

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΟΥΪΛΕΜΕΖΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2025

«Ο ρόλος των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στη ρύθμιση της φυσιολογίας των μυϊκών κυττάρων»

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: Σουϊλεμέζη Σταυρούλα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

«The role of steroid hormone receptors in the regulation of muscle cell physiology»

Name of student: Souilemezi Stavroula

Supervisor: Dr. Psarra Anna-Maria

Laboratory: Structural and Functional Biochemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

- **Επιβλέπουσα**

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

- **Μέλος**

Λεωνίδας Δημήτριος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

- **Μέλος**

Καρατζαφέρη Χριστίνα: Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τρίκαλα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την κυτταρική γήρανση, πραγματοποιείται μια μόνιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε ενδογενείς ή εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες όπως βλάβες στο DNA και οξειδωτικό στρες. Υπάρχουν αρκετά μοντέλα επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της D-γαλακτόζης (D-galactose), όπου φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό και να προκαλεί τις λιγότερες παρενέργειες. Η χρόνια νεφρική νόσος, αποτελεί μια διαταραχή με υψηλό ρυθμό θνησιμότητας, όπου παρατηρείται μία σταδιακή μη αναστρέψιμη μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Μία σημαντική παρενέργεια κατά την χρόνια νεφρική νόσο, είναι η ουραιμία, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται με σηματοδοτικούς μηχανισμούς πρόκλησης ουραιμικής μυοπάθειας και ατροφίας των μυών. Όμοια με την κυτταρική γήρανση, κατά την χρόνια νεφρική νόσο, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και μία απορρύθμιση των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα γλυκοκορτικοειδή, αποτελούν στεροειδείς ορμόνες με πολλαπλές δράσεις και ιδιαίτερη εμπλοκή σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον μυϊκό μεταβολισμό. Στόχος της μελέτης αποτελούσε η διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, γονιδίων στόχων τους και μορίων που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην αναπνευστική αλυσίδα, στην ρύθμιση της σηματοδότησης σε συνθήκες επαγόμενης γήρανσης μέσω D-galactose σε μυϊκά κύτταρα C2C12 αλλά και σε γαστροκνήμιους μύες ουραιμικών ποντικών με χρόνια νεφρική νόσο.

Για την επίτευξη του στόχου, αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμασία MTT σε κύτταρα C2C12 και τα αποτελέσματα έδειξαν πως η επώαση των κυττάρων με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h, προκάλεσε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 30-40%, όμοια με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας, όπου αντίστοιχες συγκεντρώσεις D-galactose χρησιμοποιούνται για την επαγωγή επιθυμητού φαινοτύπου γήρανσης. Στην συνέχεια, ανοσοαποτύπωση κατά Western, μορίων όπως ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), γονιδίων στόχων του όπως ο υποδοχέας που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPAR α), η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), αλλά και η υπομονάδα IV του συμπλόκου COX της αναπνευστικής αλυσίδας, σε κύτταρα C2C12, που καλλιεργήθηκαν τόσο σε πλήρες θρεπτικό μέσο όσο και σε θρεπτικό μέσο που απουσιάζουν οι ορμόνες και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX, έδειξαν ότι κατά την επαγωγή γήρανσης C2C12 κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR μειώθηκαν ενώ των PPAR α , PEPCK και COXIV αυξήθηκαν. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών και αυξητικών παραγόντων παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και της PEPCK, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPAR α μειώθηκαν, δράσεις οι οποίες περιορίστηκαν παρουσία DEX. Επίσης, υπό συνθήκες απουσίας ορμονών και αυξητικών παραγόντων η D-galactose προκάλεσε μείωση τόσο του GR όσο και της PEPCK. Παράλληλα η μελέτη υποκυτταρικής κατανομής των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογόνων (ER α και ER β) σε συνθήκες γήρανσης με D-galactose για 24h και 48h, μέσω ανοσοκυταροχημείας φθορισμού, έδειξε μιτοχονδριακό εντοπισμό του υποδοχέα ER β τόσο σε συνθήκες control όσο και παρουσία D-galactose. Όσο αφορά τον υποδοχέα ER α , παρατηρείται διαφοροποίηση στην κατανομή του, με επικρατέστερη τη μιτοχονδριακή εντόπισή του στις συνθήκες control, και την πυρηνική παρουσία D-galactose. Αντίστοιχα, ο υποδοχέας GR, στις συνθήκες control βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυταρόπλασμα αλλά κατά την γήρανση εντοπίζεται κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western στα δείγματα γαστροκνήμιου μυ ουραιμικών κονίκλων έδειξαν μία τάση αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, του ERα, του PPARα και του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α) ενώ παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης των επιπέδων της COXIV και της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία φθορισμού για την μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR και διαπιστώθηκε πως βρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια στα δείγματα αναφοράς γαστροκνήμιου ιστού αλλά ενισχύεται η πυρηνική του εντόπιση σε συνθήκες ουραιμικής μυοπάθειας. Επομένως, διαπιστώνεται τόσο σε καταστάσεις επαγόμενης γήρανσης όσο και ουραιμικής μυοπάθειας μια διατάραξη των μεταβολικών διεργασιών που σχετίζονται με GR σηματοδότηση, ενεργειακό μεταβολισμό και μιτοχονδριακή λειτουργία.

Λέξεις κλειδιά: Κυτταρική γήρανση, Χρόνια νεφρική νόσος, Ουραιμία, Μυϊκή ατροφία, Υποδοχείς στεροειδών ορμονών, Οξειδωτικό στρες

ABSTRACT

During cellular senescence, a permanent inhibition of cell proliferation occurs due to the exposure of cells to endogenous or exogenous stressors such as DNA damage and oxidative stress. There are several models of induced cellular senescence, the most prominent example being that of D-galactose, where it appears to be highly effective and causes the fewest side effects. Chronic kidney disease, a disorder with a high mortality rate, where there is a gradual irreversible decline in kidney function. An important side effect in chronic kidney disease is uremia, which appears to be involved in signaling mechanisms causing uremic myopathy and muscle atrophy. Similar to cellular senescence, in chronic kidney disease, increased levels of active oxygen radicals (ROS) and a deregulation of normal metabolic processes occurring in the mitochondria of cells are observed. Glucocorticoids are steroid hormones with multiple actions and particular involvement in signaling pathways that regulate muscle metabolism. The aim of the study was to investigate the possible involvement of steroid hormone receptors, their target genes and molecules directly or indirectly involved in the respiratory chain in the regulation of D-galactose-induced aging signaling in C2C12 muscle cells and in gastrocnemius muscle of uremic mice with chronic kidney disease.

To achieve this goal, we first performed an MTT assay in C2C12 cells and the results showed that incubation of cells with D-galactose at concentrations of 30mg/ml and 40mg/ml for 24h and 48h caused a 30-40% decrease in cell proliferation, similar to data from international literature, where corresponding concentrations of D-galactose are used to induce a desired aging phenotype. Next, Western Blot analysis of molecules such as the glucocorticoid receptor (GR), its target genes such as the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and subunit IV of the respiratory chain COX complex, in C2C12 cells, cultured in both complete culture medium and hormone-absent medium and subsequently supplemented with the synthetic glucocorticoid DEX, showed that upon induction of senescence of C2C12 cells cultured in complete culture medium, the

protein levels of GR decreased while PPAR α , PEPCK and COXIV increased. When cells were cultured in culture medium in the absence of hormones and growth factors, an increase in protein levels of GR and PEPCK was observed, while protein levels of PPAR α decreased, actions that were reduced in the presence of DEX. Moreover, under conditions of absence of hormones and growth factors, D-galactose induced decrease in both GR and PEPCK. In parallel, the study of subcellular distribution of glucocorticoid (GR) and estrogen (ER α and ER β) receptors under D-galactose senescence conditions for 24 h and 48 h, by fluorescence immunocytochemistry, showed mitochondrial localization of ER β receptor both in control conditions and in the presence of D-galactose. As for the ER α receptor, there was a variation in its distribution, with a predominance of mitochondrial localization in control conditions, and nuclear localization presence of D-galactose. Similarly, the GR receptor, in control conditions, is found in both the nucleus and the cytoplasm, but during senescence it is predominantly localized in the nuclei of cells.

In addition, Western Blot results on gastrocnemius muscle uremic samples showed a trend of increasing protein levels of GR, ER α , PPAR α and peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α), while a trend of decreasing levels of COXIV and electrical dehydrogenase (SDH) was observed compared to reference samples. Finally, fluorescence immunohistochemistry was performed to study the subcellular localization of GR and it was found to be mainly located in mitochondria in reference samples of gastrocnemius tissue but its nuclear localization was enhanced in uremic myopathy conditions. Therefore, a disruption of metabolic processes related to GR signaling, energy metabolism and mitochondrial function is found in both induced senescence and uremic myopathy states.

Key words: Chronic kidney disease, Uremia, Muscle atrophy, Cellular aging, Steroid hormone receptors, Oxidative stress

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	9
1.1.1 Γενικές πληροφορίες για κυτταρική γήρανση	9
1.1.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων	9
1.2 ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	14
1.2.1 Γενικές πληροφορίες για χρόνια νεφρική νόσο	14
1.2.2 Μυϊκή ατροφία και νεφρική νόσος	15
1.2.3 Οξειδωτικό στρες και μυϊκή ατροφία	15
1.3 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ	15
1.3.1 Βασικά στοιχεία για τα γλυκοκορτικοειδή	15
1.3.2 Ενδογενής βιοσύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών	16
1.4 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	17
1.4.1 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών (GR)	17
1.4.2 Υποδοχέας Οιστρογόνων (ER)	21
1.4.3 Υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α (PPARα)	24
1.5 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΩΛΕΙΑ ΜΥΪΚΗΣ ΜΑΖΑΣ	25
1.5.1 Καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπιροσταφυλικού (PEPCK)	25
1.5.2 Ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH)	26
1.5.3 Υπομονάδα IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV)	27
1.6 ΣΚΟΠΟΣ	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 ΥΛΙΚΑ	30
2.1.1 Οργανολογία	30
2.1.2 Αναλώσιμα υλικά	30
2.1.3 Αντιδραστήρια	31
2.1.4 Σύσταση διαλυμάτων	32
2.1.5 Αντισώματα	33
2.1.6 Κυτταρικές σειρές	34
2.1.7 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	34
2.1.8 Πειραματικά μοντέλα κόνικλων	34

2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	35
2.2.1	Καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων	35
2.2.2	Θρυψινοποίηση	35
2.2.3	Επίστρωση και μέτρηση κυττάρων	35
2.2.4	Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω της μεθόδου MTT	36
2.2.5	Επαγωγή γήρανσης σε κύτταρα C2C12 και μελέτη επίδρασης δεξαμεθαζόνης	37
2.2.6	Συλλογή κυττάρων	38
2.2.7	Λύση κυττάρων	38
2.2.8	Λύση κυττάρων γαστρονήμιου μυϊκού ιστού κονίκλων	38
2.2.9	Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω μεθόδου Bradford	39
2.2.10	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες	39
2.2.11	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western	40
2.2.12	Τεχνική Ανοσοκυτταροχημείας Φθορισμού	40
2.2.13	Κοπή διαδοχικών τομών γαστρονήμιου μυϊκού ιστού σε κρουτόμο	41
2.2.14	Τεχνική Ανοσοϊστοχημείας Φθορισμού	41
2.2.15	Υπολογιστική και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	42
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
3.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΣΕ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12	42
3.1.1	Μελέτη της επίδρασης διαλυμάτων D-γαλακτόζης στην βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12	42
3.1.2	Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που εμπλέκονται στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, πυρηνικών υποδοχέων και μοριακών στόχων τους σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με D-γαλακτόζη παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης	44
3.1.3	Διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης μέσω ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού	47
3.2	ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΟΥΡΑΙΜΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΟΝΙΚΛΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ	51
3.2.1	Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western	51
3.2.2	Σύγκριση της υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) μεταξύ δειγμάτων γαστρονήμιου που προήλθαν από υγιή και ουραιμικά πειραματικά μοντέλα κονίκλων μέσω ανοσοϊστοχημείας φθορισμού	56
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64
	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	69

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

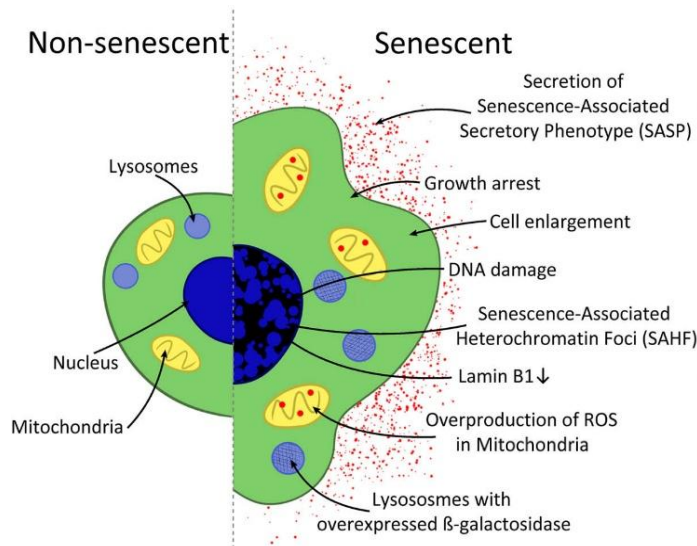
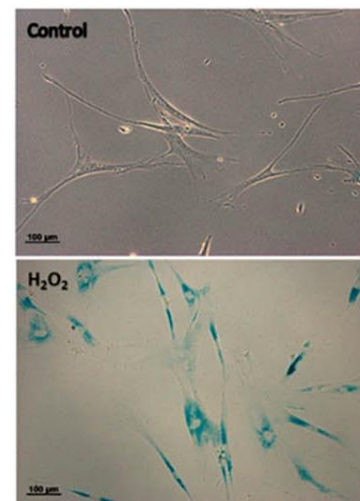
1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

1.1.1 Γενικές πληροφορίες για κυτταρική γήρανση

Γενικά, η γήρανση είναι μια έμφυτη διαδικασία κατά την οποία παρατηρείται προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των ιστών και των οργάνων, γεγονός που συμβάλει σε αυξημένη προδιάθεση για την πρόκληση ασθενειών, όπως ενδεικτικά ο καρκίνος, ο διαβήτης, νευροεκφυλιστικές και μυοσκελετικές ασθένειες (*Mohamad Kamal et al. 2020, Minetto et al. 2020*). Για την διεξοδική μελέτη των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την γήρανση, συνήθως πραγματοποιούνται *in vitro* έρευνες, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κυττάρων, καθώς επιτρέπουν τη γρήγορη διεξαγωγή αποτελεσμάτων. Ειδικότερα, κατά την κυτταρική γήρανση, διεξάγεται μία μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επομένως καταστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων έπειτα από έκθεση τους σε διάφορα ερεθίσματα όπως οξειδωτικό στρες, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και ακτινοβολία (*Mohamad Kamal et al. 2020, Regulski et al. 2017*). Ακόμη, έχει αποδειχθεί πως η κυτταρική γήρανση έχει διπλό ρόλο καθώς φαίνεται να λειτουργεί ευεργετικά σε ορισμένες περιπτώσεις αλλά και επιζήμια σε άλλες. Συγκεκριμένα, όσο αναφορά τον ευεργετικό της ρόλο, σε φυσιολογικές αποκρίσεις φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και συμμετέχει στην επούλωση των πληγών (*Tominaga et al. 2015*). Αξίζει να αναφερθεί πως τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημιοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και πρωτεάσες που χαρακτηρίζονται ως μόρια συσχετιζόμενα με την γήρανση-SASPs (Senescence-associated secretory phenotype), όπου σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με σκοπό την εκκαθάριση των γηρασμένων κυττάρων. Όμως, έχει σημειωθεί να έχουν και επιβλαβή δράση καθώς σε γηρασμένα κύτταρα, τα μόρια SASPs ενεργοποιούν μονοπάτια όπου τα γειτονικά υγιή κύτταρα αποκτούν και αυτά γηρασμένο φαινότυπο (*Sreekumar et al. 2020*).

1.1.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων

Παρόλο που τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται ετερογενή, έχουν βρεθεί κάποια τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά χαρακτηριστικά, που τα διαχωρίζουν από τα υγιή κύτταρα. Αρχικά, όσο αναφορά τη μορφή των γηρασμένων κυττάρων, τα τελευταία είναι επίπεδα, συσσωρεύουν σταγονίδια λιπιδίων και έχουν σχεδόν διπλάσιο μέγεθος σε σύγκριση με τα μη γερασμένα κύτταρα λόγω αναδιάταξης του κυτταροσκελετού τους (*Lloyd et al. 2013, Walters et al. 2016*). Επιπλέον, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα της όξινης β-γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με τη γήρανση (SA-β-gal), κάτι το οποίο ευθύνεται εξαιτίας της αυξημένης περιεκτικότητας σε λυσοσώματα που φαίνεται να τα διακρίνει (*Valieva et al. 2022*). Επίσης, παρουσιάζονται σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία και το μιτοχονδριακό μεταβολισμό καθώς στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται αυξημένη βιογένεση των μιτοχονδρίων αλλά και επαγωγή της κυτταρικής αναπνοής (*Helman et al. 2016*). Τέλος, έχουν ταυτοποιηθεί εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση, γνωστές ως SAHF (Senescence-associated heterochromatin foci), οι οποίες παρατηρούνται στους πυρήνες μόνο των γηρασμένων κυττάρων (*Sreekumar et al. 2020, Narita et al. 2003*).

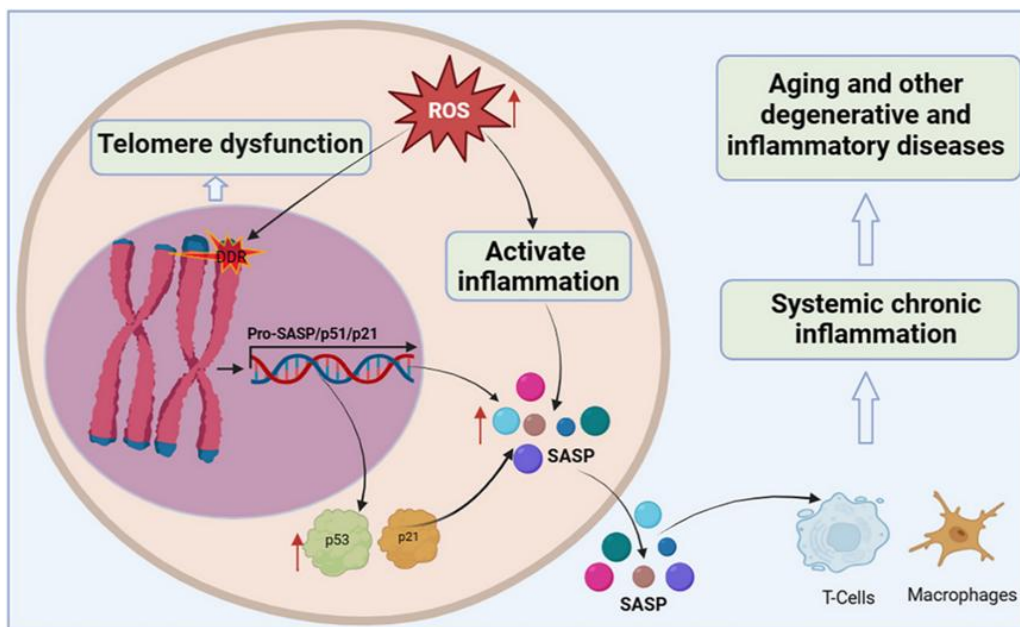
A**B****IMR90 cells**

Εικόνα 1: Συγκριτική ανάλυση υγιών και γηρασμένων κυττάρων. (Α) Σχηματική απεικόνιση των κύριων μορφολογικών αλλά και λειτουργικών αλλαγών μεταξύ γερασμένων και μη γερασμένων κυττάρων. (Β) Χρώση β-γαλακτοζιδάσης σε υγιή και γηρασμένα κύτταρα ινοβλαστών IMR90, όπου στα τελευταία προστέθηκε H_2O_2 για την πρόκληση της γήρανσης (50 μM για 2h). Τροποποίηση εικόνας (Henschke et al. 2024, Foroozandeh et al. 2019).

1.1.3 Παράγοντες που ενεργοποιούν μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης

1.1.3.1 Γονιδιωματική αστάθεια και απώλεια των τελομερών ως καθοριστικός παράγοντας της κυτταρικής γήρανσης

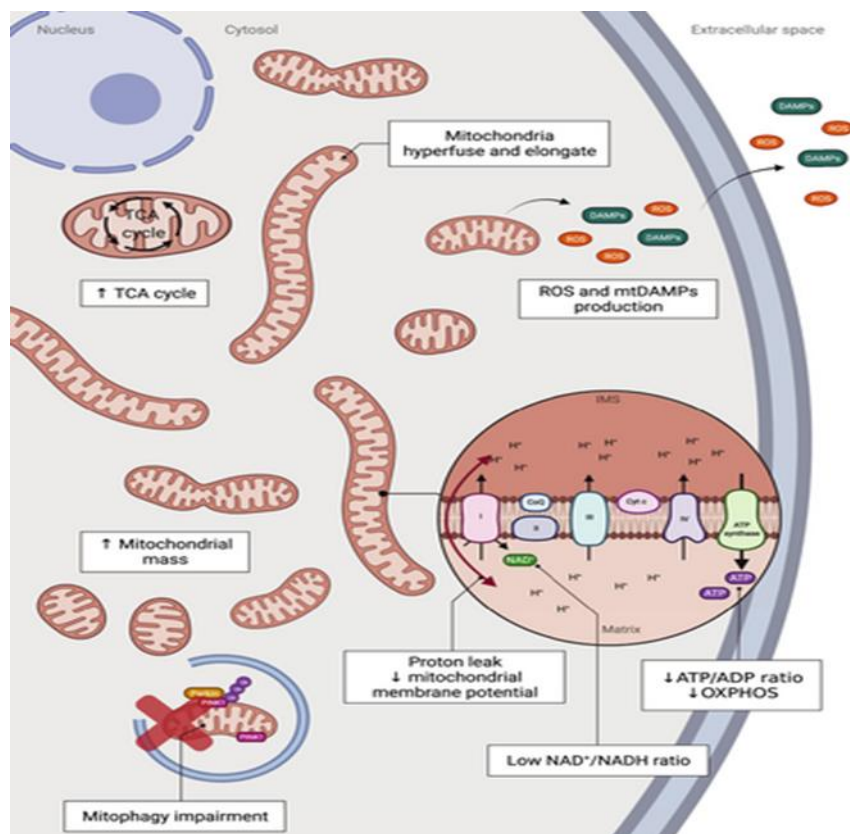
Κατά τη διάρκεια της γήρανσης, οι τοξίνες, η φωτογήρανση και η μηχανική καταπόνηση στους ιστούς προκαλούν βλάβες στο DNA, όπου ένα ποσοστό βλαβών δεν ανιχνεύεται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA του κυττάρου. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί πως ασθενείς με μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA, παρουσιάζουν επίσης χαρακτηριστικά πρόωρης γήρανσης (Li et al. 2024). Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί πως τα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών, έχουν περιορισμένη ικανότητα να διαιρούνται, όπου μετά εισέρχονται σε μία κατάσταση κυτταρικής γήρανσης-ένα φαινόμενο γνωστό ως «όριο Hayflick» (Shay et al. 2000). Γενικά, μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση παρατηρείται μια σύντμηση των τελομερών, που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και είναι ειδικές δομές της χρωματίνης που αποτελούνται από επαναλήψεις της αλληλουχίας TTAGGG (Chen et al. 2007). Ειδικότερα, κατά την σύντμηση των τελομερών, ενεργοποιείται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων του DNA (DBR-Double-strand break repair), όπου πραγματοποιείται σύντηξη των αδερφών χρωματίδων οδηγώντας μετά από κάποιους κύκλους αντιγραφής σε γονιδιωματική αστάθεια (Lee et al. 2021). Λόγω της ελλιπούς αντιγραφής των τελομερών του DNA, τα υπερβολικά μικρά σε μήκος τελομερή θα αποτελέσουν εναρκτήριο σήμα, που αρχικά θα οδηγήσει σε μόνιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, λόγω φωσφοριλίωσης των κινασών σερίνης/θρεονίνης Checkpoint Kinase 1 και 2 (CHK1, CHK2), αλλά και σε κυτταρική γήρανση (Shreeya et al. 2024). Αναλυτικότερα, κατά την διάρκεια της γήρανσης, παρατηρείται αύξηση των ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν βλάβες στην αλληλουχία των τελομερών, προκαλώντας υπερέκφραση των δεικτών αναστολής του κυτταρικού κύκλου p53 και p21. Ακόμη, τα γερασμένα κύτταρα εκκρίνουν μόρια SASPs, τα οποία στρατολογούν και ενισχύουν τα Τ κύτταρα και τα μακροφάγα οδηγώντας σε συστηματική χρόνια φλεγμονή και κυτταρική γήρανση (Li et al. 2024, Zhu et al. 2019).



Εικόνα 2: Η σύντμηση των τελομερών, οδηγεί σε ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης. Ειδικότερα, τα υψηλά επίπεδα ριζών οξυγόνου επάγουν βλάβες στις αλληλουχίες των τελομερών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και την επαγωγή των μορίων που συμβάλουν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Στην συνέχεια, τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν SASPs με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία αποτυγχάνουν να καταστείλουν την φλεγμονή και επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια συσχετιζόμενα με την γήρανση (Li *et al.* 2024).

1.1.3.2 Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Τα μιτοχόνδρια, είναι σημαντικά οργάνδια του κυττάρου, τα οποία έχουν το δικό τους γονιδίωμα και εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας με την μορφή του ATP. Σε συνθήκες γήρανσης, έχει αναφερθεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία όπου παρατηρείται μειορρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αλλά και μειωμένο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ακόμη, έχει αναφερθεί αύξηση της μάζας των μιτοχονδρίων σε γηρασμένα κύτταρα, κάτι το οποίο αντισταθμίζει μερικώς την μειωμένη μιτοφαγία που επικρατεί σε συνθήκες γήρανσης. Έτσι συσσωρεύονται μη φυσιολογικά μιτοχόνδρια προσπαθώντας να αντικαταστήσουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Miwa *et al.* 2022). Κατά τη διάρκεια της γήρανσης, έχει αποδειχθεί μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης FIS1, που φυσιολογικά συμμετέχει στη μιτοχονδριακή σχάση, στρατολογώντας την πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη δυναμίνη 1 (DRP1-Dynamin-related protein 1). Ειδικότερα, knock-down του γονιδίου FIS1, οδηγεί σε αύξηση των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species) επάγοντας την κυτταρική γήρανση (Martini *et al.* 2023). Επιπρόσθετα, λόγω της αυξημένης διαρροής ηλεκτρονίων, απορρυθμίζεται η δράση του συμπλόκου I στην αναπνευστική αλυσίδα, το οποίο φυσιολογικά οξειδώνει την ανηγμένη μορφή του δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADH) σε NAD, με αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων NAD⁺ κατά την γήρανση (Miwa *et al.* 2022). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως γενικά τα κύτταρα ως απάντηση στο στρες, απελευθερώνουν ενδογενή συστατικά στον εξωκυττάριο χώρο για να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση, τα οποία ονομάζονται συλλογικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβες (DAMPs- damage-associated molecular patterns), τα οποία αναγνωρίζονται από υποδοχείς κυττάρων επάγοντας ανοσολογική απόκριση. Έρευνες αναφέρουν ότι η φλεγμονή κατά τη γήρανση και οι ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση ίσως οφείλονται στην ικανότητα των κυττάρων, μέσω της έμφυτης ανοσίας, να ανιχνεύουν DAMPs, που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια [καρδιολιπίνη, μιτοχονδριακός παράγοντας μεταγραφής A (TFAM), ATP, ηλεκτρικό οξύ, κυτόχρωμα c και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)] (Grazioli *et al.* 2018).



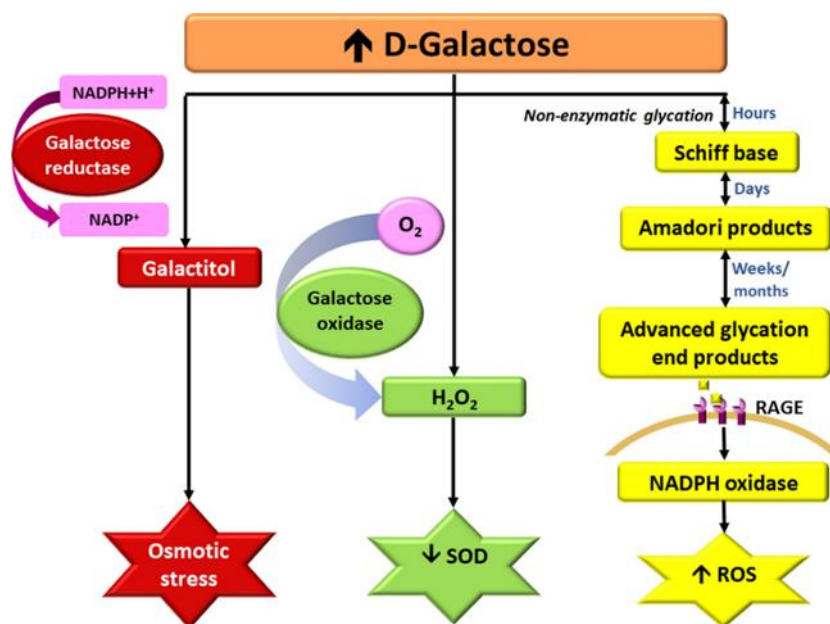
Εικόνα 3: Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων σε συνθήκες κυτταρικής γήρανσης. Αναλυτικότερα, τα γηρασμένα κύτταρα φαίνεται πως έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως μειωμένο δυναμικό μεμβράνης των μιτοχονδρίων αλλά και χαμηλά ποσοστά των λόγων ATP/ADP και NAD⁺/NADH. Επιπρόσθετα, κατά την γήρανση, αυξάνεται η μάζα των μιτοχονδρίων, αναστέλλεται η μιτοφαγία και τα μιτοχόνδρια παράγουν υψηλά ποσοστά ROS αλλά και DAMPs (Martini et al. 2023).

