



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ/ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.»**

ΜΠΟΥΡΝΟΒΑ ΕΛΕΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας – Διευθύντρια Εργαστηρίου Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Σύμβουλος/Συνεπιβλέπουσα))

Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ (Μέλος)

Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM

“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS

**«STUDY OF ANTIOXIDANT/ANTISENESCENT ACTIVITY OF PLANT
EXTRACTS IN MESENHYMAL STEM CELLS.»**

BOURNOVA ELENI

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τραχανά Βαρβάρα, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογίας και υπεύθυνη καθηγήτρια μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα σαν και αυτό και να της εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου για την άριστη συνεργασία μας και τη συμβολή της τόσο στην εκπόνηση της εργασίας μου, όσο και στη συγγραφή της. Η βοήθεια της ήταν καθοριστική και πολύτιμη για την υλοποίηση και την ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Ουτσκούνη Ζωζώ, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε κατά την υλοποίηση των πειραμάτων για να με βοηθά και να με καθοδηγεί και για όλες τις συμβουλές και τα σημαντικά στοιχεία που χρειαζόμουν κατά τη συγγραφή της εργασίας μου και δε δίστασε ποτέ να μου παρέχει.

Τέλος, το μεγαλύτερο και ουσιαστικότερο ευχαριστώ χρωστάω στους γονείς μου που με στήριξαν καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου και έκαναν το καλύτερο δυνατό για τη μόρφωση μου και για όσα μου πρόσφεραν σε όλα τα χρόνια της ζωής μου, αλλά και σε όλους τους οικείους μου για την κατανόηση και την συνεχή υποστήριξη και συμπαράσταση τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα, συγκεκριμένα τα μεσεγχυματικά και ιδίως αυτά που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs) αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την επιστημονική έρευνα, χάρη στις ευκαιρίες που προσφέρουν για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στην αναγεννητική ιατρική. Ένα από τα αντικείμενα της επιστημονικής κοινότητας, παγκοσμίως, είναι η χρήση των βλαστοκυττάρων για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης, μιας κυτταρικής κατάστασης που χαρακτηρίζεται από τη μόνιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και προκαλείται από στρεσογόνους παράγοντες. Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, μια νέα προοπτική στην αναγεννητική ιατρική προσφέρει η εφαρμογή φυτικών εκχυλισμάτων, σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα *in vitro*, προωθώντας, με τον τρόπο αυτό, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους και αποτρέποντας την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης. Υπάρχουν ενδείξεις για δυο φυτά, τα *Platanus orientalis* και *Viscum album*, σχετικά με την αντιοξειδωτική τους δράση και την καθυστέρηση της κυτταρικής γήρανσης ανθρώπινων κυττάρων, γεγονός που οδήγησε στην ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης αυτής της δράσης τους σε WJ-MSCs, το οποίο ήταν και το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Για την εξέταση του συγκεκριμένου ζητήματος, χρησιμοποιήθηκαν WJ-MSCs στα οποία πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις με φυτικά εκχυλίσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων από διάφορα μέρη των φυτών *Platanus orientalis* και *Viscum album* και έγινε, αρχικά, αξιολόγηση της αντιγηραντικής δράσης τους με τη δοκιμασία SA-β-gal. Η διαδικασία ανέδειξε τρία φυτικά εκχυλίσματα με ισχυρά προγηραντική δράση, αλλά και ένα με εμφανή αποτροπή επαγωγής κυτταρικής γήρανσης. Το εκχύλισμα που δεν επάγει την κυτταρική γήρανση, καθώς και ένα εξ αυτών που υπέδειξαν προγηραντική δράση χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον έπειτα από την επαγωγή εξωγενούς οξειδωτικού στρες, μέσω της επίδρασης με τον οξειδωτικό παράγοντα (H₂O₂) στα WJ-MSCs. Αξιολογήθηκε η προστατευτική ή όχι ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν έναντι των οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού, με σκοπό τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης 8-oxo-dG για την ανίχνευση οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε: (α) WJ-MSCs στα οποία έγινε επαγωγή οξειδωτικού στρες, (β) WJ-MSCs στα οποία εφαρμόστηκε φυτικό εκχύλισμα με προγηραντική δράση/ WJ-MSCs στα οποία εφαρμόστηκε φυτικό εκχύλισμα με προγηραντική δράση και επαγωγή οξειδωτικού στρες και (γ) WJ-MSCs στα οποία εφαρμόστηκε φυτικό εκχύλισμα που δεν επάγει κυτταρική γήρανση / WJ-MSCs στα

οποία εφαρμόστηκε φυτικό εκχύλισμα που δεν επάγει κυτταρική γήρανση και επαγωγή οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φυτικό εκχύλισμα που ευθυνόταν για την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα WJ-MSCs είχε και οξειδωτική δράση, ενώ το εκχύλισμα που δεν επάγει κυτταρική γήρανση επέδειξε και ισχυρά προστατευτική δράση έναντι των εξωγενώς επαγόμενων οξειδωτικών βλαβών. Το εκχύλισμα με την αντιοξειδωτική δράση και την ικανότητα αποτροπή της επαγωγής κυτταρικής γήρανσης είναι το *Platanus seeds aqua extract* σε συγκέντρωση 0,1%.

Όλα τα παραπάνω παρέχουν νέα στοιχεία ως προς την αντιγηραντική/αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων του φυτού *Platanus orientalis*, αναδεικνύοντας τη μεγάλη σημασία διαφοροποίησης της δράσης των διαφορετικών τμημάτων του φυτού, αλλά και των διαφορετικών εκχυλισμάτων, καθώς και την εξάρτηση της όποιας δράσης τους από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται.

ABSTRACT

Human stem cells, especially mesenchymal and in particular those derived from Wharton's jelly (WJ-MSCs) are an important tool for scientific research, thanks to the opportunities they offer for the development of new therapeutic strategies in regenerative medicine. On the other hand, one of the objects of the scientific community, worldwide, is the use of stem cells to study cellular senescence, a cellular condition characterized by the permanent cessation of cell cycle that is caused by stress factors. According to the current literature, a new perspective in regenerative medicine is offered by the use of plant extracts in *in vitro* cultures of mesenchymal stem cells, that are promoting their proliferation and differentiation and prevent the induction of cellular senescence. There are indications for two plants, *Platanus orientalis* and *Viscum album*, regarding their antioxidant capacity and the delay of cellular senescence of human cells, which led to the need of further investigation of this activity in WJ-MSCs, which was also the objective of this thesis.

To examine this specific topic, WJ-MSCs were used in order to study the effects of different concentrations of plant extracts from *Platanus orientalis* and *Viscum album*. Their ability to delay or postpone senescence was initially evaluated using the SA- β -gal assay. The assessment revealed three plant extracts which are strongly pro-senescent, but also one with obvious anti-senescence ability. The anti-senescent extract as well as one of those that showed pro-senescence activity were also added to WJ-MSCs culture after the induction of exogenous oxidative stress through their exposure to (H₂O₂). The protective capacity against oxidative DNA damage of the plant extracts was then evaluated. In particular, immunofluorescence was performed, with the aim to reveal the appearance of 8-oxo-dG, a common marker of oxidative DNA damage in: (a) WJ-MSCs in which oxidative stress was induced, (b) WJ-MSCs pre-treated with the pro-senescent plant extract followed by the induction of oxidative stress and (c) WJ-MSCs pre-treated with the anti-senescent plant extract followed by the induction of oxidative stress. The results showed that the plant extract that is responsible for inducing cellular senescence in WJ-MSCs caused also oxidative damage, while the extract with the anti-senescent effect showed a strong protective effect against exogenously induced oxidative damage. The extract with the antisenescent/antioxidant effect is *Platanus* seeds aqua extract at a concentration of 0.1%.

All of the above provide new evidence regarding the anti-senescence/antioxidant activity of *Platanus orientalis* extracts, highlighting the great difference in the activities of the different parts of the plant, of the different extracting methods, as well as the dependence of their abilities on the concentration used.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Ανθρώπινα Βλαστικά Κύτταρα	10
1.1.1. Ταξινόμηση βλαστοκυττάρων με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης	10
1.1.2. Ταξινόμηση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων με βάση την προέλευση τους	12
1.1.3. Χαρακτηριστικά και πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων	15
1.1.3.1. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)	16
1.1.4. Ανθρώπινα Βλαστικά Κύτταρα και σύγχρονες εφαρμογές	17
1.2. Κυτταρική γήρανση	18
1.2.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση	19
1.2.2. Πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες (SIPS)	20
1.2.3. Παράγοντες που οδηγούν σε γήρανση κυττάρων	20
1.2.5. Βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης	27
1.2.6. Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης	29
1.3. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) ...	31
1.3.1. Τα φυτικά εκχυλίσματα	31
1.4. Platanus orientalis (Ανατολικός πλάτανος)	32
1.5. Viscum album L. (Ευρωπαϊκό γκι)	34
2. ΣΚΟΠΟΣ	36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)	37
3.1.1. Δείγματα.....	37
3.1.2. Υλικά καλλιέργειας.....	37
3.1.3. Συνθήκες καλλιέργειας.....	38
3.1.4. Απόψυξη των WJ-MSCs	38
3.1.5. Ανακαλλιέργεια των WJ-MSCs.....	39
3.2. Επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα στα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τη γέλη του Wharton	40

3.3.	Προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal.....	41
3.3.1.	Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	41
3.3.2.	Πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε:.....	42
3.4.	Επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂) στα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τη γέλη του Wharton	42
3.5.	Ανίχνευση της 8-oxo-dG μέσω ανοσοφθορισμού σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες.....	44
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
4.1.	Αξιολόγηση της δράσης φυτικών εκχυλισμάτων επί της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης.	46
4.2.	Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton, τα οποία έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες, μέσω του παράγοντα H ₂ O ₂	51
4.3.	Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα της ουσίας (3) Platanus seeds aqua extract σε συγκέντρωση 0,1% και σε WJ-MSCs που εφαρμόστηκε επίδραση με το εκχύλισμα (3) 0,1% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες.	53
4.4.	Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton, στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με φυτικό εκχύλισμα της ουσίας (2) Platanus Aqua-Glycerin σε συγκέντρωση 10% και σε WJ-SCs που εφαρμόστηκε επίδραση με το εκχύλισμα (2) 10% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες.....	56
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ανθρώπινα Βλαστικά Κύτταρα

Τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία υπάρχουν τόσο σε έμβρυα, όσο και ενήλικους οργανισμούς και δίνουν γένεση σε διαφοροποιημένα κύτταρα, που αποτελούν δομικά στοιχεία ιστών και οργάνων (Kolios and Moodley, 2012; Zakrzewski *et al.*, 2019). Τα βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και συμβάλλουν στην αναγέννηση των ιστών (Yin, 2020).

Τα κύρια χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων είναι:

- α) η αυτοανανέωση, δηλαδή η ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται εκτενώς,
- β) η ικανότητα διαφοροποίησης τους.

Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων τύπων βλαστοκυττάρων. Για παράδειγμα, τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης, ενώ τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται σε ιστούς ενηλίκων έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, καθώς δεν πολλαπλασιάζονται εκτενώς και επιπλέον μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα ειδικά για ιστούς στους οποίους βρίσκονται.

1.1.1. Ταξινόμηση βλαστοκυττάρων με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης

Τα βλαστοκύτταρα ταξινομούνται με βάση το εύρος των δυνατοτήτων διαφοροποίησης σε παντοδύναμα, ολοδύναμα, πολυδύναμα, ολιγοδύναμα και μονοδύναμα (Sobhani *et al.*, 2017) (Εικόνα 1.1).

1.1.1.1. Παντοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (Totipotent Stem Cells)

Τα παντοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι τα πιο αδιαφοροποίητα κύτταρα και βρίσκονται στην πρώιμη ανάπτυξη. Ένα γονιμοποιημένο ωάριο και τα κύτταρα των δύο πρώτων διαιρέσεων είναι παντοδύναμα κύτταρα, καθώς διαφοροποιούνται τόσο σε εμβρυϊκούς όσο και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς, σχηματίζοντας έτσι το έμβρυο και τον πλακούντα (Kolios and Moodley, 2012). Τα παντοδύναμα βλαστοκύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται σε κύτταρα ολόκληρου του οργανισμού. Μετά από 4-6 ημέρες, περίπου, τα παντοδύναμα

βλαστοκύτταρα διαιρούμενα σχηματίζουν τη βλαστοκύστη, στο εσωτερικό της οποίας υπάρχουν τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα που θεωρούνται ολοδύναμα (Zakrzewski *et al.*, 2019).

1.1.1.2. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (Pluripotent Stem Cells)

Τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (PSCs) διαφοροποιούνται σε κύτταρα των τριών βλαστικών στοιβάδων εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα, αλλά δε σχηματίζουν εξωεμβρυϊκές δομές, όπως ο πλακούντας (Zakrzewski *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Τα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης των προεμφυτευτικών εμβρύων (εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα [ESCs]) ή μπορούν να προέλθουν από επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων (επαγόμενα PSCs [iPSCs]) (Yamanaka, 2020). Η πολυδυναμικότητα των PSCs είναι συνεχής: ξεκινάει από τα ολοδύναμα κύτταρα, όπως τα ESCs και τα iPSCs και καταλήγει σε βλαστοκύτταρα με μικρότερη ισχύ, που χαρακτηρίζονται ως πολυ-, ολιγο- ή μονο- δύναμα κύτταρα. (Zakrzewski *et al.*, 2019).

1.1.1.3. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (Multipotent Stem Cells)

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και διαφοροποιούνται σε κύτταρα από ένα μόνο βλαστικό στρώμα. Τα μεσεγχευματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) είναι τα πιο αναγνωρισμένα πολυδύναμα κύτταρα. Προέρχονται από μια ποικιλία ιστών συμπεριλαμβανομένου του μυελού των οστών, του λιπώδους ιστού, των οστών, της γέλης του Wharton, του αίματος του ομφάλιου λώρου και του περιφερικού αίματος. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστούς που προέρχονται από το μεσόδερμα, όπως ο λιπώδης ιστός, τα οστά, οι χόνδροι και οι μύες (Kolios and Moodley, 2012). Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα και χρήσεις για τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα: λειτουργούν ως σημαντικός παράγοντας στη διαδικασία της ανάπτυξης, της επισκευής ιστών και της προστασίας και έχουν εφαρμοστεί στη θεραπεία διαφορετικών διαταραχών (Sobhani *et al.*, 2017). Ένα παράδειγμα πολυδύναμου βλαστοκυττάρου είναι ένα αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων αίματος. Μετά τη διαφοροποίηση, ένα πολυδύναμο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο γίνεται ολιγοδύναμο (Zakrzewski *et al.*, 2019).

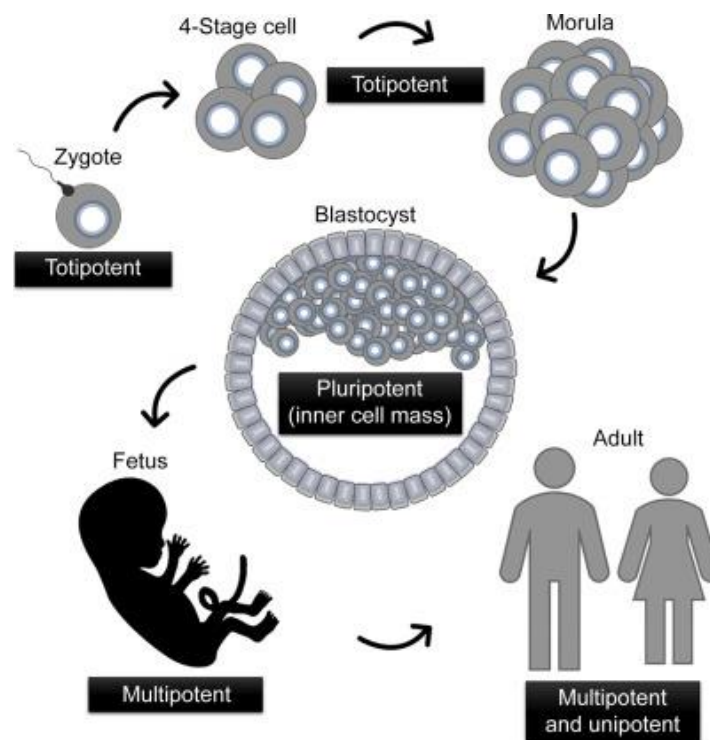
1.1.1.4. Ολιγοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (Oligopotent Stem Cells)

Τα ολιγοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι σε θέση να αυτοανανεώνονται και να σχηματίζουν δύο ή περισσότερες κυτταρικές σειρές σε έναν συγκεκριμένο ιστό. Για παράδειγμα, τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μυελοειδή

και λεμφοειδή κύτταρα , που είναι τυπικά παραδείγματα ολιγοδύναμων κυττάρων (Kolios and Moodley, 2012).

1.1.1.5. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (Unipotent Stem Cells)

Τα μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε έναν μόνο τύπο κυττάρου, σχηματίζοντας μια ενιαία γενεαλογία, όπως τα μυϊκά βλαστοκύτταρα και δημιουργώντας ώριμα μυϊκά και όχι άλλα κύτταρα (Kolios and Moodley, 2012; Zakrzewski *et al.*, 2019)



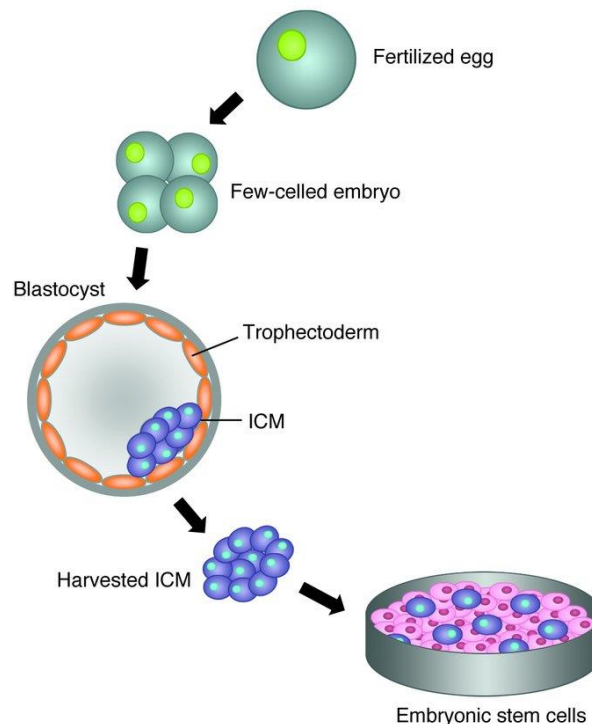
Εικόνα 1.1: Το εύρος της δυναμικότητας των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων (Łos, Skubis and Ghavami, 2019).

1.1.2. Ταξινόμηση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων με βάση την προέλευση τους

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν, επίσης, να ομαδοποιηθούν σε τρεις ευρείες κατηγορίες με βάση την προέλευσή τους: εμβρυϊκά και ενήλικα βλαστοκύτταρα και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Γενικά, τα εμβρυϊκά και τα iPSCs είναι ολοδύναμα, ενώ τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι ολιγοδύναμα ή μονοδύναμα.

1.1.2.1. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα (ESCs)

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι ολοδύναμα και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ικανότητα αυτοανανέωσης και δυναμικότητας (Kolios and Moodley, 2012; Sobhani et al., 2017). Προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, ένα στάδιο του προεμφυτευτικού εμβρύου, 5-6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ιστό των τριών πρωταρχικών βλαστικών στιβάδων, αλλά μπορούν επίσης να διατηρηθούν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, για παρατεταμένη περίοδο, σε μια καλλιέργεια (Kolios and Moodley, 2012) (Εικόνα 1.2).

