



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“Μελέτη της αντιγηραντικής - αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από φύκη σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα”

“Study of anti-senescence - antioxidant activity of extracts from algae in mesenchymal stem cells”

Σιαμπαλιώτη Ελευθερία του Ευαγγέλου,

Λάρισα 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (επιβλέπουσα): Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Τραχανά Βαρβάρα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε επιλέγοντας με για την εκπόνηση της πτυχιακής και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής Γούτα Ανδρέα και Ουτσκούνη Ζωζώ που μου προσέφεραν την βοήθεια τους και διατήρησαν καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας όμορφο κλίμα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κ. Στάγκο Δημήτριο και κ. Γιακουντή Αντώνιο για όλες τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου και με βοήθησαν στην εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το πιο μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και στην οικογένεια μου που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Η κυτταρική γήρανση είναι μια διαδικασία που μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες και οδηγεί στην παύση του κυτταρικού κύκλου. Όλα τα γηρασμένα κύτταρα επιδεικνύουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά όπως είναι η ακανόνιστη μορφολογία, ο εκκριτικός φαινότυπος αλλά και η έκφραση συγκεκριμένων δεικτών. Ανάμεσα στους παράγοντες που οδηγούν στην κυτταρική γήρανση είναι βλάβες στο DNA όταν αυτές δεν μπορούν να επιδιορθωθούν. Βλάβες στο DNA μπορούν να προκαλέσουν διάφοροι εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες. Ουσίες που μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των ελευθέρων ριζών που προκαλούν οξειδωτικό στρες είναι τα καροτενοειδή, οι φαινόλες κ.α. Τέτοιες ουσίες έχει δείχθει ότι περιέχονται στα φύκη *Gigartina teedei* και *Codium fragile*. Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αντιγηραντικής και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από τα φύκη *Gigartina teedei* και *Codium fragile* σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιγηραντική δράση τους πραγματοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της δραστικότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση ενώ οι βλάβες στο DNA προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού με αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη 53BP1. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι μόνο το εκχύλισμα που προέρχεται από το φύκος *Gigartina teedei* έχει ήπια αντιοξειδωτική δράση, ενώ το *Codium fragile* δεν εμφανίζει αξιοσημείωτη δράση.

Abstract

Cellular senescence is a multifactorial process which leads to permanent cell cycle arrest. Senescent cells share several common characteristics such as their irregular morphology, a secretory phenotype and specific biomarkers expression. Oxidative stress, has proven to be a major DNA-damaging factor, which if not repaired, results in cellular senescence. A growing amount of evidence suggest that substances such as carotenoids and phenols can decrease the number of free radicals and consequently, prevent oxidative stress. These substances are contained in algae *Gigartina teedei* and *Codium fragile*. Hence, the aim of this thesis was to investigate the anti-senescence and antioxidant activity of extracts from these algae in human mesenchymal stem cells. For this cause, anti-senescence abilities of the algae were assessed by calculating the activity of β -galactosidase's enzyme and DNA damage was analysed using immunofluorescence with a specific antibody against 53BP1 protein. Our results showed that extracts from only *Gigartina teedei* had a mild antioxidant effect, while extracts from *Codium fragile* do not show a notable effect.

Περιεχόμενα

1. Βλαστοκύτταρα	7
1.1 Τι είναι τα βλαστοκύτταρα.....	7
1.2 Τα είδη των βλαστοκυττάρων και οι εφαρμογές τους	8
1.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα.....	10
1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από την Γέλη Wharton	11
2.Κυτταρική γήρανση	12
2.1 Τα είδη της κυτταρικής γήρανσης.....	12
2.2 Φαινοτυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης	14
2.3 Βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης	18
2.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης.....	19
2.5 Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με την γήρανση	22
3.Οξειδωτικό στρες	24
3.1 Επαγόμενη γήρανση από οξειδωτικό στρες	24
4.Τα φύκη.....	25
4.1 Gigartina teedei	25
4.2 Codium fragile	26
5. Σκοπός εργασίας	26
6. Υλικά και μέθοδοι.....	27
6.1 Κυτταρικό μοντέλο	27
6.2 Μέσα ανάπτυξης.....	28
6.3 Διαχείριση δειγμάτων	28
6.4 Δείγματα από φύκη.....	30
6.5 Μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal	30
6.6 Οξεία εξωγενής προσβολή με H ₂ O ₂	32
6.7 Ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 53BP1	32
7. Αποτελέσματα.....	35
7.1 Προσδιορισμός της δραστικότητας SA-β-gal	35
7.2 Ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 53BP1	38
8. Συζήτηση-Συμπεράσματα	40
9. Βιβλιογραφία.....	43