1.1.3.3 Απορρύθμιση της αυτοφαγίας

Κατά την κυτταρική γήρανση, παρατηρείται υψηλός μεταβολικός ρυθμός, ο οποίος ευθύνεται εν μέρη στην σηματοδότηση από την κινάση mTOR (Target of Rapamycin), η οποία προάγει τον κυτταρικό αναβολισμό και καταστέλλει την καταβολική οδό της αυτοφαγίας. Αναλυτικότερα, φυσιολογικά κατά την αυτοφαγία, πραγματοποιείται αποικοδόμηση καταστραμένων μακρομορίων και οργανιδίων, στα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα την διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης του κυττάρου (Roger et al. 2021). Όμως σε συνθήκες στρες, όπως κατά την γήρανση, παρατηρείται εξασθένιση της πρωτεολυτικής λειτουργίας των λυσοσωμάτων, άρα μειώνεται η αυτοφαγική ροή, που αυτό οδηγεί στην συσσώρευση κυτταρικών βλαβών και την πρόκληση ασθενειών που συσχετίζονται με τη γήρανση. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε σε κλινικές μελέτες σε ανθρώπους αλλά και τρωκτικά, ότι καθώς αυξάνεται η ηλικία των υπό μελέτη οργανισμών, μειώνεται η έκφραση των πρωτεϊνών ATG5-ATG12 και Becln1 που σχετίζονται με την έναρξη της αυτοφαγίας (Hara et al. 2006, Li et al. 2024). Έτσι, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δυσλειτουργία της αυτοφαγίας συσχετίζεται με την γήρανση. Επομένως, η ενίσχυση των σηματοδοτικών μονοπατιών της αυτοφαγίας σε ζώα-μοντέλα γήρανσης είναι απαραίτητη για την παράταση της διάρκειας ζωής και τη βελτίωση της παθολογικής γήρανσης και των συσχετιζόμενων ασθενειών (Roger et al. 2021).

1.1.3.4 Επαγόμενη κυτταρική γήρανση μέσω D-γαλακτόζης

Αρχικά, αξίζει να αναφερθεί πως έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες, όπου έδειξαν πως ενέσεις D-γαλακτόζης μπορούν να μειώσουν την μακροζωία σε τρωκτικά, στη Δροσόφιλα, σε νευρώνες εγκεφάλου αρουραίων και σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα (Azman *et al.* 2019). Γενικότερα, η D-galactose είναι ένας μονοσακχαρίτης και συγκεκριμένα μια αλδοεξόζη, που βρίσκεται φυσικά σε διάφορα τρόφιμα, όπως ενδεικτικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα (το γάλα, το βούτυρο, το τυρί, το γιαούρτι) και τα φρούτα (δαμάσκηνα, κεράσια και σύκα) (Acosta *et al.* 1995). Συγκεκριμένα, η μέγιστη συνιστώμενη ημερήσια δόση γαλακτόζης είναι 50g, όπου μεταβολίζεται από τον οργανισμό και ένα μεγάλο μέρος της αποβάλλεται 8 ώρες μετά την λήψη της (Morava *et al.* 2014). Όμως, η D-galactose σε πολύ υψηλά επίπεδα μετατρέπεται σε αλδόζη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω του ενζύμου οξειδάση της γαλακτόζης, με αποτέλεσμα την μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας και την συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), όπου οι τελευταίες είναι ικανές να οδηγήσουν σε απόπτωση, οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Azman *et al.* 2019). Επιπλέον, η περίσσεια D-galactose μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτιτόλη μέσω του ενζύμου της αναγωγάσης της γαλακτόζης. Όμως, η γαλακτιτόλη δεν μεταβολίζεται περαιτέρω και συσσωρεύεται στα κύτταρα επηρεάζοντας την οσμωτική πίεση και πιθανώς μπορεί να προκαλέσει επιδείνωση του αντιοξειδωτικού συστήματος άμυνας, οδηγώντας έτσι στην αύξηση των ελεύθερων ριζών (Bo-Htay *et al.* 2018). Ακόμη, η D-galactose μπορεί να εκκινήσει μη ενζυματικές αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης, όπου μόρια σακχάρων προσκολλώνται σε πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να σχηματιστούν τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοποίησης (AGEs- Advanced Glycation End Products) μετά από εβδομάδες ή μήνες. Όταν τα AGEs συνδεθούν με τους υποδοχείς τους (RAGE-Receptor for Advanced Glycation Endproducts), αυξάνεται η παραγωγή ROS, γεγονός που σχετίζεται με ασθένειες (Bo-Htay *et al.* 2018). Αξίζει να αναφερθεί, πως οι ερευνητές προτιμούν το μοντέλο γήρανσης που προκαλείται από D-γαλακτόζη καθώς εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες και αυξημένο ποσοστό επιβίωσης κατά την πειραματική διαδικασία (Azman *et al.* 2019 , Yanar *et al.* 2011).



Εικόνα 4: Σύνοψη των δράσεων της D-galactose, που επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια οξειδωτικού στρες και κυτταρικής γήρανσης. Ειδικότερα, η περίσσεια D-galactose ανάγεται από το ένζυμο αναγωγάση της γαλακτόζης με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτιτόλης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε οσμωτικό στρες. Επιπλέον, η D-galactose μπορεί να οξειδωθεί από την οξειδάση της γαλακτόζης και να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), όπου το τελευταίο όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα μπορεί να αναστείλει την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD-Superoxide dismutase). Ακόμη, η D-galactose αποτελεί πρόδρομο μόριο προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα οποία όταν συνδεθούν με τους υποδοχείς RAGE, οδηγούν στην παραγωγή ROS μέσω ενεργοποίησης της οξειδάσης NADPH (Bo-Htay et al. 2018).

1.2 ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

1.2.1 Γενικές πληροφορίες για χρόνια νεφρική νόσο

Κατά την χρόνια νεφρική νόσο (CKD), παρατηρείται μια προοδευτική επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας καθώς προσβάλλει περισσότερα από 800 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Ειδικότερα είναι πιο διαδεδομένη σε ηλικιωμένα άτομα, γυναίκες και άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και υπέρταση (Kovesdy et al. 2022). Κατηγοριοποιείται σε πέντε στάδια ανάλογα με τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR). Η μείωση της νεφρικής λειτουργίας, ιδίως στα πιο προχωρημένα στάδια, έχει συσχετιστεί με σημαντικές αλλαγές στον ενεργειακό μεταβολισμό, στο ισοζύγιο αζώτου, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και παράλληλα παρατηρείται σημαντική αύξηση της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), όπου οι τελευταίες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για διάφορες επιπλοκές της νόσου (Granata et al. 2009). Να τονιστεί πως εξαιτίας της αδυναμίας των νεφρών να φιλτράνουν το αίμα, προκαλείται ουραιμία, δηλαδή ανίχνευση ουρίας στο αίμα των ασθενών (Zemaitis et al. 2024). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί πως αρκετές ουραιμικές τοξίνες είναι υπεύθυνες για την ατροφία των σκελετικών μυών καθώς ενεργοποιούν μονοπάτια πρωτεόλυσης, αυτοφαγίας, μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και οξειδωτικού στρες (Kim et al. 2021).

1.2.2 Μυϊκή ατροφία και νεφρική νόσος

Καθώς η νεφρική ανεπάρκεια εξελίσσεται, συνοδεύεται επίσης από μυϊκή αδυναμία, και πρόωρη κόπωση, χαρακτηριστικά που ονομάζονται συλλογικά ουραιμική μυοπάθεια (Poulianiti et al. 2019). Ειδικότερα, ο σκελετικός μυς αποτελείται από 2 τύπους βλαστικών κυττάρων, τα δορυφορικά κύτταρα και έναν πληθυσμό πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (Seale et al. 2001). Τα δορυφορικά κύτταρα σχηματίζουν μια αυτοανανεούμενη δεξαμενή βλαστικών κυττάρων στους ενήλικους μυς, όπου ενεργοποιούνται μετά από τραυματισμό, άσκηση ή αλλαγές στο επίπεδο των αυξητικών παραγόντων (IGF-1), με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε μυοσώληνες, σχηματίζοντας μυϊκά κύτταρα για να αντισταθμίσουν την απώλεια μυϊκών ινών. Όμως, κατά τη χρόνια νεφρική νόσο, η ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των δορυφορικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά και παράλληλα έχουν ανιχνευτεί χαμηλά επίπεδα mRNA μυογενίνης και MyoD γεγονός που υποδηλώνει την αδυναμία αποτελεσματικής αναγέννησης και επιδιόρθωσης των μυών, οδηγώντας τελικά σε μυϊκή ατροφία (Wang et al. 2023, Wang et al. 2009). Γενικότερα, η μυϊκή ατροφία στους νεφροπαθείς οφείλεται τόσο στην μειωμένη λειτουργία των δορυφορικών κυττάρων όσο και σε άλλους μηχανισμούς όπως η φλεγμονή (λόγω αυξημένης έκκρισης IL-6, CRP, TNF-α), η μεταβολική οξέωση, η περίσσεια αγγειοτενσίνης II και η μείορρύθμιση του μονοπατιού ινσουλίνης/IGF. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς ενεργοποιούν την αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) (Souza et al. 2015).

1.2.3 Οξειδωτικό στρες και μυϊκή ατροφία

Η μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) είναι ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός για την παραγωγή ATP κάτω από αερόβιες συνθήκες. Φυσιολογικά, κατά την OXPHOS παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες όμως εξουδετερώνονται εξαιτίας της παρουσίας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Bhatti et al. 2017). Γενικότερα, το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού (Daenen et al. 2019). Το οξειδωτικό στρες προάγει την καταβολική κατάσταση και επιταχύνει την ατροφία των μυών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου, μειώνεται η ευαισθησία του μυοϊνιδίου στα κατιόντα Ca^{+2} με αποτέλεσμα την κόπωση των μυών (Kaltsatou et al. 2015). Ακόμη, μελέτες έχουν παρατηρήσει αυξημένα επίπεδα βιοδεικτών οξειδωτικού στρες, όπως του δείκτη οξείδωσης των λιπιδίων μηλονοδιαλδεύδη (MDA) και μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε δείγματα αίματος και μυϊκού ιστού ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Kaltsatou et al. 2015, Crowe et al. 2007, Rapa et al. 2019, Lim et al. 2002).

1.3 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

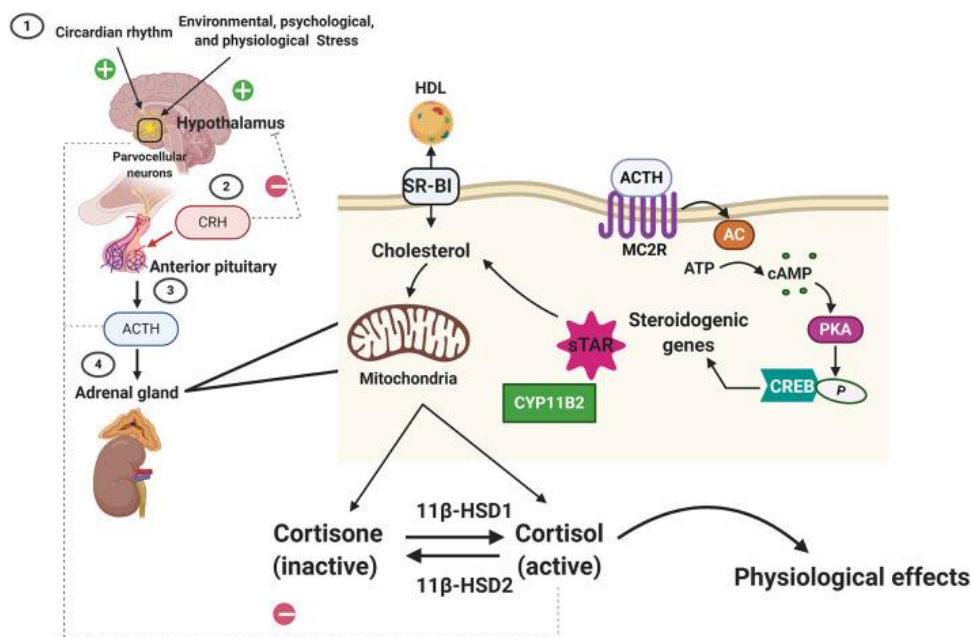
1.3.1 Βασικά στοιχεία για τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids, GC) είναι στεροειδείς ορμόνες που θεωρούνται απαραίτητες για τη λειτουργία των θηλαστικών και φαίνεται να συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού και εγκεφαλικές διεργασίες (Timmermans et al. 2019). Το κύριο φυσικό γλυκοκορτικοειδές στον οργανισμό είναι η κορτιζόλη, ενώ το πιο γνωστό συνθετικό γλυκοκορτικοειδές είναι η δεξαμεθαζόνη. Γενικά, τα γλυκοκορτικοειδή θεωρούνται πως έχουν αντιφλεγμονώδη και

ανοσοκατασταλτική δράση, όμως πολλές φορές προκαλούν παρενέργειες όπως καταστολή των επινεφριδίων, υπέρταση, οστεοπόρωση, μυϊκή ατροφία, αύξηση του βάρους και διαβήτη (Bordag et al. 2015). Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Αναλυτικότερα, η κορτιζόλη μπορεί να προκαλέσει υπεργλυκαιμία καθώς σε συνθήκες στρες αυξάνεται η σύνθεση ενζύμων που συμμετέχουν στα μονοπάτια γλυκογονόλυσης και τη γλυκονεογένεσης. Έχει σημειωθεί πως η κορτιζόλη αυξάνει τη γλυκονεογένεση καθώς επάγει τη έκφραση του ενζύμου PEPCK (Chourpiliadis et al. 2023). Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν καταβολικά μονοπάτια στους μύες, όπου από την μυϊκή διάσπαση (μείωση μυϊκής μάζας) προκύπτουν αμινοξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για την παραγωγή γλυκόζης. Τέλος, έχει αναφερθεί πως τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν την ενεργοποίηση της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (HSL), οδηγώντας σε αυξημένη λιπόλυση και κατά συνέπεια σε μεγαλύτερη διαθεσιμότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων, όπου τα τελευταία αποτελούν υπόστρωμα για β-οξείδωση στα μιτοχόνδρια (Chourpiliadis et al. 2023).

1.3.2 Ενδογενής βιοσύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών

Όσο αναφορά την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών, αυτή ρυθμίζεται μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων και εκκρίνονται ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες όπως πχ το στρες (Cruz-Topete et al. 2020). Γενικά, υπό την επίδραση φυσικών ή στρεσογόνων παραγόντων, διεγείρονται οι νευρώνες εντός του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου, με αποτέλεσμα οι τελευταίοι να απελευθερώσουν την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Η CRH μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και επάγει την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) από τα κορτικοτρόπα κύτταρα. Στην συνέχεια, η ACTH, δεσμεύεται σε υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs-G protein-coupled receptors), που εντοπίζονται στις εξωκυτταρικές μεμβράνες του φλοιού των επινεφριδίων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης και την παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Έπειτα, το cAMP, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) για να υδρολύσει τους εστέρες χοληστερόλης σε χοληστερόλη. Ακόμη, η PKA οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση της στεροειδογόνου οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης (StAR-steroidogenic acute regulatory protein), που είναι υπεύθυνη για την μεταφορά την χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια, όπου συμβαίνει η στεροειδογένεση, δηλαδή η παραγωγή γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο μόριο την χοληστερόλη (Cruz-Topete et al. 2020). Η βιολογικά ενεργή μορφή του γλυκοκορτικοειδούς είναι η ελεύθερη από πρωτεΐνες του πλάσματος-κορτιζόλη που μετατρέπεται σε κορτιζόνη (ανενεργή μορφή), μέσω του ενζύμου αφυδρογονάση 11β-υδροξυστεροειδών τύπου 2 (11-βHSD2). Η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη, όπου και η κορτιζόνη μπορεί να μετατραπεί σε κορτιζόλη μέσω του ενζύμου αφυδρογονάση των 11β-υδροξυστεροειδών τύπου 1 (11-βHSD1). Τέλος, ανάλογα με τα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, ενεργοποιείται και ο βρόχος αρνητικής ανατροφοδότησης, που καταστέλλει τα επίπεδα της ACTH στην πρόσθια υπόφυση και τα επίπεδα της CRH στον υποθάλαμο με στόχο την διατήρηση της ομοιόστασης (Cruz-Topete et al. 2020).



Εικόνα 5: Ρύθμιση της σύνθεσης και της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Αναλυτικότερα, η έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες διεγείρει την έκκριση της κορτικοτροπίνης από τον υποθάλαμο (CRH). Η CRH ενεργοποιεί στη συνέχεια την έκκριση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση. Η ACTH συνδέεται στη συνέχεια με τους υποδοχείς της (υποδοχέας μελανοκορτίνης 2, MC2R) που εντοπίζονται στον φλοιό των επινεφριδίων, με αποτέλεσμα στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC). Η πρόσδεση της ACTH στον MC2R οδηγεί στην ενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης (AC) και την παραγωγή κυκλικού AMP (cAMP), όπου το τελευταίο ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Έπειτα η PKA, φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη (CREB-Cyclic AMP response element-binding protein), η οποία επάγει την έκφραση στεροειδογενών γονιδίων (StAR-steroidogenic acute regulatory protein) με αποτέλεσμα τη μεταφορά χοληστερόλης (η οποία εισάγεται από το αίμα στα φλοιώδη κύτταρα μέσω του υποδοχέα SARB1- scavenger receptor type B class 1) στα μιτοχόνδρια, όπου συντίθενται γλυκοκορτικοειδή. Η βιολογικά ενεργή μορφή του γλυκοκορτικοειδούς είναι η ελεύθερη κορτιζόλη που μπορεί να μετατραπεί στην κορτιζόνη (ανενεργή μορφή), από την αφυδρογονάση των 11β-υδροξυστεροειδών τύπου 2 (11-βHSD2). Παράλληλα, η αφυδρογονάση 11β-υδροξυστεροειδών τύπου 1 (11-βHSD1) είναι ένα ένζυμο που οδηγεί στην μετατροπή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη. Η ομοιοστάση διατηρείται με ένα βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης όπου καταστέλλονται τα επίπεδα της ACTH στην πρόσθια υπόφυση και τα επίπεδα της CRH στον υποθάλαμο (Cruz-Torpe et al. 2020) .

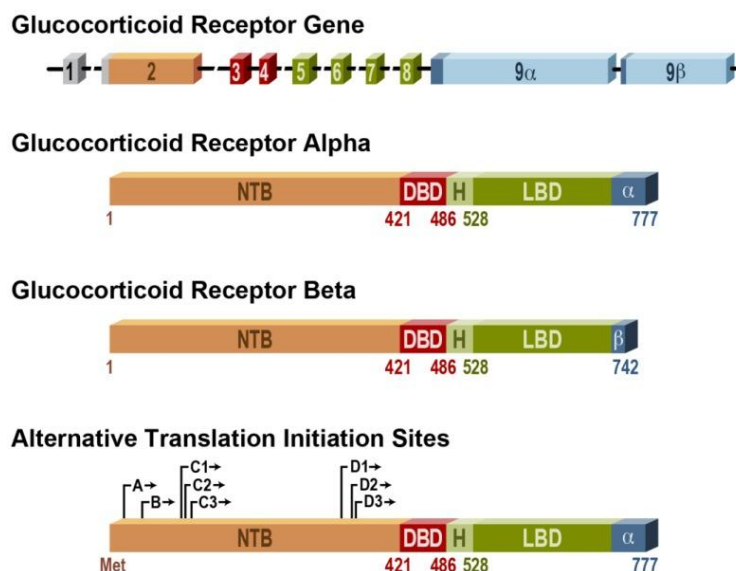
1.4 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

1.4.1 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών (GR)

1.4.1.1 Δομή και ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών GR, είναι ένας υποδοχέας στεροειδών ορμονών και αποτελεί μέλος της συντηρημένης υποοικογένειας 3 των πυρηνικών υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει και άλλους υποδοχείς όπως τους υποδοχείς οιστρογόνων, ανδρογόνων και προγεστερόνης. Κωδικοποιείται από το γονίδιο NR3C1, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31) (Lockett et al. 2024). Ειδικότερα, το γονίδιο NR3C1, αποτελείται από 9 εξώνια και περιέχει τρεις βασικές λειτουργικές επικράτειες: την αμινοτελική περιοχή (N-τελική περιοχή), την περιοχή δέσμευσης DNA (DBD-DNA Binding Domain) και την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD-Ligand Binding Domain). Σχετικά με την επικράτεια NTD περιέχει μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης 1 ανεξάρτητα από την πρόσδεση του ligand (AF1), μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η μεταγραφική ενεργοποίηση και η αλληλεπίδραση του GR με άλλους

μεταγραφικούς παράγοντες. Η επικράτεια DBD περιέχει 2 εξαιρετικά συντηρημένα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, τα οποία συμβάλουν στην πρόσδεση του GR σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE), που υπάρχουν στην αλληλουχία του DNA καθώς και στον διμερισμό του υποδοχέα. Επίσης, στην DBD εντοπίζεται ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού του υποδοχέα GR (NLS1), που συμβάλει στην μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα του κυττάρου. Επιπλέον, στο καρβοξυτελικό άκρο της DBD περιλαμβάνεται μία περιοχή εύκαμπτου συνδέτη που παρέχει ευελιξία κατά την αλλαγή της στεροδιαμόρφωσης του υποδοχέα. Η LBD σχηματίζει έναν υδρόφοβο θύλακα για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών και σε αυτή έχει ταυτοποιηθεί μία δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF2 (Lockett *et al.* 2024). Λόγω του εναλλακτικού ματίσματος προκύπτουν διάφορα μεταγγραφα του υποδοχέα GR και συγκεκριμένα τα GR α , GR β , GR γ , GR-A και GR-P (Merkulov *et al.* 2012). Ειδικότερα, λόγω της εναλλακτικής ωρίμανσης του εξωνίου 9 του GR προκύπτουν δύο κύριες ισομορφές του GR, ο GR α (777 αμινοξέα) και ο GR β (742 αμινοξέα) που φαίνεται να έχουν ανταγωνιστική δράση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως λόγω της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης και οι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του GR προκύπτουν πολλές και διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα, από τις οποίες η ισομορφή GR α -C φαίνεται να δρα ως ο πιο ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης (Gruver-Yates *et al.* 2013).



Εικόνα 6: Η δομή του γονιδίου NR3C1 και οι εναλλακτικές ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GR (Gruver-Yates *et al.* 2013).

1.4.1.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκεται ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

Αρχικά, αξίζει να αναφερθεί πως οι υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), εντοπίζεται σε διάφορα υποκυτταρικά οργάνδια όπως στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, σε κυτταρικές μεμβράνες αλλά και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Στην βιβλιογραφία, αναφέρονται τόσο γενωμικές όσο και μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα GR, αλλά παράλληλα ο ίδιος ο υποδοχέας ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο (Meduri *et al.* 2020).

❖ Γενωμικές δράσεις του υποδοχέα GR

Οι γενωμικές δράσεις του υποδοχέα GR, επιτυγχάνονται μέσω της πρόσδεσης των γλυκοκορτικοειδών στην επικράτεια LBD του υποδοχέα (Meduri *et al.* 2020). Ειδικότερα, τα γλυκοκορτικοειδή είναι λιποδιαλυτά μόρια και επομένως είναι ικανά να

διαπερνούν ελεύθερα την κυτταρική μεμβράνη. Απουσία προσδέτη, ο υποδοχέας GR βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες chaperone (hsp90, hsp70 και p23) και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506 σε μια μεταγραφικά ανενεργή μορφή. Με την πρόσδεση των στεροειδών ορμονών, ο υποδοχέας GR υφίσταται αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης, με αποτέλεσμα την αποσύνδεσή του από το προαναφερθέν σύμπλοκο πρωτεϊνών και την μετατόπιση του στον πυρήνα του κυττάρου καθώς λόγω αυτής της αναδιάταξης εκθέτονται τα 2 σήματα πυρηνικού εντοπισμού του υποδοχέα. Έπειτα, μετά τον ομοδιμερισμό του υποδοχέα στον πυρήνα του κυττάρου, αυτός δρα άμεσα με την πρόσδεση του σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) με αποτέλεσμα να επάγει ή να καταστέλλει γονίδια στόχους του. Ακόμη ο GR μπορεί να δράσει έμμεσα ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων μέσω της αλληλεπίδρασης του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί πως η αλληλεπίδραση του GR με τους προφλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες (AP1, NF-κΒ) καταστέλλει τη δράση τους, γεγονός που αποδίδει την αντιφλεγμονώδη ιδιότητα των γλυκοκορτικοειδών. Συγκεκριμένα, ο GR δεσμεύει άμεσα την υπομονάδα Jun του AP1 και την υπομονάδα p65 του NF-κΒ, παρεμβαίνοντας έτσι στην μεταγραφική ενεργοποίηση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (Oakley et al. 2013).

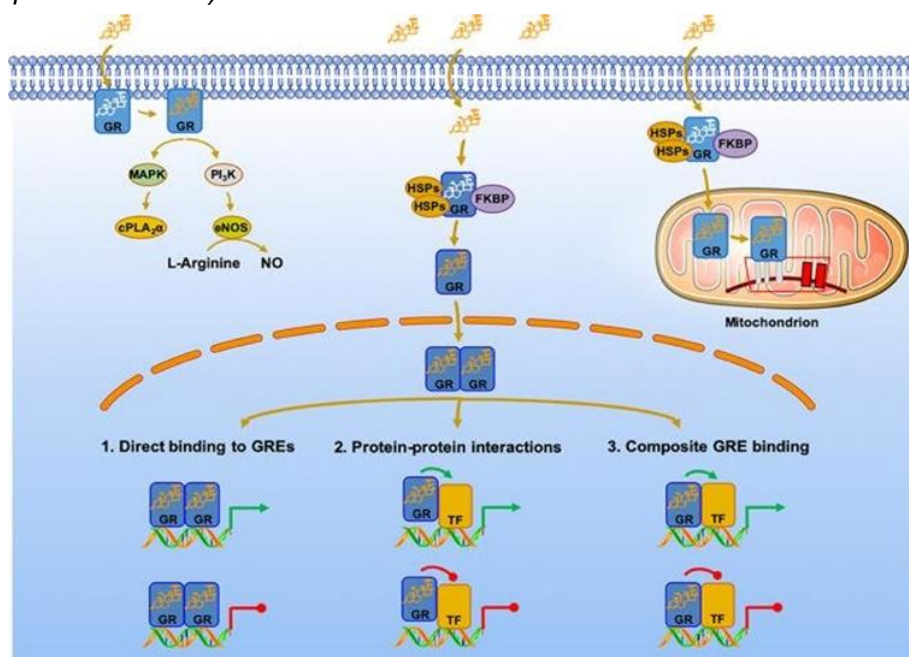
❖ Μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα GR

Οι μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα GR, χαρακτηρίζονται ως γρήγορες καθώς δεν απαιτούν ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε σύγκριση με τις γενωμικές. Στο γενωμικό μονοπάτι, οι στεροειδείς ορμόνες επιτελούν τις δράσεις τους μέσω κυρίως μεμβρανικών υποδοχέων GR (mGR) που συνδέονται με G-πρωτεΐνες ενεργοποιώντας διάφορα μονοπάτια όπως το PI3K-Akt, το οποίο συνδέεται με γεγονότα αυτοφαγίας και οξειδωτικού στρες και φαίνεται να υπερενεργοποιείται σε ασθενείς με πολλαπλή χρόνια νεφρική νόσο (Seale et al. 2001, Wang et al. 2023). Ακόμη, μέσω πειραμάτων σε μυϊκά κύτταρα C2C12, έχει αποδειχθεί πως η δεξαμεθαζόνη καταστέλλει άμεσα την πρόσληψη γλυκόζης μέσω GR μη γενωμικών μηχανισμών, όπου καταστέλλεται η δράση μορίων όπως η AMPK και την CaMKII που φυσιολογικά συμβάλλουν στη μετατόπιση του υποδοχέα πρόσληψης γλυκόζης Glut4. Επομένως, η δεξαμεθαζόνη οδήγησε στην ταχεία αναστολή πρόσληψης της γλυκόζης και την επαγωγή της μυϊκής ατροφίας (Gong et al. 2016, Panettieri et al. 2019).