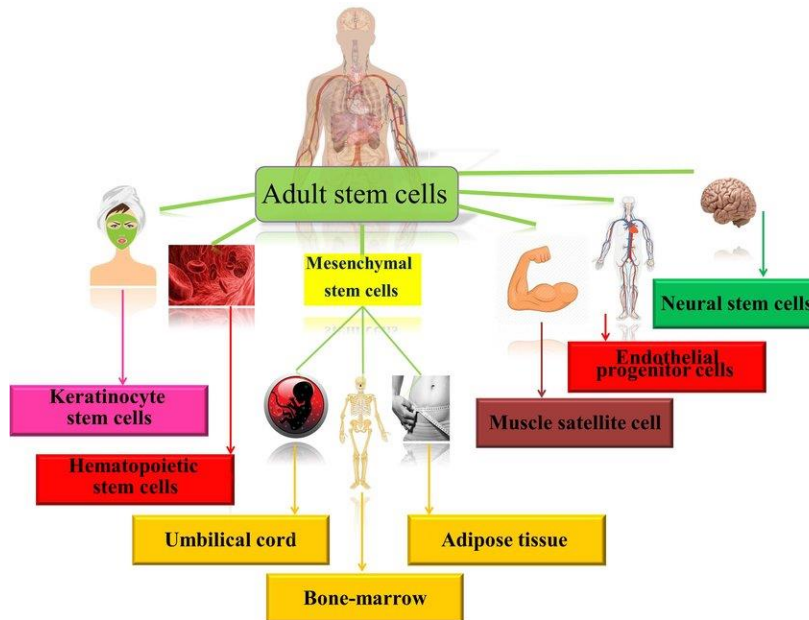


Εικόνα 1.2: Η προέλευση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (Łos, Skubis and Ghavami, 2019).

1.1.2.2. Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα (ASCs)

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα προέρχονται από ιστό ενηλίκων και είναι είτε πολυδύναμα είτε ολιγοδύναμα είτε μονοδύναμα. (Kolios and Moodley, 2012; Dulak *et al.*, 2015). Έχουν την ικανότητα να παράγουν τουλάχιστον έναν τύπο διαφοροποιημένων λειτουργικών απογόνων και έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, αφού δεν πολλαπλασιάζονται εκτενώς (Kolios and Moodley, 2012; Sobhani *et al.*, 2017). Παραδείγματα τέτοιων κυττάρων αποτελούν τα πολυδύναμα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα (MSCs), όπως είναι βλαστοκύτταρα που προέρχονται από ιστό του πλακούντα ή άλλους περιγεννητικούς ιστούς (Εικόνα 1.3). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταμόσχευση ενηλίκων βλαστοκυττάρων αποκαθιστά τα κατεστραμμένα όργανα *in vivo* και άλλες ότι τα

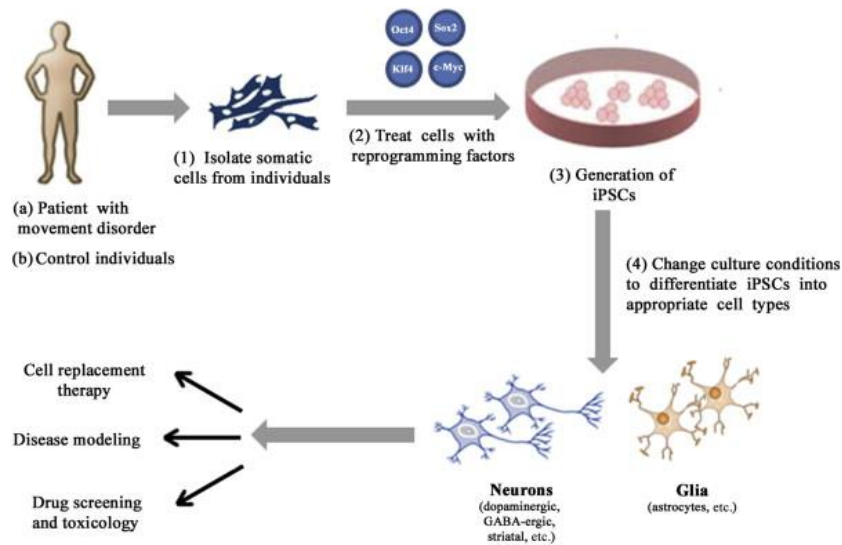
καλλιεργημένα ενήλικα βλαστοκύτταρα εκκρίνουν διάφορους μοριακούς μεσολαβητές με αντι-αποπτωτικές, ανοσοτροποποιητικές, αγγειογεννητικές και χημειοελκτικές ιδιότητες που προάγουν την αποκατάσταση (Kolios and Moodley, 2012).



Εικόνα 1.3: Πηγές προέλευσης ενήλικων βλαστοκυττάρων (Łos, Skubis and Ghavami, 2019).

1.1.2.3. Επαγόμενα Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (iPSCs)

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα παράγονται από ενήλικα σωματικά κύτταρα μέσω της εισαγωγής βασικών μεταγραφικών παραγόντων. Τα iPSCs μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε πολλούς τύπους κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα, παρέχοντας τεράστιες δυνατότητες στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής (Yoshihara, Hayashizaki and Murakawa, 2017) (Εικόνα 1.4). Μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα κύτταρα είναι παρόμοια με τα ανθρώπινα ESCs, όσον αφορά τη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, τα επιφανειακά αντιγόνα, τη γονιδιακή έκφραση, την επιγενετική κατάσταση τους και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς τύπους των τριών βλαστικών στοιβάδων in vitro (Kolios and Moodley, 2012).



Εικόνα 1.4: Πώς δημιουργούνται τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα iPSCs (Datta and Kim, 2015).

1.1.3. Χαρακτηριστικά και πηγές Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, που αναφέρονται επίσης ως πολυδύναμα στρωματικά κύτταρα ή μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs), έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης επιστημονικής έρευνας από την αρχική τους ανακάλυψη από τον Alexander Friedenstein στα τέλη της δεκαετίας του 1960, που εντοπίστηκαν για πρώτη φορά και απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών (Bernardo and Fibbe, 2013; Spees, Lee and Gregory, 2016).

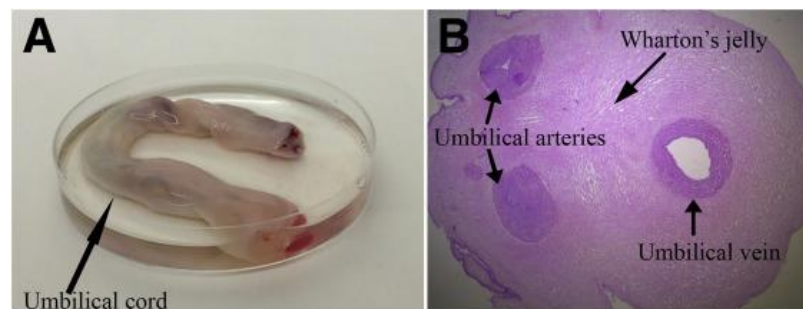
Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα, που μοιάζουν με ινοβλάστες και έχουν ειδική ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε κύτταρα του εξωδέρματος, του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος και πιο συγκεκριμένα σε λιποκύτταρα, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες (Bernardo and Fibbe, 2013; Ridge, Sullivan and Glynn, 2017). Έχουν, επίσης, ανοσοτροποποιητικά και αντιφλεγμονώδη οφέλη και είναι γνωστά ως αναγεννητικοί παράγοντες, καθώς η έρευνα έχει δείξει ότι, έχουν επανορθωτική λειτουργία σε πολλαπλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του πνεύμονα, του ήπατος, του εγκεφάλου και της καρδιάς (Ridge, Sullivan and Glynn, 2017; Ranjbaran *et al.*, 2018).

Τα MSCs αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας τρία χαρακτηριστικά: 1) προσκόλληση στον πυθμένα ειδικής φλάσκας καλλιέργειας, 2) διαφοροποίηση στα κύτταρα που αναφέρθηκαν πιο πάνω και 3) έκφραση ειδικών επιφανειακών δεικτών CD90, CD105, CD73 και CD44, καθώς και έλλειψη έκφρασης πολλών δεικτών συμπεριλαμβανομένων των CD34 και HLA-DR (Ranjbaran *et al.*, 2018).

Τα MSCs έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μυελό των οστών, λιπώδη ιστό, αρθρικό υμένα, δέρμα, σκελετικούς μύες, οδοντικό πολφό, ομφάλιο λώρο, πλακούντα και άλλους ιστούς, περιφερικό αίμα, κερατοειδή και αμφιβληστροειδή, ήπαρ και πάγκρεας (Musiał-Wysocka *et al.*, 2019).

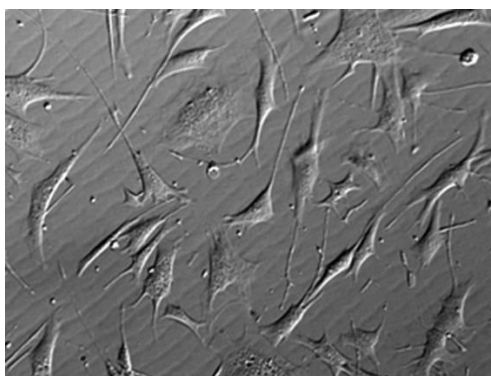
1.1.3.1. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο και ο πλακούντας συνδέονται με έναν ελαστικό συνδετικό ιστό, που εμποδίζει τα αγγεία του ομφάλιου λώρου από συμπίεση, στρέψη και κάμψη, παρέχοντας παράλληλα καλή κυκλοφορία του αίματος. Ανατομικά, αυτός ο συνδετικός ιστός αποτελείται από δύο ομφαλικές αρτηρίες και μια ομφαλική φλέβα, και οι δύο ενσωματωμένες σε μια συγκεκριμένη βλεννώδη μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνη, γνωστή ως γέλη του Wharton, η οποία στη συνέχεια καλύπτεται από αμνιακό επιθήλιο (Kim *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.5: (A) ομφάλιος λώρος, (B) η γέλη του Wharton (Wharton's jelly) (Liau *et al.*, 2020).

Στο παρελθόν, ο μυελός των οστών χρησιμοποιούνταν, συχνότερα, για τη λήψη μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, αλλά πλέον έχουν δημοσιευτεί πολλά άρθρα σχετικά με τη χρήση εμβρυϊκών κυττάρων και συγκεκριμένα τη χρήση βλαστοκυττάρων από τη γέλη του Wharton. Τα MSCs από τον ομφάλιο λώρο ή τη γέλη του Wharton, είναι εύκολα προσβάσιμα και λαμβάνονται περισσότερο συχνά, σε σύγκριση με τα βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών και των εμβρυϊκών. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs) έχουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και δεν μετατρέπονται σε τερατογόνα ή καρκινογόνα κύτταρα σε περίπτωση μεταμόσχευσης (Ranjbaran *et al.*, 2018).



Εικόνα 1.6: Καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (Ridge, Sullivan and Glynn, 2017).

1.1.4. Ανθρώπινα Βλαστικά Κύτταρα και σύγχρονες εφαρμογές

Η συμβολή των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων στη σύγχρονη ιατρική είναι πολύ σημαντική, καθώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμα τόσο για τη βασική έρευνα, όσο και για τις ευκαιρίες που προσφέρουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στην κλινική πράξη. Για παράδειγμα, τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα είναι εξαιρετικά εργαλεία για την κατανόηση της ανθρώπινης ανάπτυξης και της οργανογένεσης. Βλαστοκύτταρα, όπως τα iPSCs είναι κρίσιμα για τη διερεύνηση νέων και ασφαλών θεραπειών. Επιπλέον, τα βλαστοκύτταρα μπορούν να αντικαθιστούν τους κατεστραμμένους ιστούς ή ακόμη και να αναγεννούν όργανα (Kolios and Moodley, 2012).

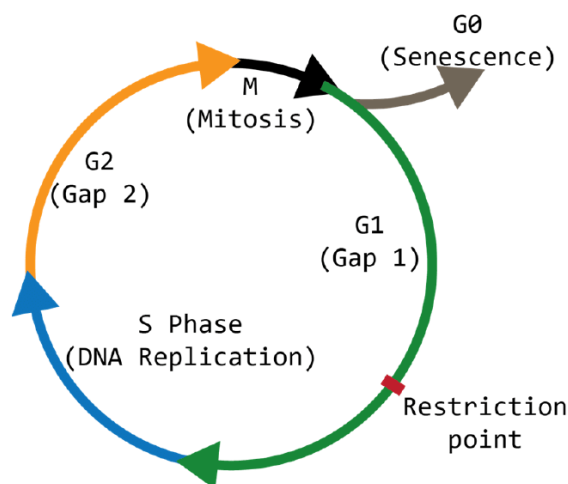
Η κυτταρική θεραπεία εφαρμόζεται, πλέον, σχεδόν σε κάθε εκφυλιστική διαταραχή, με προκλινικές και κλινικές μελέτες να δείχνουν αποτελέσματα σε ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, η κίρρωση, η πνευμονική ίνωση, η νόσος του Crohn, η καρδιακή ανεπάρκεια και οι διαταραχές του νευρικού συστήματος, χάρη στις ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των βλαστοκυττάρων (Kolios and Moodley, 2012).

Ωστόσο, υπάρχουν προκλήσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην κυτταρική θεραπεία και την αναγεννητική ιατρική με βλαστοκύτταρα. Τέτοια ζητήματα είναι η ανοσοαπόρριψη και ο σχηματισμός όγκων, εξαιτίας της γενετικής αστάθειας των βλαστοκυττάρων. Πράγματι, η πλαστικότητα και η αυτοανανέωση που χαρακτηρίζουν τα βλαστοκύτταρα θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση στον ιστό του ξενιστή, ενώ τερατώματα θα μπορούσαν να αναπτυχθούν από τη χρήση ESCs ή iPSCs στη θεραπευτική μεταμόσχευση κυττάρων. Τέλος, έχει τεθεί μια σειρά από ηθικούς προβληματισμούς κυρίως στη χρήση των ESCs. Αυτές περιλαμβάνουν τις ηθικές διαμάχες της καταστροφής ενός

εμβρύου (στο στάδιο της βλαστοκύστης) κατά την απομόνωση των ESCs, κατάσταση η οποία μπορεί πλέον να παρακαμφθεί δυνητικά από τη δημιουργία iPSCs (Kolios and Moodley, 2012).

1.2. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι μια κυτταρική κατάσταση που προκύπτει φυσιολογικά από στρεσογόνους παράγοντες και χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη και γενικά μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.7) με εκκριτικά χαρακτηριστικά, μακρομοριακές βλάβες και αλλοιωμένο μεταβολισμό (Gorgoulis *et al.*, 2019). Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε πολλαπλασιαζόμενα διπλοειδή κύτταρα, που υπόκεινται σε διαφορετικές καταπονήσεις και έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της πολλαπλασιαστικής διάρκειας ζωής τους. Είναι, δηλαδή, ένας κυτταρικός αμυντικός μηχανισμός, που εμποδίζει τα κύτταρα να συσσωρεύσουν βλάβες και συνοδεύεται από αποτυχία επανεισόδου στον κυτταρικό κύκλο, παρουσία μιτογόνων ερεθισμάτων, ενισχυμένο εκκριτικό φαινότυπο και αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης λαμβάνει χώρα σε πολλούς ιστούς, κατά τη διάρκεια διαφορετικών φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, όπως η αναδιαμόρφωση των ιστών, ο τραυματισμός, ο καρκίνος και η γήρανση του οργανισμού (Calcinotto *et al.*, 2019).



Εικόνα 1.7: Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Kennedy, Berrett and J., 2012).

Η κυτταρική γήρανση είναι μία από τις αιτιολογικές διεργασίες της γήρανσης του οργανισμού και είναι υπεύθυνη για διαταραχές, που σχετίζονται με το γεγονός ότι ένας οργανισμός γερνά. Η γήρανση είναι ένα φαινόμενο, που χαρακτηρίζεται από την προοδευτική μείωση της λειτουργίας πολλαπλών κυττάρων και ιστών. Σε οργανισμούς με ανανεώσιμους ιστούς, η γήρανση χαρακτηρίζεται, επίσης, από αύξηση των υπερπλασιών, οι πιο σοβαρές από

τις οποίες είναι οι καρκίνοι. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της γήρανσης είναι η σταδιακή απώλεια λειτουργίας, ή εκφυλισμός, που συμβαίνει σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο ιστών και ολόκληρου του οργανισμού. Η απώλεια λειτουργικότητας που σχετίζεται με την ηλικία είναι χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των οργανισμών που γερνούν, από μονοκύτταρα πλάσματα έως μεγάλα, πολύπλοκα ζώα (Campisi, 2013).

Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν, επίσης, να διαδραματίσουν θετικό ρόλο. Στην εμβρυογένεση και την αναδιαμόρφωση των ιστών, τα γηρασμένα κύτταρα απαιτούνται για τη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου και την επισκευή του ιστού. Στον καρκίνο, η γήρανση λειτουργεί ως ισχυρός φραγμός για την πρόληψη της ογκογένεσης. Ως εκ τούτου, η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός βασικών χαρακτηριστικών της γήρανσης, η πρόκληση γήρανσης σε καρκινικά κύτταρα ή η εξάλειψη των γηρασμένων κυττάρων με φαρμακολογικές παρεμβάσεις σε γηρασμένους ιστούς κερδίζει την προσοχή σε πολλά πεδία έρευνας (Calcinotto *et al.*, 2019).

Η κυτταρική γήρανση περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 60 χρόνια, όταν ανακαλύφθηκε ότι ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες έχουν ένα πεπερασμένο δυναμικό αναπαραγωγής σε καλλιέργεια, μετά το οποίο τα κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση μη αναστρέψιμης αναδιπλασιαστικής διακοπής του κυτταρικού κύκλου και η ανάπτυξη τους σταματά (Calcinotto *et al.*, 2019; Uyar *et al.*, 2020).

1.2.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση

Η αναδιπλασιαστική γήρανση ήταν ο πρώτος υπότυπος κυτταρικής γήρανσης που περιγράφηκε και προκαλείται από τη βράχυνση των τελομερών και την επακόλουθη αύξηση των αλλοιώσεων του DNA (Roger, Tomas and Gire, 2021). Παρατηρείται μια συνεχής μείωση του μήκους των τελομερών του DNA, σε κάθε κυτταρική διαίρεση (Calcinotto *et al.*, 2019; Uyar *et al.*, 2020). Η επακόλουθη απώλεια DNA, καθώς προχωρά ο χρόνος, ενεργοποιεί τελικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που αποκλείουν περαιτέρω κυτταρικές διαιρέσεις και έτσι ο κύκλος σταματά (Uyar *et al.*, 2020). Αυτό το βιολογικό ρολόι, είναι γνωστό ως «όριο Hayflick» και αντιπροσωπεύει φυσιολογική απόκριση των κυττάρων για την πρόληψη της συσσώρευσης βλαβών του DNA και συνεπώς της γονιδιωματικής αστάθειας (Calcinotto *et al.*, 2019).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έγινε σαφές ότι η αναδιπλασιαστική γήρανση, που οφείλεται στη βράχυνση των τελομερών, είναι μόνο ένας από τους πολλούς μηχανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική γήρανση (Uyar *et al.*, 2020).

1.2.2. Πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες (SIPS)

Τα διπλοειδή κύτταρα μπορούν, επίσης, να εμφανίσουν μια επιταχυνόμενη απόκριση στη γήρανση, ανεξάρτητα από τη βράχυνση των τελομερών, γνωστή ως πρόωρη γήρανση (Calcinotto *et al.*, 2019). Έχει θεωρηθεί, ως μια άλλη μορφή κυτταρικής γήρανσης, που ονομάζεται πρόωρη γήρανση η οποία προκαλείται από στρες (Stress Induced Premature Senescence-SIPS) και προσδιορίστηκε, αρχικά, χρησιμοποιώντας διάφορες κυτταρικές πιέσεις, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), το υπεροξείδιο του υδρογόνου, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και υπέρυθη ακτινοβολία (IR), που προκάλεσαν πρόωρα γήρανση, παρόμοια με το φαινόμενο, της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (Suzuki and Boothman, 2008; de Magalhães and Passos, 2018). Αυτή η μορφή γήρανσης εμφανίζεται και αμέσως μετά από άλλες προσβολές, όπως το γονοτοξικό στρες ή το μεταβολικό σοκ, που προκαλούνται στα κύτταρα υπό συνθήκες καλλιέργειας. Το ογκογόνο στρες που προκαλείται από την υπερέκφραση ορισμένων ογκογονιδίων ή την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επίσης προκαλεί πρόωρη γήρανση (Calcinotto *et al.*, 2019).