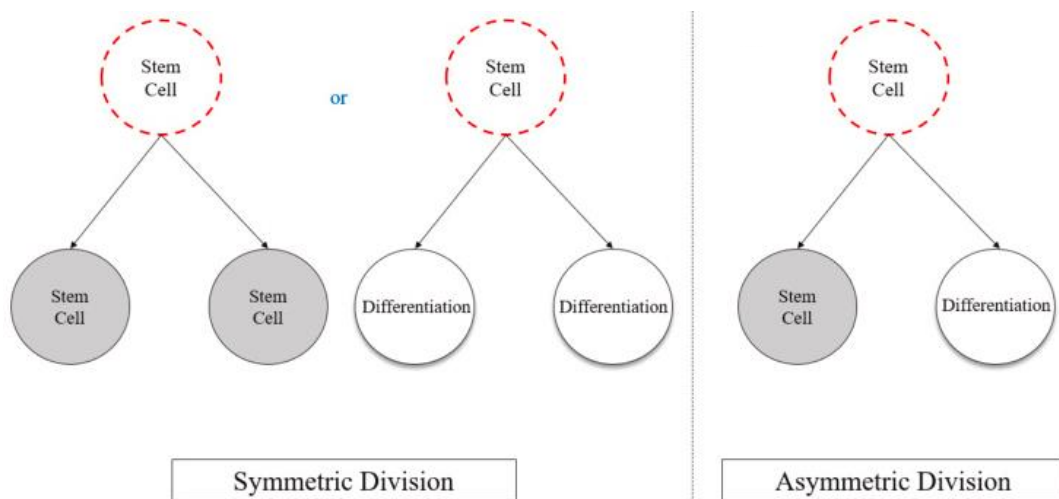
Εισαγωγή

1. Βλαστοκύτταρα

1.1 Τι είναι τα βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών. Ως βλαστοκύτταρα ή αλλιώς βλαστικά κύτταρα ορίζονται τα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα της αυτό-ανανέωσης και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα λειτουργικά κύτταρα (Jones, Richard, 2010, Weissman IL, 2000). Η διατήρηση της ομοιόστασης σε έναν οργανισμό απαιτεί διαρκή παραγωγή νέων κυττάρων με σκοπό την αντικατάσταση των νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα μπορούν να "μεταναστεύσουν" στους διάφορους ιστούς όπου και συντελείται η ωρίμανσή τους (Denham, 2005).

Ένα βλαστοκύτταρο ανάλογα με τον τρόπο που διαιρείται μπορεί: α) να παραμείνει στην ηρεμία (quiescence) χωρίς να διαιρεθεί ούτε να διαφοροποιηθεί, β) μπορεί να διαιρεθεί συμμετρικά οδηγώντας στον σχηματισμό δύο πανομοιότυπων θυγατρικών κυττάρων ίδια με το αρχικό, γ) μπορεί να διαιρεθεί ασύμμετρα και έτσι να προκύψει ένα θυγατρικό κύτταρο ίδιο με το αρχικό και ένα πιο διαφοροποιημένο που ονομάζεται προγονικό κύτταρο.



Εικόνα 1: Τα αποτελέσματα της διάρεσης των βλαστοκυττάρων (Ramakrishna et al., 2020).

Ανάλογα με τον τρόπο διαίρεσης τους τα βλαστοκύτταρα είτε ανανεώνουν την δεξαμενή βλαστοκυττάρων είτε συμβάλλουν στην δημιουργία και την αναγέννηση των ιστών (Biehl & Russell, 2009).