❖ Μιτοχονδριακές δράσεις του υποδοχέα GR

Επιπρόσθετα, έχουν ταυτοποιηθεί στο μιτοχόνδριο, ομόλογες αλληλουχίες με τα GREs στον πυρήνα (mtGREs), στις οποίες προσδένεται το σύμπλοκο στεροειδούς ορμόνης-GR με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, τα οποία εμπλέκονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση/αναπνευστική αλυσίδα (OXPHOS) (Sekeris et al. 1990, Psarra et al. 2011, Psarra et al. 2008). Ακόμη, μελέτες έχουν αποδείξει ότι η οξεία και περιορισμένη έκθεση των κυττάρων με γλυκοκορτικοειδή αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ATP, οδηγεί σε αύξηση του δυναμικού της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (Kokkinoroulou et al. 2021). Επιπρόσθετα, έρευνα αποδεικνύει ότι το γλυκοκορτικοειδές deflazacort επάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση αυξάνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα των συμπλόκων III, IV και της ATP συνθάση και βελτίωσε την εισροή ασβεστίου στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών σε πειραματικά μοντέλα ποντικού με δυστροφία Duchenne (Dubinin et al. 2020). Αντίθετα, η μακροχρόνια χορήγηση και οι υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών μπορεί να απορρυθμίσει τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό, να αυξήσει την ευαισθησία των κυττάρων σε φαινόμενα σύντηξης των τελομερών και την παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Μάλιστα, η

μακροχρόνια επώαση του γλυκοκορτικοειδούς α-methylprednisolone (PDN) σε κύτταρα C2C12, οδήγησε σε μείωση της εισροής ασβεστίου καταστέλλοντας έτσι σηματοδοτικά μονοπάτια που συμβάλλουν στον εκφυλισμό των σκελετικών μυών (Passaquin *et al.* 1998).



Εικόνα 7: Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια (γενωμικό, μη γενωμικό, μιτοχονδριακό) στα οποία συμμετέχει ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών. Ειδικότερα, κατά το γενωμικό μονοπάτι, ο υποδοχέας GR, αφού συνδεθεί με τον προσδέτη του, αποσυνδέεται από το σύμπλοκο πρωτεϊνών θερμικού σοκ και ανοσοφιλινών με αποτέλεσμα την μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου, όπου αλληλεπιδρά με GREs ή/και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων του. Κατά το μη γενωμικό μονοπάτι, ο μεμβρανικός υποδοχέας GR, μπορεί επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν κινάσες MAPK και PI3K. Επίσης, έχουν αναφερθεί και μιτοχονδριακές δράσεις όπου ο υποδοχέας GR, συνδέεται σε αλληλουχίες GREs στο μιτοχόνδριο, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων (Meduri *et al.* 2020).

1.4.1.3 Ο ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην κυτταρική γήρανση και μεταβολισμό μυϊκών κυττάρων

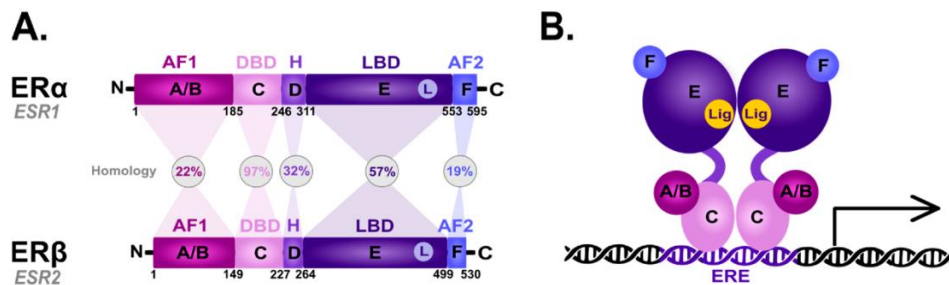
Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα βασικά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών αυξάνονται κατά τη γήρανση και έχει αποδειχθεί πως τα χρόνια αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με μια πληθώρα παρενεργειών, όπως η απώλεια οστών, η μυοπάθεια, η μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη και η ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας (Macfarlane *et al.* 2024). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια ακολουθεί έναν κirkάδιο ρυθμό όπου στον ανθρώπινο οργανισμό, υπάρχει μία κορύφωση των επιπέδων νωρίς το πρωί, που ακολουθείται από μία δεύτερη αύξηση των επιπέδων τους αργά το απόγευμα. Με την αύξηση της ηλικίας, η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών απορρυθμίζεται με αποτέλεσμα την υψηλή έκκριση κορτιζόλης την νύχτα (Macfarlane *et al.* 2024). Μάλιστα, έρευνα σε ηλικιωμένα τρωκτικά, τα οποία υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση όπου έλαβαν μόσχευμα εμβρυϊκού υπερχιασματικού πυρήνα, παρατηρήθηκε ανάκτηση του φυσιολογικού κirkάδιου ρυθμού έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών (Hurd *et al.* 1995). Ακόμη, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία, όρος «inflammaging», που πρόκειται για μία κατάσταση φλεγμονής που αναπτύσσεται με την ηλικία. Γενικότερα, ο οργανισμός ως απάντηση στην φλεγμονή και τα υψηλά

επίπεδα κυτταροκινών (IL-6, IL-1, TNF-α), ενεργοποιεί τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) για να παραχθούν γλυκοκορτικοειδή και τα τελευταία να ασκήσουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους. Όμως, τα χρόνια αυξημένα ενδογενή επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, μπορεί να οδηγήσουν σε ανοσοκαταστολή και φαινόμενα αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Macfarlane *et al.* 2024). Επιπρόσθετα, η έκφραση του 11β-HSD1 έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά αυξημένη στους σκελετικούς μύες σε γυναίκες άνω των 60 ετών σε σύγκριση με εκείνες ηλικίας 20 έως 40 ετών. Επιπλέον, η έκφραση του mRNA του 11β-HSD1 στους σκελετικούς μύες συσχετίζεται αρνητικά με τη μυϊκή μάζα και τη διάμετρο των ινών τύπου 2 σε ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών. Στην ίδια έρευνα, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα GR με την μυϊκή μάζα, ούτε εντοπίστηκε κάποια διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων (Zaki *et al.* 2015).

1.4.2 Υποδοχέας Οιστρογόνων (ER)

1.4.2.1 Δομή και ισότυποι του υποδοχέα οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες που εμπλέκονται σε ένα πλήθος φυσιολογικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την φλεγμονή, την αναπαραγωγή, τη διατήρηση της οστικής μάζας και την ανάπτυξη μαστικού ιστού (Fuentes *et al.* 2019). Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί δύο διαφορετικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα ER, και συγκεκριμένα το ESR1 για τον υποδοχέα α (ERα-Estrogen Receptor alpha) και το ESR2 για τον υποδοχέα β (ERβ-Estrogen Receptor beta). Τα γονίδια αυτά είναι αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού και εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και συγκεκριμένα το ESR1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 ενώ το ESR2 στο χρωμόσωμα 14 (Miziak *et al.* 2023). Σχετικά με τη δομή του υποδοχέα οιστρογόνων, αυτός αποτελείται από 6 πρωτεϊνικές επικράτειες. Αναλυτικότερα, οι επικράτειες A και B βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο και περιέχουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης 1 (AF-1). Η επικράτεια C, περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, μέσω της οποίας προσδένεται ο υποδοχέας σε στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (EREs). Η επικράτεια D, περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού ενώ η επικράτεια E, είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των οιστρογόνων στον υποδοχέα. Τέλος, στην επικράτεια F, εντοπίζεται μία δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-2), που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με άλλους συνενεργοποιητές. Μάλιστα, πραγματοποιείται αλληλεπίδραση των περιοχών AF-1 και AF-2 εξαιτίας της αλλαγής στεροδιαμόρφωσης του υποδοχέα που υποβοηθείται μέσω της επικράτειας D που λειτουργεί ως περιοχή εύκαμπτου συνδέτη (Miziak *et al.* 2023). Αξίζει να αναφερθεί πως λόγω του εναλλακτικού ματίσμος, υπάρχουν 5 μικρότερου μοριακού βάρους ισομορφές για τον ERα ενώ για τον ERβ έχουν ταυτοποιηθεί τρεις μικρότερες και μία μεγαλύτερη μοριακού βάρους ισομορφή. Ακόμη, ο ERβ φαίνεται να αναστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του ERα παρουσιάζοντας έτσι μια ανταγωνιστική δράση (Miziak *et al.* 2023).

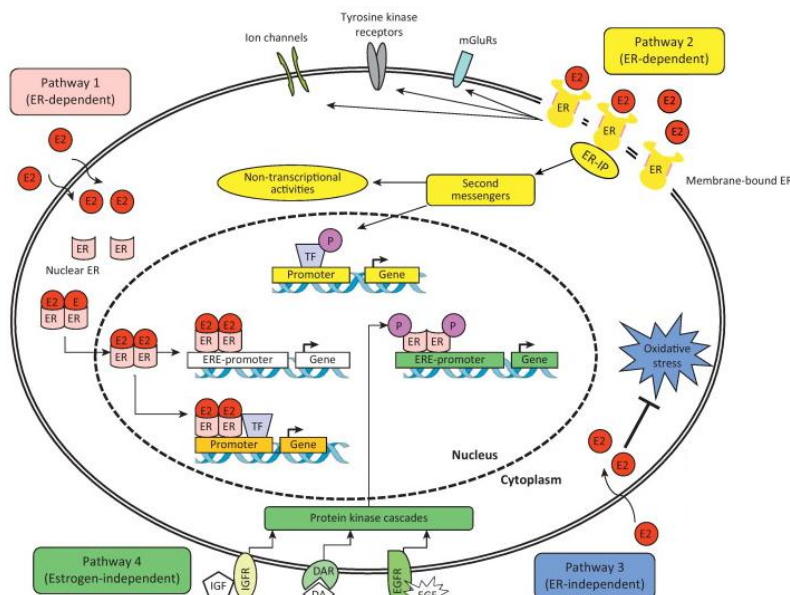


Εικόνα 8: Α. Σχήμα των λειτουργικών επικρατειών του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) και σύγκριση της ομολογίας τους μεταξύ των ισοτύπων ERα και ERβ. Β. Απεικόνιση της πρόσδεσης του διμερούς του υποδοχέα ER στα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs) (Miziak et al. 2023).

1.4.2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα οιστρογόνων

Οι βιολογικές δράσεις του υποδοχέα οιστρογόνων ER, διακρίνονται σε γενωμικές όπου ο υποδοχέας ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων στόχων του και σε μη γενωμικές κατά όπου ενεργοποιούνται μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης με κύριους συντελεστές τις κασπάσες. Τέλος, έχουν καταγραφεί και δράσεις των οιστρογόνων, σε σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα από την σύνδεση του προσδέτη (ligand) αλλά και ανεξάρτητα του υποδοχέα (Fuentes et al. 2019).

Ειδικότερα, στο άμεσο γενωμικό μονοπάτι, ο υποδοχέας ER δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τα οιστρογόνα και μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα, όπου και διμερίζεται. Στην συνέχεια το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτης συνδέεται σε αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs) ή συνδέεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Κατά το έμμεσο γενωμικό μονοπάτι, ο μεμβρανικός υποδοχέας ER που είναι συζευγμένος με πρωτεΐνες G (GPCR), παρουσία οιστρογόνων, επάγει τόσο την διαμόρφωση μεμβρανικών διαύλων ιόντων όσο και δεύτερους αγγελιοφόρους με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων. Ακόμη, οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν να ενεργοποιηθούν κυρίως από τη φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα τους κατάλοιπα, απουσία οιστρογόνων. Έτσι στο μονοπάτι ανεξαρτήτου προσδέτη, συμμετέχουν μόρια που ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης, όπως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και πεπτιδικόι αυξητικοί παράγοντες. Τέλος, μέσω του μονοπατιού ανεξαρτήτου υποδοχέα, τα οιστρογόνα ασκούν αντιοξειδωτικές επιδράσεις (Fuentes et al. 2019).



Εικόνα 9: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER). Ειδικότερα, κατά το άμεσο γενωμικό μονοπάτι, πραγματοποιείται μετατόπιση του υποδοχέα ER από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με αποτέλεσμα την ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων μέσω της πρόσδεσης σε στοιχεία απόκρισης EREs και μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες αντίστοιχα. Κατά το έμμεσο γενωμικό μονοπάτι, η σηματοδότηση ξεκινά από μεμβρανικούς υποδοχείς ER, ρυθμίζοντας διαύλους ιόντων και δευτέρους αγγελιοφόρους με αποτέλεσμα τον έλεγχο της δράσης μεταγραφικών παραγόντων. Ακόμη, έχουν ταυτοποιηθεί δράσεις των οιστρογόνων όπου τα ίδια ανεξαρτήτως του υποδοχέα τους, ασκούν αντιοξειδωτικές επιδράσεις. Τέλος, έχει αναφερθεί πως ο υποδοχέας ER μπορεί να ενεργοποιηθεί χωρίς την παρουσία οιστρογόνων, μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες (Cui et al. 2013).

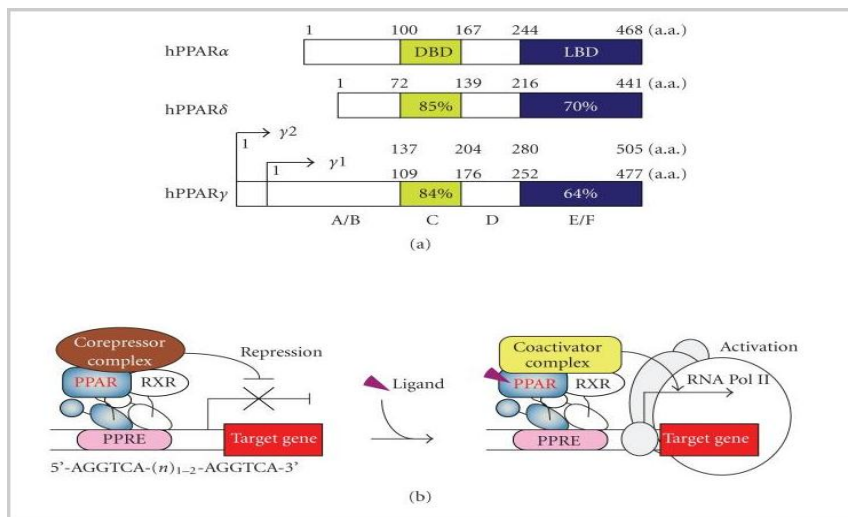
1.4.2.3 Επίδραση των οιστρογόνων στη μιτοχονδριακή λειτουργία των μυών καθώς και σε συνθήκες γήρανσης.

Ειδικότερα, τα οιστρογόνα (με πιο δραστικό οιστρογόνο την 17-β οιστραδιόλη) θεωρείται ότι παρουσιάζουν ευεργετικές επιδράσεις στη μιτοχονδριακή λειτουργία και συμβάλλουν στην πρόληψη της σαρκοπενίας, όπου η τελευταία αποτελεί μια μυοσκελετική νόσος που χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια μυϊκής μάζας και δύναμης (Yoh et al. 2023, Ardeljan et al. 2023). Ερευνητική μελέτη έχει αποδείξει πως ο σκελετικός μυς θηλυκών αρουραίων που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με οιστρογόνα παρουσιάζει αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας, της αντιοξειδωτικής προστασίας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε σύγκριση με τους αρσενικούς αρουραίους (Capllonch-Amer et al. 2014, Farhat et al. 2017). Ακόμη, πειραματική μελέτη έδειξε πως η έλλειψη οιστρογόνων σε ποντίκια οδηγεί σε μείωση της λειτουργίας του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλέγματος I (COXI) στους μύες, η οποία αποκαθίσταται με τη θεραπεία με οιστρογόνα (Torres et al. 2018). Επιπλέον, κατά την γήρανση παρατηρείται αδυναμία των σκελετικών μυών, κάτι το οποίο επιδεινώνεται λόγω της απουσίας οιστρογόνων (Collins et al. 2019). Ακόμη, τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν προστατευτικές δράσεις έναντι της απόπτωσης που προκαλείται από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σύμφωνα με μελέτη σε κύτταρα C2C12. Ειδικότερα, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε πως η 17β-οιστραδιόλη, αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP27, η οποία αλληλεπιδρά με την κασπάση-3 και αναστέλλει την διάσπαση και ενεργοποίηση της, εμποδίζοντας έτσι την απόπτωση των κυττάρων C2C12 (Vasconsuelo et al. 2010).

1.4.3 Υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α (PPARα)

1.4.3.1 Δομή και βιολογικές δράσεις του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστική των υπεροξεισωμάτων (PPAR) είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Όσο αναφορά την δομή τους, αποτελούνται από 6 πρωτεϊνικές επικράτειες (A/B, C, D και E/F), από τις οποίες οι περιοχές DBD και LBD παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά ομοιότητας στην αμινοξική τους αλληλουχία μεταξύ των 3 ισοτύπων PPARα, PPARδ και PPARγ, που έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο (*Tachibana et al. 2008*). Ειδικότερα, ο PPARα εκφράζεται σε διάφορα όργανα όπως στο ήπαρ, στους νεφρούς, στην καρδιά αλλά και στους μυς (*Mandard et al. 2004*). Ο υποδοχέας PPARα ενεργοποιείται από διάφορους προσδέτες, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τα εικοσανοειδή και τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα. Έχει φανεί πως ο PPARα συμμετέχει στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων καθώς επάγει την μεταγραφή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), μειώνει τα επίπεδα mRNA της απολιποπρωτεΐνης C-III (ApoC-III), ο οποίος αποτελεί αναστολέας της LPL, και διεγείρει την πρόσληψη και την μετατροπή των λιπαρών οξέων σε παράγωγα ακυλο-CoA, ενός βασικού μορίου που συμμετέχει στον κύκλο του Krebs και συνεπώς στην παραγωγή ενέργειας (*Staels et al. 1995, Schoonjans et al. 1996, Schoonjans et al. 1996*). Σχετικά, με τον μηχανισμό δράσης του, ο ίδιος δημιουργεί ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον υποδοχέα ρετινοειδούς X και στην συνέχεια το σύμπλοκο αυτό συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης στον υποδοχέα PPAR (PPREs- proliferator responsive elements). Απουσία προσδέτη φαίνεται να καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του ενώ παρουσία προσδέτη συνδέεται με συνενεργοποιητές επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν τον λιπιδιακό μεταβολισμό (*Tachibana et al. 2008*).



Εικόνα 10: Οι δομικές επικράτειες των υποδοχέων PPARα στον άνθρωπο και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο με τον υποδοχέα ρετινοειδούς X στο οποίο συμμετέχει για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (*Tachibana et al. 2008*).

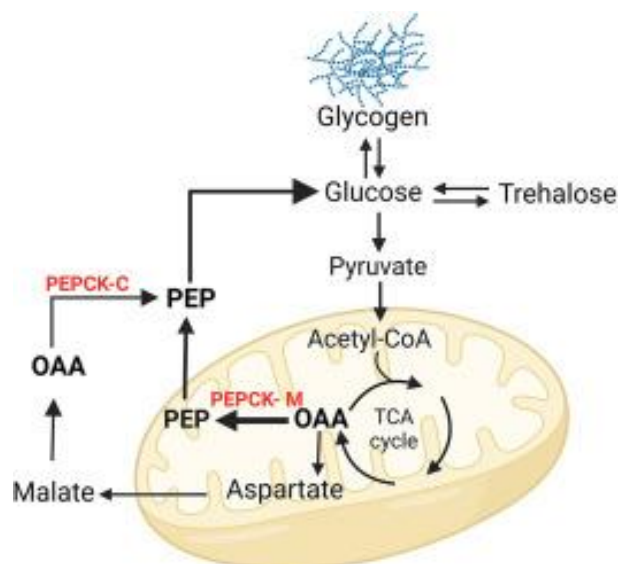
1.4.3.2 Μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α και εμπλοκή του στην κυτταρική γήρανση και την χρόνια νεφρική νόσο

Έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι οι υποδοχείς PPARα και PPARγ αναστέλλουν την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων, όπως οι κυτταροκίνες, οι μεταλλοπρωτεάσες της μήτρας των μιτοχονδρίων (MMPs) και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης. Για παράδειγμα, η χορήγηση fibrate, αγωνιστή του PPARα, σε ασθενείς με μέτρια υπερλιπιδαιμία οδήγησε σε μείωση των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), της ιντερφερόνης (IFN), του ινωδογόνου και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) (*Madej et al. 1998, Blanquart et al. 2003*). Ακόμη, οι υποδοχείς PPARα και PPARγ ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής σε ηλικιοεξαρτώμενες νόσους. Αναλυτικότερα, η χορήγηση του αγωνιστών του PPARα, Wy 14,643 και θεϊκής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS) κατέστειλε την ενεργότητα του NF-κΒ και την έκφραση γονιδίων-στόχων που ρυθμίζονται από τον τελευταίο (*Poynter et al. 1998*). Τέλος, η ενεργοποίηση του PPARα φαίνεται να έχει προστατευτικές ιδιότητες κατά την χρόνια νεφρική νόσο. Ερευνητική μελέτη απέδειξε πως η ενεργοποίηση του PPARα από την oleylethanolamide, οδήγησε στην καταστολή της φλεγμονής και ίνωσης των νεφρών (*Comella et al. 2024, Masenga et al. 2024*).

1.5 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΩΛΕΙΑ ΜΥΪΚΗΣ ΜΑΖΑΣ

1.5.1 Καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK)

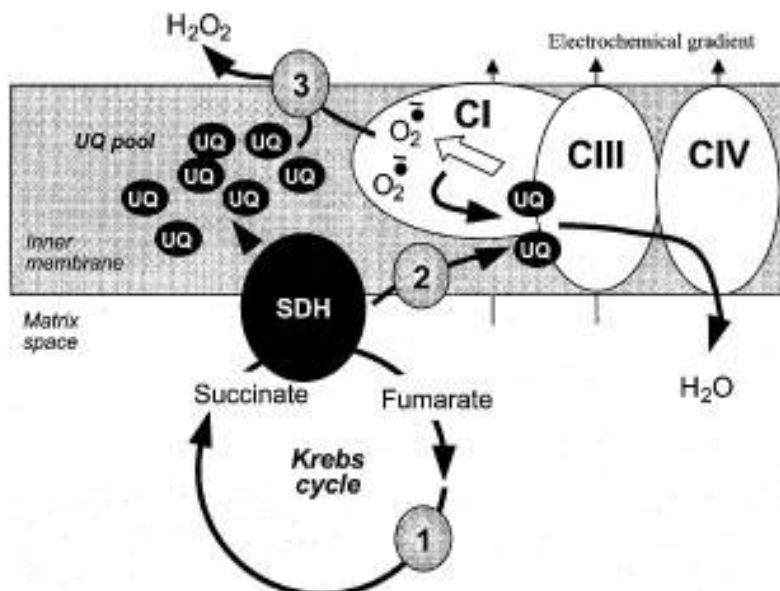
Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) είναι ένα σημαντικό ένζυμο ρυθμίζει την γλυκονεογένεση κυρίως στο ήπαρ και στους νεφρούς. Αφού πραγματοποιηθεί μετατροπή των αμινοξέων και άλλων μη υδατανθρακικών πηγών σε οξαλοξικό (OAA) στον κύκλο του Krebs, η PEPCK καταλύει τη μετατροπή του OAA σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP), όπου το τελευταίο μετατρέπεται στην συνέχεια σε γλυκόζη μέσω μίας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων (*Montal et al. 2015*). Πειραματική μελέτη έχει αποδείξει ότι σε γηρασμένα λόγω ηλικίας σκουλήκια *C.elegans*, παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας της κυτταροπλασματικής PEPCK-C, γεγονός που οδήγησε σε απορρύθμιση της μυϊκής δραστηριότητας των σκουληκιών. Ακόμη, στην ίδια μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι η υπερέκφραση της PEPCK-C στους μύες των *C.elegans* οδήγησε σε αύξηση του προσδόκιμου ορίου ζωής (lifespan) (*Yuan et al. 2016*).



Εικόνα 11: Η μετατροπή του οξαλοξικού σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό μέσω του ενζύμου PEPCK. Αφού παραχθεί το φωσφοενολοπυροσταφυλικό, με την δράση πολλών ενζύμων, παράγεται εν τέλει η γλυκόζη (Martins da Silva et al. 2023).

1.5.2 Ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH)

Η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH), αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες (SDHA-D) και είναι το μόνο σύμπλοκο της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) που κωδικοποιείται εξ ολοκλήρου από γονίδια του πυρήνα (Whitehouse et al. 2019). Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στην μεταφορά ηλεκτρονίων από τον κύκλο του Krebs στην αναπνευστική αλυσίδα συμβάλλοντας στην παραγωγή ενέργειας με την μορφή του ATP. Ειδικότερα, στον κύκλο του Krebs, η SDH οξειδώνει το ηλεκτρικό σε φουμαρικό σχηματίζοντας παράλληλα FADH_2 ενώ κατά OXPHOS, η SDH μεταφέρει ηλεκτρόνια από το FADH_2 στην ουβικινόνη (UbQ) αλλά και στο σύμπλεγμα III της αναπνευστικής αλυσίδας (Bezawork-Geleta et al. 2017). Επομένως η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου έχει θεωρηθεί δείκτης της οξειδωτικής ικανότητας των μιτοχονδρίων (Fattoretti et al. 2001). Η πλήρης έλλειψη της δραστηριότητας της SDH, θα παρεμποδίσει τη ροή ηλεκτρονίων τόσο στο σύμπλεγμα III της αναπνευστικής αλυσίδας όσο και στη δεξαμενή κινόνων, με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες, με δυσμενείς κλινικές επιπτώσεις όπως για παράδειγμα τον σχηματισμό όγκων που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με καρκινώματα νεφρικών κυττάρων (RCC) (Rustin et al. 2002, Kumar et al. 2021). Πειραματική μελέτη σε ποντίκια με χρόνια νεφρική νόσο απέδειξε μέσω χρώσης της SDH, μείωση της δραστηριότητας της SDH στον μυϊκό ιστό των ποντικών με CKD σε σύγκριση με την ομάδα ποντικών αναφοράς (Okamoto et al. 2024).



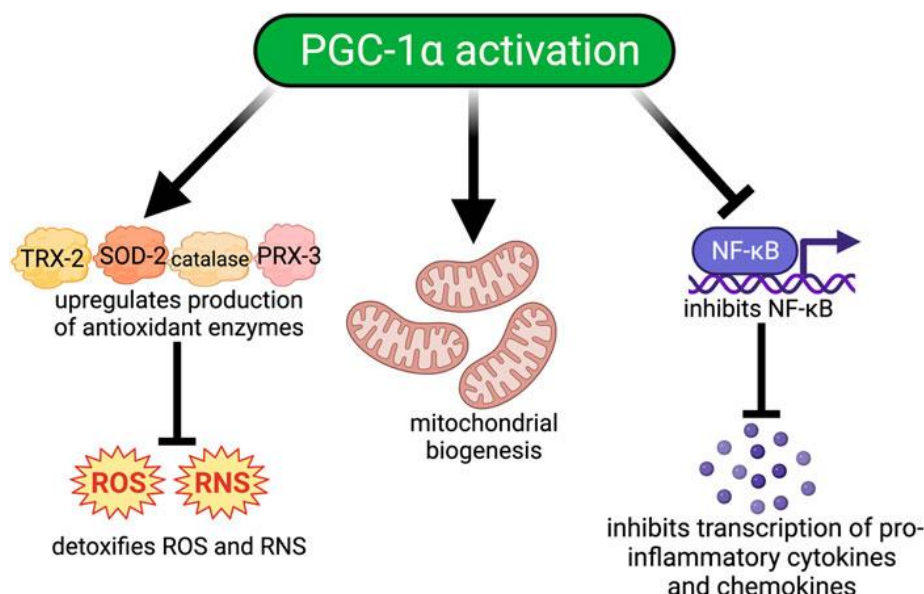
Εικόνα 12: Η εμπλοκή του ενζύμου SDH στον κύκλο του Krebs καθώς και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αναλυτικότερα, η SDH καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό στον κύκλο του Krebs (1), ενώ τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν μεταφέρονται στο σύμπλεγμα III της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την αναγωγή του οξυγόνου προς την παραγωγή νερού (2). Ακόμη, η SDH μπορεί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια αυτά στην ουβικινόλη, η οποία θεωρείται πως έχει αντιοξειδωτική δράση (3) (Rustin et al. 2002).

1.5.3 Υπομονάδα IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV)

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c ή σύμπλοκο COX συμμετέχει στο τελικό βήμα της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνευστικής αλυσίδας) όπου καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο μοριακό οξυγόνο, μετατρέποντας το τελευταίο σε νερό. Αποτελείται από 13 υπομονάδες, από τις οποίες οι τρεις κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και οι υπόλοιπες δέκα από το πυρηνικό DNA (Li et al. 2006). Ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια έχουν χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), αλλά και μειωμένη μιτοχονδριακή βιογένεση. Συνολικά, έρευνες σε ποντίκια και ανθρώπους με νεφρική νόσο έδειξαν μειωμένη έκφραση του κυτοχρώματος C και των υπομονάδων I, II, III, IV και V του συμπλόκου COX που συμμετέχουν στην OXPHOS γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο COX και κυτόχρωμα C είναι δυσλειτουργικά (Serrano et al. 2022, Chung et al. 2019). Μελέτη έδειξε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV κατά 30% σε καρδιακό μυ ηλικιωμένων ποντικών σε σύγκριση με νεότερα ηλικιακά ποντίκια (Lee et al. 2015).