Τα κύτταρα που εμφανίζουν SIPS μοιράζονται πολλά κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα που υφίστανται αναδιπλασιαστική γήρανση. Η διαφορά μεταξύ των κυττάρων που υφίστανται αναδιπλασιαστική γήρανση και του SIPS φαίνεται να σχετίζεται με το χρόνο κατά τον οποίο εκφράζονται αυτά τα χαρακτηριστικά. Η αναδιπλασιαστική γήρανση είναι προγραμματισμένη και εμφανίζεται σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή όπου εκτίθενται τα άκρα των τελομερών DNA, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, ενώ το SIPS δεν προγραμματίζεται, αλλά είναι απόκριση σε ένα δεδομένο στρες. Το SIPS, δηλαδή, δεν ενεργοποιείται από δυσλειτουργικά τελομερή (Suzuki and Boothman, 2008).

1.2.3. Παράγοντες που οδηγούν σε γήρανση κυττάρων

Στους ενήλικους ιστούς, η γήρανση εμπλέκεται με την απόκριση των κυττάρων σε διαφορετικούς τύπους βλαβών (McHugh and Gil, 2018).

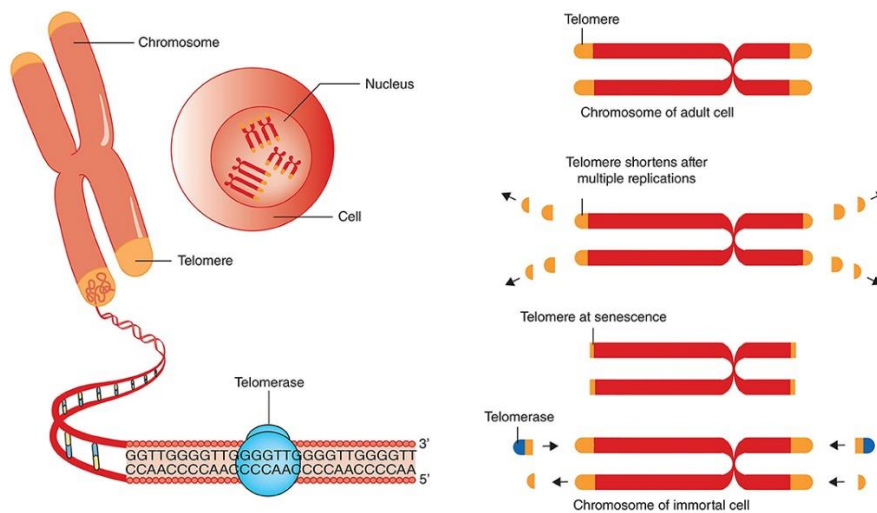
1.2.3.1. Βράχυνση τελομερών

Μία από τις προσβολές που προκαλούν τη γήρανση είναι η βλάβη των τελομερών. Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, που βρίσκονται στο τέλος των χρωμοσωμάτων και προστατεύονται από ένα σύμπλεγμα πολλαπλών πρωτεϊνών, γνωστές ως shelterin. Αυτές οι πρωτεΐνες πιστεύεται ότι διατάσσουν το τελομερικό DNA σε μια δομή βρόγχου, γνωστή ως βρόγχος T (McHugh and Gil, 2018). Στα σπονδυλωτά είναι διαδοχικές

επαναλήψεις της ακολουθίας TTAGGG. Η shelterin προλαμβάνει την ενεργοποίηση της απόκρισης σε μια βλάβη του DNA (DNA Damage Response-DDR), μέσω της κάλυψης των εκτεθειμένων άκρων του DNA, αποτρέποντας έτσι τις συγχωνεύσεις χρωμοσωμάτων από άκρο σε άκρο, που θα οδηγούσαν σε κρίση τελομερών (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014; McHugh and Gil, 2018). Το σύμπλεγμα shelterin αποτελείται από έξι πρωτεΐνες: TRF1, TRF2 και POT1, που αναγνωρίζουν την τελομερική αλληλουχία επανάληψης, και επιπλέον τις πρωτεΐνες TIN2, TPP1 και Rap1 (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014). Τα κύτταρα που στερούνται τις πρωτεΐνες shelterin, υφίστανται μια ανώμαλη απόκριση σε βλάβη στο DNA και πρόωρη επαγωγή γήρανσης (McHugh and Gil, 2018).

Η βράχυνση των τελομερών είναι ίσως ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός, που οδηγεί στη γήρανση των κυττάρων (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014). Εμφανίζεται κατά την κυτταρική διαίρεση, επειδή οι τυπικές DNA πολυμεράσες δεν μπορούν να αντιγράψουν πλήρως τα άκρα του DNA, ένα φαινόμενο που ονομάζεται πρόβλημα αντιγραφής τελικού τμήματος (end replication problem), με αποτέλεσμα τα κύτταρα να χάνουν 50-200 ζεύγη βάσεων τελομερικού DNA κατά τη διάρκεια κάθε S φάσης (Εικόνα 1.8). Τα ανθρώπινα τελομερή κυμαίνονται από μερικές κιλοβάσεις έως 10-15 kb σε μήκος, οπότε πραγματοποιούνται πολλές κυτταρικές διαιρέσεις προτού πρόβλημα αντιγραφής τελικού τμήματος καταστήσει τα τελομερή εξαιρετικά μικρά και δυσλειτουργικά. Μόνο ένα ή λίγα τέτοια τελομερή είναι αρκετά για να πυροδοτήσουν τη γήρανση. Το πρόβλημα αντιγραφής τελικού τμήματος είναι ένας σημαντικός, αλλά όχι ο μοναδικός, λόγος για τον οποίο τα φυσιολογικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι η βράχυνση των τελομερών συμβάλλει αιτιολογικά στην κυτταρική γήρανση, καθώς η υπερέκφραση της τελομεράσης, ενός ενζύμου ικανού να διατηρήσει το μήκος των τελομερών, είχε ως αποτέλεσμα την αθανатоποίηση των κυττάρων (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014).

Πιστεύεται ότι η προοδευτική απώλεια των επαναλήψεων των τελομερών αποσταθεροποιεί τους βρόχους T και, κατά συνέπεια, αυξάνει την πιθανότητα απομάκρυνσης του καλύμματος του τελομερούς. Η απομάκρυνση του καλύμματος των τελομερών, που οφείλεται στη βράχυνση των τελομερών, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι DDR. Το DDR προκαλεί μια παροδική διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επιτρέποντας στον μηχανισμό κυτταρικής επιδιόρθωσης να δράσει και να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA. Ωστόσο, εάν η ζημιά είναι ανεπανόρθωτη, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου μπορεί να γίνει μόνιμη και να οδηγήσει σε κυτταρική γήρανση (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014).



Εικόνα 1.8: Η διαδικασία βράχυνσης των τελομερών και η σταδιακή μείωση του μήκους τους (Vaiserman and Krasnienkov, 2021).

1.2.3.2. Οξειδωτικό στρες και πρόωρη γήρανση

Το αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι ένας περαιτέρω σημαντικός παράγοντας, ο οποίος ευθύνεται για τη γήρανση των κυττάρων (SIPS). Εμφανίζεται όταν η υπερπαραγωγή αντιδρώντων ειδών οξυγόνου (ROS)/αντιδρώντων ειδών αζώτου (RNS) υπερκαλύπτει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου (Varesi et al., 2022). Τα ROS που απελευθερώνονται είναι κύρια παραπροϊόντα του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και προκαλούν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα, μέσω της βλάβης μακρομορίων, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια ή νουκλεϊκά οξέα (Kramer et al., 2021).

Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και τα αντιδραστικά είδη αζώτου (RNS) πυροδοτούν τη γήρανση μέσω διαφορετικών μηχανισμών:

- μέσω της διέγερσης του παράγοντα NF-κB, η οποία προκαλεί τη μεταγραφή των κύριων παραγόντων που συνθέτουν τον εκκριτικό φαινότυπο, που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype-SASP)
- μέσω θραύσης της διπλής αλυσίδας DNA, που ενεργοποιεί μια παρατεταμένη απόκριση DDR, που οδηγεί στην κυτταρική γήρανση
- μέσω επιπλέον βλάβης των τελομερών, η οποία συνδέεται άμεσα με την κυτταρική γήρανση
- μέσω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων λόγω της παραγωγής και συσσώρευσης ROS/RNS και • μέσω της αναστολής του Nrf2, ενός κρίσιμου αντιοξειδωτικού μεταγραφικού παράγοντα (Varesi et al., 2022).

1.2.3.3. Βλάβες στο DNA και γήρανση

Τα κύτταρα εκτίθενται, συνεχώς, σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA, συμπεριλαμβανομένων των χημικών μεταλλαξιγόνων, της ακτινοβολίας και του οξειδωτικού στρες, που αναλύθηκε προηγουμένως. Για να διατηρηθεί η σταθερότητα του γονιδιώματος, μια εξελικτικά διατηρημένη οδός, γνωστή ως οδός απόκρισης σε βλάβη DNA (DDR), μπορεί να ανιχνεύσει τη βλάβη του DNA και να στρατολογήσει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης για να τη διορθώσει. Το DDR μεσολαβεί το παροδικό σημείο ελέγχου, μέσω της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης p53-p21, πριν από την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA. Ωστόσο, εάν η βλάβη του DNA δεν μπορεί να διορθωθεί, τα κύτταρα μπορεί είτε να υποστούν απόπτωση είτε να εισέλθουν σε κυτταρική γήρανση (Zhou, Borsa and Simon, 2021).

1.2.4. Φαινότυπος και δείκτες γηρασμένων κυττάρων

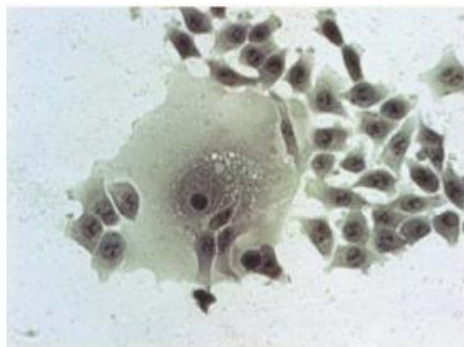
Το κύριο χαρακτηριστικό της κυτταρικής γήρανσης είναι η μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, συνοδευόμενη από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που μπορούν να αποτελέσουν βιο-δείκτες των γηρασμένων κυττάρων:

- αλλοιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων
- συσσώρευση βλαβών του DNA και αλλοίωση της χρωματίνης, που οδηγούν σε αστάθεια του γονιδιώματος
- αυξημένη δραστηριότητα της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal)
- εκκριτικός φαινότυπος, που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP) (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).

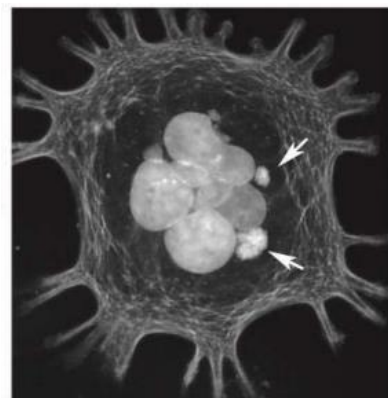
Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται ακόμη από αντίσταση στην απόπτωση και συχνά αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση και γλυκόλυση, μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων και αυξημένη παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) (Kirkland and Tchkonja, 2017).

1.2.4.1. Μορφολογία γηρασμένων κυττάρων

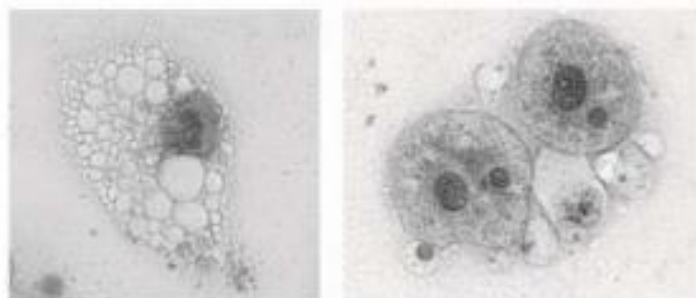
Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν μια συγκεκριμένη μορφολογία που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, γίνονται τεράστια και πεπλατυσμένα και μερικές φορές αυξάνουν το μέγεθός τους αρκετές δεκάδες φορές (Εικόνα 1.9). Επιπλέον, διαθέτουν κενοτόπια και λυσοσώματα στο κυτταρόπλασμα τους (Εικόνα 1.11), πολλούς ή/και μεγάλους πυρήνες (Εικόνα 1.10) και συχνά έχουν κοκκιώδη εμφάνιση (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).



Εικόνα 1.9: Γιγάντιο γηρασμένο κύτταρο που περιβάλλεται από μικρά κύτταρα (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).



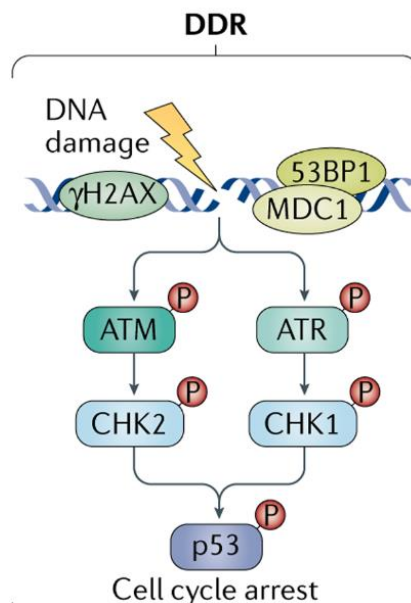
Εικόνα 1.10: Κύτταρο με πολλαπλούς πυρήνες και δυο μικροπυρήνες με συμπυκνωμένη χρωματίνη (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).



Εικόνα 1.11: Κύτταρο με κυτταροπλασματικά κενोटόπια (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).

1.2.4.2. Απόκριση στις βλάβες του DNA και κυτταρική γήρανση

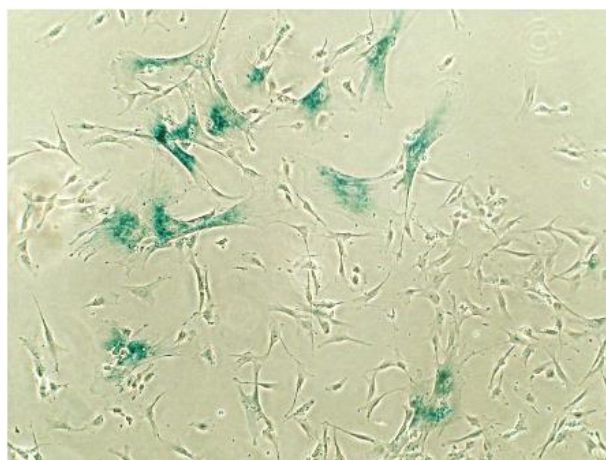
Οι βλάβες που δημιουργούνται στο πυρηνικό DNA αναφέρονται, συχνά, ως μια συνηθισμένη υποκείμενη αιτία κυτταρικής γήρανσης, κυρίως με τη μορφή θραύσης της διπλής έλικας του DNA (DSBs). (Di Micco et al., 2021). Όταν στο DNA συμβεί διπλό σπάσιμο και στις δυο αλυσίδες του, αυτό ανιχνεύεται από πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως «αισθητήρες», όπως οι ATM και οι ATR και ενεργοποιείται, έτσι, το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA, DDR (Εικόνα 1.12). Αυτές οι κινάσες «αισθητήρες» φωσφορυλιώνουν τους καθοδικούς διαμεσολαβητές CHK1 και CHK2 και p53 και συντονίζουν την επιδιόρθωση του DNA στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Όταν το DDR ενεργοποιηθεί ο κυτταρικός κύκλος σταματά, προκειμένου να αποτραπεί η διάδοση αλλοιωμένων γενετικών πληροφοριών στα θυγατρικά κύτταρα και να αποκατασταθεί η βλάβη (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016). Παράγοντες DDR συσσωρεύονται σε σημεία βλάβης του DNA, τροποποιώντας την χρωματίνη στα σημεία αυτά, π.χ. μέσω της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H2AX και άλλων πρωτεϊνών, όπως η 53BP1. Αυτές οι εστίες σηματοδοτούν μεμονωμένες θέσεις βλάβης του DNA και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου και στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μέχρι να αποκατασταθεί η βλάβη. Εάν, όμως, η βλάβη του DNA επιμένει, προκαλείται παρατεταμένη σηματοδότηση DDR και παρατεταμένη διακοπή του πολλαπλασιασμού, που οδηγεί στην κυτταρική γήρανση (Di Micco et al., 2021).



Εικόνα 1.12: Το σηματοδοτικό μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA (DDR) (Di Micco *et al.*, 2021).

1.2.4.3. Δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση

Η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση, που προσδιορίζεται εύκολα χρωματομετρικά, θεωρείται ένας από τους πρώτους βιοδείκτες τη γήρανσης και συνέβαλε καθοριστικά στην απόδειξη ότι κύτταρα με χαρακτηριστικά γήρανσης συσσωρεύονται σε γηρασμένους ιστούς σε διάφορα θηλαστικά αλλά και ιστούς ασθενών που πάσχουν από σχετιζόμενες με τη γήρανση νόσους (Di Micco *et al.*, 2021). Η β γαλακτοσιδάση είναι ένα λυσοσωμικό ένζυμο, το οποίο είναι ενεργό σε pH 6 (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016). Η δραστηριότητα SA-β-gal, τυπικά, μετράται με χρώση *in situ*, χρησιμοποιώντας ένα χρωμογόνο υπόστρωμα όπως το X-gal (Lee *et al.*, 2006) (Εικόνα 1.13). Η δραστηριότητα SA-β-gal προκύπτει από μια αυξημένη έκφραση του GLB-1, του γονιδίου που κωδικοποιεί τη λυσοσωμική βήτα-γαλακτοσιδάση (β-gal). Η αυξημένη έκφραση του GLB-1 mRNA και των επιπέδων της πρωτεΐνης β-gal προκύπτει από την αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητας των λυσοσωμάτων, η οποία πιθανώς οφείλεται στη συσσώρευση κατεστραμμένων μακρομορίων σε γηρασμένα κύτταρα (Jannone *et al.*, 2020). Σύμφωνα με μελέτες, παρατηρήθηκε η έκφραση του σε γηρασμένους, αλλά όχι σε νεαρούς ινοβλάστες. Αν και δεν είναι ειδική για τη γήρανση των κυττάρων, σήμερα είναι γνωστό ότι η β γαλακτοσιδάση είναι ενεργή σε μακροφάγα και σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και είναι ο πιο κοινός και χρήσιμος δείκτης για τον έλεγχο των γηρασμένων κυττάρων, λόγω της απλότητας της μεθόδου προσδιορισμού και της φαινομενικής εξειδίκευσής της για γηρασμένα κύτταρα (Lee *et al.*, 2006; Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016).



Εικόνα 1.13: Χαρακτηριστική εικόνα θετικών στη χρώση Xgal κυττάρων (τα κύτταρα που απεικονίζονται με μπλε είναι γηρασμένα) (Hass *et al.*, 2011).

1.2.4.4. Εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση SASP

Ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP) μπορεί να οριστεί ως ένα εξαιρετικά μεταβλητό, δυναμικό και μακροχρόνιο πρόγραμμα γηρασμένων κυττάρων, που συνίσταται στην άφθονη έκκριση προφλεγμονωδών μορίων στο μικροπεριβάλλον του ιστού (Jannone *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκκριση υψηλών επιπέδων παραγόντων που εμπλέκονται στη διακυτταρική σηματοδότηση, όπως φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1, IL-6), χημειοκινών, παραγόντων ανάπτυξης και αδιάλυτων συστατικών, αγγειογενετικών παραγόντων και μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) (Gorgoulis *et al.*, 2019; Jannone *et al.*, 2020). Οι κυτοκίνες αρχίζουν να εκκρίνονται μετά την καθιέρωση σηματοδότησης επίμονης βλάβης του DNA, που συνήθως σχετίζεται με τη γήρανση (Sikora, Mosieniak and Alicja Sliwinska, 2016). Ο φαινότυπος SASP αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων και διαμεσολαβεί πολλές από τις παθοφυσιολογικές επιδράσεις τους. Συγκεκριμένα, οι παράγοντες SASP εμπλέκονται με την εμφάνιση οργανισμικής γήρανσης, την επούλωση τραυμάτων και την πλαστικότητα των ιστών και επίσης, συμμετέχουν στην επίμονη χρόνια φλεγμονή. Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσουν σε στρατολόγηση ανώριμων ανοσοκατασταλτικών μυελοειδών κυττάρων σε όγκους προστάτη και ήπατος και να συμβάλλουν στην ογκογένεση, οδηγώντας την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Gorgoulis *et al.*, 2019).