Με βάση την ικανότητα διαφοροποίησής τους τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε:

Παντοδύναμα (totipotent) βλαστοκύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού. Τα κύτταρα αυτά έχουν το μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης (differentiation potential) και δύνανται να σχηματίσουν τόσο εμβρυακές όσο και εξωεμβρυακές δομές. Παράδειγμα αποτελεί το ζυγωτό που προκύπτει μετά την γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζώαριο. Από αυτά τα κύτταρα μπορεί και να προέλθει οποιοδήποτε είδος των βλαστικών στιβάδων.

Ολοδύναμα (pluripotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλους τους κυτταρικούς τύπους των τριών βλαστικών στιβάδων: ενδόδερμα, εξώδερμα, μεσόδερμα αλλά δε μπορούν να σχηματίσουν εξωεμβρυακές δομές (Zakrzewski, 2019).

Πολυδύναμα (multipotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να δώσουν κυτταρικούς τύπους μία μόνο βλαστικής στιβάδας ή συγκεκριμένους τύπους ενός ιστού (Biehl & Russell, 2009).

Βλαστικά κύτταρα με ακόμη μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης είναι τα ολιγοδύναμα (oligopotent) που δίνουν ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους καθώς και τα μονοδύναμα (unipotent) που οδηγούν σε ένα τύπο κυττάρων (Zakrzewski, 2019).

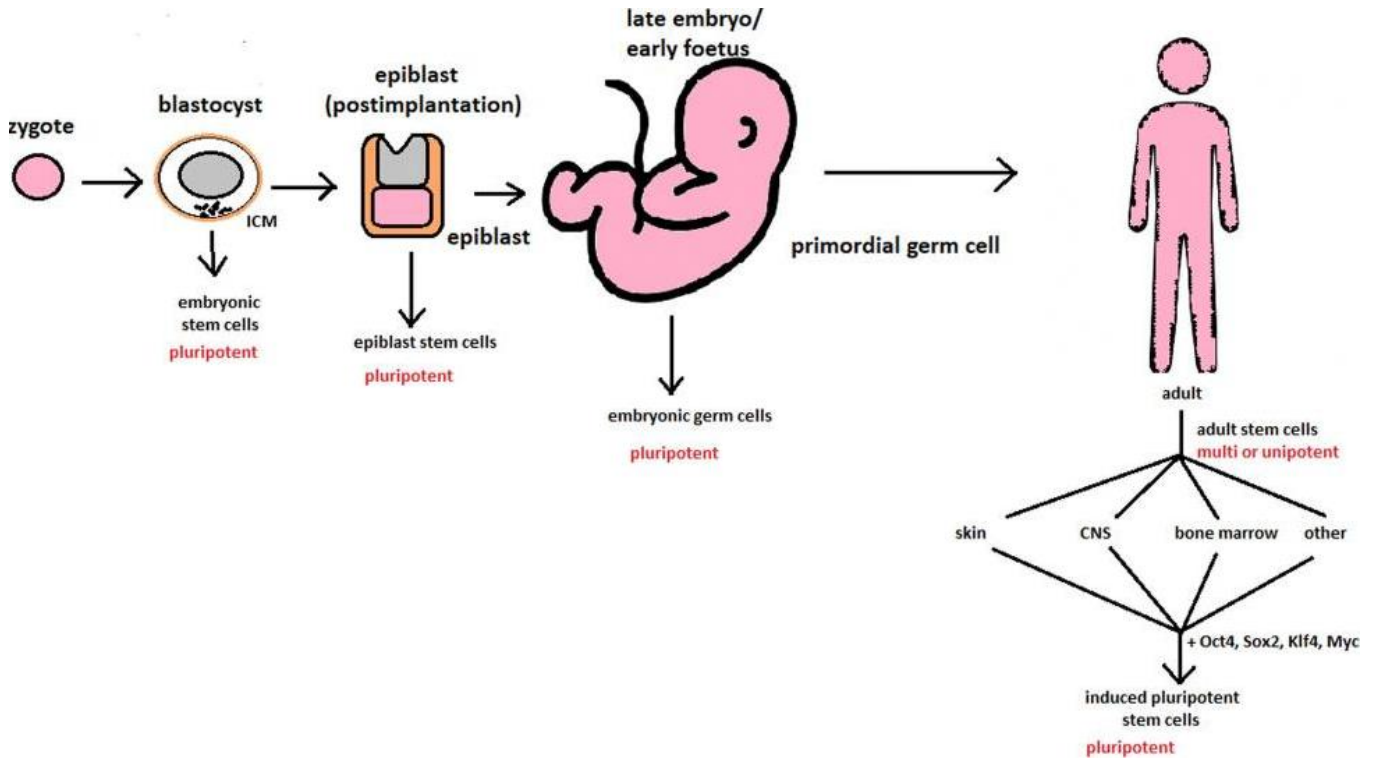
1.2 Τα είδη των βλαστοκυττάρων και οι εφαρμογές τους