1.5.4 Συνενεργοποιητής-1 α του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α)

Ο συνενεργοποιητής-1 α του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α) αλληλεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές αποκρίσεις μεταξύ των οποίων είναι η θερμογένεση, η βιογένεση των μιτοχονδρίων, ο μεταβολισμός γλυκόζης/λιπαρών οξέων, η αναδιαμόρφωση του μυϊκού ιστού και η ανάπτυξη της καρδιάς. Είναι αποδεδειγμένο ότι ο PGC-1α προκαλεί αναδιαμόρφωση της σύνθεσης των σκελετικών μυϊκών ινών σε ίνες τύπου IIa, οι οποίες περιέχουν περισσότερα μιτοχόνδρια και παρουσιάζουν σχετικά υψηλότερους ρυθμούς οξειδωτικού μεταβολισμού (Liang et al. 2006). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι ο PGC-1α ενεργοποιεί την οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη μιτοχονδριακή βιογένεση στον μυϊκό ιστό μέσω επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων NRF-1, NRF-2 που επάγουν την μεταγραφή συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (Cytc, COXIV) και του μιτοχονδριακού παράγοντα μεταγραφής A (Tfam), προωθώντας έτσι την αντιγραφή και μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) (Liang et al. 2006). Ακόμη, ο PGC-1α ρυθμίζει την έκφραση μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών γονιδίων (δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου, καταλάση και θειορεδοξίνη) και έτσι προλαμβάνει την οξειδωτική βλάβη τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Rius-Pérez et al. 2020). Παρουσία οξειδωτικού στρες, ενεργοποιείται η κίνηση AMPK, η οποία φωσφορυλιώνει τον PGC-1α οδηγώντας σε αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης, την οξείδωση των λιπαρών οξέων και την μιτοχονδριακή βιογένεση (Rius-Pérez et al. 2020). Σύμφωνα με μία ερευνητική μελέτη, τα επίπεδα mRNA του PGC-1α ήταν αυξημένα σε μυϊκό ιστό ποντικών με χρόνια νεφρική νόσο σε σύγκριση με ποντίκια που ανήκουν στην ομάδα αναφοράς (Okamoto et al. 2024). Βέβαια, να τονιστεί πως υπάρχουν και άλλες πειραματικές μελέτες όπου σε ασθενείς και πειραματικά μοντέλα με CKD, παρατηρείται μείωση τόσο των επιπέδων mRNA όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων του PGC-1α (Liang et al. 2006, Han et al. 2017, Valle et al. 2005).



Εικόνα 13: Οι βιολογικές επιδράσεις του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC1-α). Ειδικότερα, ο PGC-1α επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση, η θειορεδοξίνη-2 (TRX-2), η υπεροξειρεδοξίνη-3 (PRX-3) και η υπεροξειδική δισμουτάση του μαγγανίου (SOD-2), οι οποίες καταστέλλουν τις δράσεις των ενεργών ριζών. Ακόμη, ο PGC1-α επάγει την μιτοχονδριακή βιογένεση ενώ καταστέλλει τη φλεγμονή αναστέλλοντας τον NF-κΒ και επομένως μειορρυθμίζοντας την μεταγραφή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών (Mohammadi et al. 2022).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτελούσε η μελέτη της εμπλοκής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στη ρύθμιση σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία μυϊκού ιστού όπως του ενεργειακού μεταβολισμού και της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε μυϊκό κυτταρικό μοντέλο σε συνθήκες επαγόμενης γήρανσης, όσο και σε σκελετικούς μύες χρησιμοποιώντας ένα ουραιμικό ζωικό μοντέλο κόνικλων με χρόνια νεφρική νόσο.

Αρχικά, πρωταρχικός στόχος ήταν η πρόκληση κυτταρικής γήρανσης σε μυϊκά κύτταρα C2C12 με την προσθήκη D-galactose για 24h και 48h και ο καθορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης D-galactose που θα οδηγούσε σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 30-40%. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western προκειμένου να μελετηθούν πιθανές μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV), μόριο έμμεσο στόχο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), καθώς και των άμεσων μοριακών στόχων του GR δηλαδή της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) και του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α (PPAR α), σε συνθήκες γήρανσης που προκλήθηκε μέσω D-galactose σε κύτταρα C2C12 παρουσία και απουσία ενός αγωνιστή του GR, της δεξαμεθαζόνης. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και των υποδοχέων οιστρογόνων α και β (ER α και ER β) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 παρουσία D-galactose, μέσω ανοσοκυταροχημείας φθορισμού.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γαστροκνήμιου μυϊκού ιστού, που χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό μιτοχονδρίων, από 2 ομάδες κόνικλων: κόνικλοι που υποβλήθηκαν σε εικονική χειρουργική επέμβαση (sham operation) χωρίς την πρόκληση νεφρικής νόσου (δείγματα αναφοράς-control) και κόνικλοι που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση μερικής νεφροεκτομής (ουραιμικά δείγματα). Όλη η συλλογή των δειγμάτων καθώς και ο επακόλουθος χειρισμός και οι αναλύσεις έγιναν με τυφλό σχεδιασμό. Ειδικότερα, μελετήθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, πρωτεϊνικές μεταβολές των πυρηνικών υποδοχέων GR, ER α και PPAR α και μορίων που ρυθμίζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως αυτά της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH), της υπομονάδας IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV) και του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική των υπεροξεισωμάτων γ (PGC1- α), μεταξύ υγιών (control) και ουραιμικών κόνικλων και διερευνήθηκε κατά πόσο αυτές οι διαφορές αντανakλούν την οξειδωτική κατάσταση των σκελετικών μυών. Τέλος, διεξήχθη ανοσοϊστοχημεία φθορισμού για να συγκριθεί η υποκυτταρική κατανομή του υποδοχέα GR μεταξύ δειγμάτων αναφοράς και ουραιμικών κόνικλων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Οργανολογία

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Ο πειραματικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Εργαστηριακός Εξοπλισμός	Εταιρεία
Mini-Rocker Shaker	BioSan
Multimode Plate Reader	Enspire multimode plate reader
Scraper	Thermo Fisher Scientific
Αναδευτήρας (Vortex)	Bio Vortex V1
Ανάστροφο Μικροσκόπιο	A. Kruss Optronic Germany
Αυτόματος πιπεταδόρος	HTC Lab solution
Επωστήρας κυτταροκαλλιιεργειών	Thermo Electron Corporation
Ζυγοί	Kern EW, Kern 440-47N
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	Tel Star AV-30/70
Θερμαινόμενη πλάκα	Kisker
Κρυοτόμος	SLEE MAINZ
Μαγνητικός Αναδευτήρας	Nuova thermolyne
Οριζόντιος Αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Πλάκα Neubauer	HBG Germany
Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών	W.B Kodak
Συνεστιάκο Μικροσκόπιο	Zeiss LSM 800, Zeiss, Jena, Germany
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN tetra cell
Συσκευή υπερήχων	Heischer Ultrasound Technology, UP400S
Τροφοδοτικά	Wealtec Elite 200, Pharmacia Biotech EPS 600
Υδατόλουτρο κυτταροκαλλιιεργειών	P. Selecta
Φασματοφωτόμετρο	Spectronic 20 GENESYSTEM
Φυγόκεντροι	Nippon Genetics Europe GmbH, Jouan BR4, Eppendorf 5810R

2.1.2 Αναλώσιμα υλικά

Ο κατάλογος των αναλώσιμων υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Αναλώσιμα Υλικά	Εταιρεία
Αντικειμενοφόρες πλάκες	MATSUNAMI (TOMO)
Βαθμονομημένα Σωληνάρια (15mL, 50mL)	Sarstedt
Γυάλινες πιπέτες	Kimble
Διηθητικά χαρτιά	Sigma
Καλυπτρίδες	SLEE medical
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45μM)	Amersham™ Protran™
Ορολογικές Πιπέτες (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt
Πιάτα καλλιέργειας κυτάρων (60x15mm)	Corning
Πλαστικά σωληνάρια (eppendorf) (1.5 mL)	Sarstedt
Ρύγχη πιπετών	Sarstedt

(0.2-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)	
Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (96 θέσεων)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	FUJI MEDICAL
Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75)	Sarstedt

2.1.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Τα αντιδραστήρια-χημικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
2-Propanol	PanReac AppliChem ITW Reagents
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich
Acrylamide/Bis 40% (Acr)	Bio-Rad
Ammonium persulfate (APS)	Serva
Bradford (5X)	Bio-Rad
Brophenolol blue	Fluka
Developer	Fuji
Dexamethasone (DEX)	Sigma-Aldrich
D-galactose	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Enhanced ChemiLuminescence (ECL)	Santa Cruz
Ethanol 100%	Honeywell
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Scharlau
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Fixer	Fuji
Glycerol	KaloChem
Glycine	Serva
Hoechst-33342	Sigma-Aldrich
Hydrochloric acid (HCl)	Scharlau
L-Glutamine 200mM (L-Gln) (100X)	Gibco
Methanol 100%	Honeywell
MitoTracker Red CMXRos (CMX)	Thermo Fisher Scientific
OCT	SAKURA FINETEK
Penicillin/Streptomycin (P/S) (5000U/mL)	Gibco
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	SERVA
Phosphate Buffered Saline (PBS) (1X, 10X)	Gibco
Protease inhibitors	Roche
Protein ladder	Proteintech
Skimmed milk powder	Regilait
Sodium chloride (NaCl)	Penta CHEMICALS
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva
Triton X-100	AppliChem
Trypsin-EDTA 5% (10X)	Gibco
Tween 20	Sigma-Aldrich
β -mercaptoethanol	Riedel de Haen

2.1.4 Σύσταση διαλυμάτων

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για την διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμασιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Διαλύματα	Σύσταση
Διάλυμα Bradford (1X)	Αραίωση του διαλύματος Bradford 5X σε dH₂O με στόχο την παραγωγή διαλύματος συγκέντρωσης 1X
Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer Solution)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος προστίθενται: 725mL dH₂O 250mL Διαλύματος Α εταιρίας Fuji 25mL Διαλύματος Β εταιρίας Fuji ➤ Αποθήκευση σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.
Διάλυμα Blocking 10% (w/v) για ανοσοαποτύπωση κατά Western	Περιέχονται 10% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα σε TBST 1X.
Διάλυμα λύσης κυττάρων/ιστών (Lysis Buffer)	20 mM Tris pH 7.5 0,5% (v/v) Triton X-100 250 mM NaCl 3 mM EDTA - Πριν τη χρήση του προστίθενται 10μg/ml DTT, 1 mM PMSF και διάλυμα Protease Inhibitors στην απαιτούμενη συγκέντρωση ➤ Αποθήκευση στους 4°C.
Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer Solution)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος προστίθενται: 750mL dH₂O 225mL Διαλύματος Α εταιρίας Fuji 25mL Διαλύματος Β εταιρίας Fuji ➤ Αποθήκευση σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα PBST (1X)	Περιέχονται (σε dH ₂ O): 10 % (v/v) PBS 10X 0,1% (v/v) Tween 20 ➤ Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS (10X)	- Περιέχονται 200mM Tris base και 1,5 M NaCl. - Ρύθμιση του pH (7,4-7,6) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. ➤ Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα TBST (1X)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος (σε dH ₂ O) προστίθενται: 10 % (v/v) TBS 10X 0,06% (v/v) Tween 20 ➤ Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) (1X)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος (σε dH ₂ O) προστίθενται: 20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Running Buffer 10X (0,25 M Tris base, 1,918 M Glycine) 0,05% (v/v) SDS ➤ Αποθήκευση στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (10X)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος (σε dH ₂ O) προστίθενται: 1,918 M Glycine 0,25 M Tris base ➤ Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (1X)	Για την παρασκευή 1L διαλύματος (σε dH ₂ O) προστίθενται: • 10% (v/v) Running Buffer 10X • 0,1% (v/v) SDS ➤ Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
--	--

2.1.5 Αντισώματα

Τα αντισώματα (πρωτογενή και δευτερογενή) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western εμφανίζονται στον Πίνακα 5 και Πίνακα 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Τα πρωτογενή αντισώματα έναντι πρωτεϊνών-στόχων.

Πρωτογενή αντισώματα έναντι	Εταιρεία	Συγκέντρωση (v/v)	Μοριακό Βάρος (kDa)	Πηγή
Cytochrome c oxidase IV isoform (COXIV)	Proteintech	1/500, 1/5000	17	Rabbit
Estrogen receptor alpha (ERα)	ProteinTech	1/500, 1/1000	66	Rabbit
Estrogen receptor beta (ERβ)	ELK	1/500	50	Rabbit
Glucocorticoid receptor (GR) (F10)	Santa Cruz	1/20	95	Mouse
Glucocorticoid receptor (GR) (G5)	Santa Cruz	1/50	95	Mouse
Glucocorticoid receptor (GR) (H300)	Santa Cruz	1/500	95	Rabbit
Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (PPARα) (H-2, sc-398394)	Santa Cruz	1/1000	55	Mouse
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) (4A8, sc-517380)	Santa Cruz	1/250	110	Mouse
Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) (sc-32879)	Santa Cruz	1/1000	67	Rabbit
Succinate dehydrogenase (SDH)	Invitrogen	1/5000	70	Mouse
β-actin	Proteintech	1/1000	42	Mouse

Πίνακας 6: Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Δευτερογενή αντισώματα έναντι	Εταιρεία	Συγκέντρωση (v/v)
Mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies	1/50000
Rabbit IgG-HRP	Pierce Antibodies	1/50000
Mouse IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/500
Rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/500

2.1.6 Κυτταρικές σειρές

❖ C2C12

Η κυτταρική σειρά C2C12 αποτελεί έναν υποκλώνο μυοβλαστών που προήλθαν από φυσιολογικούς ενήλικους μυς ποδιών ποντικίου. Ειδικότερα, η αρχική κυτταρική σειρά C2 προήλθε από τους Yaffe και Saxel στο Ινστιτούτο Επιστημών Weizmann το 1977, όπου δημιουργήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες από το μηριαίο μυ ποντικών ηλικίας 2 μηνών (Yaffe *et al.* 1977). Τα κύτταρα C2C12 έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και να διαφοροποιούνται γρήγορα σε μυοσωλήνες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, σχηματίζοντας συσταλτές μυϊκές ίνες ενώ παράλληλα εκφράζουν και μυϊκές πρωτεΐνες. Ακόμη, τα κύτταρα C2C12 αποτελούν ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και των οστεοβλαστών καθώς και των μοριακών και βιοχημικών μονοπατιών που πραγματοποιούνται κατά την μυϊκή ατροφία και την μυογένεση (Li *et al.* 2023, Otsuka *et al.* 2003).

2.1.7 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των μυϊκών κυττάρων C2C12 παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν την ανάπτυξη των κυττάρων C2C12.

Θρεπτικά μέσα	Σύσταση
Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5g/L) with phenol red (DMEM) 1X 	Περιέχονται: • 4,5 gr/L D-Glucose • L-glutamine • Phenol Red • 110 mg/ml Sodium Pyruvate. ❖ Προστίθενται 10% v/v FBS (Fetal Bovine Serum), 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S (Penicillin/Streptomycin) ➤ Αποθήκευση στους 4°C.
 Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5g/L) without phenol red (DMEM) 1X	Περιέχονται: • 4,5 gr/L D-Glucose • L-glutamine • 25mM HEPES ❖ Προστίθενται 10% v/v cs-FBS (Charcoal-stripped FBS), 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S (Penicillin/Streptomycin). ➤ Αποθήκευση στους 4°C.

2.1.8 Πειραματικά μοντέλα κόνικλων

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί λευκοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας που εγκλιματίστηκαν στη μονάδα εργαστηριακών ζώων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48ωρών πραγματοποιήθηκαν διάφορες χειρουργικές επεμβάσεις με στόχο την πρόκληση ουραιμικών μοντέλων μέσω μερικής νεφρεκτομής όπου τα πειραματόζωα βρίσκονται στα αρχικά στάδια της προ-διάλυσης της χρόνιας νεφρικής νόσου. Οι χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με απόφαση έγκρισης του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (αρ. πρωτ. 16/7/20-04-2023). Εν συντομία, πραγματοποιήθηκε τομή 4cm στα πλευρά των ζώων και στην συνέχεια τα 3/4 του δεξιού νεφρικού φλοιού τους καταστράφηκαν μέσω ηλεκτροκαυτηρίασης. Ειδικότερα η ηλεκτροκαυτηρίαση πραγματοποιήθηκε για 1s σε σημεία του φλοιού που απείχαν μεταξύ τους 1mm. Έπειτα από 2 εβδομάδες που παρατηρήθηκε αντισταθμιστική

υπερτροφία του αριστερού νεφρού, το δεξί νεφρό αφαιρέθηκε μέσω χειρουργικής επέμβασης (Gotloib *et al.* 1982). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν και κόνικλοι ως control group, οι οποίοι υπέστησαν εικονική χειρουργική επέμβαση (sham operation) χωρίς να προκληθεί νεφρική νόσος (δείγματα αναφοράς). Δώδεκα εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, έγινε ευθανασία των ζώων με έγχυση διαλύματος πεντοβαρβιτάλης. Ακολούθησε λήψη γαστροκνήμιου μυϊκού ιστού από κάθε ζώο και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C (Poulianiti *et al.* 2019).

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων

Η καλλιέργεια των μυϊκών κυττάρων C2C12, πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5 gr/L D-Glucose) με phenol red, το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% v/v FBS, 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S. Ακόμη, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων όπου προστέθηκε δεξαμεθαζόνη (DEX), στα μυϊκά κύτταρα σε καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες και συγκεκριμένα το DMEM χωρίς phenol red στο οποίο είχε προστεθεί 10% v/v cis-FBS (charcoal inactivated FBS), 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S. Ειδικότερα για την προετοιμασία του cis-FBS, το FBS υποβάλλεται σε κατεργασία με διάλυμα ενεργού άνθρακα με αποτέλεσμα να δεσμεύει μικρά μη πολικά μόρια όπως είναι οι ορμόνες και έτσι είναι δυνατή η μελέτη της επίδρασης μόνο της δεξαμεθαζόνης σε συνθήκες κυτταρικής γήρανσης. Τέλος τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 .

2.2.2 Θρυψινοποίηση

Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο και συγκεκριμένα μια πρωτεάση σερίνης που διασπά τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην σύνδεση μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας της καλλιέργειας. Η χρήση της είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις κορεσμού της φλάσκας με κύτταρα σε ποσοστό 80-90%. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από την φλάσκα καλλιέργειας των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, προστίθεται η θρυψίνη στην φλάσκα και ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το ένζυμο για 1-2min σε συγκεκριμένες συνθήκες (37°C και 5% CO_2). Στην συνέχεια, πραγματοποιείται παρατήρηση των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και εφόσον έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας, ακολουθεί η απενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου με την προσθήκη θρεπτικού μέσου DMEM σε ποσότητα 4X του όγκου της θρυψίνης που είχε αρχικά προστεθεί. Έπειτα διεξάγεται ανάδευση και μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε βαθμονομημένο σωληνάριο τύπου falcon, όπου πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5min σε 1000rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό υλικό. Επόμενο βήμα αποτελεί η επανακαλλιέργεια των κυττάρων σε φλάσκα ή η επίστρωσή τους σε πιάτα καλλιέργειας.

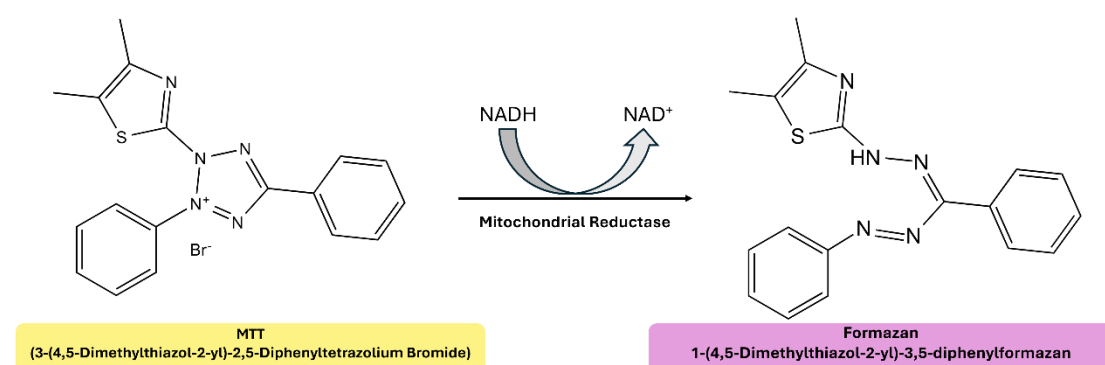
2.2.3 Επίστρωση και μέτρηση κυττάρων

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της θρυψινοποίησης, ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια της πλάκας Neubauer. Ειδικότερα, μετά την επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, μεταφέρονται 10μl κάτω από την καλυπτρίδα στην πλάκα Neubauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων

σε κάθε τεταρτημόριο στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Έπειτα υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των διαθέσιμων κυττάρων που υπάρχουν στην φλάσκα ανά ml και με βάση τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που θα επιστρωθούν σε πιάτα καλλιέργειας, μεταφέρεται ο επιθυμητός όγκος αυτών των κυττάρων σε νέο falcon, το οποίο περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM. Στην συνέχεια πραγματοποιείται ισοκατανομή του διαλύματος από το νέο falcon σε κάθε well από τα πιάτα καλλιέργειας. Τέλος, μετά από μια ήπια ανάδευση, διεξάγεται ανάπτυξη των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.2.4 Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω της μεθόδου MTT

Η δοκιμασία MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος μέσω της οποίας είναι δυνατή η μέτρηση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά παράλληλα μετριέται και η τοξικότητα διάφορων ουσιών που προστίθενται στα κύτταρα. Ειδικότερα, η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αναγωγή της κίτρινης χρωστικής 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης, μία αντίδραση που πραγματοποιείται από μιτοχονδριακές NAD(P)H εξαρτώμενες αφυδρογονάσες μόνο σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Mosmann et al. 1983).

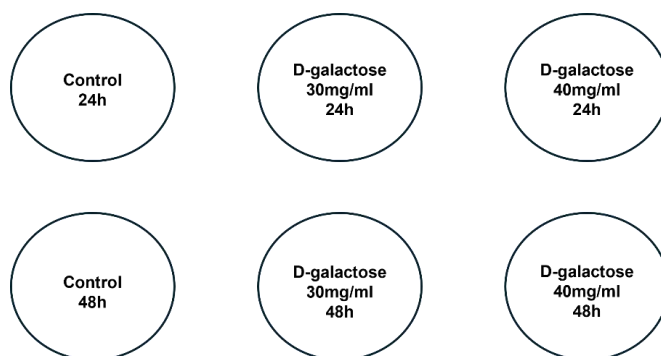


Εικόνα 14: Η αντίδραση αναγωγής της κίτρινης χρωστικής 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης.

Συγκεκριμένα, σε 96-well plates, επιστρώθηκαν 3.000 C2C12 κύτταρα/well και ακολούθησε επώαση τους για 24h σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM high glucose with phenol red σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με D-galactose (διάλυση σε DMEM) σε συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 60mg/ml 24h και 48h. Στη συνέχεια, προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT σε συγκέντρωση 0,5mg/ml για 3 ώρες και αφού δημιουργήθηκαν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι τελευταίοι διαλυτοποιήθηκαν με την προσθήκη 200μL ισοπροπανόλης (οργανικός διαλύτης). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση και ανάδευση του plate στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45min και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης στα 570nm. Επίσης, μετρήθηκε και η απορρόφηση στα 690nm, ώστε να γίνει κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς το background, δηλαδή το μη ειδικό σήμα. Να αναφερθεί πως πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις από κάθε πειραματική συνθήκη και στο τέλος διεξήχθη στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος StatPlus.

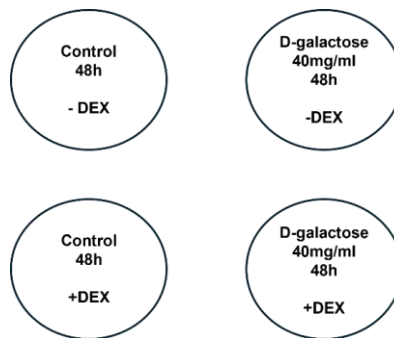
2.2.5 Επαγωγή γήρανσης σε κύτταρα C2C12 και μελέτη επίδρασης δεξαμεθαζόνης

Κύριος στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση πιθανών μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και μοριακών στόχων τους καθώς και μορίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης. Επομένως, σε πιάτα καλλιέργειας (60x15mm), επιστρώθηκαν κύτταρα C2C12 και συγκεκριμένα 200.000 cells/plate παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM με phenol red υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5g/L), το οποίο περιείχε 10% v/v FBS, 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂ για 48 ώρες και στην συνέχεια για την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης προστέθηκε D-γαλακτόζη (D-galactose) σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24h και 48h. Να τονιστεί πως η D-galactose είναι διαλυμένη στο ίδιο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM με phenol red υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5g/L). Άρα, υπήρχαν και άλλες δύο συνθήκες μάρτυρες (controls), στις οποίες τα κύτταρα επωάζονται μόνο με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM για 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα.



Εικόνα 15: Οι συνθήκες του πειράματος με σκοπό την διερεύνηση των μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών καθώς και μορίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, κατά την επαγωγή γήρανσης, παρουσία D-galactose.

Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίδραση της δεξαμεθαζόνης παρουσία D-galactose. Επομένως πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων C2C12 (150.000 cells/plate) σε πιάτα καλλιέργειας (60x15mm), παρουσία θρεπτικού DMEM χωρίς phenol red υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5 g/L), το οποίο περιείχε 10% v/v cis-FBS, 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S. Μετά το πέρας των 48 ωρών ανάπτυξης των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο, ακολούθησε προσθήκη D-galactose στα κύτταρα για 48 ώρες και επώαση τους στους 37°C και 5% CO₂. Έπειτα προστέθηκε δεξαμεθαζόνη (DEX) για 48 ώρες σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁷ M, η οποία ήταν διαλυμένη σε αιθανόλη 100%. Στο συγκεκριμένο πείραμα, υπήρχαν 2 συνθήκες μάρτυρες (controls) όπου περιείχαν κύτταρα C2C12 σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς phenol red υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5 g/L) τόσο παρουσία όσο και απουσία δεξαμεθαζόνης (DEX).



Εικόνα 16: Οι συνθήκες του πειράματος με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της δεξαμεθαζόνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών καθώς και μορίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, κατά την επαγωγή γήρανσης C2C12 κυττάρων, παρουσία D-galactose.

2.2.6 Συλλογή κυττάρων

Μετά το πέρας της επώασης των κυττάρων με τις ουσίες, ακολουθεί η συλλογή τους μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται harvest. Συγκεκριμένα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό DMEM από τα πιάτα καλλιέργειας και έπειτα διεξάγονται 2 πλύσεις με PBS 1X στους 4°C. Κατά την διάρκεια των πλύσεων, με τη βοήθεια μίας πλαστικής ράβδου (scraper), αποκολλώνται τα κύτταρα από την επιφάνεια των plates και μεταφέρονται σε πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του περιεχομένου των erpendorfs για 5min στις 1.500 rpm στους 4°C. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80°C.

2.2.7 Λύση κυττάρων

Αρχικά, τα ιζήματα των κυττάρων μεταφέρονται από τους -80°C σε θερμοκρασία 4°C για 10-15min. Έπειτα, σε κάθε πειραματική συνθήκη προστίθεται Lysis Buffer, το οποίο πριν χρησιμοποιηθεί εμπλουτίζεται με 10μg/ml DTT, 1mM PMSF και με διάλυμα αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων στην κατάλληλη συγκέντρωση με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το διάλυμα λύσης για 30min στους 4°C. Στην συνέχεια, εκτός από χημική λύση, διεξάγεται με μηχανική λύση με την χρήση υπερήχων, οι οποίοι βελτιστοποιούν την διασπορά των συστατικών των δειγμάτων και συμβάλουν να μειωθεί το ιξώδες κάθε δείγματος μέσω της διάσπασης του DNA. Ειδικότερα, πραγματοποιούνται 5 κύκλοι έκθεσης των κυττάρων σε υπερήχους για 1sec, όπου κάθε κύκλος υπερήχου ξεκινά 35s μετά την ολοκλήρωση του προηγούμενου.

2.2.8 Λύση κυττάρων γαστρονήμιου μυϊκού ιστού κονίκλων

Οι χειρισμοί κονίκλων και η λήψη δειγμάτων έγινε από τους συνεργάτες μας Καθηγήτρια Χριστίνα Καρατζαφέρη και Αναπληρωτή Καθηγητή Γιώργο Σακκά, ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Ελήφθησαν 2 δείγματα από κονίκλους που έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση αλλά όχι καυτηριασμό νεφρών και 5 δείγματα από ουραιμικούς κονίκλους. Τα δείγματα ιστών, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C, μεταφέρονται στους 4°C για περίπου 30min. Έπειτα πραγματοποιείται τομή από κάθε ιστό με νυστέρι, μέτρηση του βάρους κάθε δείγματος και περαιτέρω τεμαχισμός αυτού σε μικρότερα κομμάτια. Ακολουθεί η λύση των δειγμάτων, κατά την οποία σε κάθε τομή

ιστού προστίθεται διάλυμα λύσης (Lysis Buffer), το οποίο συμπληρώνεται με 10μg/ml DTT, 1mM PMSF και με διάλυμα αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων στην κατάλληλη συγκέντρωση με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των δειγμάτων με το διάλυμα λύσης για 30min, υλοποιείται ομογενοποίηση των δειγμάτων, η οποία γίνεται σε 5 κύκλους των 100 up and down (ανοδικά και καθοδικά κινήσεις του εμβόλου του μηχανικού ομογενοποιητή), με παράλληλη περιστροφή αυτού με ταχύτητα περιστροφής 500 στροφές ανά λεπτό, όπου κάθε κύκλος απέχει από τον προηγούμενο 30s. Τέλος, τα δείγματα εκτίθενται και σε υπερήχους για 1sec και αυτή η έκθεση επαναλαμβάνεται για 4 κύκλους που διαφέρουν χρονικά μεταξύ τους 30s.