1.2.5. Βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης

Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν πολλά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Kudlova, De Sanctis and Hajduch, 2022). Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη υποενότητα, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν ένα διευρυμένο και πεπλατυσμένο σχήμα αλλά και αυξημένη δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που σχετίζεται με τη γήρανση, η οποία παραμένει το χρυσό πρότυπο για την αναγνώριση γηρασμένων κυττάρων σε δείγματα καλλιέργειας και ιστών (Wang and Dreesen, 2018). Επειδή, όμως, κανένας δείκτης δεν είναι αρκετός από μόνος του για την αδιαμφισβήτητη αναγνώριση ενός γηρασμένου κυττάρου, συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυασμοί δεικτών και αναλυτικές τεχνικές για να αυξηθεί η ειδικότητα της ανίχνευσης (Kudlova, De Sanctis and Hajduch, 2022).

- **SA-β-gal δραστηριότητα**

Εκτός από τις προαναφερθείσες αλλαγές στο κυτταρικό μέγεθος και σχήμα, η γήρανση συχνά, όπως αναφέρθηκε, συνοδεύεται από αύξηση της λυσοσωμικής δραστηριότητας που μπορεί να ανιχνευθεί με ενζυματική χρώση. Το σχετιζόμενο με τη γήρανση, λυσοσωμικό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (SA-β-γαλακτοσιδάση), η οποία έχει βέλτιστο pH 4.0 αλλά στα γηρασμένα κύτταρα δρα σε pH 6. Για πολύ καιρό, το SA-β-gal ήταν το χρυσό πρότυπο για την ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων, αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν εγείρει ανησυχίες σχετικά με την ειδικότητά του. Κατά συνέπεια, η δραστηριότητα SA-β-gal δεν μπορεί να θεωρηθεί αρκετά ειδική για να ταυτοποιήσει τα γηρασμένα κύτταρα από μόνη της, αν και παραμένει ευρέως χρησιμοποιούμενη επειδή η δραστηριότητά της σχετίζεται στενά με τη γήρανση και την κατάσταση κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kudlova, De Sanctis and Hajdуч, 2022).

- **8-oxoG**

Η 8-οξογουανίνη (8-oxoG) είναι μία από τις πιο κοινές αλλοιώσεις του DNA και χαρακτηριστικός δείκτης γήρανσης. Προκύπτει από την οξειδωτική τροποποίηση της γουανίνης από τις ROS. Κατά τη διάρκεια της γήρανσης, η 8-oxoG συσσωρεύεται σε διάφορους ιστούς θηλαστικών. Καθώς το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες λόγω της δομής και της θέσης του, εμφανίζει αυξημένα 8-oxoG τόσο in vivo όσο και in vitro (Zhou, Borsa and Simon, 2021).

- **γH2AX, 53BP1**

Η πρωτεΐνη γH2AX, που είναι φωσφορυλιωμένη στο αμινοξύ Ser139 και η 53BP1 ανήκουν στις πρωτεΐνες του μονοπατιού DDR (μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA) και συσσωρεύονται σε περιοχές όπου έχει συμβεί δίκλωνη ρήξη του DNA. Οι δυο αυτές πρωτεΐνες θεωρούνται, συνεπώς, ευαίσθητοι δείκτες γήρανσης (Kudlova, De Sanctis and Hajdуч, 2022).

- **BrdU, EdU και Ki67**

Υπάρχουν ορισμένοι σημαντικοί αρνητικοί δείκτες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο που πρέπει απουσιάζουν από τα γηρασμένα κύτταρα. Ειδικότερα, οι αναλύσεις που βασίζονται στην ενσωμάτωση της βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) και/ή της 5-αιθυνυλ-2'-δεοξουριδίνης (EdU) [61] θα πρέπει να δείχνουν χαμηλή ή απουσία σύνθεσης τους. Παράλληλα, δεν πρέπει να παρατηρείται η έκφραση του Ki67, μιας πρωτεΐνης που εκφράζεται αποκλειστικά σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και υπάρχει σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός από τη G0 (Kudlova, De Sanctis and Hajdуч, 2022).

- **P16, pRB, p21, p53**

Όπως θα ήταν αναμενόμενο, οι πρωτεΐνες που ανήκουν στις οδούς επαγωγής της γήρανσης p16/RB και p53/p21 είναι, επίσης, κοινοί δείκτες γήρανσης (Kudlova, De Sanctis and Hajduch, 2022). Ο ρόλος τους θα αναλυθεί διεξοδικά στη συνέχεια.

1.2.6. Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης

Η κυτταρική διαίρεση είναι μια θεμελιώδης διαδικασία, της οποίας η εκτέλεση χωρίς σφάλματα είναι απαραίτητη για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Τα περισσότερα ανθρώπινα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα σταματούν οριστικά να διαιρούνται μετά από έναν πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων σε καλλιέργεια και εισέρχονται σε μια κατάσταση που ονομάζεται κυτταρική ή αναδιπλασιαστική γήρανση. Αυτά τα κύτταρα σταματούν, μη αναστρέψιμα, στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και δεν μπορούν πλέον να διαιρεθούν παρά το γεγονός ότι παραμένουν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

Η κυτταρική γήρανση σχετίζεται με την ανοδική ρύθμιση του p16INK4a στους περισσότερους ιστούς θηλαστικών. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την ενεργοποίηση πολλών μονοπατιών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης του αμφιβληστροειδούς pRb και του μονοπατιού p14Arf/p53 (Min *et al.*, 2014). Ερεθίσματα όπως το κυτταρικό στρες, οι βλάβες του DNA έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών p16INK4a και p14Arf, που συμμετέχουν στα αντίστοιχα μονοπάτια (Min *et al.*, 2014). Τα δύο αυτά μονοπάτια, όπου συμμετέχουν οι πρωτεΐνες p53 και pRb, αντίστοιχα, είτε αλληλεπιδρούν είτε λειτουργούν ανεξάρτητα για να σταματήσουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και να ξεκινήσουν τη γήρανση (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007).

- **Τα μονοπάτια p16INK4a-pRb και p14Arf-p53**

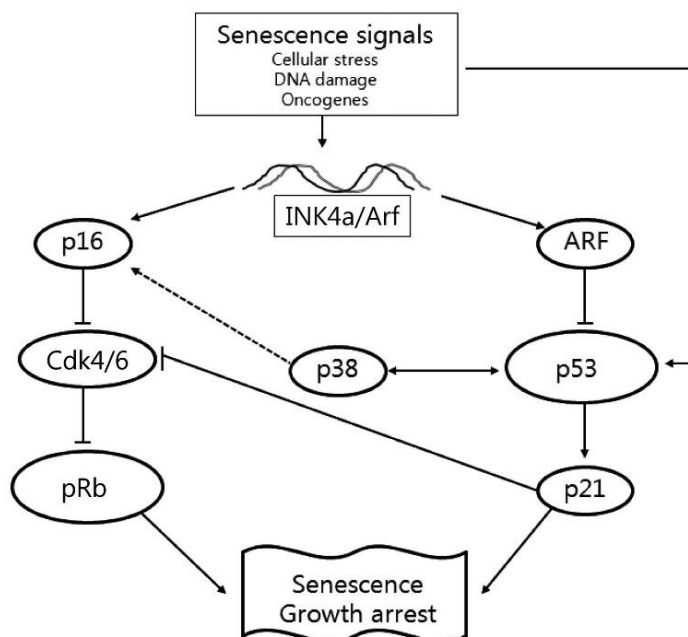
Η p16INK4a είναι ένας ισχυρός αναστολέας της μετάβασης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο (D'Arcangelo, Tinaburri and Dellambra, 2017). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του p16INK4a, με αποτέλεσμα την αναστολή της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης Cdk4/6. Αυτό οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της υποφωσφορυλιωμένης Rb, γεγονός που μειώνει την έκφραση του p16INK4a. Η αυξημένη, όμως, έκφραση του p16INK4a οδηγεί σε γήρανση, μέσω της οδού που περιγράφεται στη συνέχεια (Min *et al.*, 2014).

Μετά από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα (π.χ., βλάβη στο DNA, ογκογόνα σήματα), η p16 δεσμεύει άμεσα την Cdk4/6, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα κινάσης και αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση της pRb, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Έτσι, η pRb παραμένει συνδεδεμένη με τους παράγοντες E2Fs στο κυτταρόπλασμα, αποτρέποντας τη μεταγραφή που προκαλείται από E2F και καταλήγοντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου. Η μετάβαση από την προσωρινή στη σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η οποία περιλαμβάνει παρατεταμένη αναστολή της κυκλίνης με παρατεταμένη ενεργοποίηση της οδού p16, μπορεί να θεωρηθεί το αρχικό βήμα της κυτταρικής γήρανσης. Η γήρανση που προκαλείται από το p16 σχετίζεται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης ή/και τις εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση (SAHFs) (D'Arcangelo, Tinaburri and Dellambra, 2017).

Από την άλλη, ο καταστολέας όγκου p14Arf έχει αναδειχθεί ως ένας ενδιαφέρον υποψήφιος που συνδέεται με τη γήρανση. Η Arf είναι η δεύτερη πρωτεΐνη, μαζί με την p16, που εκφράζεται από τον γενετικό τόπο INK4a/Arf. Μετά από στρεσογόνο ερέθισμα, η έκφραση της Arf αυξάνεται, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνει την ικανότητα του MDM2 να προάγει την αποικοδόμηση της p53, οδηγώντας στη σταθεροποίηση και τη συσσώρευση της p53, αλλά συνεπώς την επαγγή της έκφρασης της p21.

Η αυξημένη έκφραση της Arf προκαλεί διακοπή της ανάπτυξης, ένα από τα χαρακτηριστικά της πρόωρης γήρανσης, μέσω της p21, ενός κρίσιμου μεταγραφικού στόχου της p53 και μεσολαβητής της, εξαρτώμενης από την p53, γήρανσης. Η p21 είναι αυτή που προκαλεί μια παροδική διακοπή της ανάπτυξης μετά από βλάβη στο DNA (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007; Min *et al.*, 2014). Το γεγονός που καθορίζει αν τα κύτταρα θα εισέλθουν στη διαδικασία της γήρανσης ή αν ο κυτταρικός τους κύκλος θα σταματήσει παροδικά, παραμένει άγνωστο. Αν η επιδιόρθωση του DNA είναι γρήγορη, η σηματοδότηση p53-p21 τερματίζεται, ο κυτταρικός κύκλος ξεκινά και το κύτταρο δεν οδηγείται σε γήρανση, ενώ η αργή, ατελής ή ελαττωματική επιδιόρθωση οδηγεί σε παρατεταμένη σηματοδότηση και γήρανση του κυττάρου. (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007).

Έτσι, οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες του τόπου INK4a/Arf λειτουργούν σε δυο διακριτές οδούς, που επάγουν τη γήρανση, καθώς η p16INK4a ρυθμίζει άμεσα την pRb, ενώ η 14Arf ρυθμίζει άμεσα την p53 και έμμεσα την pRb (Min *et al.*, 2014) (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Τα μονοπάτια p16INK4a-pRb και p14Arf-p53 στην επαγωγή της παύσης του κυτταρικού κύκλου και της έναρξης της κυτταρικής γήρανσης (Min *et al.*, 2014).

1.3.Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων σε μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα φυτά και τα προϊόντα τους χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υγείας και έχουν χρησιμοποιηθεί, εκτενώς, στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και αιώνες (Kornicka, Kocherova and Marycz, 2017; Saud, Malla and Shrestha, 2019). Η διερεύνηση της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα μπορεί να προσφέρει βαθύτερη κατανόηση της ευεργετικής τους επίδρασης και να αποκαλύψει τις οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία (Kornicka, Kocherova and Marycz, 2017).

1.3.1. Τα φυτικά εκχυλίσματα

Εκχυλίσματα από διαφορετικά μέρη ενός φυτού (ρίζα, φλοιός, λουλούδι, φύλλα και σπόροι) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαφορετικούς θεραπευτικούς σκοπούς (Saud, Malla and Shrestha, 2019). Τα φυτικά εκχυλίσματα είναι εμπλουτισμένα με φυτοχημικά συστατικά, όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και άλλες χημικές ουσίες που δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί και περιγραφεί, που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην εξαγωγή θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Όχι μόνο ολόκληρα εκχυλίσματα μπορεί να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες, αλλά και μεμονωμένα συστατικά, όπως η απλή πολυφαινόλη ή η

σαπωνίνη, μπορεί να ασκήσουν ευεργετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, το τμήμα του φυτού από το οποίο λαμβάνεται το εκχύλισμα επηρεάζει σημαντικά τη χημική του σύσταση.

Η επίδραση των φυτικών ενώσεων, για την προώθηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων *in vitro*, μπορεί να γίνει μια νέα προοπτική στην αναγεννητική ιατρική. Λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας και της οικονομικής τους προσιτότητας, οι ουσίες που προέρχονται από φυτά φαίνεται να είναι καλός υποψήφιος για τη μερική ή πλήρη υποκατάσταση συνθετικών διεγερτικών.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSCs, μετά από επίδραση με εκχυλίσματα φυτών, είναι υψηλός. Επιπλέον, έρευνες έδειξαν ότι ορισμένα εκχυλίσματα έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες που προκαλούν απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και άλλα ότι αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό και μειώνουν την κυτταρική γήρανση σε MSCs (Kornicka, Kocherova and Marycz, 2017). Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών πιθανά φέρουν νέες προοπτικές στη θεραπεία με βλαστοκύτταρα και την αναγεννητική ιατρική (Saud, Malla and Shrestha, 2019)

1.4. *Platanus orientalis* (Ανατολικός πλάτανος)

Το φυτό *Platanus orientalis* ή αλλιώς Ανατολικός πλάτανος είναι ένα από τα μεγαλύτερα και μακροβιότερα δέντρα της ανατολικής Μεσογείου και είναι εγγενές στη Βουλγαρία και τη Βόρεια Ελλάδα, στο βόρειο Ζάγκρος στο Ιράν και στο νότιο Καύκασο.

Ανήκει στο γένος *Platanus*, το οποίο αποτελείται από εννέα είδη, δύο από την Ευρώπη και την Ασία και τα υπόλοιπα από τη Βόρεια Αμερική, που εκτείνονται νότια ως το Μεξικό. Η οικογένεια του είναι η *Platanaceae*, από την οποία ο Πλάτανος είναι το μόνο σωζόμενο μέλος (Rix and Fay, 2017).

Ο *Platanus orientalis* είναι ένα μεγάλο φυλλοβόλο δέντρο, ιθαγενές στις εύκρατες περιοχές, ύψους 20 έως 25 μέτρων με διάμετρο 1 έως 3 μέτρα. Το σχήμα του δέντρου είναι μεταβλητό, μερικές φορές σχηματίζει έναν μόνο ψηλό κορμό, αλλά πιο συχνά διακλαδίζεται χαμηλά πάνω από το έδαφος, με πολλά κλαδιά από αυτό το ύψος και χωρίς ξεκάθαρο κορμό (Εικόνα 1.14). Ο πλάτανος δεν φυτρώνει στη σκιά. Τα αρσενικά άνθη έχουν πυκνά στρογγυλεμένα κεφάλια και το δέντρο είναι μονόχωρο στη φύση. Τα θηλυκά άνθη είναι παρόμοια με τα αρσενικά άνθη και ανθίζουν μεταξύ Μαρτίου και Μαΐου. Ο σπόρος ωριμάζει από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο. Τα πλατάνια γενικά πολλαπλασιάζονται με μοσχεύματα.

Ο πλάτανος είναι πολύ σημαντικό καλλωπιστικό δέντρο και στις περισσότερες περιοχές φυτεύεται ως σκιερό δέντρο, χρήσιμο για φύτευση σε λεωφόρους και δρόμους, γιατί είναι ανεκτικό στην ατμοσφαιρική ρύπανση (Sajid *et al.*, 2012) (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.14: Το δέντρο *Platanus orientalis* (Environment, Planning and Agency, 2007).



Εικόνα 1.15: Τα φύλλα του *Platanus orientalis* (Boya and Kullanilan, 2016).

Ο *Platanus orientalis* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία δερματολογικών, γαστρεντερικών ή ρευματικών παθήσεων, ενώ νανοσωματίδια (NPs) του έχουν, επίσης, συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντισηπτικές και

αναλγητικές ιδιότητες. Πρόσφατες αναλύσεις της χημικής σύστασης των καρπών του *P. orientalis* έδειξαν ότι χαρακτηρίζεται από την παρουσία λιπαρών οξέων, τερπενοειδών, κουμαρινών και ιδιαίτερα φλαβονοειδών και φλαβονοειδών γλυκοσιδίων. Αναφέρεται ότι τα NPs, που απομονώνονται από τους καρπούς του *P. orientalis* ασκούν αντιοξειδωτική δράση, ενεργοποιούν πρωτεοστατικούς μηχανισμούς και καθυστερούν τη γήρανση των οργανισμών ή τη γήρανση των ανθρώπινων κυττάρων (Chatzigeorgiou *et al.*, 2017).

1.5. Viscum album L. (Ευρωπαϊκό γκι)

Το γένος *Viscum* ανήκει στην οικογένεια Santalaceae ή Viscaceae, στην τάξη Santalales και περιλαμβάνει περίπου 100 είδη. Τα περισσότερα από αυτά εμφανίζονται στην Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και τη νότια Ασία, ενώ μόνο λίγα είδη είναι εγγενή στην Ευρώπη, την εύκρατη Ασία, τη Μαλαισία και την ανατολική Αυστραλία.

Το είδος *Viscum album* L., ή αλλιώς ευρωπαϊκό γκι, είναι ένας δημοφιλής ημιπαρασιτικός, αιθαλής θάμνος που εμφανίζεται στην Ευρώπη, τη βορειοδυτική Αφρική, τη νοτιοδυτική και την κεντρική Ασία. Αυτό το φυτό αναπτύσσεται σε διάφορα δέντρα και, ανάλογα με τον ξενιστή, έχουν διακριθεί υποείδη: *Viscum album* L. ssp., που εμφανίζεται σε φυλλοβόλα δέντρα, *Viscum album* ssp. *abietis* (Wiesb.) Abrom., που εμφανίζεται στο έλατο, ενώ το *Viscum album* ssp. *austriacum* (Wiesb.) Volim. φύεται κυρίως στο πεύκο (Önay-Uçar, Karagöz and Arda, 2006). Προμηθεύεται νερό, μέταλλα και οργανικές ενώσεις από τον ξενιστή και ταυτόχρονα πραγματοποιεί φωτοσύνθεση και παράγει ενώσεις πλούσιες σε ενέργεια. Ευδοκμεί από τον Νοέμβριο έως τον Μάρτιο, γιατί ανήκει στα λίγα αγγειόσπερμα που δεν πετούν τα φύλλα τους κατά τη διάρκεια του ευρωπαϊκού χειμώνα. Το ευρωπαϊκό γκι έχει σημαντικές οικολογικές λειτουργίες. Τα άνθη και τα μούρα του ωριμάζουν το χειμώνα και αποτελούν θρεπτική πηγή για πολλά έντομα και πουλιά (Schröder *et al.*, 2022).