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να χωριστούν επίσης ανάλογα με την προέλευση τους σε: εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs), ενήλικα βλαστοκύτταρα (ASCs) και επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs).

- Με τον όρο εμβρυικά βλαστοκύτταρα αναφερόμαστε στα κύτταρα που προκύπτουν από την απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων προερχόμενων από την βλαστοκύστη, η οποία και σχηματίζεται περίπου 5 ημέρες μετά την γονιμοποίηση (Chagastelles & Nardi 2011a).

Τα κύτταρα αυτά είναι ολοδύναμα καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο του ανθρώπινου σώματος (Mora, 2017). Το 1981 εδραιώθηκαν οι πρώτες κυτταρικές σειρές εμβρυικών βλαστοκυττάρων από βλαστοκύστες ποντικών και οι ανθρώπινες δημιουργήθηκαν το 1998. Η διαδικασία απομόνωσής τους απαιτεί την καταστροφή της βλαστοκύστης, γεγονός που εγείρει ηθικούς προβληματισμούς σχετικά με

την χρήση τους. Έτσι η εφαρμογή τους για θεραπεία είναι σχετικά περιορισμένη και στους ασθενείς χορηγούνται διαφοροποιημένα κύτταρα που προέρχονται από εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Chagastelles & Nardi 2011a, Rippon, 2004) .



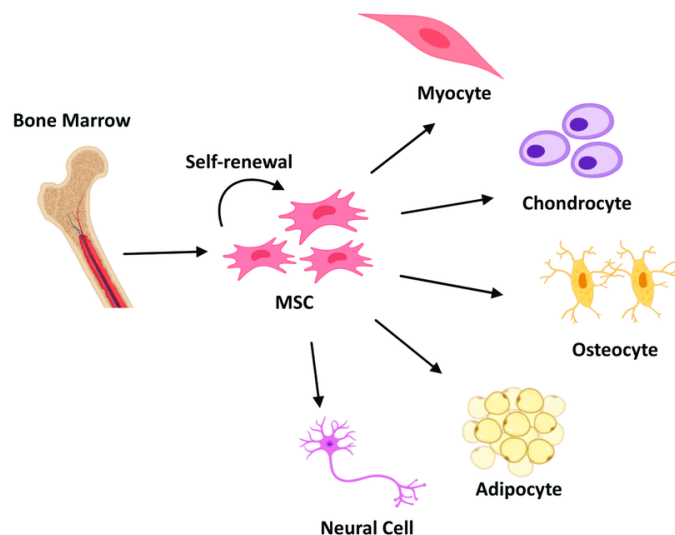
Εικόνα 2: Αλλαγές στο δυναμικό των βλαστοκυττάρων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (Zakrzewski, 2019).

- Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι κύτταρα με πιο περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης (Chagastelles & Nardi, 2011a) και τα οποία είναι σημαντικά για την αναγέννηση των ιστών μετά από ενδεχόμενη βλάβη και την διατήρηση της ομοιόστασης (David & Sassoon, 2022, Raff, 2003). Μεταξύ των κυτταρικών τύπων που μπορούν να δώσουν τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι τα μεσεγχευματικά, τα νευρικά, τα αιμοποιητικά και τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος (Zakrzewski, 2019). Τα ενήλικα σωματικά κύτταρα μετά από μία σειρά κλινικών δοκιμών φάνηκε πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για μεταμόσχευση από ένα δότη στον ίδιο αφού δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση και δεν υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης τερατώματος όπως στην περίπτωση των εμβρυικών βλαστοκυττάρων (Chagastelles & Nardi, 2011a). Τέλος η χρήση τους δεν επάγει ηθικούς προβληματισμούς.

- Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να προκύψουν από ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα μέσω επαναπρογραμματισμού. Το 2006 οι Yamanaka και Takahashi έδειξαν την ικανότητα πρόκλησης ολοδυναμίας σε σωματικά κύτταρα με την έκφραση τεσσάρων γονιδίων με φορέα έναν ρετροϊό. Τα γονίδια αυτά ήταν: Octamer-Binding Transcription Factor 4 (Oct4), SRY (Sex Determining Region Y)-box 2 (Sox2), Kruppel-Like Factor 4 (Klf4) και Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (c-Myc) γνωστά και ως “Yamanaka Factors” ή παράγοντες OSKM (Menon, 2016). Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με αυτών της βλαστοκύστης όπως η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και πρωτεϊνών, πρότυπα μεθυλίωσης της χρωματίνης κ.α. και δεν εγείρουν ηθικά ζητήματα σχετικά με την προέλευσή τους (Chagastelles & Nardi, 2011a).

1.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα αποτελούν είδος των ενήλικων βλαστοκυττάρων και η απομόνωσή τους καθώς και η καλλιέργειά τους *in vitro* είναι μια σχετικά εύκολη διαδικασία. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μεγάλη πλαστικότητα και για αυτό μπορούν να έχουν πολλές θεραπευτικές εφαρμογές (Beyer Nardi, 2006). Μπορούν να απομονωθούν από τον μυελό των οστών, από τον



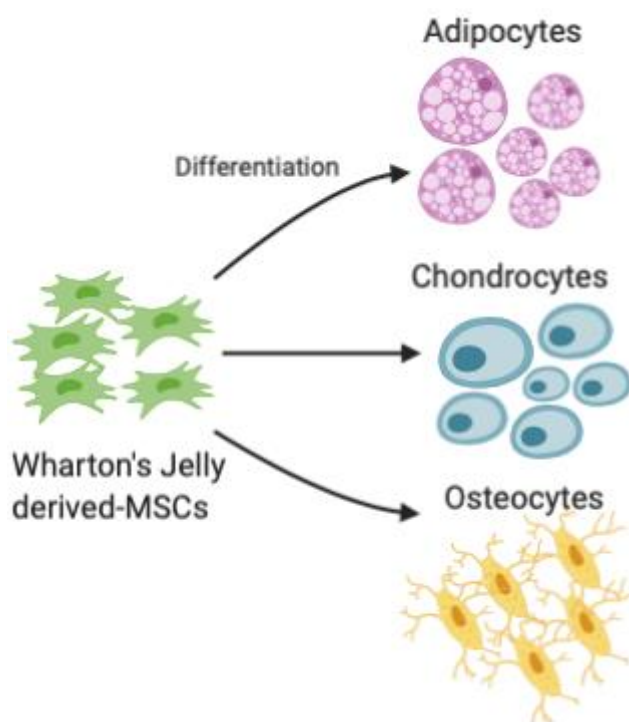
Εικόνα 3: Διαφοροποίηση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Bianco, 2008)

ομφάλιο λώρο καθώς και από πολλά άλλα είδη ιστών. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα και ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο έχουν προέλθει μπορούν να δώσουν

τους εξής τύπους κυττάρων: χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα ή ινοβλάστες (Bianco, 2008, Friedenstein, 1990).

1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από την Γέλη Wharton

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν είτε από έναν ενήλικο οργανισμό είτε από εμβρυικούς/περιγεννητικούς ιστούς. Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα κύτταρα που προέρχονται από το ίδιο το έμβρυο και κύτταρα που προέρχονται από εξωεμβρυακές δομές όπως ο ομφάλιος λώρος του πλακούντα, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα της Γέλης Wharton (WJ-MSCs) και η αμνιακή μεμβράνη (Marino et al, 2019).