2.2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω μεθόδου Bradford

Μετά την λύση των δειγμάτων, ακολουθεί η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που έχει την ικανότητα να συνδέεται με πρωτεΐνες μετατοπίζοντας έτσι το φάσμα απορρόφησης της χρωστικής, μεταβάλλοντας το χρώμα της από καφέ σε μπλε. Ειδικότερα, πραγματοποιείται αραιώση του αντιδραστήριου Bradford 5X σε 1X και στην συνέχεια προστίθενται 1ml αντιδραστήριου Bradford 1X σε 1μL δείγματος (αραιώση 1/1000). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 15-20min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετριοούνται οι απορροφήσεις από κάθε δείγμα στα 595nm. Τέλος με βάση τις απορροφήσεις που λήφθηκαν, ήταν δυνατή η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλης BSA. Τέλος, μετά την ανάλυση των παραπάνω δεδομένων διεξάγεται προετοιμασία των δειγμάτων για να ακολουθήσει ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.2.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδιο κάτω υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Πριν ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 min και μεταφέρονται σε πήκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (stacking gel). Στην συνέχεια, εξαιτίας της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου (90V), οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το stacking gel σε πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (separating gel). Να σημειωθεί πως κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται Running Buffer 1X. Η σύσταση των stacking gel και separating gel παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Η σύσταση των πηκτωμάτων χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (stacking gel) και υψηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (separating gel).

Stacking gel	Separating gel
ddH ₂ O	ddH ₂ O
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
SDS 0,1% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Acr 4% (w/v)	Acr 10% (w/v)
APS 1% (w/v)	APS 1% (w/v)
TEMED 0,04% (v/v)	TEMED 0,04% (v/v)

2.2.11 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

❖ Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, πραγματοποιείται εξισορρόπηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer 1X. Στην συνέχεια, γίνεται η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά την οποία δημιουργείται μία δομή τύπου "sandwich" όπου η πηκτική πολυακρυλαμίδης και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εφάπτονται άμεσα και περικλείονται μεταξύ 2 σφουγγαριών και 4 διηθητικών χαρτιών τύπου Whatman. Τέλος, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και συγκεκριμένα 0,35A για 70min στους 4°C, που συμβάλλει στην ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών.

❖ Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων (Blocking)

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά, ακολουθεί το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση πρωτογενών αντισωμάτων. Έτσι, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται και αναδεύεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα Blocking, το οποίο περιέχει 10% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα διαλυμένο σε TBST 1X.

❖ Ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω ανοσοενζυμικής αντίδρασης

Μετά το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολουθεί επώαση και ανάδευση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι διαλυμένο σε 2% w/v άπαχο γάλα σε TBST 1X, για 1 overnight στους 4°C. Έπειτα, ακολουθούν 5 πλύσεις (διάρκειας 5min/πλύση) στην μεμβράνη με TBST 1X για την απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολουθεί, η επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (αραίωση 1/50000), το οποίο είναι διαλυμένο σε 2% άπαχο αποξηραμένο γάλα σε TBST 1X, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος του δευτερογενούς αντισώματος, ακολουθούν 3 πλύσεις (διάρκειας 5min/πλύση) με TBST 1X.

❖ Εμφάνιση του σήματος

Η ανίχνευση του σήματος στηρίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας καθώς το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP). Ειδικότερα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το υπόστρωμα του ενζύμου HRP, δηλαδή το ECL (ECL_A και ECL_B σε αναλογία 1:1) για 3min στο σκοτάδι. Έπειτα, πραγματοποιείται μεταφορά της μεμβράνης σε κασετίνα έκθεσης, στην οποία τοποθετούνται φωτοευαίσθητα X-ray φιλμ στο σκοτάδι (Dark Room). Για την εμφάνιση του σήματος, το φιλμ τοποθετείται αρχικά σε διάλυμα εμφάνισης του σήματος (Developer) και έπειτα σε διάλυμα μέσω του οποίου μονιμοποιείται το σήμα (Fixer).

2.2.12 Τεχνική Ανοσοκυτταροχημείας Φθορισμού

Η ανοσοκυτταροχημεία, είναι μια δοκιμασία όπου είναι δυνατή η παρατήρηση της υποκυτταρικής εντόπισης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων με την χρήση αντισωμάτων αλλά και η μελέτη μορφολογικών χαρακτηριστικών του κυττάρου. Συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν κύτταρα C2C12 σε coverslips (15.000/coverslip) και ακολούθησε επώασή τους σε πλήρες θρεπτικό DMEM high glucose with phenol red για 24h σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Έπειτα, προστέθηκε D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση των μιτοχονδρίων με την φθορίζουσα χρωστική

MitoTracker CMX-Ros (200nM) σε DMEM high glucose with phenol red για 30min σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Αφού διεξήχθη μια πλύση με PBS 1X, οι καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν αρχικά με την προσθήκη μεθανόλης για 10min στους -20°C και έπειτα με την προσθήκη ακετόνης για 1 min στους -20°C. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBS 1X και στις καλυπτρίδες προστέθηκαν διαλύματα με πρωτογενή αντισώματα έναντι GR-G5 (αραίωση 1/50), ERα (αραίωση 1/500) και ERβ (αραίωση 1/500) σε PBS 1X για 1h. Ακολουθεί 1 πλύση με PBS 1X και προστίθενται διαλύματα με δευτερογενή αντισώματα anti mouse συζευγμένο με Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500), anti rabbit-Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500) και φθορίζουσα χρωστική έναντι των πυρήνων-Hoescht 33342 σε συγκέντρωση 1 µg/ml για 1h στο σκοτάδι. Μετά από 1 πλύση με PBS 1X, οι καλυπτρίδες επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με την χρήση διαλύματος polyvinyl alcohol (PVA) και αποθηκεύονται στους 4°C. Έπειτα πραγματοποιήθηκε παρατήρηση και λήψη εικόνων στο συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss LSM 800 (αντικειμενικός φακός: 63X, σάρωση laser: 4X, bidirectional scanning, pinhole: 1Airy Unit-AU).

2.2.13 Κοπή διαδοχικών τομών γαστρονήμιου μυϊκού ιστού σε κρουτόμο

Τα δείγματα γαστροκνήμιου μυϊκού ιστού κονίκλων μεταφέρονται από τους -80°C σε κρουτόμο, ο οποίος είχε ρυθμιστεί στην θερμοκρασία των -20°C. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί λήψη ομοιόμορφων τομών, αρχικά κάθε δείγμα ιστού στερεώνεται πάνω σε ειδική κεφαλή του κρουτόμου με την χρήση υλικού OCT. Στην συνέχεια, αφού διεξαχθεί λείανση κάθε δείγματος ιστού, λαμβάνονται διαδοχικές τομές πάχους 6µm. Έπειτα, οι διαδοχικές τομές, μεταφέρονται σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες και αποθηκεύονται στους -20°C.

2.2.14 Τεχνική Ανοσοϊστοχημείας Φθορισμού

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια τεχνική κατά την οποία χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι πρωτεϊνών-στόχων και έτσι είναι δυνατή η ανίχνευση μορίων σε δείγματα ιστών και η πιθανή εντόπιση/μετατόπισή τους σε υποκυτταρικά διαμερίσματα. Ειδικότερα, τα δείγματα ιστών που βρίσκονται στις αντικειμενοφόρες πλάκες μονιμοποιούνται, αρχικά με την προσθήκη μεθανόλης για 10min στους -20°C και έπειτα προστίθεται ακετόνη για 5min πάλι στους -20°C. Ακολούθως πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με PBST 1X. Στην συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται με διάλυμα blocking για μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων, το οποίο περιέχει 15% v/v FBS σε PBST 1X, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού πραγματοποιηθούν 3 πλύσεις με PBST 1X, τα δείγματα επωάζονται με διαλύματα πρωτογενών αντισωμάτων έναντι του GR-G5 (αραίωση 1/50) και του GR-F10 (αραίωση 1/20) σε PBST 1X για 1h. Μετά το πέρας της 1h, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBST 1X και προστίθεται πρωτογενές αντίσωμα έναντι της COXIV (αραίωση 1/500) σε PBST 1X για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, διεξάγονται 2 πλύσεις με PBST 1X και προστίθεται διάλυμα που περιέχει τα δευτερογενή αντισώματα anti mouse-Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500), anti rabbit-Alexa Fluor 588 (αραίωση 1/200) και φθορίζουσα χρωστική Hoescht 33342 (1 µg/ml) για 1h στο σκοτάδι. Τέλος, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBST 1X και επιστροφή των αντικειμενοφόρων πλακών με διάλυμα PVA στους 4°C. Η λήψη εικόνων έγινε με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Zeiss LSM 800 (αντικειμενικός φακός: 40X, σάρωση laser: 4X, bidirectional scanning, pinhole: 1Airy Unit-AU).

2.2.15 Υπολογιστική και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω μεθόδου Bradford, η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων ανοσοαπύπωσης κατά Western Blot, η στατιστική ανάλυση t-test και οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας MTT διεξήχθησαν με την χρήση του Microsoft Office Excel. Για την ποσοτικοποίηση της έντασης και την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαπύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα ImageJ και Adobe Photoshop CS αντίστοιχα. Ακόμη, τα αποτελέσματα του πειράματος MTT αναλύθηκαν στατιστικά με One-Way Analysis of Variance-Tukey B (ANOVA) μέσω του προγράμματος StatPlus.

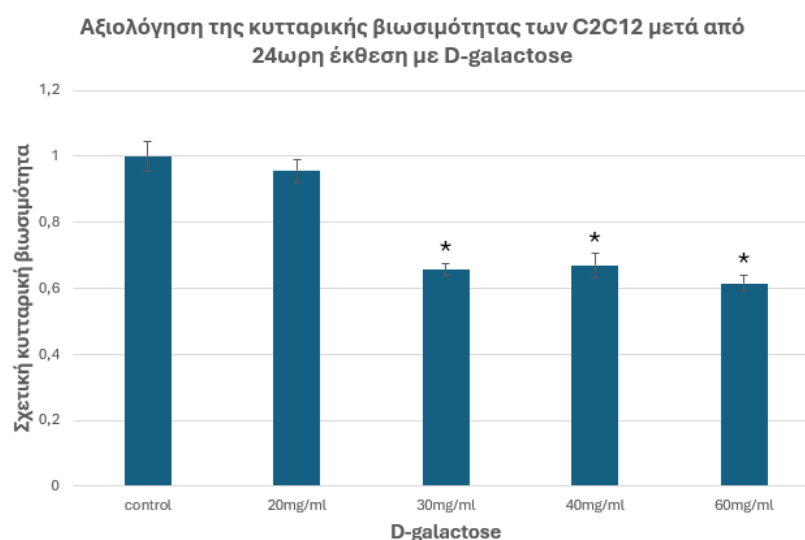
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΣΕ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12

3.1.1 Μελέτη της επίδρασης διαλυμάτων D-γαλακτόζης στην βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12.

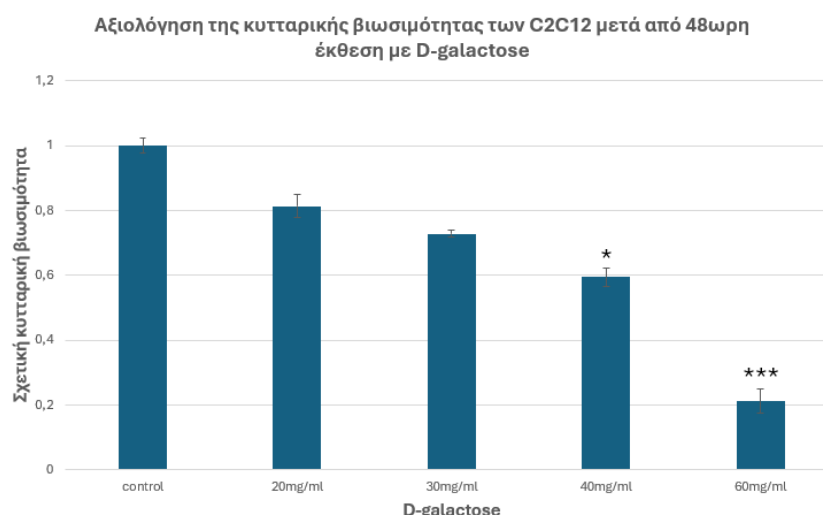
Αρχικά, στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης διαφορετικής συγκέντρωσης D-γαλακτόζης, στην κυτταρική βιωσιμότητα των C2C12, μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT. Ειδικότερα, επιστρώθηκαν 3.000 κύτταρα C2C12/well σε 96 well plate και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε DMEM high glucose με phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1 v/v % P/S και 1% v/v L-glutamine για 24h. Ακολούθησε, προσθήκη D-galactose σε συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 60mg/ml για 24h και 48h σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Αφού ολοκληρωθεί το εισοσιτετράωρο και το σαρανταοκτάωρο, προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT (0,5 mg/ml) και διεξήχθη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης με ισοπροπανόλη. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570nm και στα 690nm (background). Να τονιστεί πως η συνθήκη αναφοράς (control) περιείχε μόνο κύτταρα σε πλήρες θρεπτικό DMEM high glucose με phenol red.

Στο Διάγραμμα 1, παρουσιάζεται η κυτταρική βιωσιμότητα των C2C12 έπειτα από επώαση με D-galactose για 24h. Συγκεκριμένα, η D-galactose σε συγκέντρωση 20mg/ml προκάλεσε πολύ μικρή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 4%. Ακόμη, σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose προκλήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 30% ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση της D-galactose, στα 60mg/ml, παρατηρείται αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ποσοστό 40% σε σύγκριση με την συνθήκη αναφοράς (control).



Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των C2C12 μετά από 24ωρη έκθεση σε D-galactose. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα παρουσιάζεται ως η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία των διαλυμάτων D-galactose σε σύγκριση με τη κυτταρική βιωσιμότητα στην συνθήκη μάρτυρα (control), όπου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα στο διάγραμμα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ SD (n=5). * $p \leq 0.05$.

Στο Διάγραμμα 2, φαίνεται η επίδραση της επώασης των κυττάρων C2C12 με D-galactose για 48h. Ειδικότερα, φαίνεται να προκλήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 20% παρουσία διαλύματος D-galactose σε συγκέντρωση 20mg/ml σε σύγκριση με την συνθήκη control. Η D-galactose σε συγκέντρωση 30mg/ml προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας της τάξης του 30% όπως και στις 24h. Επίσης, η προσθήκη D-galactose σε συγκεντρώσεις 40mg/ml και 60mg/ml προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 40% και 80% αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control.



Διάγραμμα 2: Αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των C2C12 μετά από 48ωρη έκθεση σε D-galactose. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα παρουσιάζεται ως η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία των διαλυμάτων D-galactose σε σύγκριση με τη κυτταρική βιωσιμότητα στην συνθήκη μάρτυρα (control), όπου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα στο διάγραμμα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ SD (n=5). * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

3.1.2 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που εμπλέκονται στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, πυρηνικών υποδοχέων και μοριακών στόχων τους σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με D-γαλακτόζη παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης.

Επόμενος στόχος, αποτελούσε τόσο η μελέτη της επίδρασης της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με D-galactose, τόσο απουσία όσο και παρουσία της δεξαμεθαζόνης (DEX), που αποτελεί αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α (PPAR α), της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) και της υπομονάδας IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COXIV) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν 200.000 κύτταρα C2C12 ανά plate, σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM με phenol red υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5g/L) για 24h. Ακολούθησε προσθήκη D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h. Στις συνθήκες control, στα κύτταρα προστέθηκε μόνο DMEM high glucose με phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S.

Ακόμη για τη μελέτη της επίδρασης της DEX, επιστρώθηκαν 150.000 κύτταρα C2C12 ανά plate, σε θρεπτικό υλικό DMEM high glucose χωρίς phenol red, παρουσία FBS από το οποίο είχαν αφαιρεθεί ορμόνες και αναπτυξιακοί παράγοντες, με κατάλληλη κατεργασία, προκαλώντας έτσι συνθήκη ανάπτυξης των κυττάρων απουσία ορμόνης και έλλειψης θρεπτικών συστατικών (starvation). Ακολούθησε επώαση για 24h. Έπειτα προστέθηκε D-galactose 40mg/ml για 48h. Έπειτα προστέθηκε δεξαμεθαζόνη (DEX) για 48 ώρες σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M. Να τονιστεί πως στις συνθήκες control, επώαστηκαν τα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο DMEM high glucose χωρίς phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v cis-FBS, 1% v/v L-glutamine και 1% v/v P/S.

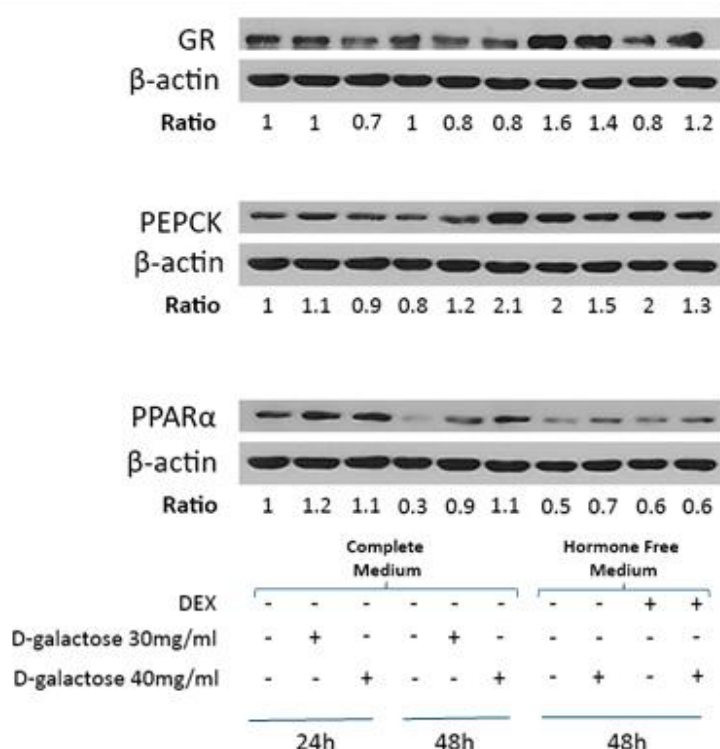
Στην Εικόνα 17, παρουσιάζεται η επίδραση της D-galactose στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), καθώς και μορίων στόχων του, όπως του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων α (PPAR α) και της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), έπειτα από επώαση της με τα κύτταρα C2C12 για 24h και 48h απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης.

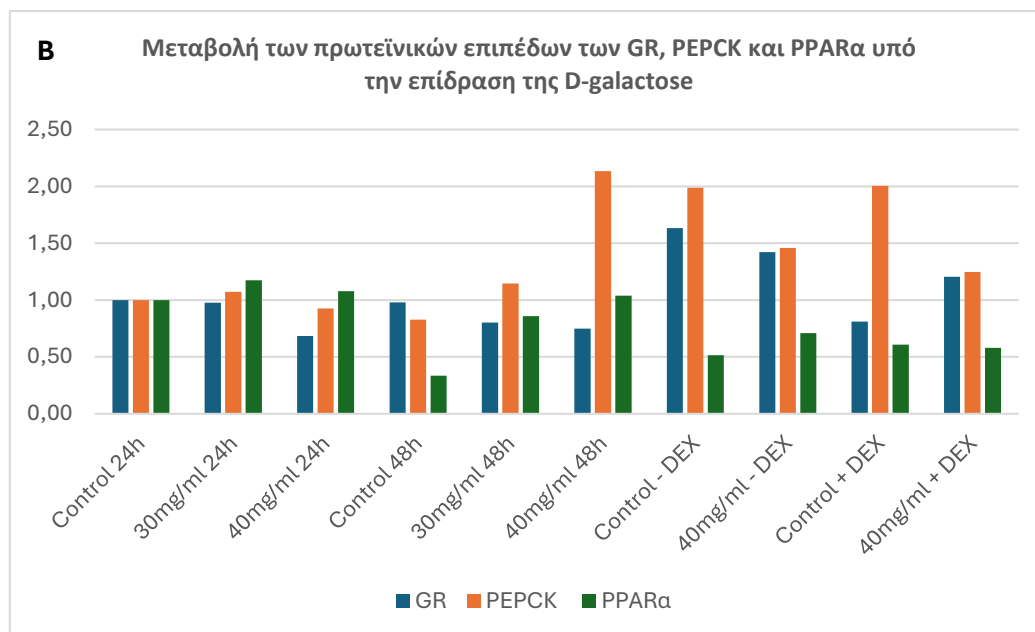
Ειδικότερα, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, σε συνθήκες γήρανσης κατά 30% έπειτα από επώαση με D-galactose σε συγκέντρωση 40 mg/ml για 24h. Όμοιες μεταβολές (μείωση κατά 20%) επιτυγχάνονται παρουσία τόσο 30mg/ml όσο και 40mg/ml D-galactose για 48h σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Ακόμη, σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών υλικών φαίνεται μία αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά 60%, η οποία μερικώς αιρείται με την προσθήκη D-galactose καθώς υπάρχει αύξηση μόνο κατά 40% σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Κατά την προσθήκη DEX, στεροειδής ορμόνη που ενεργοποιεί τον GR και δρα ως αντιφλεγμονώδες, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά 20% ενώ η συνύπαρξη της D-galactose και της DEX αναιρεί μερικώς αυτήν την δράση καθώς παρατηρείται μια μικρή αύξηση κατά 20% σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h και 50% σε σχέση με τη συνθήκη παρουσία DEX.

Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταβολή τους παρουσία D-galactose στις 24h. Σε αντίθεση, κατά την επώαση 48 h με D-galactose παρατηρείται αύξηση κατά 1.2 και 2.1 φορές σε συγκεντρώσεις 30 mg/ml και 40mg/ml σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Σε συνθήκες έλλειψης ορμονών, τόσο απουσία όσο και παρουσία DEX παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK κατά 2 φορές, σχέση με τη συνθήκη αναφοράς σε πλήρες μέσο ανάπτυξης. Η προσθήκη D-galactose αυξάνει μερικώς τα επίπεδα της PEPCK κατά 50% σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h, ενώ μειώνει τα επίπεδα από λόγο 2 σε 1.5, σε σύγκριση με τη συνθήκη αναφοράς ανάπτυξης των κυττάρων απουσία ορμόνης. Η συνύπαρξη DEX και D-galactose μειώνει κατά περίπου 15% ακόμα περισσότερο τα επίπεδα PEPCK (από λόγο 1.5 σε λόγο 1.3).

Όσο αναφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα), αυτά αυξάνονται κατά 20% και 10% μετά από επώαση με 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose για 24h αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control των 24h. Αντίστοιχη αύξηση (σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς) παρατηρείται και κατά την επώαση των κυττάρων με 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose για 48h. Επιπλέον, σε συνθήκες θρεπτικού υλικού, στο οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες παρατηρούμε μια μείωση των επιπέδων του PPARα κατά 50%, ενώ η προσθήκη της D-galactose αναιρεί μερικώς αυτή την μείωση καθώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα μειώνονται μόνο κατά 30%. Η προσθήκη DEX προκαλεί αύξηση κατά 20% των επιπέδων PPARα σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (48h επώαση σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών και D-galactose), (μεταβολή λόγου από 0,5 σε 0,6), ενώ αναστέλλει την αύξηση των επιπέδων του PPARα λόγω της γήρανσης καθώς ο συνδυασμός της με D-galactose φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του PPARα κατά περίπου 20% σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (48h επώαση σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών και D-galactose) και να τα μειώνει κατά 40% σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h.

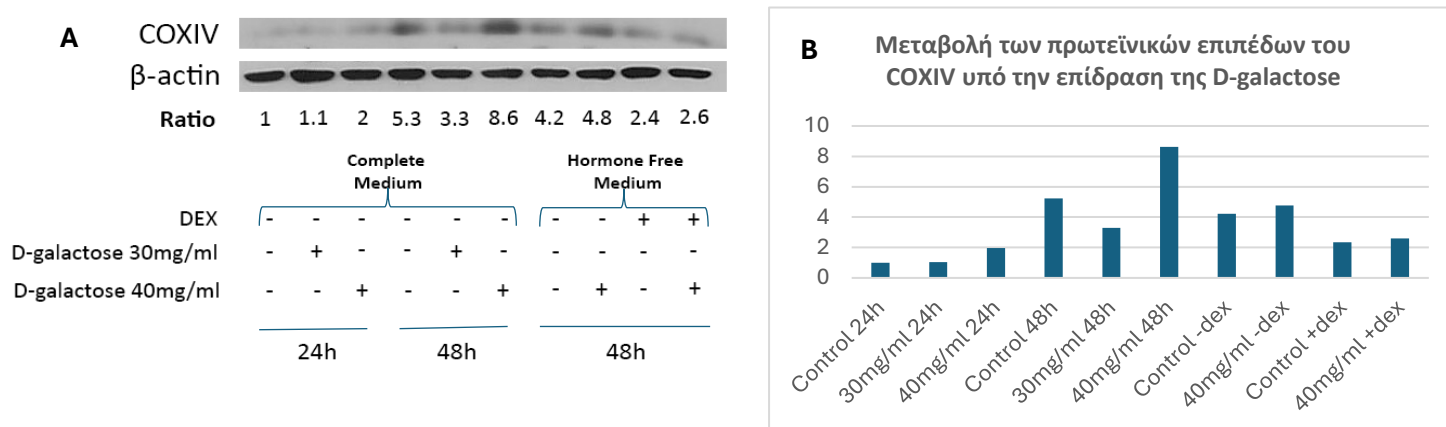
A





Εικόνα 17: Διερεύνηση και διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) και του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα) σε μυϊκά κύτταρα C2C12 ύστερα από επώαση με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30 mg/ml και 40 mg/ml για 24h και 48h, απουσία και παρουσία DEX (10^{-7} M) για 48h. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του υπό μελέτη μορίου ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη control 24h.

Στην Εικόνα 18, παρουσιάζεται η επίδραση της D-galactose στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας IV του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COXIV). Η επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης με την προσθήκη D-galactose 30 mg/ml για 24h, οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV κατά 10% ενώ παρουσία D-galactose 40 mg/ml παρατηρούνται υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα της COXIV κατά 2 φορές σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Όσο αναφορά την επίδραση της D-galactose μετά από 48h, παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV τόσο στην συνθήκη control 48h όσο και παρουσία D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml κατά 5.3, 3.3 και 8.6 φορές σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Όμοια με την συνθήκη επώασης 24 h, 40 mg/ml D-galactose προκαλούν αύξηση κατά περίπου 1.5-2 φορές των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (control 48 h). Σε συνθήκες θρεπτικού μέσου, στο οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της COXIV κατά 4.2 φορές, η οποία ενισχύεται παρουσία D-galactose καθώς καταγράφεται αύξηση κατά 4.8 φορές σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h. Η προσθήκη DEX αναιρεί μερικώς την αύξηση της COXIV, καθώς τόσο απουσία όσο και παρουσία D-galactose αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της COXIV κατά 2.4 και 2.6 φορές αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control 24h και προκαλεί μείωση κατά περίπου 40% σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (control 48h σε θρεπτικό μέσο που απουσιάζουν οι ορμόνες).



Εικόνα 18: Διερεύνηση και διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COXIV) σε μυϊκά κύτταρα C2C12 ύστερα από επώαση με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30 mg/ml και 40 mg/ml για 24h και 48h απουσία και παρουσία DEX (10⁻⁷M) για 48h. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών της COXIV ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη control 24h.