Το ευρωπαϊκό γκι διαθέτει γραμμικά και λογχοειδή δερματώδη φύλλα που παραμένουν για αρκετές εποχές (Εικόνα 1.17). Τα κιτρινοπράσινα άνθη του και τα ημιδιαφανή και υπόλευκα μούρα αναπτύσσονται στα τέλη του φθινοπώρου και στις αρχές του χειμώνα (Εικόνα 1.18). Το *V. album* δεν αναπτύσσεται στο έδαφος, αλλά εξαπλώνεται στους κορμούς των δέντρων από πτηνά των οποίων τα περιττώματα περιέχουν σπόρους. Σε αντίθεση με άλλα φυτά, το *V. album* έχει περίοδο βλάστησης 12 μηνών, δεν αγγίζει ποτέ το έδαφος και ανθίζει κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Catarina *et al.*, 2021).



Εικόνα 1.17: Ενήλικο φυτό του είδους *Viscum album* (Catarina *et al.*, 2021).



Εικόνα 1.18: Τα φύλλα και οι καρποί του *Viscum album* (Box, 2019).

Το γκι χρησιμοποιείται στη φυτική του μορφή ως φάρμακο. Το βότανο αποτελείται από διχοτόμους κιτρινοπράσινους μίσχους και λογχοειδή, άμισχα φύλλα. Παραδοσιακά, το βότανο του ευρωπαϊκού γκι χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στη θεραπεία της υπέρτασης, του άγχους, της αϋπνίας, της εσωτερικής αιμορραγίας ή της αθηροσκλήρωσης και σε συμπληρωματικές θεραπείες καρκίνου (Nazaruk and Orlikowski, 2016). Τα εκχυλίσματα *V. album* θα μπορούσαν επίσης να μειώσουν τις επιβλαβείς και μεταλλαξιογόνες επιδράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που δημιουργούνται κατά την επίδραση του οξειδωτικού στρες, π.χ. μετά από τη χημειοθεραπεία του καρκίνου (Önay-Uçar, Karagöz and Arda, 2006)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία, έχει καταγραφεί η συμβολή των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στην επιστημονική έρευνα υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα τους και την λεπτομερή μελέτη της κυτταρικής γήρανσης. Ακόμη, πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορα φυτά. Τα στοιχεία αυτά προσφέρουν νέες προοπτικές για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών, που μπορούν να εφαρμοστούν στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής χρησιμοποιώντας τα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα σε συνδυασμό με τα ευεργετικά οφέλη των φυτικών εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε εκτενέστερα η αντιοξειδωτική/αντιγηραντική δράση φυτικών εκχυλισμάτων δυο φυτών σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs), για τα οποία υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συμβολή τους στην προστασία των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες, αλλά και στην καθυστέρηση της κυτταρικής γήρανσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

3.1.1. Δείγματα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από τη γέλη του Wharton ενός νεογέννητου βρέφους και καλλιεργήθηκαν για συγκεκριμένους πειραματικούς σκοπούς.

3.1.2. Υλικά καλλιέργειας

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας:

Για την καλλιέργεια των WJ-MSCs χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), το οποίο περιέχει:

- ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (σε αναλογία 10% v/v), που περιέχει αναπτυξιακούς παράγοντες (αμινοξέα, πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες).
- πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (σε αναλογία 1% v/v), αντιβιοτικά που προστατεύουν από παράγοντες μόλυνσης.

Το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

- Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS):

Το PBS είναι ένα ρυθμιστικό, υδατικό διάλυμα αλάτων, που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των WJ-MSCs, το οποίο διατηρεί σταθερό το pH των κυττάρων της καλλιέργειας. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, στους 25°C.

- Θρυψίνη:

Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που χρησιμοποιήθηκε κατά την καλλιέργεια, καθώς έχει την ιδιότητα να βοηθά τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνεια του μέσου καλλιέργειάς τους. Αποθηκεύεται στους 4°C και πριν τη χρήση της τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C, καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της.

3.1.3. Συνθήκες καλλιέργειας

- Η καλλιέργεια των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες πολυστυρένιου, με διαπερατό φίλτρο, που ωφελεί τα κύτταρα στην οξυγόνωση τους και στην αποφυγή μολύνσεων.
- Οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε απαγωγό-θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος εξασφαλίζει άσηπτες συνθήκες εργασίας, προκειμένου να αποφευχθούν οποιεσδήποτε εξωτερικές μολύνσεις.
- Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, σταθερής θερμοκρασίας 37°C και 5% συγκέντρωσης CO₂, συνθήκες που θεωρούνται πρότυπες για την σωστή ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων.
- Τέλος, η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχονταν καθημερινά σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.

3.1.4. Απόψυξη των WJ-MSCs

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton απομονώνονται, όπως προαναφέρθηκε, από τον ομφάλιο λώρο συγκεκριμένου δότη και στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευτούν σε τράπεζες υγρού αζώτου στους -150°C, σε συνθήκες ψύξης, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για οποιονδήποτε σκοπό. Για την ψύξη των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων χρησιμοποιούνται ειδικά φιαλίδια, τα cryovials. Τα cryovials περιέχουν 4x10⁶ κύτταρα/mL θρεπτικού υλικού DMEM, καθώς και FBS σε αναλογία 30%v/v και Dimethyl Sulfoxide (DMSO) σε αναλογία 10% v/v. Το DMSO είναι ένας οργανικός διαλύτης, ο οποίος βοηθά στη σταδιακή ψύξη των κυττάρων, προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων πάγου.

Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα βλαστοκύτταρα, για ερευνητικούς ή άλλους σκοπούς, είναι απαραίτητη η απόψυξή τους μέσα στον απαγωγό, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθήκη 2mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM σε falcon 15mL
- Μεταφορά του cryovial, που περιέχει τα βλαστοκύτταρα, στο υδατόλουτρο (37°C) για 10 έως 15 δευτερόλεπτα
- Απόχυση του περιεχομένου του cryovial στο falcon των 15ml με το θρεπτικό μέσο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1800rpm, για 5-7 λεπτά και στους 25°C
- Απόρριψη του υπερκειμένου

- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1800rpm, για 5-7 λεπτά και στους 25°C
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 2mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM
- Μεταφορά των κυττάρων, που βρίσκονται στο falcon, σε φλάσκες από πολυστυρένιο
- Προσθήκη 3mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM για την επίτευξη τελικού όγκου 10mL
- Επώαση κυττάρων στον κλίβανο επώασης

3.1.5. Ανακαλλιέργεια των WJ-MSCs

Μόλις τα καλλιεργούμενα βλαστοκύτταρα καλύψουν το 60-80% της επιφάνειας της φλάσκας, πρέπει να ανακαλλιεργηθούν, διότι έχουν εξαντληθεί τόσο τα συστατικά του θρεπτικού μέσου, όσο και ο διαθέσιμος χώρος της φλάσκας. Τα κύτταρα, δηλαδή, τοποθετούνται σε δυο νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό υλικό, προκειμένου να συνεχίσουν να αναπτύσσονται ομαλά. Για τη διαδικασία αυτή ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Απόρριψη παλαιού θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- Πλύση των κυττάρων δύο φορές με 5ml διαλύματος PBS
- Προσθήκη 1,5mL θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο για 3,5 λεπτά, για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας
- Παρατήρηση των κυττάρων στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο, ώστε να διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, χάρη στη θρυψίνη
- Προσθήκη μέσα στη φλάσκα 5mL από το νέο πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο απενεργοποιεί την θρυψίνη
- Μεταφορά όλης της ποσότητας του θρεπτικού υλικού μαζί με τα κύτταρα σε δύο νέες φλάσκες (σε κάθε φλάσκα προστίθενται 5 mL)
- Συμπλήρωση 5mL πλήρους θρεπτικού μέσου σε κάθε φλάσκα ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φλάσκα να είναι 10mL
- Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο επώασης για την ανάπτυξη τους σε πρότυπες συνθήκες

3.2.Επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα στα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τη γέλη του Wharton

Όταν τα καλλιεργούμενα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα καλύψουν περίπου το 70% της επιφάνειας της φλάσκας, τότε μοιράζονται σε 6-well plate το οποίο φέρει έξι πηγαδάκια (wells), μέσα σε νέο θρεπτικό υλικό, όπου τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, γίνεται επίδραση στα κύτταρα με 10 διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα, τα οποία προέρχονται από δυο φυτά: το *Platanus orientalis* και το *Viscum album*. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις επιδράσεις είναι τα ακόλουθα:

1. *Platanus Fermented* (υδατικό εκχύλισμα που έχει υποστεί ζύμωση)
2. *Platanus Aqua-Glycerin* (υδατικό εκχύλισμα με γλυκερίνη)
3. *Platanus seeds aqua extract* (υδατικό εκχύλισμα)
4. *Platanus tratol extract*
5. *Platanus methanol* (μεθανολικό εκχύλισμα)
6. *Platanus Seeds Fermented* (υδατικό εκχύλισμα που έχει υποστεί ζύμωση)
7. *Viscum Bark* (εκχύλισμα φλοιού ιξού)
8. *Viscum Seeds* (εκχύλισμα σπόρων ιξού)
9. *Leaf extract* (εκχύλισμα φύλλων με γλυκερίνη)
10. *Viscum Leaves* (εκχύλισμα φύλλων)

Τα εκχυλίσματα 1-6 προέρχονται από το *Platanus orientalis* και τα 7-10 από το *Viscum album* και χρησιμοποιήθηκαν σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις η καθεμία: 0,1%, 1% και 10%. Κάθε εκχύλισμα τοποθετήθηκε, σε κάθε συγκέντρωση, σε ένα πηγαδάκι του 6-well plate, που περιείχε κύτταρα, για 48 ώρες και τα κύτταρα παρατηρούνταν ανά 24 ώρες.

• Πρωτόκολλο που ακολούθηθηκε:

- Απόρριψη παλαιού θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα, εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70% της επιφάνειας της φλάσκας
- Πλύση των κυττάρων δύο φορές με 5mL διαλύματος PBS
- Μεταφορά 200.000 κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate και συμπλήρωση με πλήρες θρεπτικό μέσο, ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι να είναι 1,5mL
- Τοποθέτηση του 6well στον κλίβανο για 24 ώρες, ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν σε πρότυπες συνθήκες
- Μετά από 24 ώρες, απόρριψη παλαιού θρεπτικού υλικού από το 6well
- Πλύση των κυττάρων δύο φορές με 1mL διαλύματος PBS

- Προσθήκη των 10 διαφορετικών εκχυλισμάτων (τα οποία βρίσκονται διαλυμένα μέσα σε πλήρες θρεπτικό μέσο) και στις τρεις συγκεντρώσεις, 0,1%, 1%, 10%, σε κάθε πηγαδάκι
- Τοποθέτηση του dwell στον κλίβανο επώασης για 48 ώρες (τα κύτταρα παρατηρούνται ανά 24 ώρες).

3.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των φυτικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις επιδράσεις και να αξιολογηθεί η γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal, του πιο κοινού δείκτη αξιολόγησης της γήρανσης. Η γήρανση των κυττάρων μπορεί να οπτικοποιηθεί, μέσω της ταυτοποίησης της αυξημένης ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, η οποία παράγεται από τα λυσοσώματα γηρασμένων κυττάρων σε μεγάλο ποσοστό και ανιχνεύεται με τη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος Xgal (5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοζίτης). Όταν το Xgal διασπαστεί από τη β-γαλακτοσιδάση σε pH=6, δίνει χρώμα μπλε. Έτσι, τα γηρασμένα κύτταρα βάφονται μπλε και διακρίνονται από τα φυσιολογικά, παρατηρώντας τα στο μικροσκόπιο.

3.3.1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

A. Διάλυμα μονιμοποίησης (Fixative solution): 2% φορμαλδεΰδη/ 0,2 % γλουταραλδεΰδη σε PBS

B. Διάλυμα χρώσης (Staining solution):

- Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM κιτρικό οξύ/φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) σε pH 6.0
- 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$
- 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$
- 150 mM NaCl
- 2 mM MgCl_2
- 1 mg/mL Xgal

3.3.2. Πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την κυτταροκαλλιέργεια (από το 6 well plate όπου έγιναν οι επιδράσεις)
- Πλύση με κρύο PBS, δύο φορές
- Προσθήκη διαλύματος μονιμοποίησης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 5 λεπτά
- Πλύση με κρύο PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1-2 mL διαλύματος χρώσης σε κάθε πηγαδάκι του well plate
- Επώαση στους 37°C για 6–24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο
- Απομάκρυνση διαλύματος χρώσης
- Πλύση με κρύο PBS (τρεις φορές)
- Λήψη φωτογραφιών σε οπτικό μικροσκόπιο

3.4.Επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) στα ανθρώπινα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τη γέλη του Wharton

Για την περαιτέρω μελέτη της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις επιδράσεις στα WJ-SCs, έγινε επαγωγή οξειδωτικού στρες, με τη χρήση εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα (υπεροξείδιο του υδρογόνου). Η επαγωγή του οξειδωτικού στρες έγινε σε WJ-MSCs, στα οποία προηγουμένως πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ενός φυτικού εκχυλίσματος που είχε προγηραντική και ενός που είχε αντιγηραντική δράση, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal. Η ανάκαμψη των κυττάρων έγινε για 1 ώρα απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και φυτικών ουσιών, δηλαδή τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας.

- **Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:**
 - Φυτικά εκχυλίσματα 3 και 2 διαλυμένων σε πλήρες θρεπτικό υλικό
 - Αρχικό διάλυμα H₂O₂
 - Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ορό FBS για την δημιουργία διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης 300 μM
- **Πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε:**
 - Μεταφορά 200.000 κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate

- Μεταφορά του 6 well στον κλίβανο επώασης και ανάπτυξη των κυττάρων σε πρότυπες συνθήκες σε πλήρες θρεπτικό μέσο
- Αφού επιτευχθεί 70% confluency, αφαίρεση πλήρους θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια
- Πλύση των κυττάρων με 1ml PBS
- Δημιουργία διαλύματος H_2O_2 το οποίο περιέχει H_2O_2 συγκέντρωσης 300 μM διαλυμένο σε σκέτο θρεπτικό υλικό, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικά
- Σήμανση του 6-well plate και πραγματοποίηση επιδράσεων με βάση το παρακάτω πρότυπο:

NT	H_2O_2 1h	2
3	2 + H_2O_2 1h	3 + H_2O_2 1h

Εικόνα 2.1: Συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο 6-well plate για την επίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

- ❖ **NT:** No treatment, δηλαδή κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε διάλυμα H_2O_2 , ούτε και φυτικές ουσίες και αποτελούν τα control.
- ❖ **NT 1h:** κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα H_2O_2 για 30 λεπτά και ανάκαμψαν για 1h.
- ❖ **2:** κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με το εκχύλισμα 2 για 48 ώρες.
- ❖ **3:** κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τ εκχύλισμα 3 για 48 ώρες.
- ❖ **2+ H_2O_2 1h:** κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με το εκχύλισμα 4 για 48 ώρες και μετά την αφαίρεση του, επίδραση με διάλυμα H_2O_2 για 30 λεπτά και ανάκαμψη 1 ώρα.
- ❖ **3+ H_2O_2 1h:** κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με το εκχύλισμα 3 για 48 ώρες και μετά την αφαίρεση του, επίδραση με διάλυμα H_2O_2 για 30 λεπτά και ανάκαμψη 1 ώρα.
- ❖ Όλες οι επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό θάλαμο και έπειτα το 6-well plate τοποθετείται μέσα στον επωαστικό κλίβανο για τους αντίστοιχους χρόνους που αναγράφονται πιο πάνω.

Η ανάκαμψη των κυττάρων πραγματοποιείται ως εξής:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια, αφού πραγματοποιηθούν οι επιδράσεις για τους χρόνους που αναφέρθηκαν
- Διπλή πλύση κυττάρων με 1ml PBS
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM
- Μεταφορά του 6-well plate στον κλίβανο επώασης, για 1 ώρα.

3.5.Ανίχνευση της 8-οχο-dG μέσω ανοσοφθορισμού σε μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες

- **Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν:**
 - αντίσωμα 8-οχο-dG (1:200, Clone 2E2, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)
 - κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα.
- **Πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε:**
 - Μεταφορά 5×10^4 κυττάρων σε 6-well plate και ανάπτυξη τους στον κλίβανο επώασης σε πρότυπες συνθήκες για 24 ώρες
 - Απομάκρυνση παλαιού θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια
 - Πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS
 - Προσθήκη διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 300 μM και τοποθέτηση του 6-well plate στον πάγο
 - Τριπλή πλύση με διάλυμα PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων για 15 λεπτά μέσω διαλύματος μεθανόλης ($-20^\circ C$) και για άλλα 15 λεπτά μέσω διαλύματος ακετόνης ($-20^\circ C$). Τα κύτταρα αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα
 - Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι 0,05N HCL για 5 λεπτά μέσα σε πάγο
 - Πλύση με διάλυμα PBS για 5 λεπτά, τρεις φορές
 - Επώαση με 250 μl διαλύματος RNAase (100 $\mu g/ml$) σε NaCl (150mM), κιτρικό νάτριο (15mM) για 1 ώρα στους $37^\circ C$
 - Διαδοχικές πλύσεις με PBS, και διάλυμα EtOH 35%, 50%, 75% για 3 λεπτά το καθένα
 - Πλύση με διάλυμα αιθανόλης 70% που περιέχει 4% v/v φορμαλδεΰδη, διάλυμα αιθανόλης 50% και 35% και PBS, για 2 λεπτά το καθένα

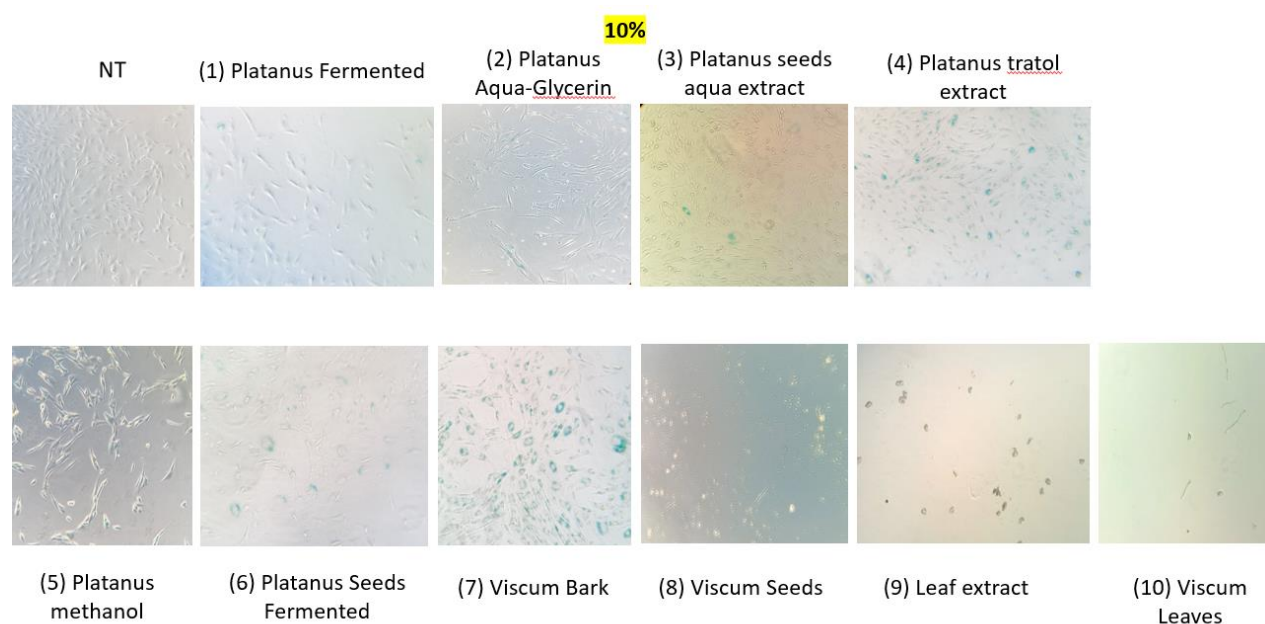
- Επώαση με 250μL διαλύματος Proteinase K (5μg/ml) σε 20mM Tris, 1mM EDTA (pH 7,5) για 10 λεπτά στους 37°C
- Πλύση με PBS για αρκετές φορές
- Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων με 5% ορό κατσίκας σε PBS για 1 ώρα
- Τριπλή πλύση με PBS
- Επώαση με 250μL αντισώματος έναντι της 8-υδροξογουανίνης συγκέντρωσης 1:250, το οποίο είναι αραιωμένο σε PBS, που περιέχει 1% BSA και 0,01% Tween20
- Πλύση για 5 λεπτά με PBS, που περιέχει 0,05% Tween, αρκετές φορές
- Επώαση με 250μL δευτεροταγές αντίσωμα goat anti-mouse IgG συγκέντρωσης 5μg/mL, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBS που περιέχει 1% BSA, για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση αρκετές φορές με PBS, που περιέχει 0,05% Tween20
- Ξέπλυμα με απιονισμένο νερό

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

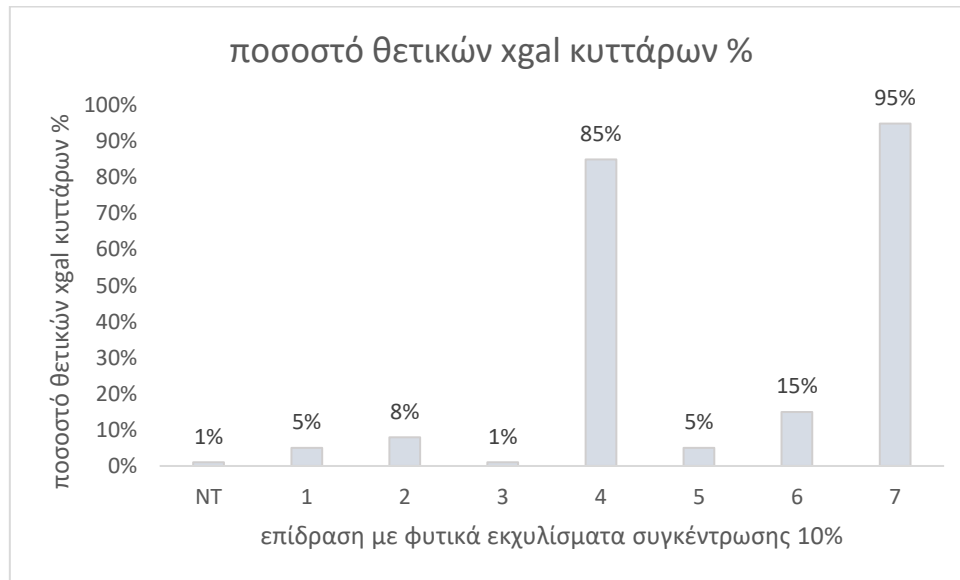
4.1. Αξιολόγηση της δράσης φυτικών εκχυλισμάτων επί της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης.

