, Democritus University of Thrace - International University of Greece].
https://repo.lib.duth.gr/jspui/bitstream/123456789/17144/1/ChristodoulouC_2023.pdf