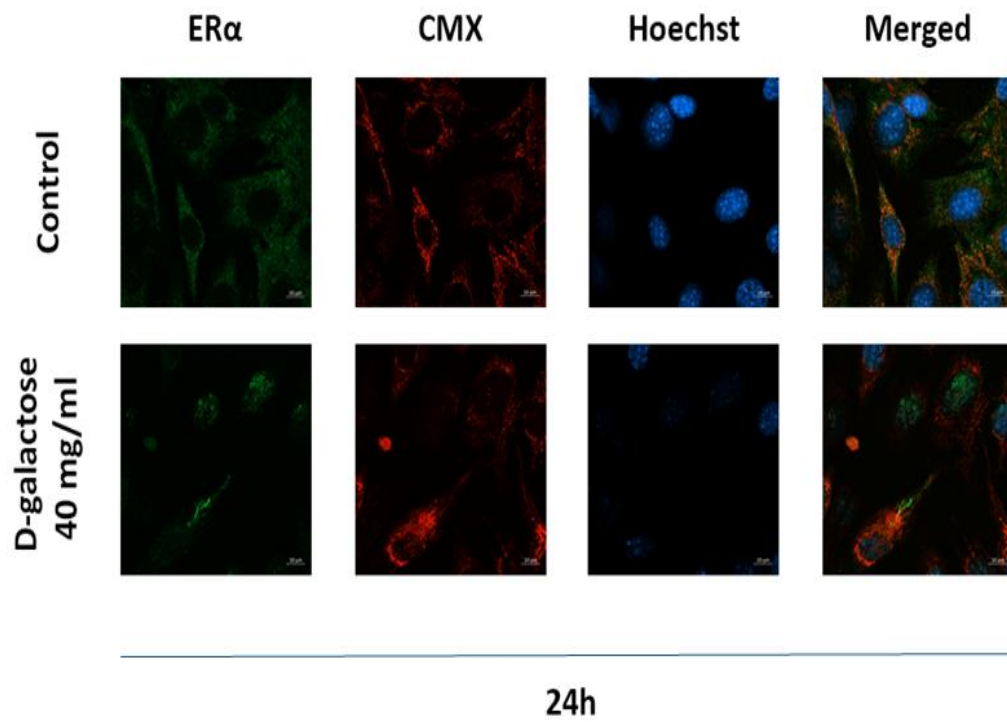
3.1.3 Διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης μέσω ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού.

Στην συνέχεια, εξετάστηκε, μέσω ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού, η πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERβ) σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης.

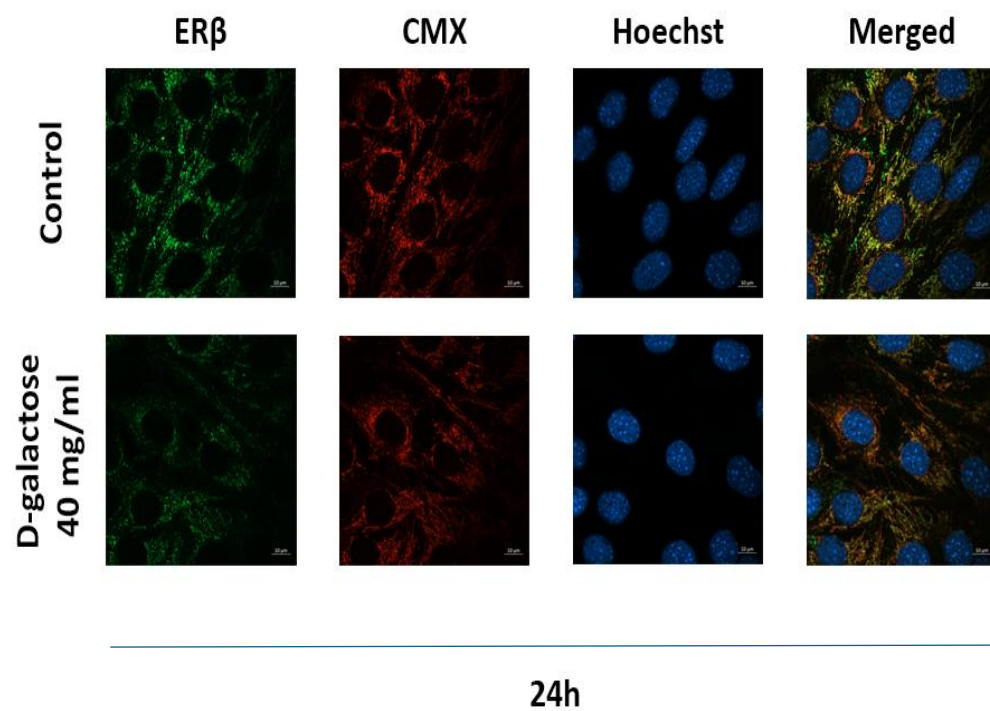
Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε επίστρωση και επώαση κυτάρων C2C12 σε coverslips (15.000/coverslip) για 24h. Ακολούθως, προστέθηκε D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h. Επόμενο βήμα ήταν η σήμανση των μιτοχονδρίων με την χρωστική MitoTracker CMX-Ros (200nM) για 30min και έπειτα διεξήχθη μονιμοποίηση των κυττάρων με μεθανόλη και ακετόνη για 10min και 1min αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλυμάτων με πρωτογενή αντισώματα έναντι GR-G5 (αραίωση 1/50), ERα (αραίωση 1/500) και ERβ (αραίωση 1/500) για 1h και στην συνέχεια οι καλυπτρίδες-κύτταρα επωάζονται με δευτερογενή αντισώματα anti mouse συζευγμένο με Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500), anti rabbit-Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500) και φθορίζουσα χρωστική Hoescht 33342 (1 μg/ml) για 1h σε σκοτάδι. Τέλος πραγματοποιήθηκε λήψη εικόνων με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου.

Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται η επίδραση της D-galactose στην υποκυτταρική μετατόπιση των υποδοχέων στεροειδών ορμονών έπειτα από επώαση των κυττάρων C2C12 με D-galactose 40mg/ml για 24h. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως στην συνθήκη control, ο υποδοχέας ERα παρουσιάζει κυρίως μιτοχονδριακή εντόπιση ενώ παρουσία D-galactose φαίνεται να ενεργοποιείται η μετακίνηση του προς τον πυρήνα του κυττάρου. Όσο αναφορά τον υποδοχέα ERβ, τόσο στην συνθήκη control, όσο και παρουσία D-galactose εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Βέβαια, να τονιστεί πως σε συνθήκες κυτταρικής γήρανσης παρατηρείται μειωμένη ένταση της φθορίζουσας Alexa Fluor 488, η οποία συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του ERβ, σε σύγκριση με την συνθήκη control. Επομένως, κατά την επαγωγή γήρανσης πιθανόν να μειώνονται τα επίπεδα ERβ. Σχετικά, με τον υποδοχέα GR, φαίνεται πως στην συνθήκη control, παρουσιάζει τόσο πυρηνική αλλά και κυτταροπλασματική εντόπιση. Όμως, παρουσία D-galactose φαίνεται να ενισχύεται η πυρηνική εντόπιση του GR.

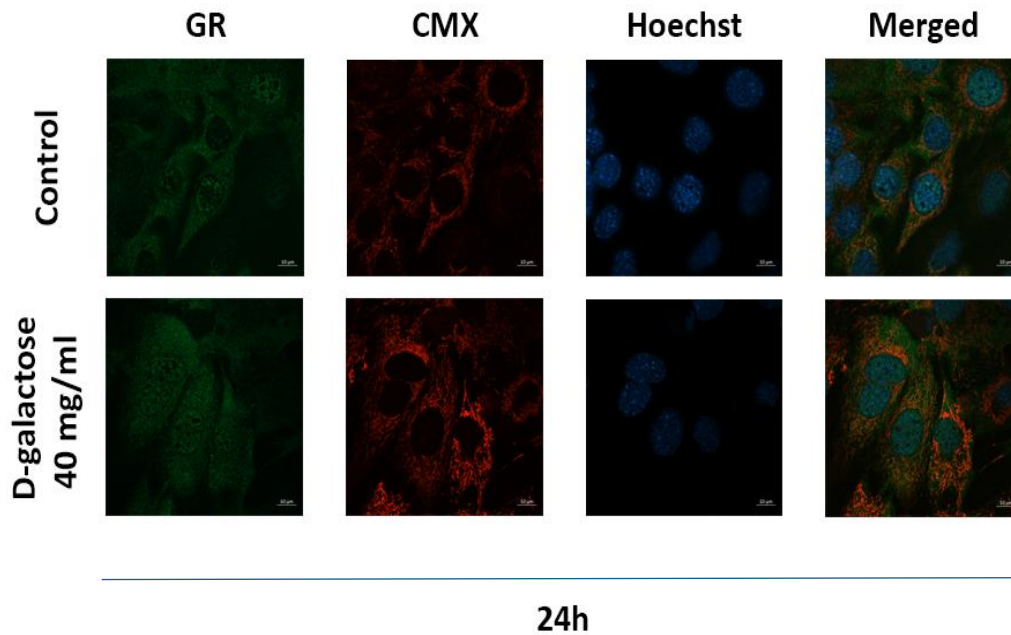
A



B

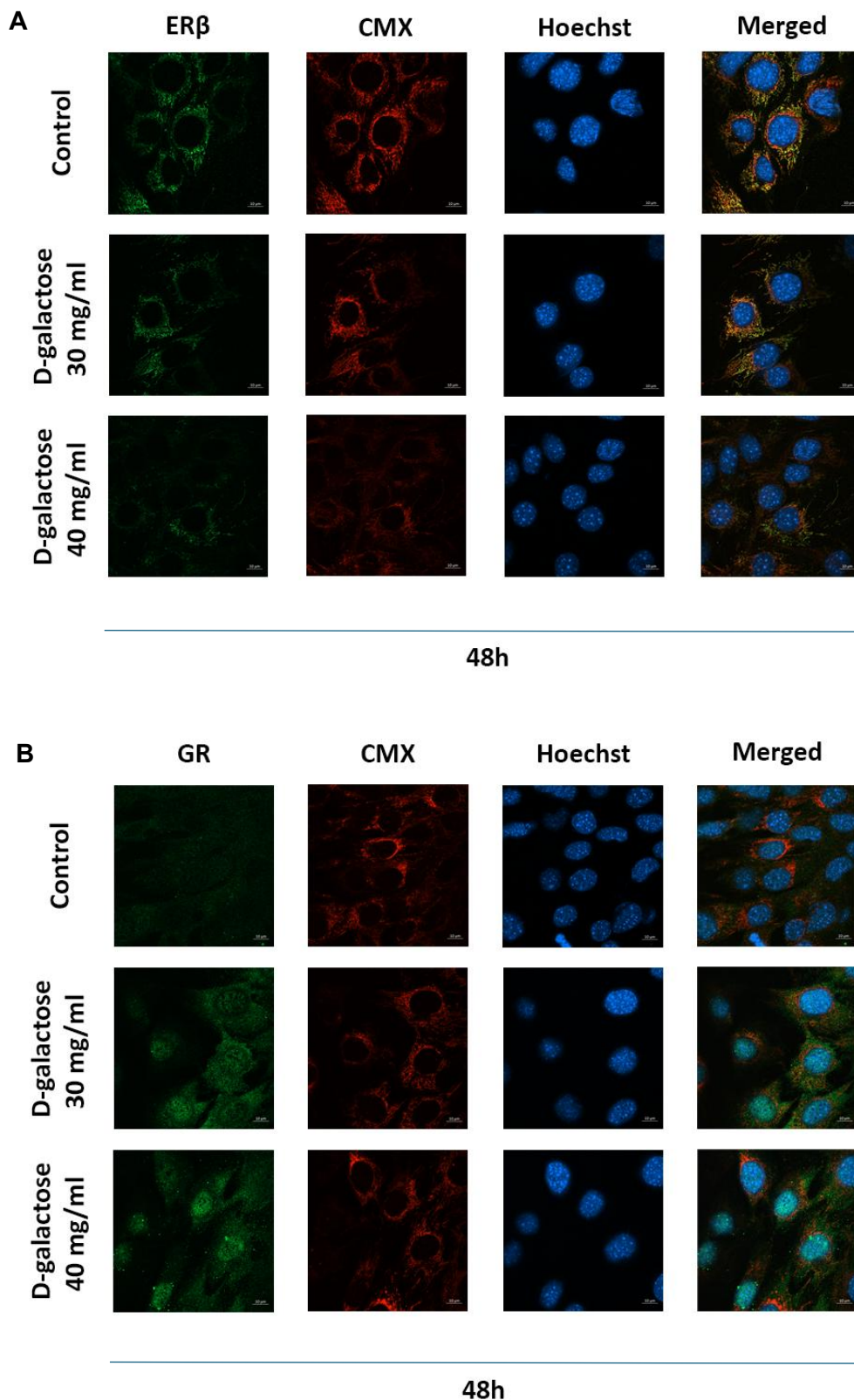


C



Εικόνα 19: Επίδραση της από D-galactose επαγόμενης γήρανσης στην υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα οιστρογόνων α -ER α (A), του υποδοχέα οιστρογόνων β -ER β (B) και του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-GR (C). Τα C2C12 κύτταρα επωάστηκαν με 40 mg/ml D-galactose για 24h. Αντιπροσωπευτικές εικόνες, που λήφθηκαν με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, των φθορίζουσων χρωστικών Alexa Fluor 488 (συνδέονται με τα πρωτογενή αντισώματα των υπό μελέτη υποδοχέων), της CMX (φθορίζουσα χρωστική των μιτοχονδρίων) και της Hoechst 33342 (φθορίζουσα χρωστική για σήμανση των πυρήνων).

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται η υποκυτταρική εντόπιση των υποδοχέων ER β και GR σε συνθήκες κυτταρικής γήρανσης όπου προστέθηκε D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml για 48h στα κύτταρα C2C12. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας ER β φαίνεται να παρουσιάζει μιτοχονδριακή εντόπιση σε συνθήκες control αλλά και κυτταρικής γήρανσης. Ακόμη, όπως και στις 24h, παρατηρείται μια προοδευτική εξασθένηση του σήματος του ER β , παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης της D-galactose. Ο υποδοχέας GR παρουσιάζει τόσο πυρηνική όσο και κυταροπλασματική εντόπιση στην συνθήκη control, όπως και στις 24h. Παρουσία D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, παρατηρείται μια έντονη μετατόπιση του GR κυρίως προς τον πυρήνα του κυττάρου.



Εικόνα 20: Επίδραση της D-galactose στην υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα οιστρογόνων β -ER β (A) και του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-GR (B) έπειτα από επώαση των μυϊκών κυττάρων C2C12, με D-galactose 30 mg/ml και 40 mg/ml για 48h. Αντιπροσωπευτικές εικόνες, που λήφθηκαν με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, των φθορίζουσων χρωστικών Alexa Fluor 488 (σύνδεση με τα πρωτογενή αντισώματα των υπό μελέτη υποδοχέων), της CMX (φθορίζουσα χρωστική των μιτοχονδρίων) και της Hoechst 33342 (φθορίζουσα χρωστική των πυρήνων).

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΟΥΡΑΙΜΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΟΝΙΚΛΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ

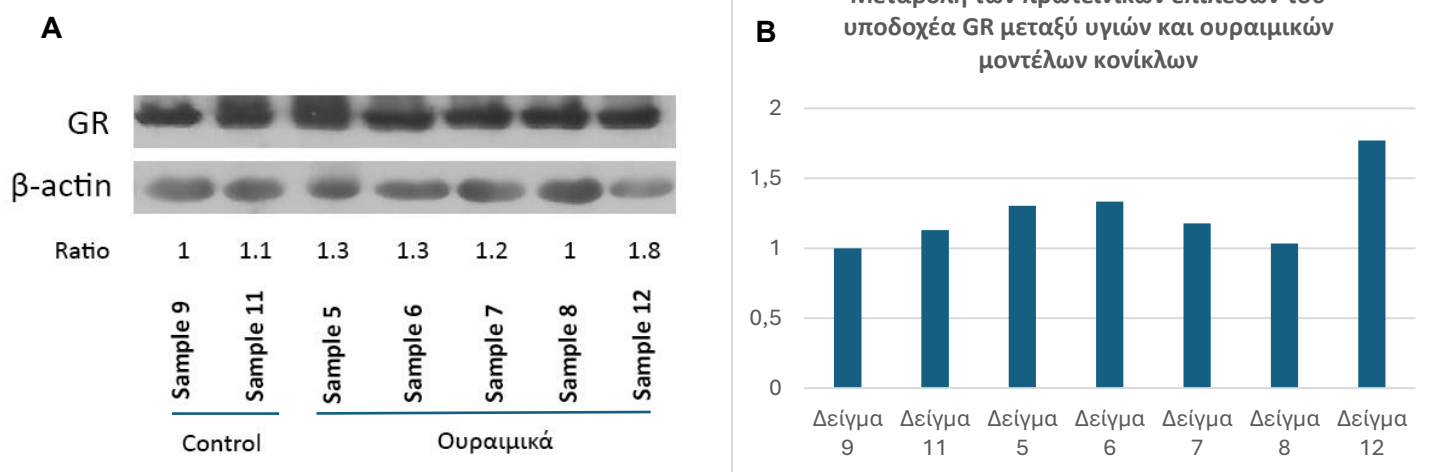
3.2.1 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

3.2.1.1 Διερεύνηση των μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα πυρηνικών υποδοχέων μεταξύ ουραιμικών δειγμάτων και δειγμάτων αναφοράς μυϊκού γαστρονήμιου κονίκλων.

Η δεύτερη κύρια ενότητα της συγκριμένης έρευνας αποτελούσε η μελέτη της έκφρασης των πυρηνικών υποδοχέων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και διατάραξης ενεργειακού μεταβολισμού, λόγω της πρόκλησης ουραιμικής μυοπάθειας, σε πειραματικά μοντέλα κονίκλων με χρόνια νεφρική νόσο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε δείγματα μυϊκού ιστού που προερχόταν από 2 ομάδες κονίκλων (control, ουραιμικά), ανιχνεύοντας έτσι τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα οιστρογόνων α (ER α) και υποδοχέα που ενεργοποιείται από πλασματογενή υπεροξειδωμάτων α (PPAR α) οποίοι ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας και μυϊκής ατροφίας.

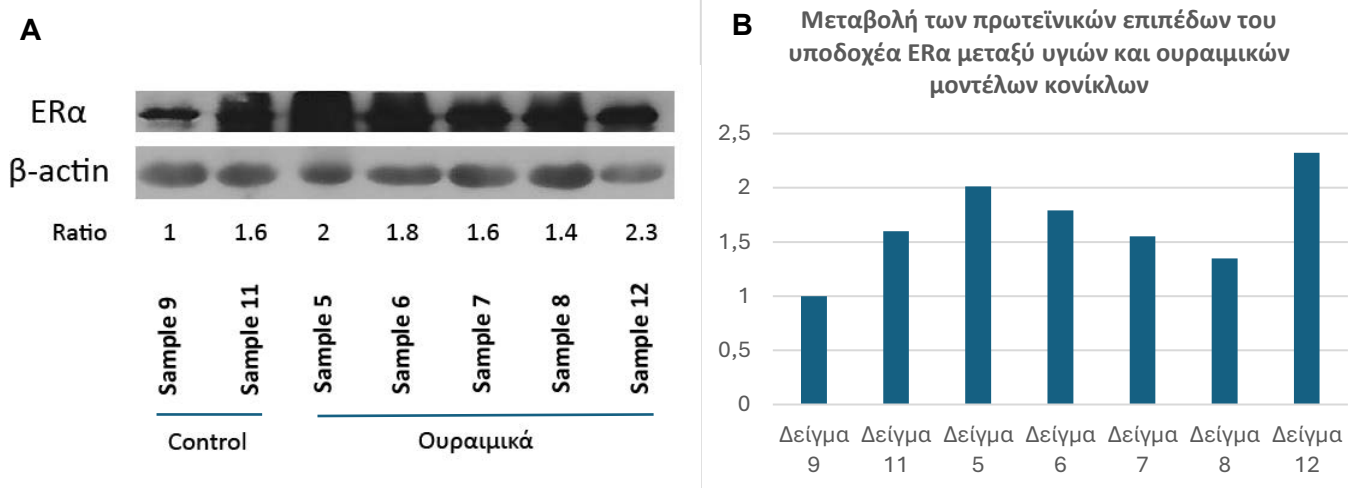
Να αναφερθεί πως πρόκειται για τυφλή μελέτη, στην οποία η προέλευση των δειγμάτων αποκαλύφθηκε εκ των υστέρων δηλαδή μετά το πέρας προκαταρκτικών πειραμάτων. Ειδικότερα, τα δείγματα 9 και 11 ανήκουν σε κονίκλους που υποβλήθηκαν σε εικονική χειρουργική επέμβαση (δείγματα control) ενώ τα δείγματα 5, 6, 7, 8 και 12 προέρχονται από ουραιμικά μοντέλα κονίκλων. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείγματος 9.

Στην Εικόνα 21, παρουσιάζονται οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μεταξύ των ομάδων των πειραματικών μοντέλων κονίκλων. Διαπιστώνεται πως στα ουραιμικά δείγματα 5, 6, 7 και 12 προκαλείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR κατά 30%, 30%, 20% και 80% αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control 9. Στο δείγμα 8 δεν ανιχνεύουμε κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα GR, δεν φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων control. Συνολικά διαπιστώνεται μια τάση αύξησης της έκφρασης του GR στα δείγματα μυϊκού ιστού που προέρχονται από ουραιμικούς κονίκλους με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σύγκριση με τα δείγματα control. Αναλυτικότερα, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 0.88 με τυπική απόκλιση (standard deviation) SD=0.08 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 1.09 με SD=0.23. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.27.



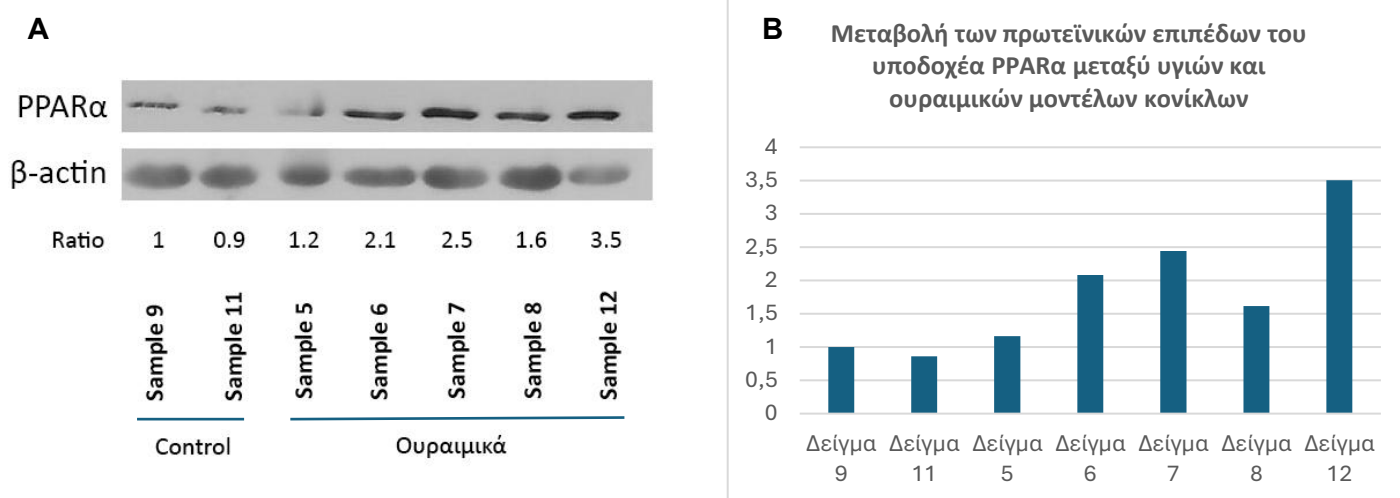
Εικόνα 21: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

Στην Εικόνα 22, φαίνονται οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των οιστρογόνων α (ERα) μεταξύ υγιών και των ουραιμικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια τάση αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERα στα ουραιμικά δείγματα 5 και 12 κατά 2 και 2.3 φορές σε σύγκριση με την συνθήκη control 9. Ακόμη, αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα κατά 80%, 60% και 40% παρουσιάζονται στα δείγματα κονίκλων με χρόνια νεφρική νόσο 6, 7 και 8 σε σύγκριση με την συνθήκη control-δείγμα 9. Ειδικότερα, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 0.89 με SD=0.29 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 1.24 με SD=0.26. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.18.



Εικόνα 22: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

Στην Εικόνα 23, απεικονίζονται οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα) μεταξύ των υγιών και των ουραιμικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, δεν διακρίνεται σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα μεταξύ των δειγμάτων 9 και 11. Ακόμη, παρατηρείται μια τάση αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα στα ουραιμικά δείγματα 5 και 8 κατά 20% και 60% ενώ παράλληλα στα δείγματα 6, 7 και 12 παρουσιάζονται υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα κατά 2.1, 2.5 και 3.5 φορές αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control-δείγμα 9. Συγκεντρωτικά, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 0.59 με SD=0.06 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 1.37 με SD=0.57. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.12.



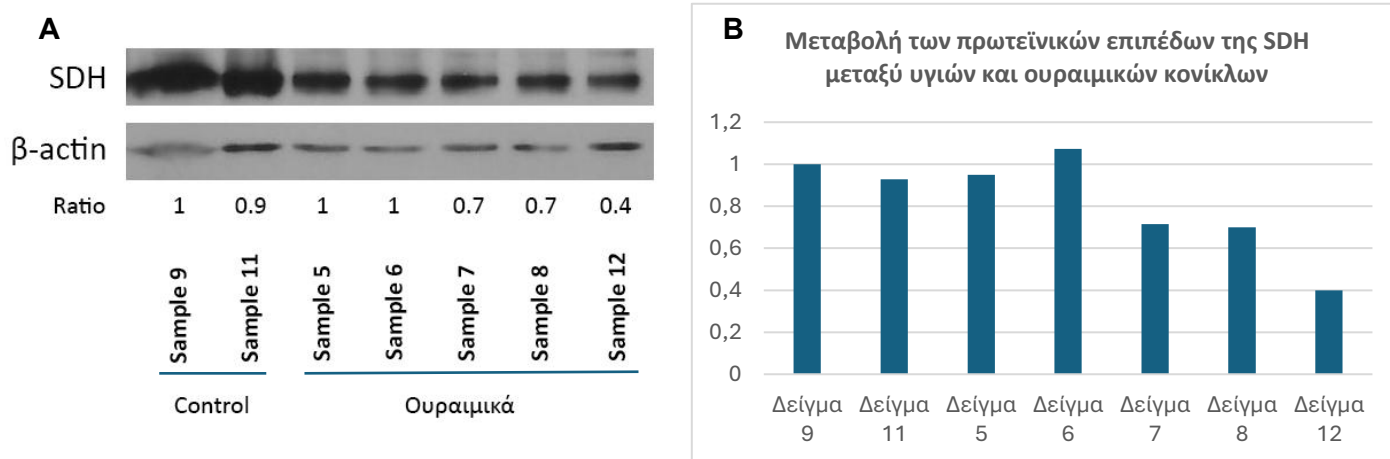
Εικόνα 23: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων α (PPARα) σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

3.2.1.2 Διερεύνηση των μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν άμεσα αλλά και έμμεσα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση μεταξύ υγιών και ουραιμικών δειγμάτων μυϊκού ιστού κονίκλων.

Επόμενος στόχος της εργασίας ήταν η ανίχνευση πιθανών μεταβολών στην έκφραση μορίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση μεταξύ των δειγμάτων μυϊκού ιστού υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Για το σκοπό αυτό, διεξήχθη ανοσοαποτύπωση κατά Western για την μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH), της υπομονάδας IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV) και του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α), ώστε να διερευνηθεί κατά πόσο η ουραιμική μυοπάθεια εξαιτίας της χρόνιας νεφρικής νόσου επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό καθώς και την βιογένεση των μιτοχονδρίων.

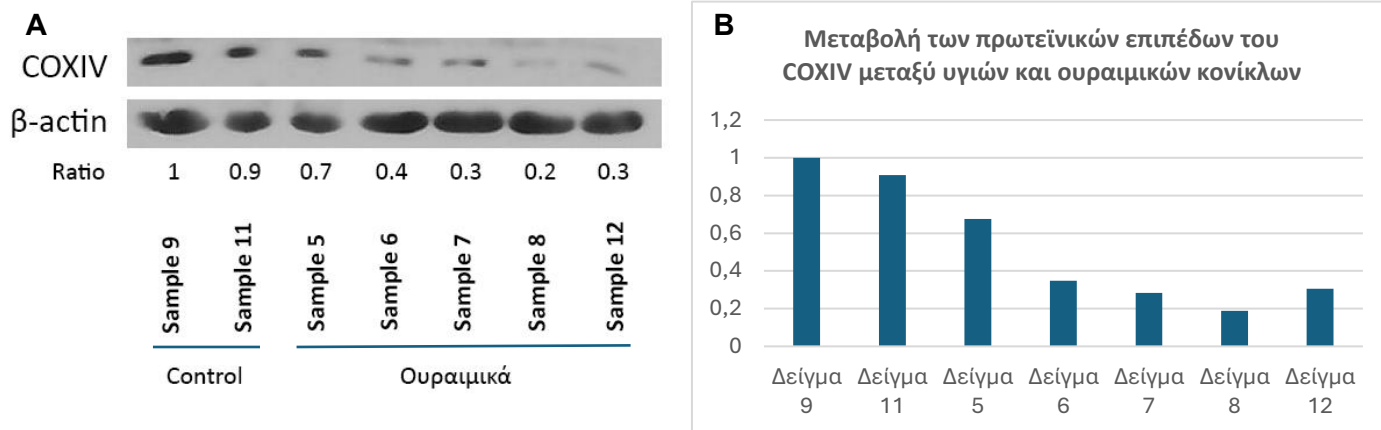
Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, τα δείγματα 5, 6, 7, 8 και 12 ανήκουν σε ουραιμικά μοντέλα κονίκλων με νεφρική νόσο ενώ τα δείγματα 9 και 11 προέρχονται από μυϊκό ιστό υγιών κονίκλων. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείγματος 9.

Στην Εικόνα 24, παρουσιάζονται οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) μεταξύ των υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH στα δείγματα 11, 5 και 6 σε σύγκριση με την συνθήκη αναφοράς (control 9). Όμως, παρατηρείται σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SDH κατά 30% στα δείγματα 7 και 8 ενώ παράλληλα παρατηρείται μείωση κατά 60% στο δείγμα 12 σε σύγκριση με το δείγμα 9. Με περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων της SDH στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 1.09 με SD=0.06 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 0.87 με SD=0.29. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.36.