Χρησιμοποιήθηκαν WJ-MSCs (passage 17), στα οποία έγιναν επιδράσεις με φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από τα φυτά *Platanus orientalis* και *Viscum album*, σε τρεις συγκεντρώσεις (0,1%, 1%, 10%). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία SA-β-gal, για την αξιολόγηση της δράσης των εκχυλισμάτων αυτών, αρχικά ως προς το αν προκάλεσαν ή όχι την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα καλλιεργούμενα βλαστοκύτταρα. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης θεωρείται ως η πιο διαδεδομένη μέθοδος ιστοχημείας για την αξιολόγηση της γήρανσης, καθώς η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου σε pH=6 συνδέεται με τα γηρασμένα κύτταρα, ενώ σε μη γηρασμένα κύτταρα η δράση της β-γαλακτοσιδάσης ανιχνεύεται σε pH=4. Η συσσώρευση του ενζύμου και η δραστηριότητα σε pH=6 αποτυπώνεται με τη δοκιμασία SA-β-gal και ανιχνεύεται με τη βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος Xgal, οπότε τα γηρασμένα κύτταρα βάφονται μπλε και διακρίνονται από τα υπόλοιπα. Για την αξιολόγηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο μετά από 20 ώρες χρώσης και λήφθηκαν οι παρακάτω εικόνες:

▪ Επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 10%:



Εικόνα 3.1: Χρώση SA-β-gal μετά από επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 10%. NT: no treatment, 1: επίδραση με το εκχύλισμα 1, 2: επίδραση με το εκχύλισμα 2, 3: επίδραση με το εκχύλισμα 3, 4: επίδραση με το εκχύλισμα 4, 5: επίδραση με το εκχύλισμα 5, 6: επίδραση με το εκχύλισμα 6, 7: επίδραση με το εκχύλισμα 7, 8: επίδραση με το εκχύλισμα 8, 9: επίδραση με το εκχύλισμα 9, 10: επίδραση με το εκχύλισμα 10. Τα εκχυλίσματα περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι.



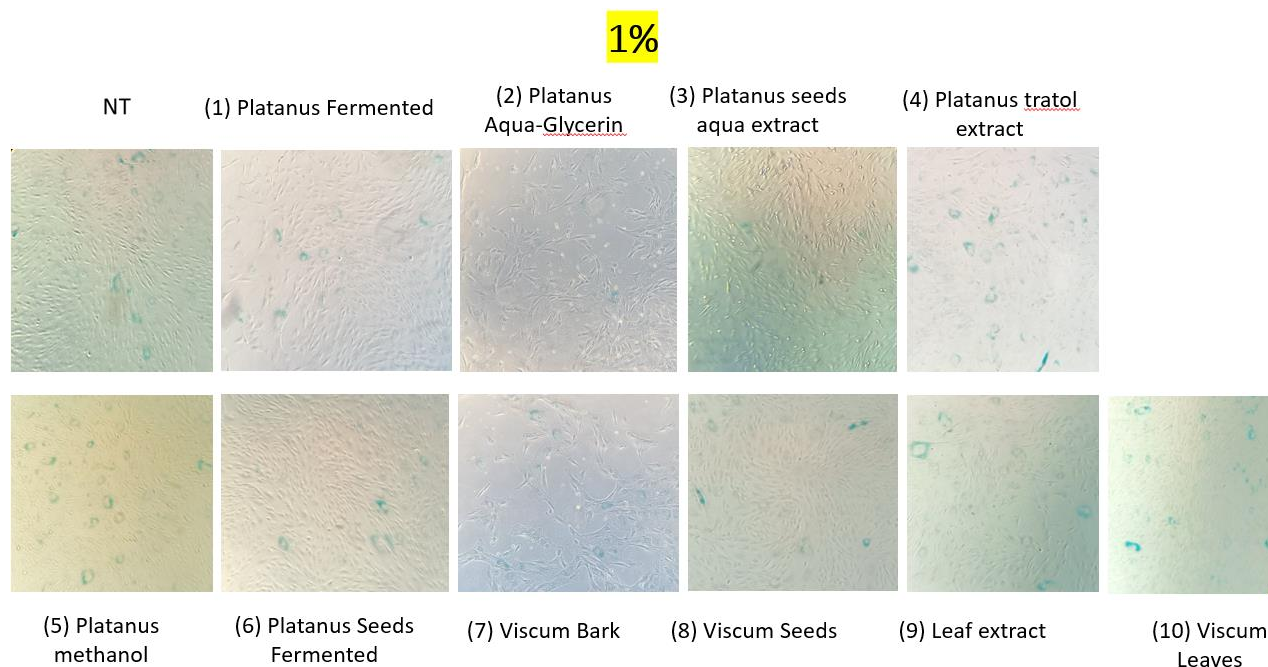
Διάγραμμα 1: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων μεσαίας ηλικίας (passage 17) θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης για τις συνθήκες NT, επίδραση με το εκχύλισμα 1 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 2 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 3 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 4 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 5 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 6 10%, επίδραση με το εκχύλισμα 7 10%.

Με βάση τις εικόνες και το Διάγραμμα 1 παρατηρούμε ότι:

- Στα κύτταρα, όπου δεν εφαρμόστηκε καμία επίδραση (no treatment), πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων βάφτηκε μπλε (<1%), επομένως θεωρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων είναι μη γηρασμένα, το οποίο είναι λογικό, καθώς τα κύτταρα είναι μεσαίας ηλικίας (passage 17).
- Στα κύτταρα όπου προστέθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα 2, 4, 7, ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων βάφτηκε μπλε, (8%, 85%, 95% αντίστοιχα), που σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα προκάλεσαν επαγωγή κυτταρικής γήρανσης και έχουν προγηραντική δράση.
- Στα κύτταρα όπου προστέθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα 8 και 9 είναι ξεκάθαρο από τις αντίστοιχες εικόνες ότι, ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων πέθαναν, που σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα είχαν τοξική δράση και σκοτώνουν τα κύτταρα.
- Στα κύτταρα όπου προστέθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα 1, 3, 5 μικρό ποσοστό των κυττάρων βάφτηκε μπλε, (5%, 1%, 5% αντίστοιχα), που σημαίνει ότι προκλήθηκε ένα

μικρό ποσοστό γήρανσης, το οποίο είναι μικρότερο σε σχέση με τα κύτταρα όπου εφαρμόστηκαν οι υπόλοιπες επιδράσεις, αλλά μεγαλύτερο συγκριτικά με τα NT.

▪ **Επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 1%:**



Εικόνα 3.2: Χρώση SA-β-gal μετά από επίδραση με φυτικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 1%. NT: no treatment, 1: επίδραση με το εκχύλισμα 1, 2: επίδραση με το εκχύλισμα 2, 3: επίδραση με το εκχύλισμα 3, 4: επίδραση με το εκχύλισμα 4, 5: επίδραση με το εκχύλισμα 5, 6: επίδραση με το εκχύλισμα 6, 7: επίδραση με το εκχύλισμα 7, 8: επίδραση με το εκχύλισμα 8, 9: επίδραση με το εκχύλισμα 9, 10: επίδραση με το εκχύλισμα 10.

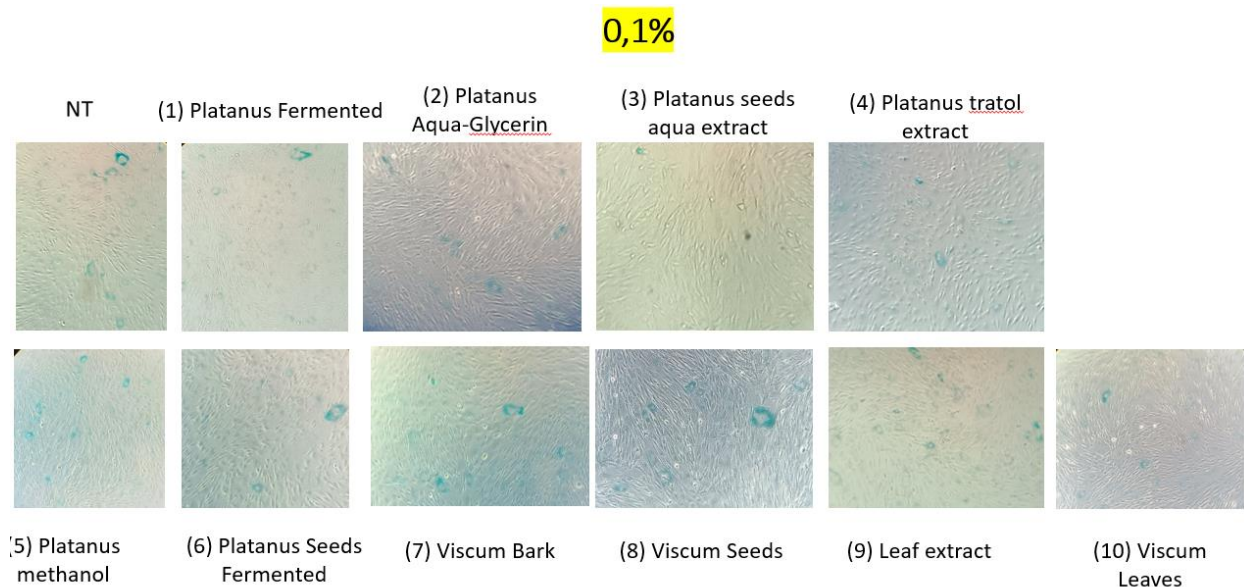


Διάγραμμα 2: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης για τις συνθήκες NT, επίδραση με το εκχύλισμα 1 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 2 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 3 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 4 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 5 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 6 1%, επίδραση με το εκχύλισμα 7 1%.

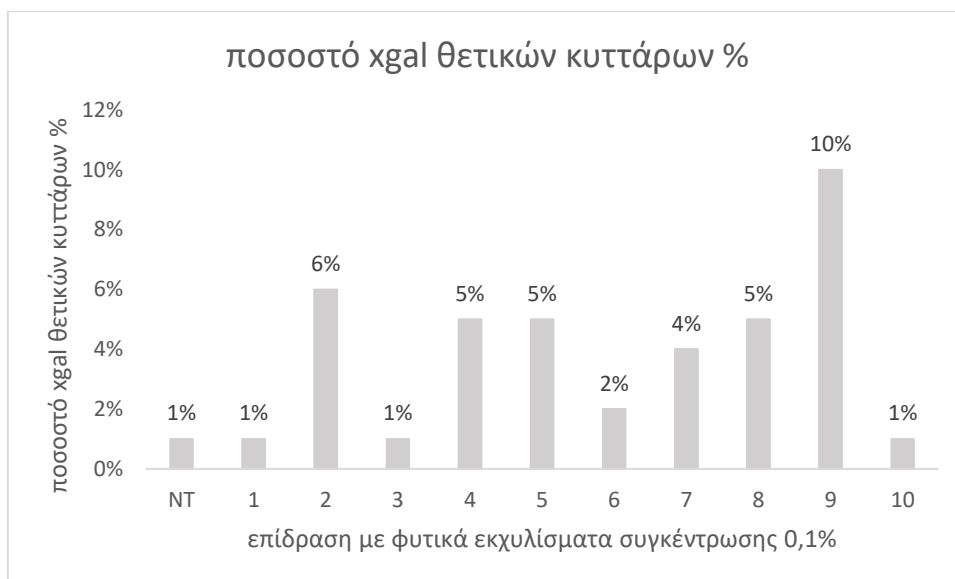
Με βάση τις εικόνες και το Διάγραμμα 2 παρατηρούμε ότι:

- Στα κύτταρα, όπου δεν εφαρμόστηκε καμία επίδραση (no treatment), πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων βάφτηκε μπλε (<3%), επομένως θεωρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων είναι μη γηρασμένα, το οποίο είναι λογικό, καθώς τα κύτταρα είναι μεσαίας ηλικίας (passage 17).
- Σε γενικές γραμμές, σε όλες τις εικόνες παρατηρείται μικρό ποσοστό κυττάρων που έχουν βαφτεί μπλε (<20%), που σημαίνει ότι όλες τα φυτικά εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 1% επάγουν σε μικρό βαθμό την κυτταρική γήρανση και σίγουρα σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τα εκχυλίσματα συγκέντρωσης 10%.

▪ **Επίδραση με φυτικές ουσίες συγκέντρωσης 0,1%:**



Εικόνα 3.3: Χρώση SA-β-gal μετά από επίδραση με φυτικές ουσίες συγκέντρωσης 0,1%. NT: no treatment, 1: επίδραση με το εκχύλισμα 1, 2: επίδραση με το εκχύλισμα 2, 3: επίδραση με το εκχύλισμα 3, 4: επίδραση με το εκχύλισμα 4, 5: επίδραση με το εκχύλισμα 5, 6: επίδραση με το εκχύλισμα 6, 7: επίδραση με το εκχύλισμα 7, 8: επίδραση με το εκχύλισμα 8, 9: επίδραση με το εκχύλισμα 9, 10: επίδραση με το εκχύλισμα 10.



Διάγραμμα 3: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης για τις συνθήκες NT, επίδραση με το εκχύλισμα 1 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 2 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 3 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 4 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 5 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 6 0,1%, επίδραση με το εκχύλισμα 7 0,1%.

Με βάση τις εικόνες και το Διάγραμμα 3 παρατηρούμε ότι:

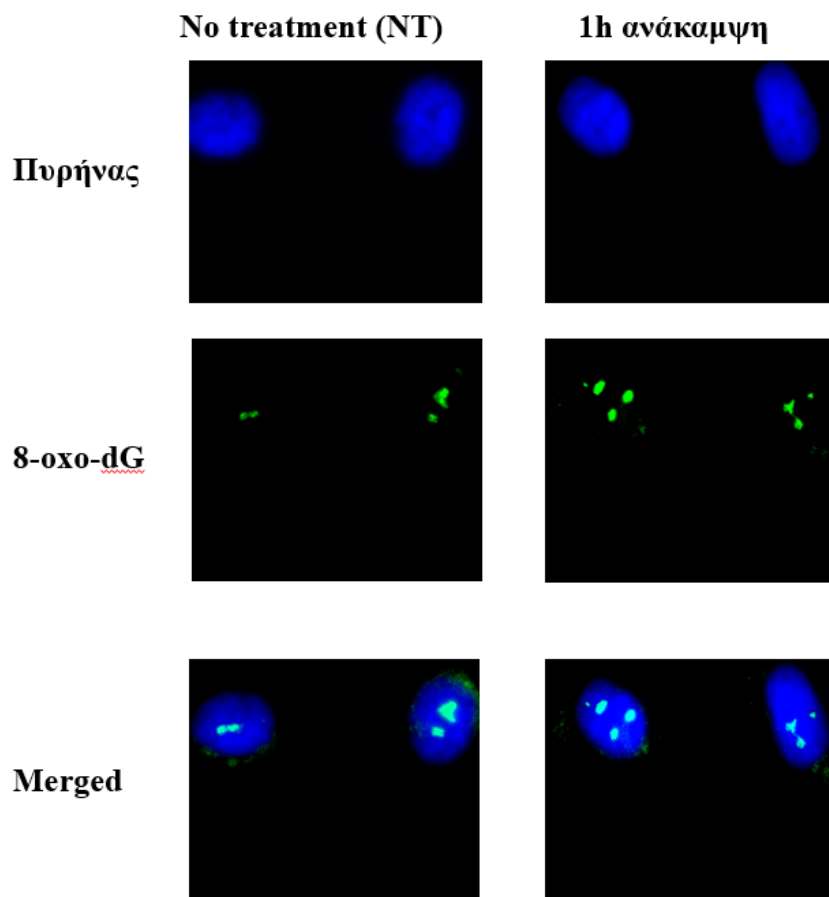
- Στα κύτταρα, όπου δεν εφαρμόστηκε καμία επίδραση (no treatment), πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων βάφτηκε μπλε (<1%), επομένως θεωρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων είναι μη γηρασμένα, το οποίο είναι λογικό, καθώς τα κύτταρα είναι μεσαίας ηλικίας (passage 17).
- Στα κύτταρα όπου προστέθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα 1, 4, 5, 6, 7, 10 και ειδικότερα το 3, ένα μικρότερο ποσοστό κυττάρων βάφτηκε μπλε (<10%), που σημαίνει ότι δεν προκάλεσαν γήρανση στο μεγαλύτερο πληθυσμό των κυττάρων και επομένως έχουν μια δράση η οποία δεν επάγει την κυτταρική γήρανση, με βάση τη δραστικότητα της β γαλακτοσιδάσης.
- ❖ Με βάση το τι παρατήρηθηκε στις εικόνες και στα αντίστοιχα γραφήματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι:
 - Τα φυτικά εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη προγηραντική δράση, με βάση τη δραστικότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση είναι τα:
 - (2): Pl Aqua-Glycerin συγκέντρωσης 10%
 - (4): Platanus tratol extract συγκέντρωσης 10%
 - (7): Viscum Bark (εκχύλισμα φλοιού ιξού) σε συγκέντρωση 10%.

- Το φυτικό εκχύλισμα με τη δράση έναντι της επαγωγής κυτταρικής γήρανσης, με βάση τη δραστηριότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση είναι το: (3) *Platanus seeds aqua extract* σε συγκέντρωση 0,1%.

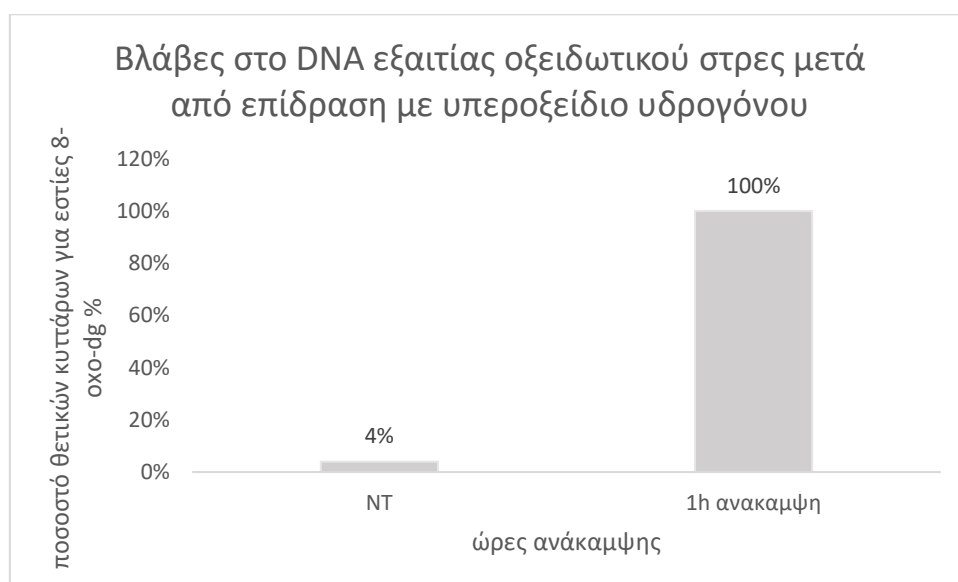
4.2. Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton, τα οποία έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες, μέσω του παράγοντα H₂O₂.

Πραγματοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 8-oxo-dG εντός μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων τα οποία είχαν εκτεθεί, προηγουμένως, στον εξωτερικό οξειδωτικό παράγοντα H₂O₂, με σκοπό την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Η επίδραση των κυττάρων με το H₂O₂ πραγματοποιήθηκε σε 6 well plate που περιείχε καλυπτρίδες. Τοποθετήθηκε αραιωμένο διάλυμα H₂O₂ σε κάθε πηγαδάκι που περιείχε κύτταρα (εκτός από το πρώτο που αποτέλεσε το control) και η επίδραση έγινε για 30 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου, τα κύτταρα αφέθηκαν να ανακάμψουν για 1 ώρα και έπειτα μονιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, η οποία βάφει τους πυρήνες των κυττάρων και εκπέμπει σήμα χρώματος μπλε. Για την ανίχνευση της 8-oxo-dG χρησιμοποιήθηκε ειδικό πρωτοταγές και το αντίστοιχο δευτεροταγές αντίσωμα, το οποίο εκπέμπει σήμα πράσινου χρώματος.



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού σε WJ-SCs που έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες, για τις συνθήκες NT, 1h.



Διάγραμμα 4: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για εστίες 8-oxo-dG για τις συνθήκες NT και 1h ανάκαμψη, μετά από επίδραση με τον παράγοντα H₂O₂.

Από τις παραπάνω εικόνες και το Διάγραμμα 4 εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Στα κύτταρα, που δεν εκτέθηκαν σε οξειδωτικό στρες (no treatment-NT) ανιχνεύονται σε πολύ μικρό βαθμό κάποιες πράσινες εστίες στους πυρήνες των κυττάρων, που σημαίνει ότι εντοπίζεται η 8-oxo-dG, αλλά σε χαμηλά επίπεδα (4% των κυττάρων ήταν θετικά για την παρουσία της 8-oxo-dG στους πυρήνες τους).
- Στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε οξειδωτικό στρες και μετά από 1 ώρα ανάκαμψης παρατηρούνται έντονες πράσινες εστίες στους πυρήνες των κυττάρων, που υποδηλώνουν την παρουσία της 8-oxo-dG και κατά συνέπεια την ύπαρξη βλαβών (100% των κυττάρων ήταν θετικά για την παρουσία της 8-oxo-dG στους πυρήνες τους), οι οποίες οφείλονται στην έκθεση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες.

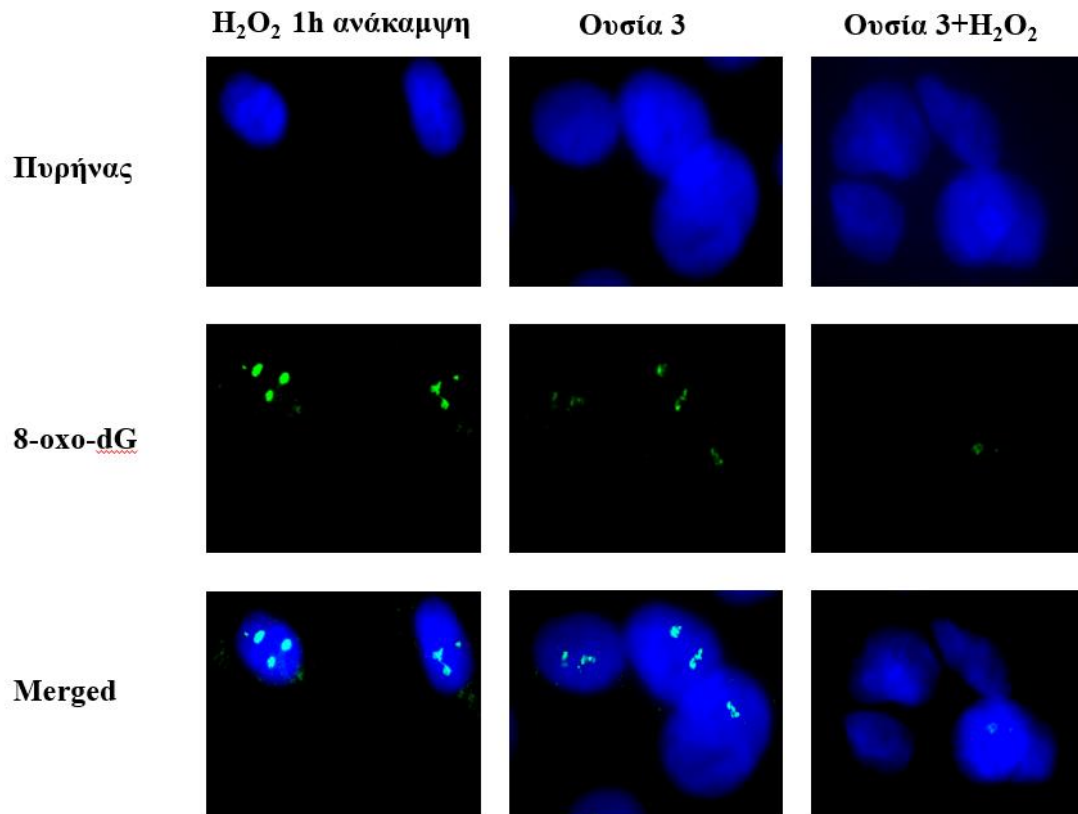
4.3. Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα της ουσίας (3) *Platanus seeds aqua extract* σε συγκέντρωση 0,1% και σε WJ-MSCs που εφαρμόστηκε επίδραση με το εκχύλισμα (3) 0,1% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες.

Πραγματοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 8-oxo-dG εντός των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση μέσω φυτικού εκχυλίσματος (3) 0,1%. Διερευνήθηκε έτσι η ικανότητα του φυτικού εκχυλίσματος (3) 0,1% στην προστασία ή όχι από βλάβες που δημιουργούνται στα κύτταρα είτε υπό κανονικές συνθήκες είτε μετά από επαγωγή οξειδωτικού στρες, που προκλήθηκε μέσω της έκθεσης των κυττάρων σε H₂O₂.

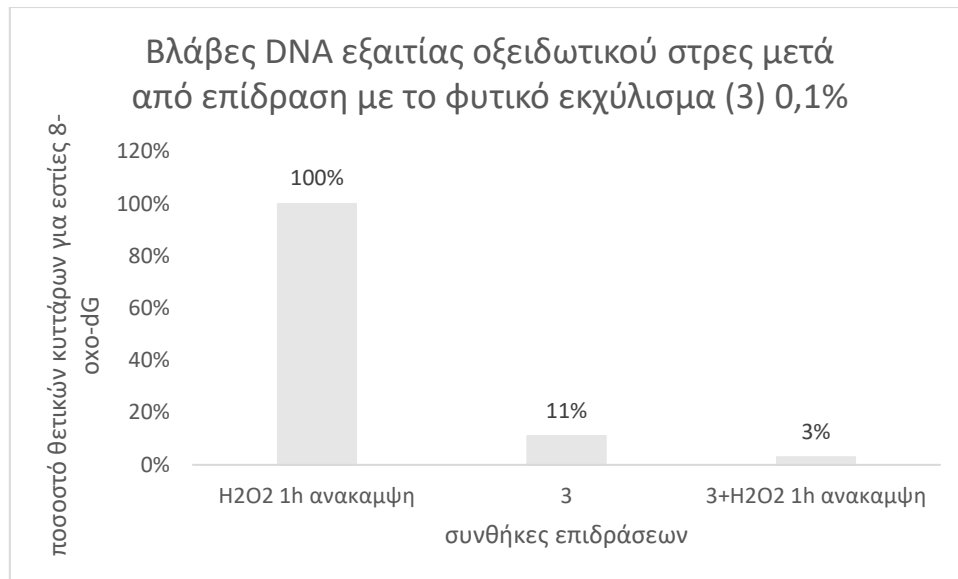
Η επίδραση των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα φυτική ουσία (3) και έπειτα με το H₂O₂ πραγματοποιήθηκε σε 6 well plate που περιείχε καλυπτρίδες. Τοποθετήθηκε εκχύλισμα (3) διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγαδάκι που περιείχε κύτταρα (εκτός από το πρώτο που αποτέλεσε το control) για 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου, αφαιρέθηκε το εκχύλισμα και τα κύτταρα στο ένα πηγαδάκι μονιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού. Στο δεύτερο πηγαδάκι μετά την αφαίρεση του εκχυλίσματος (3), τοποθετήθηκε αραιωμένο διάλυμα H₂O₂ για 30 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκε και έγινε

ανάκαμψη των κυττάρων για 1 ώρα. Τέλος, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού.

Πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, η οποία εκπέμπει σήμα χρώματος μπλε και ειδικό πρωτοταγές και αντίστοιχο δευτεροταγές αντίσωμα, για την ανίχνευση της 8-oxo-dG, το οποίο εκπέμπει σήμα πράσινου χρώματος.



Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού σε WJ-SCs στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με φυτικό εκχύλισμα 3 0,1% μόνο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επίδραση με το εκχύλισμα 3 0,1% και έπειτα επαγωγή οξειδωτικού στρες. NT=επίδραση με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη, control δείγμα.



Διάγραμμα 5: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για εστίες 8-oxo-dG για τις συνθήκες επίδραση με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη, επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα (3) συγκέντρωσης 0,1% και επίδραση με εκχύλισμα (3) 0,1% και έπειτα με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη.

Από τις παραπάνω εικόνες και το Διάγραμμα 5 εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Στα κύτταρα, που δεν εφαρμόστηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα, αλλά μόνο με το H₂O₂ (H₂O₂ 1h ανάκαμψη), παρατηρούνται αρκετές έντονες πράσινες εστίες στους πυρήνες των κυττάρων, που υποδηλώνουν την παρουσία της 8-oxo-dG και κατά συνέπεια την ύπαρξη βλαβών (100% των κυττάρων είναι θετικά για την παρουσία της 8-oxo-dG), οι οποίες οφείλονται στην έκθεση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο.
- Στα κύτταρα που πραγματοποιήθηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα (3) 0,1%, παρατηρούνται κάποιες λίγες και λιγότερο έντονες πράσινες εστίες μέσα στους πυρήνες, συγκριτικά με τα H₂O₂ 1h ανάκαμψη, συγκεκριμένα το 11% των κυττάρων είναι θετικά για εστίες της 8-oxo-dG, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία της πρωτεΐνης 8-oxo-dG, αλλά σε χαμηλά επίπεδα, το φυτικό εκχύλισμα (3) 0,1% διαθέτει αντιοξειδωτική δράση έναντι των κυττάρων.
- Στα κύτταρα στα οποία μετά από την επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα (3) 0,1% ακολούθησε επαγωγή οξειδωτικού στρες μέσω του H₂O₂, σχεδόν δεν παρατηρούνται πράσινες εστίες στους πυρήνες, συγκρίνοντας τα με τα H₂O₂ 1h ανάκαμψη. Ακόμη φαίνεται ότι μειώθηκαν οι εστίες της 8-oxo-dG συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση μόνο με το εκχύλισμα 3, συγκεκριμένα το 3% των κυττάρων είναι θετικά στην παρουσία της 8-oxo-dG. Η εικόνα αυτή υποδηλώνει, πρώτον την απουσία

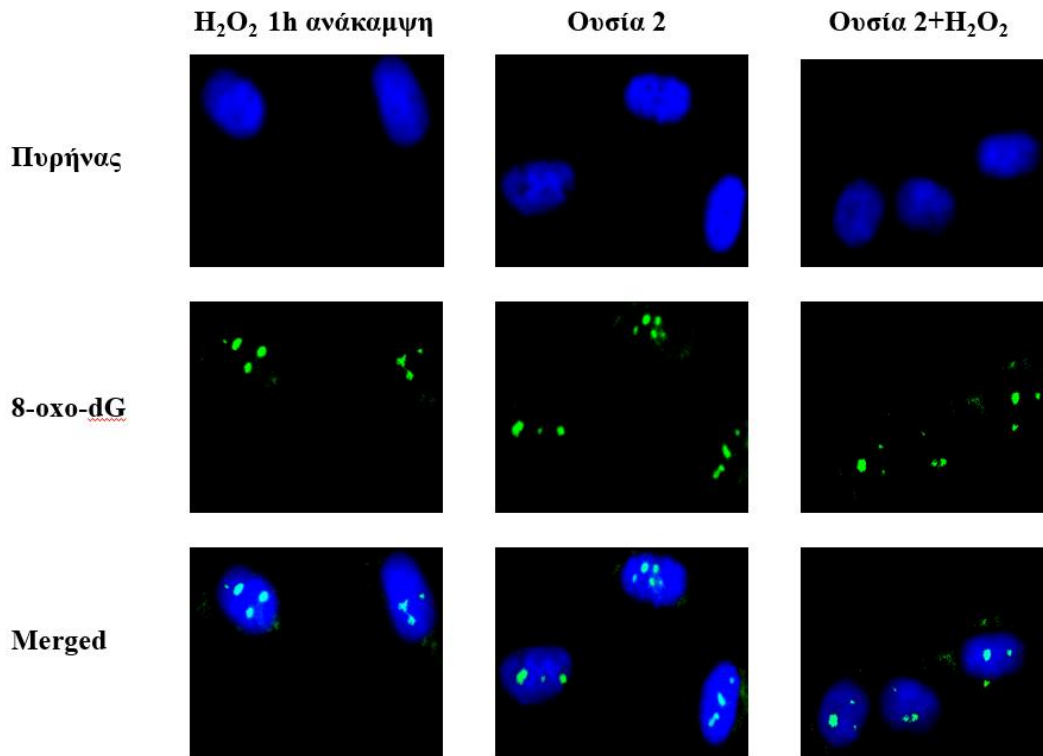
της 8-oxo-dG από τα κύτταρα και δεύτερον ότι το φυτικό εκχύλισμα (3) 0,1% διαθέτει προστατευτική δράση έναντι των βλαβών που δημιουργήθηκαν εξαιτίας του οξειδωτικού στρες. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική δράση του φυτικού εκχυλίσματος (3) συγκέντρωσης 0,1%.

4.4. Έλεγχος για τον κυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG σε μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton, στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με φυτικό εκχύλισμα της ουσίας (2) Platanus Aqua-Glycerin σε συγκέντρωση 10% και σε WJ-SCs που εφαρμόστηκε επίδραση με το εκχύλισμα (2) 10% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες.

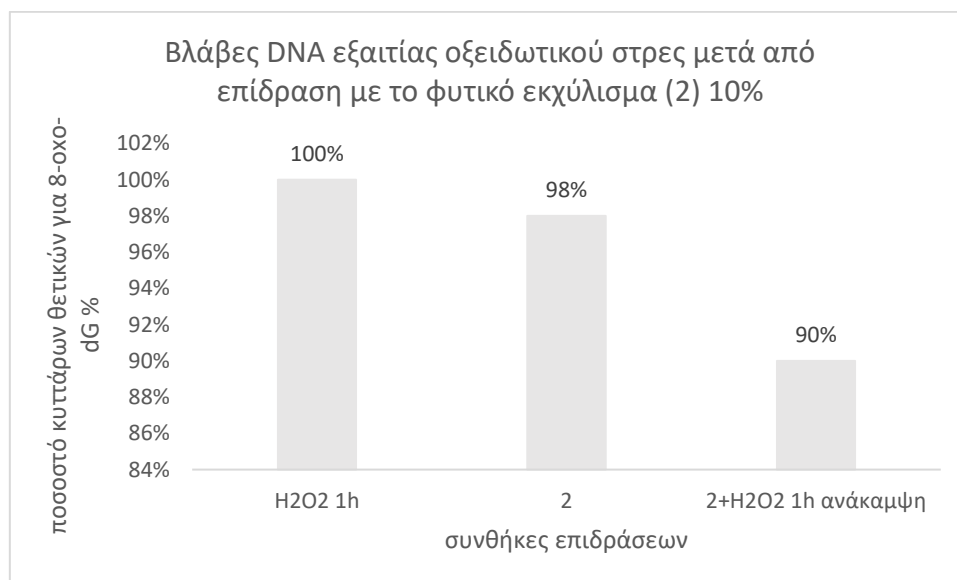
Πραγματοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 8-oxo-dG εντός μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων στα οποία έγινε επίδραση μέσω του φυτικού εκχυλίσματος (2) 10%, με σκοπό, όπως και προηγουμένως, τη διερεύνηση προστασίας ή όχι από βλάβες που δημιουργούνται στα κύτταρα μετά από επαγωγή οξειδωτικού στρες.

Η επίδραση των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα (2) και έπειτα με το H₂O₂ πραγματοποιήθηκε σε 6 well plate που περιείχε καλυπτρίδες. Ακριβώς με το ίδιο πρότυπο που περιγράφηκε και πιο πάνω, τοποθετήθηκε εκχύλισμα (2) 10% διαλυμένο σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγαδάκι που περιείχε κύτταρα (εκτός από το πρώτο που αποτέλεσε το control) για 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου, αφαιρέθηκε το εκχύλισμα και τα κύτταρα στο ένα πηγαδάκι μονιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού. Στο δεύτερο πηγαδάκι μετά την αφαίρεση του εκχυλίσματος, τοποθετήθηκε αραιωμένο διάλυμα H₂O₂ για 30 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκε και έγινε ανάκαμψη των κυττάρων για 1 ώρα. Τέλος, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού.

Πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, η οποία εκπέμπει σήμα χρώματος μπλε και ειδικό πρωτοταγές και αντίστοιχο δευτεροταγές αντίσωμα, για την ανίχνευση της 8-oxo-dG, το οποίο εκπέμπει σήμα πράσινου χρώματος.



Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού σε WJ-SCs στα οποία εφαρμόστηκε επίδραση με φυτικό εκχύλισμα 2 10% μόνο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επίδραση με το εκχύλισμα 2 10% και έπειτα επαγωγή οξειδωτικού στρες. NT= επίδραση με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη, control δείγμα.



Διάγραμμα 6: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για εστίες 8-oxo-dG για τις συνθήκες επίδραση με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη, επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα (2) συγκέντρωσης 10% και επίδραση με εκχύλισμα (2) 10% και έπειτα με H₂O₂ και 1h ανάκαμψη.