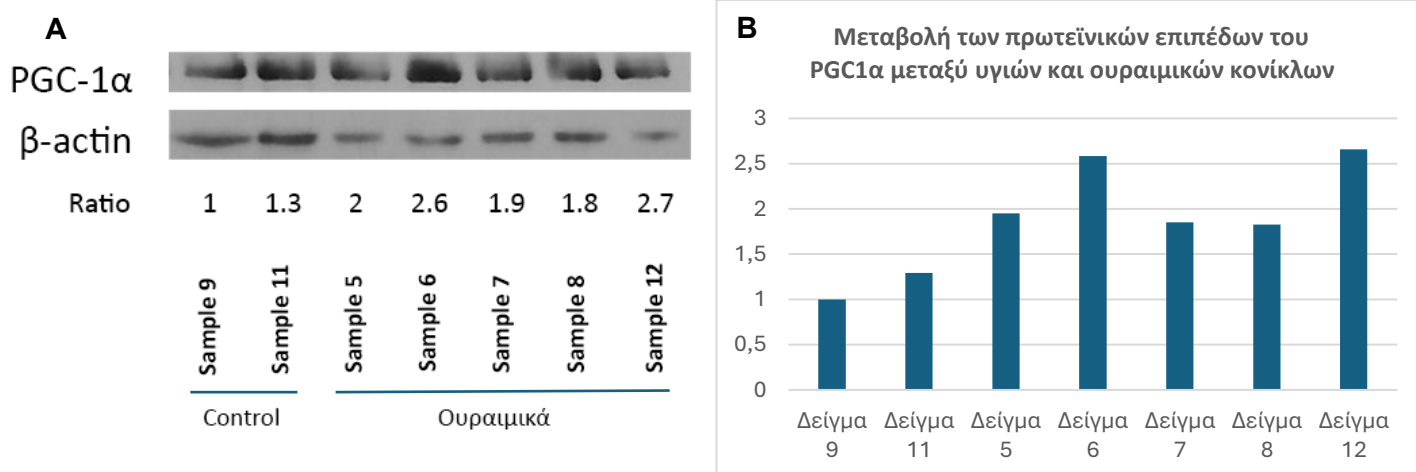
Εικόνα 24: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο μέσος όρος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της SDH ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

Οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας IV του συμπλόκου COX (COXIV), παρουσιάζονται στην Εικόνα 25. Ειδικότερα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της COXIV μεταξύ των δειγμάτων 9 και 11 δεν μεταβάλλονται σημαντικά ενώ σε συνθήκες ουραιμίας στα δείγματα 5, 6, 7, 8 και 12 παρατηρείται μείωση κατά 30%, 60%, 70%, 80% και 70% αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control 9. Συγκεντρωτικά, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 1.89 με SD=0.13 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 0.71 με SD=0.37. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.01.



Εικόνα 25: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας IV του συμπλόκου COX (COXIV) σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο μέσος όρος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της COXIV ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

Σχετικά με τον συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α), διαπιστώνεται εμφανή αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων σε όλα τα δείγματα μυϊκών ιστών που προέρχονται από κονίκλους με χρόνια νεφρική νόσο. Ειδικότερα, σύμφωνα με την Εικόνα 26, στα δείγματα 5, 6, 12 αυξάνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PGC-1α κατά 2, 2.6, και 2.7 φορές ενώ στα δείγματα 7 και 8 παρατηρείται αύξηση κατά 90% και 80% αντίστοιχα σε σύγκριση με την συνθήκη control-δείγμα 9. Αναλυτικότερα, προκύπτει ότι ο μέσος όρος (average) των πρωτεϊνικών επιπέδων του PGC-1α στα δείγματα υγιών κονίκλων είναι ίσος με 0.66 με SD=0.12 ενώ ο μέσος όρος των πρωτεϊνικών επιπέδων του PGC-1α στα ουραιμικά δείγματα είναι ίσος με 1.26 με SD=0.24. Ακόμη πραγματοποιήθηκε t test μεταξύ των υγιών και ουραιμικών δειγμάτων και προέκυψε ότι το p-value=0.02.



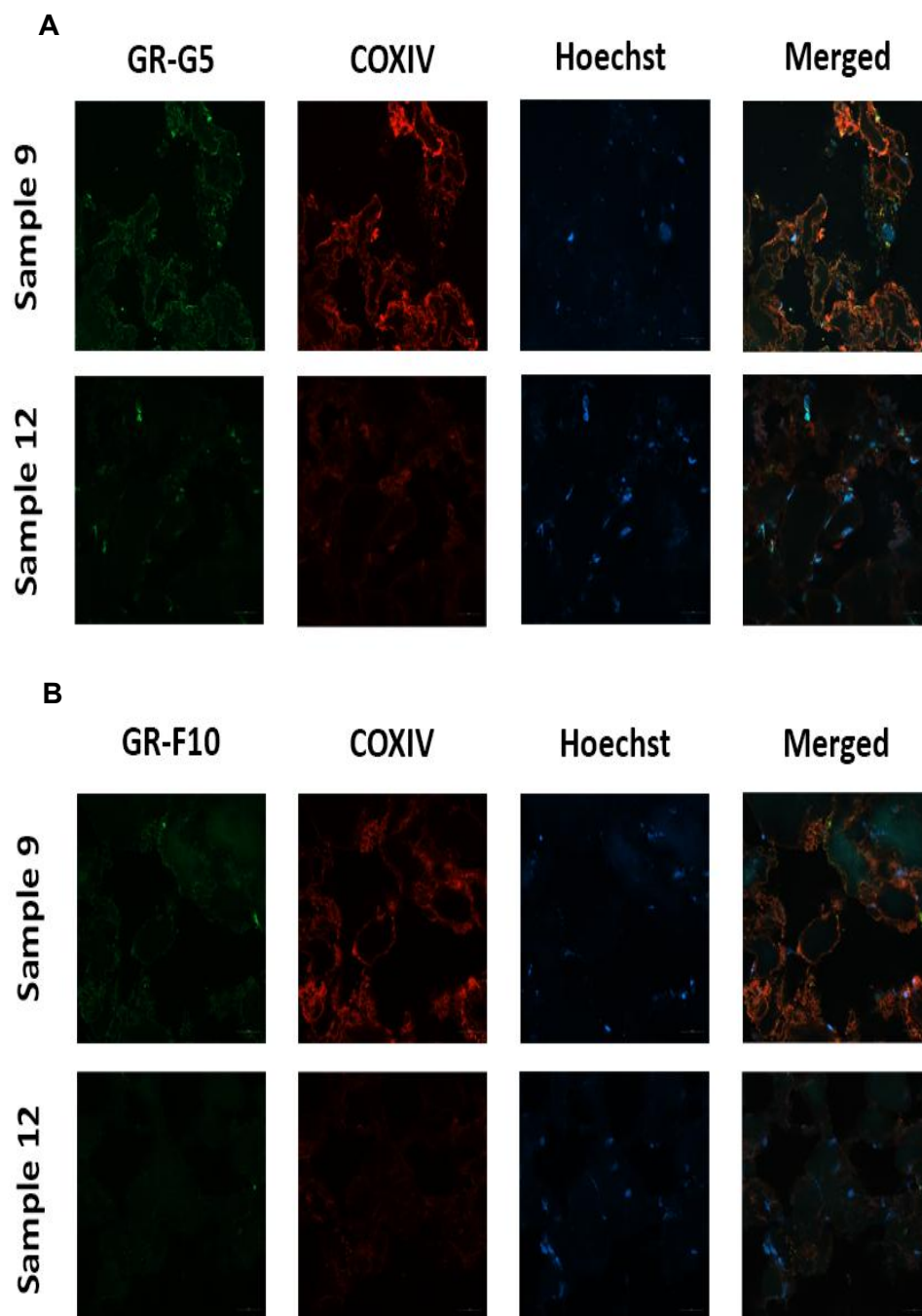
Εικόνα 26: Διερεύνηση της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC-1α), σε μυϊκούς ιστούς υγιών και ουραιμικών κονίκλων. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης/πυκνότητας των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω των προγραμμάτων Image J (A) και του Microsoft Excel (B). Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων του PGC-1α ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στην συνθήκη μάρτυρα-δείγμα 9.

3.2.2 Σύγκριση της υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) μεταξύ δειγμάτων γαστρονημίου που προήλθαν από υγιή και ουραιμικά πειραματικά μοντέλα κονίκλων μέσω ανοσοϊστοχημείας φθορισμού.

Τελευταίος στόχος της παρούσας μελέτης, αποτελούσε η διερεύνηση της πιθανής μεταβολής της υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) σε συνθήκες ουραιμικής μυοπάθειας. Για τη διεκπεραίωση αυτού του στόχου, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε δείγματα μυϊκού ιστού υγιών (δείγματα αναφοράς) και ουραιμικών κονίκλων.

Ειδικότερα, μετά την λήψη τομών μυϊκών ιστών με την βοήθεια του κρουστού, ακολουθεί μονιμοποίηση των δειγμάτων 9 και 12 με την προσθήκη κρύας μεθανόλης και ακετόνης για 10min και 5min αντίστοιχα. Έπειτα, τα δείγματα αρχικά επωάστηκαν με blocking buffer για 1h και στην συνέχεια προστέθηκαν διαλύματα πρωτογενών αντισωμάτων έναντι του GR-G5 (αραίωση 1/50) και του GR-F10 (αραίωση 1/20) για 1h. Επόμενο βήμα ήταν η επώαση των δειγμάτων με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της COXIV (αραίωση 1/500) για 1h, με στόχο τη σήμανση των μιτοχονδρίων. Τέλος, προστέθηκε διάλυμα που περιείχε δευτερογενή αντισώματα anti mouse-Alexa Fluor 488 (αραίωση 1/500), anti rabbit-Alexa Fluor 588 (αραίωση 1/200) και Hoescht 33342 σε συγκέντρωση 1 µg/ml για την σήμανση πυρήνων. Η επώαση διήρκεσε 1h σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθησε λήψη εικόνων με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου.

Στην Εικόνα 27, παρατηρείται η υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) τόσο σε δείγματα μυϊκού ιστού κονίκλων που έχουν υποβληθεί σε εικονική χειρουργική επέμβαση, όσο και σε δείγματα ουραιμικών κονίκλων με χρόνια νεφρική νόσο. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα GR-G5 και GR-F10 που προσδένονται σε διαφορετικό μοριακό επίτοπο του υποδοχέα GR, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της χρώσης καθώς και να εντοπιστεί η υποκυτταρική εντόπιση πιθανών διαφορετικών ισομορφών του υποδοχέα GR. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα GR-G5 (Εικόνα 14-A), παρατηρήθηκε πως στο δείγμα 9 (control), ο GR φαίνεται να κατανέμεται κυρίως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων ενώ στο δείγμα 12, όπου επικρατούν καταστάσεις ουραιμίας, ενισχύεται η πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και με την χρήση του αντισώματος GR-F10 (Εικόνα 14-B), όπου στο δείγμα 9 παρατηρείται να επικρατεί ο εντοπισμός του GR στα μιτοχόνδρια. Μάλιστα με την χρήση του αντισώματος GR-F10, υπό συνθήκες επαγωγής ουραιμικής μυοπάθειας, δηλαδή στο δείγμα 12, ανιχνεύεται τόσο πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα όσο και κατανομή του και σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα.



Εικόνα 27: Διερεύνηση της πιθανής μεταβολής της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) κατά την ουραιμική μυοπάθεια. Χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα GR-G5 (A) και GR-F10 (B) που στοχεύουν έναντι διαφορετικών επιτόπων του υποδοχέα GR. Αντιπροσωπευτικές εικόνες, που λήφθηκαν με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, της φθορίζουσας χρωστικής Alexa Fluor 488 (συνδέεται με τα πρωτογενή αντισώματα του υποδοχέα GR), της Alexa Fluor 588 (συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα της COXIV) και της Hoechst 33342 (φθορίζουσα χρωστική έναντι των πυρήνων).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό πως κατά την κυτταρική γήρανση πραγματοποιείται αναστολή του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε διάφορες καταστάσεις όπως το στρες (*Mohamad et al. 2020, Regulski et al. 2017*). Επιπλέον, τα γηρασμένα κύτταρα υφίστανται πολλές μορφολογικές αλλαγές αλλά και απορρύθμιση των μεταβολικών τους διεργασιών με κυριότερες μεταβολές τη σύντηξη των τελομερών, την μειορρύθμιση της αυτοφαγίας και την μειωμένη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP λόγω διατάραξης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων (*Li et al. 2024, Miwa et al. 2022, Hara et al. 2006, Lee et al. 2021*). Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν αποδείξει πως φλεγμονώδεις διαταραχές που συσχετίζονται με τη γήρανση, μπορεί να οφείλονται στην ικανότητα των γηρασμένων κυττάρων να εκκρίνουν μόρια SASPs, στα οποία περιλαμβάνονται χημειοκίνες και κυταροκίνες, όπου μέσω παρακρινούς σηματοδότησης επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης σε γειτονικά κύτταρα (*Herranz et al. 2018*).

Έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία αρκετά μοντέλα κυτταρικής γήρανσης (*Veronesi et al. 2023*), με το μοντέλο της D-galactose να αποτελεί αρκετά διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο λόγω της απλότητας, της ταχείας πρόκλησης χαρακτηριστικών της γήρανσης, αρκετών ομοιοτήτων με τη διαδικασία της φυσικής γήρανσης καθώς και αυξημένου ποσοστού επιβίωσης των πειραματοζώων μετά την χορήγηση της (*Azman et al. 2019*). Ειδικότερα, η D-galactose, επάγει την κυτταρική γήρανση μέσω διάφορων μηχανισμών, μερικοί από τους οποίους είναι η αύξηση της οσμωτικής πίεσης των κυττάρων, η αναστολή της δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς και η αύξηση των επιπέδων ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) (*Bo-Htay et al. 2018*).

Η χρόνια νεφρική νόσο, αποτελεί μια ασθένεια που επηρεάζει πάνω από 800 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, εμφανίζει υψηλή θνησιμότητα και εμφανίζεται συχνά σε ενήλικα άτομα που πάσχουν από διαβήτη και υπέρταση (*Kalantar-Zadeh et al. 2021, Kovesdy et al. 2022*). Κατά την χρόνια νεφρική νόσο, παρατηρείται μια προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας και όμοια με την κυτταρική γήρανση, παράγονται υψηλά ποσοστά ενεργών ριζών οξυγόνου και φλεγμονώδεις αποκρίσεις (*Granata et al. 2009, Souza et al. 2015*). Τα υψηλά επίπεδα ROS, επάγουν καταβολικές διεργασίες και έτσι μειώνουν την ευαισθησία των μυοϊνιδίων στα ιόντα Ca^{+2} με αποτέλεσμα την αδυναμία και κόπωση των μυών (*Kaltsatou et al. 2015*). Παράλληλα, ένα χαρακτηριστικό της χρόνιας νεφρικής νόσου είναι η παραγωγή ουραιμικών τοξινών, όπου οι τελευταίες οφείλονται για την πρόκληση της ατροφίας στους σκελετικούς μύες μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών οξειδωτικού στρες αλλά και απορρύθμισης της μιτοχονδριακού μεταβολισμού (*Souza et al. 2015*).

Σημαντική είναι η δράση των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και των γονιδίων στόχων τους στην ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και στον μεταβολισμό των μυϊκών κυττάρων. Ειδικότερα, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοειδή, με κύριους εκπροσώπους την ενδογενή κορτιζόλη και την συνθετική δεξαμεθαζόνη. Η δράση του GR επιτελείται μέσω γενωμικών, μη γενωμικών, καθώς και άμεσων μιτοχονδριακών δράσεων. Παρουσία προσδετών ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στους μύες αλλά και εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής σε συνθήκες γήρανσης (*Gong et al. 2016, Panettieri et al. 2019, Macfarlane et al. 2024*). Ομοίως, οι υποδοχείς οιστρογόνων α και β (ER α και ER β), μεταβάλλουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων τους ασκώντας αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές δράσεις μέσω των οιστρογόνων σε μυϊκά κύτταρα, οι οποίες αποδίδονται τόσο σε γενωμικές όσο και

σε μη γενωμικές δράσεις των υποδοχέων. (Fuentes et al. 2019, Capllonch-Amer et al. 2014, Farhat et al. 2017, Vasconsuelo et al. 2010).

Όσο αναφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPAR α) και την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), φαίνεται να ρυθμίζεται η έκφραση τους από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Αναλυτικότερα, σχετικά με τον υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPAR α) συμμετέχει στον μεταβολισμό των λιπιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή του acetyl-CoA, που συμμετέχει στον κύκλο του Krebs στα μιτοχόνδρια (Staels et al. 1995, Schoonjans et al. 1996). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως ο PPAR α καταστέλλει την έκφραση αλλά και την δραστηριότητα μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή κατά την νεφρική νόσο αλλά και σε καταστάσεις γήρανσης (Comella et al. 2024, Poynter et al. 1998). Σχετικά, με την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) είναι ένα βασικό ένζυμο που συμμετέχει στην παραγωγή γλυκόζης και φαίνεται να μειορρυθμίζεται σε καταστάσεις επαγόμενης γήρανσης σε πειραματικά μοντέλα C.Elegans (Yuan et al. 2016).

Επιπρόσθετα, η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH), η υπομονάδα IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV) και ο συνενεργοποιητής-1 α του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC1- α), αποτελούν βασικά συστατικά της μιτοχονδριακής λειτουργίας και βιογένεσής των μιτοχονδρίων. Ειδικότερα, η SDH θεωρείται δείκτης της εύρυθμης λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας (OXPHOS), η οποία απορρυθμίζεται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (Okamoto et al. 2024). Σχετικά με το μιτοχονδριακό σύμπλοκο COX (του οποίου συστατικό αποτελεί η υπομονάδα COXIV), αποτελεί κύριο σύμπλοκο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συμβάλλοντας στην παραγωγή ενέργειας και η έκφραση του φαίνεται να μεταβάλλεται τόσο σε καταστάσεις γήρανσης καρδιακού μυός όσο και σε σκελετικούς μύες ποντικών με χρόνια νεφρική νόσο (Lee et al. 2015, Serrano et al. 2022). Ο συνενεργοποιητής-1 α του υποδοχέα πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων γ (PGC1- α), φαίνεται να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή πολλών βιολογικών διεργασιών με κυριότερη την βιογένεση των μιτοχονδρίων που φαίνεται να επηρεάζεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Liang et al. 2006, Rius-Pérez et al. 2020).

Πρώτος στόχος της ερευνητικής μελέτης αποτελούσε η διερεύνηση της εμπλοκής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, των μεταβολών των γονιδίων στόχων τους καθώς και μορίων που συμμετέχουν στον μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό σε συνθήκες επαγόμενης γήρανσης μέσω D-galactose σε μυϊκά κύτταρα C2C12.

Αρχικά, για την επίτευξη του πρώτου στόχου, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της επίδρασης διαφορετικής συγκέντρωσης διαλυμάτων D-galactose στην βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12, ώστε να καθοριστούν οι συγκεντρώσεις της D-galactose που είναι επαρκείς για την πρόκληση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης, όπως η αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμό, με μειωμένη έως καθόλου επαγωγή κυτταρικής απόπτωσης. Ειδικότερα, καλλιεργήθηκαν μυϊκά κύτταρα C2C12 σε πλήρες θρεπτικό μέσο, όπου επωάστηκαν με D-galactose σε συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml για 24h και 48h. Ακολούθησε δοκιμασία MTT, όπου τα αποτελέσματα έδειξαν πως η D-galactose σε συγκέντρωση 20mg/ml προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 4% και 20% μετά από επώαση 24h και 48h αντίστοιχα. Αντιθέτως, σε συγκεντρώσεις 60mg/ml φαίνεται να αναστέλλει σημαντικά τον κυτταρικό κύκλο καθώς η βιωσιμότητα των C2C12 μειώνεται κατά 40% στις 24h επώασης και 80% στις 48h. Οι κατάλληλες συγκεντρώσεις D-galactose που φαίνεται

να προκαλούν τον επιθυμητό φαινότυπο γήρανσης είναι οι 30mg/ml και 40mg/ml καθώς φαίνεται να αναστέλλουν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά 30% και 40% στις 24h και 48h, αντίστοιχα, σε συμφωνία με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας (Zhang et al. 2025). Επομένως για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που ακολούθησαν προκλήθηκε γήρανση στα κύτταρα C2C12 με την προσθήκη D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml τόσο για 24h όσο και για 48h.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης των μυϊκών κυττάρων C2C12, που καλλιιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), των γονιδίων στόχων του όπως του υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων α (PPARα), της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), αλλά και της υπομονάδας IV του συμπλόκου COX της αναπνευστικής αλυσίδας. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των C2C12 και σε θρεπτικό μέσο που απουσιάζουν οι ορμόνες, και στη συνέχεια προσθήκη του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς DEX, για να μελετηθεί η επίδραση της DEX, αγωνιστή του υποδοχέα GR, που παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων που προαναφέρθηκαν σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης.

Ειδικότερα, διεξήχθη ανοσοαποτύπωση κατά Western και παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR σε συνθήκες γήρανσης παρουσία D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Επομένως, φαίνεται πως κατά την κυτταρική γήρανση, μειώνονται τα επίπεδα του υποδοχέα υπεύθυνου για την γλυκονεογένεση αλλά και την καταστολή φλεγμονωδών αντιδράσεων (Oakley et al. 2013, Macfarlane et al. 2024). Σε συνθήκες καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό, όπου απουσιάζουν οι ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες, παρατηρούμε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR τόσο απουσία όσο και παρουσία D-galactose, πιθανόν λόγω απόκρισης του κυττάρου στις συνθήκες μη επαρκούς διαθεσιμότητας τροφής και πιθανούς τάσης αποκατάστασης των επιπέδων γλυκόζης. Ακόμη, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η προσθήκη DEX, φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα του GR απουσία D-galactose και μετριάξει την αύξηση που προκαλείται λόγω της προσθήκης D-galactose, δεδομένου ότι η παρουσία ορμόνης ενεργοποιεί τα υπάρχοντα επίπεδα GR, τα οποία αρκούν πλέον για την διατήρηση επαρκών επιπέδων γλυκόζης στο κύτταρο.

Ακόμη, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, δεν φαίνεται να μεταβάλλονται παρουσία D-galactose για 24h. Αντίθετα, με την προσθήκη D-galactose για 48h, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της PEPCK, γεγονός που ίσως οφείλεται στην προσπάθεια των κυττάρων να αντισταθούν στο στρες μέσω επαγωγής αναβολικών διεργασιών και συγκεκριμένα της παραγωγής γλυκόζης (Montal et al. 2015). Όταν τα κύτταρα C2C12 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών και άλλων αναπτυξιακών παραγόντων, που προσομοιάζει καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών συστατικών – τροφής, ομοίως με την συνθήκη επαγωγής γήρανσης, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK. Η προσθήκη D-galactose φαίνεται να μετριάξει την από έλλειψη θρεπτικών συστατικών επαγόμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK (σύγκριση με την συνθήκη καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό απουσία ορμονών για 48h). Η προσθήκη της DEX δεν επηρέασε τα επίπεδα της PEPCK σε συνθήκες έλλειψης τροφής σε σύγκριση με την συνθήκη καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών για 48h ενώ η συνεπίδραση των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη και D-galactose, προκάλεσε μικρή μείωση των επιπέδων της PEPCK σε σύγκριση με την συνθήκη όπου προστέθηκε D-galactose σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με πειραματικές μελέτες όπου

παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας της PEPCK με την αύξηση της ηλικίας των σκουλικιών *C.Elegans* (Yuan *et al.* 2016) και πιθανόν να υποδηλώνουν ότι συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών σε συνδυασμό με παρουσία D-galactose, προσομοιάζουν καλύτερα πειραματικές συνθήκες γήρανσης.

Σχετικά, με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα, αυτά αυξάνονται σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης τόσο στις 24h όσο και στις 48h επώασης με D-galactose. Έτσι, σε συνθήκες γήρανσης ίσως να επάγονται αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η ενεργοποίηση του του PPARα, οδήγησε σε καταστολή του παράγοντα NF-κΒ. (Poynter *et al.* 1998). Ακόμη, σε καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο, όπου απουσιάζουν οι ορμόνες, παρατηρούμε μείωση των επιπέδων του PPARα, δράση σε συμφωνία με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας που υποδεικνύουν ότι η έκφραση του PPARα επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (Lemberger *et al.* 1994). Η δράση αυτή αναιρείται μερικώς με την προσθήκη D-galactose, σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα, που δείχνουν επαγωγή PPARα σε συνθήκες γήρανσης. Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης τόσο απουσία όσο και παρουσία D-galactose, μετριάξει την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα που προκαλείται στην συνθήκη 48h (σε θρεπτικό υλικό απουσία ορμονών), όπως και αναμενόταν.

Όσο αναφορά την υπομονάδα COXIV του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της παρουσία D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml για 24h και 48h, γεγονός που υποδηλώνει την προσπάθεια των κυττάρων να αποκαταστήσουν την μειωμένη παραγωγή ενέργειας που συνήθως παρατηρείται σε καταστάσεις κυτταρικής γήρανσης (Lee *et al.* 2015) και πιθανόν να υποδηλώνει αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων, σε συμφωνία με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας (Palikaras *et al.* 2015). Σε συνθήκες θρεπτικού μέσου απουσία ορμονών παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της COXIV, η οποία ενισχύεται με την προσθήκη D-galactose. Όμως, η προσθήκη DEX τόσο απουσία όσο και παρουσία D-galactose, φαίνεται να μετριάξει αυτή την αύξηση των επιπέδων της COXIV, ενισχύοντας τον ρυθμιστικό, άμεσο ή έμμεσο ρόλο των στεροειδών σε διαδικασίες γήρανσης.

Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η υποκυτταρική κατανομή των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογόνων α και β (ERα και ERβ) σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με D-galactose στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Ειδικότερα, έγινε ανοσοκυτταροχημεία φθορισμού και διαπιστώθηκε πως στην συνθήκη control, απουσία D-galactose, ο υποδοχέας ERα εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια του κυττάρου ενώ με την προσθήκη D-galactose μετατοπίζεται προς τον πυρήνα πιθανώς για να ασκήσει αντιοξειδωτικές δράσεις (Fuentes *et al.* 2019). Ο υποδοχέας ERβ τόσο σε συνθήκες control όσο και παρουσία D-galactose φαίνεται να έχει μιτοχονδριακή εντόπιση. Όμως παρατηρείται μία εξασθένηση του σήματος κατά την γήρανση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων. Ακόμη, όσο αναφορά την υποκυτταρική κατανομή του υποδοχέα GR φαίνεται να έχει πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση στις συνθήκες control όμως παρουσία D-galactose, ο υποδοχέας GR, βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα ασκώντας πιθανώς γενωμικές δράσεις μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων στόχων του όπως PEPCK, PPARα και αλληλεπιδρώντας και ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τη δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο PGC-1α και NF-κΒ αντίστοιχα (Oakley *et al.* 2013, Psarra *et al.* 2008).

Δεύτερος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της σηματοδότησης των πυρηνικών υποδοχέων και μορίων που ρυθμίζουν την οξειδωτική

φωσφορυλίωση σε δείγματα γαστρογνήμιου που προερχόταν από ουραιμικούς κονίκλους με χρόνια νεφρική νόσο και από κονίκλους αναφοράς (ομάδα control).

Για την υλοποίηση του δεύτερου στόχου, αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western, για να ανιχνευτούν τυχόν μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα οιστρογόνων α (ER α) και του υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξειδωμάτων α (PPAR α). Αναλυτικότερα, παρατηρείται μια τάση αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη υποδοχέων-μεταγραφικών παραγόντων στα δείγματα μυϊκού ιστού που προέρχονται από τους κονίκλους με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι ποντίκια knock out για το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα GR ειδικά στους μύες ήταν ανθεκτικά στη μυϊκή ατροφία που προκαλείται από γλυκοκορτικοειδή (*Watson et al. 2012, Watanabe et al. 2019*). Επιπλέον σε καταστάσεις μυϊκής ατροφίας ίσως να μειώνεται η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού εξαιτίας της επαγωγής της σηματοδότησης του GR, ο οποίος σύμφωνα με μία ερευνητική μελέτη φαίνεται να καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, ο οποίος φυσιολογικά ενεργοποιείται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (*Alam et al. 2017*). Σχετικά, με τον υποδοχέα οιστρογόνων ER α , έρευνα έχει αποδείξει ότι τα μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης GSH στον γαστροκνήμιο μυ αρσενικών αρουραίων με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από θεραπεία με οιστραδιόλη (*Kasimay et al. 2009*). Άρα ίσως η σηματοδότηση που επάγεται από τον υποδοχέα ER α , να αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό, μέσω της επαναφοράς των επιπέδων των ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, που επικρατεί κατά την ουραιμική μυοπάθεια. Παρόμοια, ο PPAR α φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο σε συνθήκες χρόνιας νεφρικής νόσου, καθώς προηγούμενες μελέτες δείχνουν πως η ενεργοποίηση του κατέστρεψε την ίνωση αλλά και την φλεγμονή σε ποντίκια με νεφρική ανεπάρκεια (*Comella et al. 2024*).