Από τις παραπάνω εικόνες και το Διάγραμμα 6 εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Στα κύτταρα, που δεν εφαρμόστηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα, αλλά μόνο με το H₂O₂ (H₂O₂ 1h ανάκαμψη), παρατηρούνται κάποιες έντονες πράσινες εστίες στους πυρήνες των κυττάρων, συγκεκριμένα το 100% των κυττάρων είναι θετικά για την παρουσία της 8-oxo-dG στους πυρήνες τους. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την παρουσία της 8-oxo-dG και κατά συνέπεια την ύπαρξη βλαβών, οι οποίες οφείλονται στην έκθεση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο.
- Στα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με φυτικό εκχύλισμα (2) 10% φαίνονται εντός των πυρήνων πολλές έντονες πράσινες εστίες, και η εικόνα μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με τα NT στα οποία πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία της αλλοίωσης 8-oxo-dG. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι το 98% των κυττάρων είναι θετικά για την παρουσία της 8-oxo-dG και κατ' επέκταση για την ύπαρξη πολλαπλών οξειδωτικών βλαβών. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το φυτικό εκχύλισμα (2) 10% έχει οξειδωτική δράση.
- Τέλος, στα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με το φυτικό εκχύλισμα (2) 10% και στη συνέχεια επίδραση με διάλυμα H₂O₂, οι πράσινες εστίες παραμένουν σε υψηλά επίπεδα (90% των κυττάρων είναι θετικά για την 8-oxo-dG). Η εικόνα αυτή υποδηλώνει την παρουσία της 8-oxo-dG στα κύτταρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το φυτικό εκχύλισμα (2) 10% δεν διαθέτει προστατευτική δράση έναντι των βλαβών που δημιουργήθηκαν εξαιτίας του οξειδωτικού στρες, υποδηλώνοντας ότι διαθέτει οξειδωτική δράση.

❖ Συμπέρασμα είναι ότι:

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την αντιοξειδωτική δράση του φυτικού εκχυλίσματος Platanus seeds aqua extract συγκέντρωσης 0,1%, το οποίο πιθανά ευθύνεται και για την αντιγηραντική δράση που παρατηρήθηκε. Από την άλλη το εκχύλισμα Platanus Aqua-Glycerin συγκέντρωσης 10% έχει σαφώς οξειδωτική δράση, που συνηγορεί υπέρ της προγηραντικής δράσης η οποία παρατηρήθηκε.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συμβολή των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων στη σύγχρονη ιατρική είναι πολύ σημαντική, καθώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμα τόσο για τη βασική έρευνα, όσο και για τις ευκαιρίες που προσφέρουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στην κλινική πράξη (Kolios and Moodley, 2012). Ειδικότερα τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και συγκεκριμένα αυτά που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs), σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης επιστημονικής έρευνας, χάρη στις ποικίλες ιδιότητες τους. Η κυτταρική γήρανση είναι μια κυτταρική κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη και μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και προκαλείται, από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Gorgoulis et al., 2019). Δύο χαρακτηριστικοί υπότυποι της κυτταρικής γήρανσης είναι η αναδιπλασιαστική γήρανση και η πρόωρα επαγόμενη γήρανση, λόγω στρες (Calcinotto et al., 2019; Roger, Tomas and Gire, 2021). Η αναδιπλασιαστική γήρανση χαρακτηρίζεται από τη βράχυνση των τελομερών, που συμβαίνει φυσιολογικά σε κάθε κυτταρική διαίρεση (Calcinotto et al., 2019; Uyar et al., 2020). Από την άλλη, η πρόωρα επαγόμενη κυτταρική γήρανση ή SIPS είναι μια απόκριση των κυττάρων σε διάφορες πιέσεις, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), το υπεροξειδίο του υδρογόνου, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και IR ή στο γονοτοξικό ή μεταβολικό σοκ που υφίστανται τα κύτταρα υπό συνθήκες καλλιέργειας (de Magalhães and Passos, 2018; Calcinotto et al., 2019). Χαρακτηριστικοί δείκτες κυτταρικής γήρανσης είναι η δραστηριότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση (SA-β-gal), η αλλοίωση 8-oxo-dG, μια από τις πιο κοινές αλλοιώσεις του DNA που δημιουργούνται μετά από οξειδωτικό στρες, η γH₂AX, η οποία συσσωρεύεται σε περιοχές DNA με δίκλωνες ρήξεις κ.α. (Zhou, Borsa and Simon, 2021; Kudlova, De Sanctis and Hajdich, 2022). Η εφαρμογή φυτικών ενώσεων, συγκεκριμένα φυτικών εκχυλισμάτων, για την προώθηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων *in vitro*, μπορεί να γίνει μια νέα προοπτική στην αναγεννητική ιατρική (Kornicka, Kocherova and Marycz, 2017).

Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στη μελέτη της αντιοξειδωτικής/αντιγηραντικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από τη γέλη του Wharton, το οποίο ήταν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν WJ-MSCs, προερχόμενα από τον ομφάλιο λώρο ενός νεογέννητου βρέφους, τα οποία καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν επιδράσεις στα κύτταρα με φυτικά εκχυλίσματα, έξι από τα οποία προέρχονταν από το φυτό *Platanus orientalis* και τέσσερα από το *Viscum album*.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εκχυλίσματα του *P. orientalis* ασκούν αντιοξειδωτική δράση και καθυστερούν τη γήρανση των ανθρώπινων κυττάρων, ενώ εκχυλίσματα του *V. album* θα μπορούσαν, επίσης, να μειώσουν τις επιβλαβείς και μεταλλαξιογόνες επιδράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που δημιουργούνται κατά την επίδραση του οξειδωτικού στρες (Önay-Uçar, Karagöz and Arda, 2006; Chatzigeorgiou et al., 2017; Zhou, Borsa and Simon, 2021). Για το λόγο αυτό, καθένα από τα δέκα αυτά φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε και εφαρμόστηκε σε WJ-MSCs (passage 17) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 1%, 10%), προκειμένου να διερευνηθεί ποιο εκχύλισμα και σε ποια συγκέντρωση είχε αντιγηραντική δράση ή και δράση εναντίον του οξειδωτικού στρες. Για την αξιολόγηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ως προς το αν προκάλεσαν ή όχι την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα καλλιεργούμενα βλαστοκύτταρα, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία SA-β-gal. Με βάση τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα φυτικά εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη προγηραντική δράση με βάση τη δραστικότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση είναι τα: (2): *Platanus Aqua-Glycerin* συγκέντρωσης 10%, (4): *Platanus tratol extract* συγκέντρωσης 10%, (7): *Viscum Bark* (εκχύλισμα φλοιού ιξού) σε συγκέντρωση 10%. Από την άλλη, το φυτικό εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη δράση έναντι στην επαγωγή κυτταρικής γήρανσης, με βάση τη δραστικότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση είναι το: (3) *Platanus seeds aqua extract* σε συγκέντρωση 0,1%.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε περαιτέρω η δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, έπειτα από επαγωγή εξωγενούς οξειδωτικού στρες στα κύτταρα, με τη χρήση αραιωμένου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για αυτό, πριν την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ενός φυτικού εκχυλίσματος που είχε προγηραντική και ενός που δεν προκαλούσε επαγωγή κυτταρικής γήρανσης, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal. Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμασίας SA-β-gal, χρησιμοποιήθηκε ως αποτρεπτικό της επαγωγής κυτταρικής γήρανσης το φυτικό εκχύλισμα (3) *Platanus seeds aqua extract* συγκέντρωσης 0,1% και ως προγηραντικό το φυτικό εκχύλισμα (2) *Platanus Aqua-Glycerin* συγκέντρωσης 10%.

Για τη διαπίστωση της προστατευτικής ή όχι ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, έναντι των οξειδωτικών βλαβών, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό της αλλοίωσης του DNA 8-oxo-dG. Αυτή είναι η πιο κοινή αλλοίωση του DNA, που δημιουργείται μετά από επαγωγή οξειδωτικού στρες και χαρακτηριστικός δείκτης κυτταρικής γήρανσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε WJ-MSCs τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες και τα αποτελέσματα

έδειξαν ότι τα επίπεδα της 8-oxo-dG ήταν υψηλά στα κύτταρα μετά από 1 ώρα ανάκαμψης, που σημαίνει ότι συνέβη επαγωγή οξειδωτικού στρες στα κύτταρα αυτά. Έπειτα η τεχνική του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε WJ-MSCs, στα οποία εφαρμόστηκε αρχικά 48h επώαση με το φυτικό εκχύλισμα (3) *Platanus seeds aqua extract* σε συγκέντρωση 0,1% και σε WJ-MSCs που εφαρμόστηκε επίδραση με το εκχύλισμα (3) 0,1% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα (3) 0,1% προκάλεσε ελάχιστες οξειδωτικές βλάβες, καθώς τα κυτταρικά επίπεδα της πρωτεΐνης 8-oxo-dG ήταν αρκετά χαμηλά, οπότε θεωρήθηκε ότι το εκχύλισμα (3) 0,1% δεν προκαλεί οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα. Ακόμη, βρέθηκε ότι έχει και προστατευτική δράση έναντι οξειδωτικών βλαβών, καθώς στα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το συγκεκριμένο εκχύλισμα και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂, τα επίπεδα της 8-oxo-dG εντός των πυρήνων τους παρέμειναν χαμηλά. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την αντιοξειδωτική δράση του φυτικού εκχυλίσματος *Platanus seeds aqua extract* συγκέντρωσης 0,1%, το οποίο πιθανά ευθύνεται και για το ότι δεν επάγει κυτταρική γήρανσης, όπως παρατηρήθηκε.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε WJ-MSCs, στα οποία έγινε επώαση με το φυτικό εκχύλισμα (2) *Platanus Aqua-Glycerin* σε συγκέντρωση 10% αλλά και επώαση με το εκχύλισμα (2) 10% και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή οξειδωτικού στρες μέσω επίδρασης με αραιωμένο διάλυμα H₂O₂.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φυτικό εκχύλισμα (2) 10% προκάλεσε πολλαπλές οξειδωτικές βλάβες, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τα υψηλά επίπεδα της 8-oxo-dG στους πυρήνες των κυττάρων. Ο συνδυασμός προ-επώασης με το εκχύλισμα αυτό και στη συνέχεια, έκθεση σε εξωγενές οξειδωτικό στρες οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερο αριθμό βλαβών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα *Platanus Aqua-Glycerin* συγκέντρωσης 10% έχει σαφώς οξειδωτική δράση, που συνηγορεί υπέρ της προγηραντικής δράσης η οποία παρατηρήθηκε.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρέχουν νέα δεδομένα ως προς την αντιγηραντική/αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων των φυτών *Platanus orientalis* και *Viscum album*. Καταρχάς, αναδεικνύεται η μεγάλη σημασία και διαφοροποίηση επί της δράσης των διαφορετικών τμημάτων των φυτών αλλά και των διαφορετικών εκχυλισμάτων, καθώς και η εξάρτηση της όποιας δράσης τους από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Είναι συνεπώς εξαιρετικής σημασίας να γίνεται επιλογή του τμήματος του φυτού και του συγκεκριμένου τρόπου εκχύλισης αλλά και της συγκέντρωσης που θα έχει την επιθυμητή

δράση (αντηγηραντική/αντιοξειδωτική). Επιπλέον, για να επιβεβαιωθεί η ευεργετική χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων στην αναγεννητική ιατρική, μέσω των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, μέσω μελετών που θα στοχεύουν στην διερεύνηση των συγκεκριμένων παραγόντων-συστατικών των φυτικών αυτών παρασκευασμάτων που ευθύνονται για τις ανωτέρω δράσεις. Οι μελέτες αυτές θα συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προοπτικών με τη χρήση βλαστοκυττάρων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. (2005) ‘The signals and pathways activating cellular senescence’, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), pp. 961–976. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>.
2. Bernardo, M.E. and Fibbe, W.E. (2013) ‘Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation’, *Cell Stem Cell*, 13(4), pp. 392–402. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>.
3. Box, J. (2019) ‘Oaks (*Quercus* spp.) parasitised by mistletoe *Viscum album* (Santalaceae) in Britain’, *British & Irish Botany*, 1(1), pp. 39–49. Available at: <https://doi.org/10.33928/bib.2019.01.039>.
4. Boya, D. and Kullanihan, E. (2016) ‘Do ğ al boya eldesinde kullan ı lan baz ı bitkiler’, (January 1992), pp. 2–6.
5. Calcinotto, A. *et al.* (2019) ‘Cellular senescence: Aging, cancer, and injury’, *Physiological Reviews*, 99(2), pp. 1047–1078. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>.
6. Campisi, J. (2013) ‘Aging, cellular senescence, and cancer’, *Annual Review of Physiology*, 75, pp. 685–705. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.
7. Campisi, J. and D’Adda Di Fagagna, F. (2007) ‘Cellular senescence: When bad things happen to good cells’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), pp. 729–740. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2233>.
8. Catarina, A. *et al.* (2021) ‘*Viscum Album* - Literature Review’, (May). Available at: <https://doi.org/10.21275/SR21430224614>.
9. Chatzigeorgiou, S. *et al.* (2017) ‘Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*’, *Phytomedicine*, 33, pp. 53–61. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.009>.
10. Correia-Melo, C., Hewitt, G. and Passos, J.F. (2014) ‘Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?’, *Longevity & Healthspan*, 3(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>.
11. D’Arcangelo, D., Tinaburri, L. and Dellambra, E. (2017) ‘The role of p16inK4a pathway in human epidermal stem cell self-renewal, aging and cancer’, *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 18(7). Available at:
<https://doi.org/10.3390/ijms18071591>.
12. Datta, D. and Kim, K.S. (2015) 'Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) to Study and Treat Movement Disorders', *Movement Disorders: Genetics and Models: Second Edition*, pp. 159–170. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00009-3>.
 13. Dulak, J. *et al.* (2015) 'Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine', *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), pp. 329–337. Available at:
https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023.
 14. Environment, M.O.F., Planning, S. and Agency, P. (2007) 'State of nature report 2006 - 2007'.
 15. Gorgoulis, V. *et al.* (2019) 'Cellular Senescence: Defining a Path Forward', *Cell*, 179(4), pp. 813–827. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.
 16. Hass, R. *et al.* (2011) 'Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC', *Cell Communication and Signaling*, 9(1), p. 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
 17. Jannone, G. *et al.* (2020) 'An Optimized Protocol for Histochemical Detection of Senescence-associated Beta-galactosidase Activity in Cryopreserved Liver Tissue', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 68(4), pp. 269–278. Available at:
<https://doi.org/10.1369/0022155420913534>.
 18. Kennedy, S., Berrett, H. and J., R. (2012) 'Disruption of Cell Cycle Machinery in Pancreatic Cancer', *Pancreatic Cancer - Molecular Mechanism and Targets* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5772/28660>.
 19. Kim, D.-W. *et al.* (2013) 'Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications', *Int. J. Mol. Sci*, 14, pp. 11692–11712. Available at:
<https://doi.org/10.3390/ijms140611692>.
 20. Kirkland, J.L. and Tchkonja, T. (2017) 'Cellular Senescence: A Translational Perspective', *EBioMedicine*, 21, pp. 21–28. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>.
 21. Kolios, G. and Moodley, Y. (2012) 'Introduction to stem cells and regenerative medicine', *Respiration*, 85(1), pp. 3–10. Available at:
<https://doi.org/10.1159/000345615>.

22. Kornicka, K., Kocherova, I. and Marycz, K. (2017) ‘The effects of chosen plant extracts and compounds on mesenchymal stem cells—a bridge between molecular nutrition and regenerative medicine- concise review’, *Phytotherapy Research*, 31(7), pp. 947–958. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.5812>.
23. Kramer, B.H. *et al.* (2021) ‘Oxidative stress and senescence in social insects: A significant but inconsistent link?’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1823). Available at: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5280338>.
24. Kudlova, N., De Sanctis, J.B. and Hajduch, M. (2022) ‘Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>.
25. Lee, B.Y. *et al.* (2006) ‘Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase’, *Aging Cell*, 5(2), pp. 187–195. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>.
26. Liao, L.L. *et al.* (2020) ‘Characteristics and clinical applications of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells’, *Current Research in Translational Medicine*, 68(1), pp. 5–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RETRAM.2019.09.001>.
27. Liu, G. *et al.* (2020) ‘Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications’, *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), pp. 3–32. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>.
28. Łos, M.J., Skubis, A. and Ghavami, S. (2019) ‘Stem Cells’, *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, pp. 5–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2>.
29. de Magalhães, J.P. and Passos, J.F. (2018) ‘Stress, cell senescence and organismal ageing’, *Mechanisms of Ageing and Development*, 170, pp. 2–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.07.001>.
30. McHugh, D. and Gil, J. (2018) ‘Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues’, *Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 65–77. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>.
31. Di Micco, R. *et al.* (2021) ‘Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), pp. 75–95. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
32. Min, E.Y. *et al.* (2014) ‘The effects of fucodan on senescence are controlled by the p16 INK4a-pRb and p14Arf-p53 pathways in hepatocellular carcinoma and hepatic

- cell lines', *International Journal of Oncology*, 45(1), pp. 47–56. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2426>.
33. Musiał-Wysocka, A. *et al.* (no date) 'Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency'. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20081807>.
 34. Nazaruk, J. and Orlikowski, P. (2016) 'Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L.', *Natural Product Research*, 30(4), pp. 373–385. Available at: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1022776>.
 35. Önay-Uçar, E., Karagöz, A. and Arda, N. (2006) 'Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*', *Fitoterapia*, 77(7–8), pp. 556–560. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.08.001>.
 36. Ranjbaran, H. *et al.* (2018) 'Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: Isolation and characterization', *Acta Medica Iranica*, 56(1), pp. 28–33.
 37. Ridge, S.M., Sullivan, F.J. and Glynn, S.A. (2017) 'Mesenchymal stem cells: Key players in cancer progression', *Molecular Cancer*, 16(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0597-8>.
 38. Rix, M. and Fay, M.F. (2017) '857. *Platanus Orientalis*', *Curtis's Botanical Magazine*, 34(1), pp. 29–40. Available at: <https://doi.org/10.1111/curt.12177>.
 39. Roger, L., Tomas, F. and Gire, V. (2021) 'Mechanisms and regulation of cellular senescence', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>.
 40. Sajid, M. *et al.* (2012) 'Response of plane tree (*platanus orientalis*) to cuttings and planting dates', *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2), pp. 420–424.
 41. Saud, B., Malla, R. and Shrestha, K. (2019) 'A Review on the Effect of Plant Extract on Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation'. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/7513404>.
 42. Schröder, L. *et al.* (2022) 'The gene space of European mistletoe (*Viscum album*)', *Plant Journal*, 109(1), pp. 278–294. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.15558>.
 43. Sikora, E., Mosieniak, G. and Alicja Sliwinska, M. (2016) 'Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells', *Current Drug Targets*, 17(4), pp. 377–387. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389450116666151019094724>.
 44. Sobhani, A. *et al.* (2017) 'Multipotent stem cell and current application', *Acta Medica Iranica*, 55(1), pp. 6–23.
 45. Spees, J.L., Lee, R.H. and Gregory, C.A. (2016) 'Mechanisms of mesenchymal

- stem/stromal cell function’, *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>.
46. Suzuki, M. and Boothman, D.A. (2008) ‘Stress-induced premature senescence (SIPS) - Influence of sips on radiotherapy’, *Journal of Radiation Research*, 49(2), pp. 105–112. Available at: <https://doi.org/10.1269/jrr.07081>.
47. Uyar, B. *et al.* (2020) ‘Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence’, *Ageing Research Reviews*, 64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101156>.
48. Vaiserman, A. and Krasnienkov, D. (2021) ‘Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives’, *Frontiers in Genetics* / www.frontiersin.org, 1, p. 630186. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.630186>.
49. Varesi, A. *et al.* (2022) ‘The Role of Antioxidants in the Interplay between Oxidative Stress and Senescence’, *Antioxidants*, 11(7), p. 1224. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11071224>.
50. Wang, A.S. and Dreesen, O. (2018) ‘Biomarkers of cellular senescence and skin aging’, *Frontiers in Genetics*, 9(AUG), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>.
51. Yamanaka, S. (2020) ‘Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges’, *Cell Stem Cell*, 27(4), pp. 523–531. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>.
52. Yoshihara, M., Hayashizaki, Y. and Murakawa, Y. (2017) ‘Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications’, *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), pp. 7–16. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9680-6>.
53. Zakrzewski, W. *et al.* (2019) ‘Stem cells: Past, present, and future’, *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
54. Zhou, D., Borsa, M. and Simon, A.K. (2021) ‘Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells’, *Aging Cell*, 20(2). Available at: <https://doi.org/10.1111/acel.13316>.