Στην συνέχεια μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων άμεσων ή έμμεσων στόχων του υποδοχέα GR, που εμπλέκονται στην βιογένεση των μιτοχονδρίων αλλά και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση-αναπνευστική αλυσίδα (*Psarra et al. 2008*). Ειδικότερα, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, διερευνήθηκε η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της υπομονάδας IV του μιτοχονδριακού συμπλόκου COX (COXIV), του συνενεργοποιητή-1 α του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή των υπεροξειδωμάτων γ (PGC1- α) σε δείγματα γαστρογνήμιου μυ ουραιμικών και κονίκλων αναφοράς, καθώς και της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται μια τάση μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της SDH και της COXIV στα δείγματα που προέρχονται από κονίκλους με χρόνια νεφρική νόσο. Μάλιστα η μείωση των επιπέδων της COXIV φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες έρευνες όπου παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της COXIV κατά 65% και μείωση της έκφρασης της SDH σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σύγκριση με υγιή άτομα (*Granata et al. 2009, Okamoto et al. 2024*). Άρα, πιθανώς σε συνθήκες ουραιμίας, παρατηρείται μια διατάραξη του κύκλου του Krebs αλλά και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με πιθανή μείωση των επιπέδων ATP και συνεπώς των ενεργειακών επιπέδων των κυττάρων. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ανιχνεύεται μία στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του κύριου ρυθμιστή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων PGC1- α , στους ουραιμικούς κονίκλους σε σύγκριση με τα δείγματα control. Έτσι φαίνεται πως σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, επάγεται η βιογένεση των μιτοχονδρίων, ώστε πιθανώς να αντισταθμιστεί ο διαταραγμένος

μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια, κάτι το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και από άλλη ερευνητική μελέτη όπου σε σκελετικό μυ ποντικών με χρόνια νεφρική νόσο παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του PGC1-α σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς (Okamoto *et al.* 2024).

Τελευταίος στόχος της διπλωματικής αποτελούσε η εντόπιση σε υποκυτταρικό επίπεδο του υποδοχέα GR, μέσω ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού, για την ανίχνευση πιθανής μετατόπισης του σε συνθήκες ουραιμικής μυοπάθειας. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως στα δείγματα control ενισχύεται η μιτοχονδριακή κατανομή του υποδοχέα ενώ στα δείγματα που προέρχονται από κόνικλους με χρόνια νεφρική νόσο παρατηρείται πως ο υποδοχέας GR βρίσκεται κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων. Όπως και στις συνθήκες επαγόμενης γήρανσης, έτσι και στην ουραιμική μυοπάθεια, φαίνεται να ενισχύεται η πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα GR, ο οποίος έτσι ρυθμίζει την πυρηνική μεταγραφή και ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με αντιφλεγμονώδη δράση, ενεργειακό μεταβολισμό και αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

Ανακεφαλαιώνοντας, διαπιστώθηκε πως τόσο σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, όσο και σε κόνικλους με ουραιμική μυοπάθεια παρατηρείται απορρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, του ενεργειακού μεταβολισμού και βιογένεσης του μιτοχονδρίου, οι οποίες συνοδεύονται από μεταβολές στα επίπεδα υποδοχέων στεροειδών ορμόνων και μεταγραφικών παραγόντων όπως PGC-1α και PPARα που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες, καθώς και διαδικασίες αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους άμυνας του οργανισμού. Για περαιτέρω έρευνα και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, θα μπορούσαν να μελετηθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού (GSH, SOD, CAT), παραγόντων φλεγμονής όπως NF-κΒ καθώς και να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μιτοχονδριακής παραγωγής ATP σε συνθήκες κυτταρικής γήρανσης. Ακόμη, όπως προαναφέρθηκε διαπιστώθηκε μια εξασθένηση του σήματος του υποδοχέα ERβ κατά την γήρανση με D-galactose σε σύγκριση με την συνθήκη control, κατά την ανοσοκυτταροχημεία φθορισμού. Επομένως, ενδιαφέρον έχει να επιβεβαιωθεί η πιθανή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα ERβ, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τέλος, ένας ακόμη μελλοντικός στόχος αποτελεί η επιβεβαίωση του φαινοτύπου των γηρασμένων κυττάρων σε πειραματικές συνθήκες παρουσία D-galactose σε συνδυασμό ή μη καλλιέργειας κυττάρων υπό στέρηση αναπτυξιακών παραγόντων και ορμονών μέσω ειδικών χρώσεων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Acosta, P. B., & Gross, K. C. (1995). Hidden sources of galactose in the environment. *European journal of pediatrics*, 154(7 Suppl 2), S87–S92. <https://doi.org/10.1007/BF02143811>
- ❖ Alam, M. M., Okazaki, K., Nguyen, L. T. T., Ota, N., Kitamura, H., Murakami, S., Shima, H., Igarashi, K., Sekine, H., & Motohashi, H. (2017). Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant response by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2. *The Journal of biological chemistry*, 292(18), 7519–7530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773960>
- ❖ Alexander V. Crowe, Anne McArdle, Francis McArdle, David M. Pattwell, Gordon M. Bell, Graham J. Kemp, J. Michael Bone, Richard D. Griffiths, Malcolm J. Jackson, Markers of oxidative stress in the skeletal muscle of patients on haemodialysis, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 22, Issue 4, April 2007, Pages 1177–1183, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl721>
- ❖ Ardeljan, A. D., & Hurezeanu, R. (2023). Sarcopenia. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- ❖ Azman, K. F., & Zakaria, R. (2019). D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*, 20(6), 763–782. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09837-y>
- ❖ Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., Pacak, K., & Neuzil, J. (2017). Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends in biochemical sciences*, 42(4), 312–325. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003>
- ❖ Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- ❖ Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B., & Glineur, C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2-5), 267–273. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00214-0)
- ❖ Bo-Htay, C., Palee, S., Apaijai, N., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2018). Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(3), 1392–1410. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13472>
- ❖ Bordag, N., Klie, S., Jürchott, K. et al. Glucocorticoid (dexamethasone)-induced metabolome changes in healthy males suggest prediction of response and side effects. *Sci Rep* 5, 15954 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep15954>
- ❖ Capllonch-Amer, G., Lladó, I., Proenza, A. M., García-Palmer, F. J., & Gianotti, M. (2014). Opposite effects of 17-β estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. *Journal of molecular endocrinology*, 52(2), 203–214. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0201>
- ❖ Chen, J. H., Hales, C. N., & Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?. *Nucleic acids research*, 35(22), 7417–7428. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm681>
- ❖ Chourpiliadis, C., & Aeddula, N. R. (2023). Physiology, Glucocorticoids. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- ❖ Chung, K. W., Dhillon, P., Huang, S., Sheng, X., Shrestha, R., Qiu, C., Kaufman, B. A., Park, J., Pei, L., Baur, J., Palmer, M., & Susztak, K. (2019). Mitochondrial Damage and Activation of the STING Pathway Lead to Renal Inflammation and Fibrosis. *Cell metabolism*, 30(4), 784–799.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.003>
- ❖ Collins, B. C., Laakkonen, E. K., & Lowe, D. A. (2019). Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength. *Bone*, 123, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.033>
- ❖ Comella, F., Lama, A., Pirozzi, C., Annunziata, C., Piegari, G., Sodano, F., Melini, S., Paciello, O., Lago Paz, F., Meli, R., & Mattace Raso, G. (2024). Oleylethanolamide attenuates acute-to-chronic kidney injury: in vivo and in vitro evidence of PPAR-α involvement. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 171, 116094. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116094>
- ❖ Cruz-Topete, D., Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2020). Glucocorticoid Signaling and the Aging Heart. *Frontiers in endocrinology*, 11, 347. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00347>
- ❖ Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- ❖ Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(6), 975–991. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>
- ❖ David G. Whitehouse, Benjamin May, Anthony L. Moore, Respiratory Chain and ATP Synthase, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95732-5>
- ❖ Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., & Belosludtsev, K. N. (2020). The Effect of Deflazacort Treatment on the Functioning of Skeletal Muscle Mitochondria in Duchenne Muscular Dystrophy. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8763. <https://doi.org/10.3390/ijms21228763>
- ❖ Farhat, F., Amérand, A., Simon, B., Guegueniat, N., & Moisan, C. (2017). Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. *Redox report : communications in free radical research*, 22(6), 508–514. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1296637>
- ❖ Fattoretti, P., Vecchiet, J., Felzani, G., Gracciotti, N., Solazzi, M., Caselli, U., & Bertoni-Freddari, C. (2001). Succinic dehydrogenase activity in human muscle mitochondria during aging: a quantitative cytochemical investigation. *Mechanisms of ageing and development*, 122(15), 1841–1848. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00320-7](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00320-7)
- ❖ Foroozandeh, P., Aziz, A. A., & Mahmoudi, M. (2019). Effect of Cell Age on Uptake and Toxicity of Nanoparticles: The Overlooked Factor at the Nanobio Interface. *ACS applied materials & interfaces*, 11(43), 39672–39687. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b15533>

- ❖ Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- ❖ Gong, H., Liu, L., Ni, C. X., Zhang, Y., Su, W. J., Lian, Y. J., Peng, W., Zhang, J. P., & Jiang, C. L. (2016). Dexamethasone rapidly inhibits glucose uptake via non-genomic mechanisms in contracting myotubes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 603, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.020>
- ❖ Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., Carella, M., Schena, F. P., Grandaliano, G., & Pertosa, G. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics*, 10, 388. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-388>
- ❖ Grazioli, S., & Pugin, J. (2018). Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00832>
- ❖ Gruver-Yates, A. L., & Cidlowski, J. A. (2013). Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*, 2(2), 202–223. <https://doi.org/10.3390/cells2020202>
- ❖ Han, S. H., Wu, M. Y., Nam, B. Y., Park, J. T., Yoo, T. H., Kang, S. W., Park, J., Chinga, F., Li, S. Y., & Susztak, K. (2017). PGC-1 α Protects from Notch-Induced Kidney Fibrosis Development. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(11), 3312–3322. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017020130>
- ❖ Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M. et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- ❖ Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., Swisa, A., Condiotti, R., Granit, R. Z., Nevo, Y., Fixler, Y., Shreibman, D., Zamir, A., Tornovsky-Babeay, S., Dai, C., Glaser, B., Powers, A. C., Shapiro, A. M., Magnuson, M. A., Dor, Y., ... Ben-Porath, I. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature medicine*, 22(4), 412–420. <https://doi.org/10.1038/nm.4054>
- ❖ Henschke, A., Mielcarek, A., Grześkowiak, B., Perrigue, P., Jaskot, K., Coy, E. & Moya, S. (2024). Cellular senescence and nanoparticle-based therapies: Current developments and perspectives. *Nanotechnology Reviews*, 13(1), 20230211. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2023-0211>
- ❖ 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>
- ❖ Hurd, M. W., Zimmer, K. A., Lehman, M. N., & Ralph, M. R. (1995). Circadian locomotor rhythms in aged hamsters following suprachiasmatic transplant. *The American journal of physiology*, 269(5 Pt 2), R958–R968. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.5.R958>
- ❖ Inmaculada Valle, Alberto Álvarez-Barrientos, Elvira Arza, Santiago Lamas, María Monsalve, PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells, *Cardiovascular Research*, Volume 66, Issue 3, June 2005, Pages 562–573, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>
- ❖ Kalantar-Zadeh, K., Jafar, T. H., Nitsch, D., Neuen, B. L., & Perkovic, V. (2021). Chronic kidney disease. *Lancet* (London, England), 398(10302), 786–802. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00519-5)
- ❖ Kaltsatou, A., Sakkas, G. K., Poulaniti, K. P., Koutedakis, Y., Tepetes, K., Christodoulidis, G., Stefanidis, I., & Karatzaferi, C. (2015). Uremic myopathy: is oxidative stress implicated in muscle dysfunction in uremia?. *Frontiers in physiology*, 6, 102. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00102>
- ❖ Kasimay, Ö., Şener, G., Çakır, B., Yüksel, M., Çetinel, Ş., Contuk, G., & Yeğen, B. Ç. (2009). Estrogen Protects against Oxidative Multiorgan Damage in Rats with Chronic Renal Failure. *Renal Failure*, 31(8), 711–725. <https://doi.org/10.3109/08860220903134563>
- ❖ Kim, K., Anderson, E. M., Thome, T., Lu, G., Salyers, Z. R., Cort, T. A., O'Malley, K. A., Scali, S. T., & Ryan, T. E. (2021). Skeletal myopathy in CKD: a comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 321(1), F106–F119. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00117.2021>
- ❖ Kokkinopoulou, I., & Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 6054. <https://doi.org/10.3390/ijms22116054>
- ❖ Kovesdy C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney international supplements*, 12(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>
- ❖ Kumar, R. A., Miyagi, H., Mittal, V., Crispen, P., & Kumar, U. (2021). Succinate dehydrogenase deficient renal cell carcinoma: A case report. *Urology case reports*, 40, 101885. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2021.101885>
- ❖ L. Gotloib, P. Crassweller, H. Rodella, D.G. Oreopoulos, G. Zellerman, R. Ogilvie, H. Husdan, L. Brandes, S. Vas; Experimental Model for Studies of Continuous Peritoneal Dialysis in Uremic Rabbits. *Nephron* 1 March 1982; 31 (3): 254–259. <https://doi.org/10.1159/000182655>
- ❖ Lee, DE; Perry,, RA Jr; Brown, JL; Brown, LA; Rosa, ME; Washington, TA; and Greene, NP (2015) "AGING AND OBESITY: MITOCHONDRIA AT THE HEART OF THE PROBLEM," *International Journal of Exercise Science: Conference Proceedings*: Vol. 11: Iss. 3, Article 3. <https://digitalcommons.wku.edu/ijesab/vol11/iss3/3>
- ❖ Lee, J. W., & Ong, E. B. B. (2021). Genomic Instability and Cellular Senescence: Lessons From the Budding Yeast. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 619126. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.619126>
- ❖ Lemberger, T., Staels, B., Saladin, R., Desvergne, B., Auwerx, J., & Wahli, W. (1994). Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, 269(40), 24527–24530.
- ❖ Li, L., Huang, C., Pang, J., Huang, Y., Chen, X., & Chen, G. (2023). Advances in research on cell models for skeletal muscle atrophy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 167, 115517. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115517>
- ❖ Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 38(5-6), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9052-z>

- ❖ Li, Y., Tian, X., Luo, J. et al. Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. *Cell Commun Signal* 22, 285 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01663-1>
- ❖ Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education*, 30(4), 145–151. <https://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>
- ❖ Lim, P. S., Cheng, Y. M., & Wei, Y. H. (2002). Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. *Free radical research*, 36(3), 295–301. <https://doi.org/10.1080/10715760290019318>
- ❖ Lloyd A. C. (2013). The regulation of cell size. *Cell*, 154(6), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>
- ❖ Lockett, J., Inder, W. J., & Clifton, V. L. (2024). The Glucocorticoid Receptor: Isoforms, Functions, and Contribution to Glucocorticoid Sensitivity. *Endocrine reviews*, 45(4), 593–624. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnae008>
- ❖ Macfarlane E, Zhou H, Seibel MJ. Endogenous glucocorticoids during skeletal ageing. *Explor Endocr Metab Dis*. 2024;1:191–212. <https://doi.org/10.37349/eemd.2024.00016>
- ❖ Madej, A., Okopien, B., Kowalski, J., Zielinski, M., Wysocki, J., Szygula, B., Kalina, Z., & Herman, Z. S. (1998). Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 36(6), 345–349.
- ❖ Mandard, S., Müller, M., & Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(4), 393–416. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3216-3>
- ❖ Martini, H., & Passos, J. F. (2023). Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *The FEBS journal*, 290(5), 1186–1202. <https://doi.org/10.1111/febs.16361>
- ❖ Martins da Silva, R., de Oliveira Dumas Filho, C. R., Calixto, C., Nascimento da Silva, J., Lopes, C., da Silva Vaz, I., Jr, & Logullo, C. (2023). PEPCK and glucose metabolism homeostasis in arthropods. *Insect biochemistry and molecular biology*, 160, 103986. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103986>
- ❖ Masenga, S. K., Desta, S., Hatcher, M., Kirabo, A., & Lee, D. L. (2024). How PPAR- α mediated inflammation may affect the pathophysiology of chronic kidney disease. *Current research in physiology*, 8, 100133. <https://doi.org/10.1016/j.crphys.2024.100133>
- ❖ Meduri, G. U., & Chrousos, G. P. (2020). General Adaptation in Critical Illness: Glucocorticoid Receptor- α Master Regulator of Homeostatic Corrections. *Frontiers in endocrinology*, 11, 161. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00161>
- ❖ Merkulov, V.M., Merkulova, T.I. Glucocorticoid receptor isoforms generated by alternative splicing and alternative translation initiation. *Russ J Genet Appl Res* 2, 205–213 (2012). <https://doi.org/10.1134/S2079059712030070>
- ❖ Minetto, M. A., Giannini, A., McConnell, R., Busso, C., Torre, G., & Massazza, G. (2020). Common Musculoskeletal Disorders in the Elderly: The Star Triad. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 1216. <https://doi.org/10.3390/jcm9041216>
- ❖ Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of clinical investigation*, 132(13), e158447. <https://doi.org/10.1172/JCI158447>
- ❖ Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kielbus, M., & Stepulak, A. (2023). Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, 15(19), 4689. <https://doi.org/10.3390/cancers15194689>
- ❖ Mohamad Kamal, N. S., Safuan, S., Shamsuddin, S., & Foroozandeh, P. (2020). Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *European journal of cell biology*, 99(6), 151108. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>
- ❖ Mohammadi, A., Higazy, R., & Gauda, E. B. (2022). PGC-1 α activity and mitochondrial dysfunction in preterm infants. *Frontiers in physiology*, 13, 997619. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.997619>
- ❖ Montal, E. D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B. J., Ropell, A. E., Gordon, C., Liu, W. J., DeBerardinis, R. J., Sudderth, J., Twaddell, W., Boros, L. G., Shroyer, K. R., Duraisamy, S., Drapkin, R., Powers, R. S., Rohde, J. M., Boxer, M. B., Wong, K. K., & Gimun, G. D. (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Molecular cell*, 60(4), 571–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.025>
- ❖ Morava E. (2014). Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Molecular genetics and metabolism*, 112(4), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.06.002>
- ❖ Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- ❖ Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x)
- ❖ Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- ❖ Okamoto, K., Kasukawa, Y., Nozaka, K., Tsuchie, H., Kudo, D., Kinoshita, H., Ono, Y., Igarashi, S., Kasama, F., Harata, S., Oya, K., Kawaragi, T., Tominaga, K., Watanabe, M., & Miyakoshi, N. (2024). Changes in Skeletal Muscle Atrophy over Time in a Rat Model of Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Applied Sciences*, 14(19), 9106. <https://doi.org/10.3390/app14199106>
- ❖ Otsuka, E., Notoya, M., & Hagiwara, H. (2003). Treatment of myoblastic C2C12 cells with BMP-2 stimulates vitamin D-induced formation of osteoclasts. *Calcified tissue international*, 73(1), 72–77. <https://doi.org/10.1007/s00223-002-1071-0>

- ❖ Palikaras, K., Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 521, 525–528 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature14300>
- ❖ Panettieri, R. A., Schaafsma, D., Amrani, Y., Koziol-White, C., Ostrom, R., & Tliba, O. (2019). Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends in pharmacological sciences*, 40(1), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.11.002>
- ❖ Passaquin, A. C., Lhote, P., & Rüegg, U. T. (1998). Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *British journal of pharmacology*, 124(8), 1751–1759. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702036>
- ❖ Poulianiti, K. P., Karioti, A., Kaltsatou, A., Mitrou, G. I., Koutedakis, Y., Tepetes, K., Christodoulidis, G., Giakas, G., Maridaki, M. D., Stefanidis, I., Jamurtas, A. Z., Sakkas, G. K., & Karatzaferi, C. (2019). Evidence of Blood and Muscle Redox Status Imbalance in Experimentally Induced Renal Insufficiency in a Rabbit Model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 8219283. <https://doi.org/10.1155/2019/8219283>
- ❖ Poynter, M. E., & Daynes, R. A. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *The Journal of biological chemistry*, 273(49), 32833–32841. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32833>
- ❖ Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.021>
- ❖ Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(10), 1814–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.014>
- ❖ Rapa, S. F., Di Iorio, B. R., Campiglia, P., Heidland, A., & Marzocco, S. (2019). Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease-Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 263. <https://doi.org/10.3390/ijms21010263>
- ❖ Regulski M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 29(6), 168–174.
- ❖ Rius-Pérez, S., Torres-Cuevas, I., Millán, I., Ortega, Á. L., & Pérez, S. (2020). PGC-1α, Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 1452696. <https://doi.org/10.1155/2020/1452696>
- ❖ Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>
- ❖ Rustin, P., Munnich, A. & Rötig, A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet* 10, 289–291 (2002). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200793>
- ❖ Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., & Auwerx, J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *The EMBO journal*, 15(19), 5336–5348.
- ❖ Schoonjans, K., Staels, B., & Auwerx, J. (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of lipid research*, 37(5), 907–925.
- ❖ Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (2001). The potential of muscle stem cells. *Developmental cell*, 1(3), 333–342. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00049-1)
- ❖ Sekeris C. E. (1990). The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In vivo* (Athens, Greece), 4(5), 317–320.
- ❖ Serrano, E., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z., Roche, M., & Martinez Cantarin, M. P. (2022). Uremic Myopathy and Mitochondrial Dysfunction in Kidney Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13515. <https://doi.org/10.3390/ijms232113515>
- ❖ Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>
- ❖ Shreeya, T., Ansari, M. S., Kumar, P., Saifi, M., Shati, A. A., Alfaifi, M. Y., & Elbehairi, S. E. I. (2024). Senescence: A DNA damage response and its role in aging and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in aging*, 4, 1292053. <https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1292053>
- ❖ Souza, V. A., Oliveira, D.d, Mansur, H. N., Fernandes, N. M., & Bastos, M. G. (2015). Sarcopenia in chronic kidney disease. *Jornal brasileiro de nefrologia*, 37(1), 98–105. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20150014>
- ❖ Sreekumar, P. G., Hinton, D. R., & Kannan, R. (2020). The Emerging Role of Senescence in Ocular Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 2583601. <https://doi.org/10.1155/2020/2583601>
- ❖ Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V. A., Saladin, R., Fruchart, J. C., Dallongeville, J., & Auwerx, J. (1995). Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *The Journal of clinical investigation*, 95(2), 705–712. <https://doi.org/10.1172/JCI117717>
- ❖ Tachibana, K., Yamasaki, D., Ishimoto, K., & Doi, T. (2008). The Role of PPARs in Cancer. *PPAR research*, 2008, 102737. <https://doi.org/10.1155/2008/102737>
- ❖ Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in immunology*, 10, 1545. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>
- ❖ Tominaga K. (2015). The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiology of aging & age related diseases*, 5, 27743. <https://doi.org/10.3402/pba.v5.27743>
- ❖ Torres, M. J., Ryan, T. E., Lin, C. T., Zeczycki, T. N., & Neuffer, P. D. (2018). Impact of 17β-estradiol on complex I kinetics and H2O2 production in liver and skeletal muscle mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 293(43), 16889–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005148>

- ❖ Valieva, Y., Ivanova, E., Fayzullin, A., Kurkov, A., & Igrunkova, A. (2022). Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 12(10), 2309. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102309>
- ❖ Vasconsuelo, A., Milanesi, L., & Boland, R. (2010). Participation of HSP27 in the antiapoptotic action of 17 β -estradiol in skeletal muscle cells. *Cell stress & chaperones*, 15(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0132-y>
- ❖ Veronesi, F., Contartese, D., Di Sarno, L., Borsari, V., Fini, M., & Giavaresi, G. (2023). In Vitro Models of Cell Senescence: A Systematic Review on Musculoskeletal Tissues and Cells. *International journal of molecular sciences*, 24(21), 15617. <https://doi.org/10.3390/ijms242115617>
- ❖ Walters, H. E., Deneka-Hannemann, S., & Cox, L. S. (2016). Reversal of phenotypes of cellular senescence by pan-mTOR inhibition. *Aging*, 8(2), 231–244. <https://doi.org/10.18632/aging.100872>
- ❖ Wang, K., Liu, Q., Tang, M., Qi, G., Qiu, C., Huang, Y., Yu, W., Wang, W., Sun, H., Ni, X., Shen, Y., & Fang, X. (2023). Chronic kidney disease-induced muscle atrophy: Molecular mechanisms and promising therapies. *Biochemical pharmacology*, 208, 115407. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115407>
- ❖ Wang, X. H., Du, J., Klein, J. D., Bailey, J. L., & Mitch, W. E. (2009). Exercise ameliorates chronic kidney disease-induced defects in muscle protein metabolism and progenitor cell function. *Kidney international*, 76(7), 751–759. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.260>
- ❖ Watanabe, H., Enoki, Y., & Maruyama, T. (2019). Sarcopenia in Chronic Kidney Disease: Factors, Mechanisms, and Therapeutic Interventions. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 42(9), 1437–1445. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00513>
- ❖ Watson, M. L., Baehr, L. M., Reichardt, H. M., Tuckermann, J. P., Bodine, S. C., & Furlow, J. D. (2012). A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 302(10), E1210–E1220. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00512.2011>
- ❖ YAFFE, D., SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725–727 (1977). <https://doi.org/10.1038/270725a0>
- ❖ Yanar, K., Aydın, S., Cakatay, U., Mengi, M., Büyükpınarbaşılı, N., Atukeren, P., Sitar, M. E., Sönmez, A., & Uslu, E. (2011). Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109(6), 423–433. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00756.x>
- ❖ Yoh K, Ikeda K, Horie K, Inoue S. Roles of Estrogen, Estrogen Receptors, and Estrogen-Related Receptors in Skeletal Muscle: Regulation of Mitochondrial Function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(3):1853. <https://doi.org/10.3390/ijms24031853>
- ❖ Yuan, Y., Hakimi, P., Kao, C., Kao, A., Liu, R., Janocha, A., Boyd-Tressler, A., Hang, X., Alhoraibi, H., Slater, E., Xia, K., Cao, P., Shue, Q., Ching, T. T., Hsu, A. L., Erzurum, S. C., Dubyak, G. R., Berger, N. A., Hanson, R. W., & Feng, Z. (2016). Reciprocal Changes in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Pyruvate Kinase with Age Are a Determinant of Aging in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*, 291(3), 1307–1319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691766>
- ❖ Zaki K. Hassan-Smith, Stuart A. Morgan, Mark Sherlock, Beverly Hughes, Angela E. Taylor, Gareth G. Lavery, Jeremy W. Tomlinson, Paul M. Stewart, Gender-Specific Differences in Skeletal Muscle 11 β -HSD1 Expression Across Healthy Aging, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 100, Issue 7, 1 July 2015, Pages 2673–2681, <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1516>
- ❖ Zemaitis MR, Foris LA, Katta S, et al. (2024) Uremia. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441859/>
- ❖ Zhang, Y., Wu, W., Huang, C., & Lin, D. (2025). Fisetin Alleviates d-Galactose-Induced Senescence in C2C12 Myoblasts: Metabolic and Gene Regulatory Mechanisms. *Journal of proteome research*, 24(2), 834–849. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00939>
- ❖ Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9769-1>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την πολύτιμη καθοδήγηση και την συνεχή υποστήριξή της αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέλος της ομάδας της. Δεν υπάρχουν λόγια που μπορούν να εκφράσουν πλήρως την ευγνωμοσύνη μου για όλα όσα μου δίδαξε και μου πρόσφερε σε όλο αυτό το ερευνητικό ταξίδι. Το να είμαι μέλος της ομάδας της δεν ήταν απλώς μια ακαδημαϊκή εμπειρία αλλά μια όμορφη διαδρομή γεμάτη προκλήσεις και νέες γνώσεις. Την ευχαριστώ πολύ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή της, την ενθάρρυνση και την αμέριστη βοήθεια της σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τους καθηγητές Λεωνίδα Δημήτριο και Καρατσαφέρη Χριστίνα για την υποστήριξή τους και για τη συνεργασία μας στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα την κυρία Καρατσαφέρη για την χορηγία της κυτταρικής σειράς C2C12 και την παροχή των δειγμάτων ιστών κονίκλων, μετά από χειρισμούς των κονίκλων, που διεξήχθησαν στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με τους καθηγητές Στεφανίδη Ιωάννη, Τεπετέ Κωνσταντίνο, Σακκά Γεώργιο, και επιστημονική συνεργάτιδα Γεωργία Μήτρου, τους οποίους επίσης ευχαριστώ. Τα δείγματα αυτά κατεργάστηκαν περαιτέρω στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την βοήθεια, την φιλική τους στήριξη καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε σε όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Οι συζητήσεις μας και οι αμέτρητες στιγμές γέλιου θα μου μείνουν πραγματικά αξέχαστες.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου για την υποστήριξη, την κατανόηση και για όλες εκείνες τις στιγμές που ακόμη και αν ήμουν απορροφημένη στις υποχρεώσεις μου, καταφέρατε να με κάνετε να γελάσω. Το χιούμορ και η παρουσία σας ήταν από τα πιο όμορφα «διαλείμματα» αυτής της διαδρομής.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου και τα αδέρφια μου που με στηρίζουν ηθικά και πρακτικά σε κάθε μου βήμα. Η συμβολή τους, υπήρξε θεμελιώδης στην πορεία μου και τους οφείλω πολλά περισσότερα από όσα μπορούν να ειπωθούν με λέξεις.