Εικόνα 4: Διαφοροποίηση κυττάρου προερχόμενου από τη γέλη Wharton (Rizal et al., 2020)

Η Γέλη του Wharton αποτελεί έναν βλεννογόνο συνδετικό ιστό του ομφάλιου λώρου που βρίσκεται μεταξύ του αμνιακού επιθηλίου και των ομφαλικών αγγείων. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από εκεί, έχουν μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης, είναι εύκολα ως προς την απομόνωσή τους, δεν προκαλούν σοβαρές ανοσολογικές αποκρίσεις και η χρήση τους δεν εγείρει ηθικούς προβληματισμούς (Abdulrazzak et al, 2010). Υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν ως προς χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα. Τα WJ-MSCs επιδεικνύουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα τόσο σε γενετικό όσο και

σε φαινοτυπικό επίπεδο με τη διαφορά πως τα WJ-MSCs έχουν μικρότερο χρόνο διπλασιασμού και μεγαλύτερη αναδιπλασιαστική ικανότητα *ex vivo* (Le Blanc et al, 2008).

2. Κυτταρική γήρανση

Η γήρανση στο επίπεδο των οργανισμών αποτελεί μία δυναμική διαδικασία η οποία προχωρά όσο προχωρά και ο χρόνος. Η γήρανση ενός οργανισμού χαρακτηρίζεται από σταδιακές αλλαγές τόσο σε μεταβολικό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο οδηγώντας σε αλλαγές εντός των ιστών και των οργάνων (Dziechciaż, 2014). Αυτού του είδους η γήρανση ονομάζεται χρονολογική γήρανση και σηματοδοτείται από τη συσσώρευση κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες και γηρασμένων κυττάρων εντός του οργανισμού (López-Otín, 2013). Με τον όρο κυτταρική γήρανση εννοούμε την μόνιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που αποτελεί απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα κατά την οποία τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά αδυνατώντας όμως να επανέλθουν στο φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Η επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης βοηθά στην διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και δρα ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεπώς στην καρκινογένεση (Hernandez-Segura, 2018).

2.1 Τα είδη της κυτταρικής γήρανσης

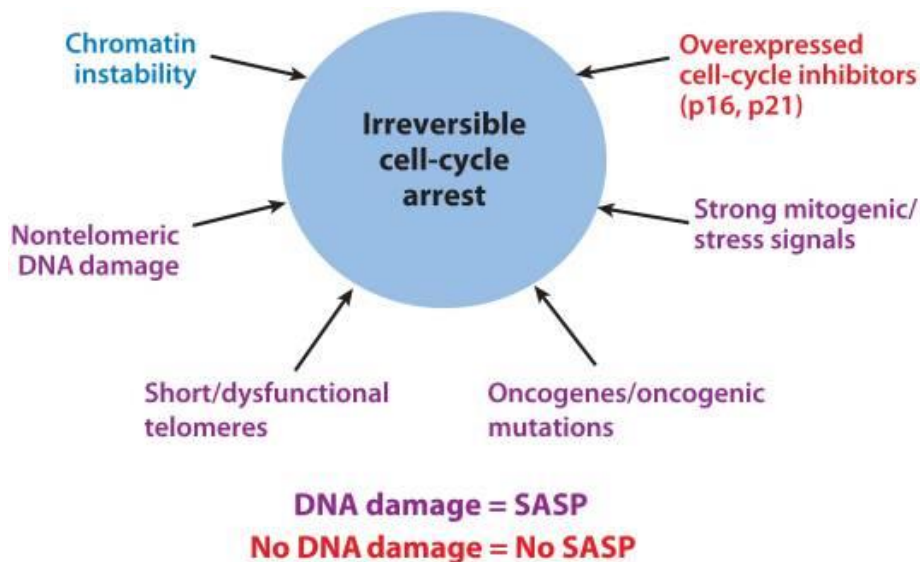
Μία πληθώρα από παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική γήρανση (Ben-Porath, 2004). Ανάλογα με το πώς προκαλείται η γήρανση διακρίνουμε την κυτταρική γήρανση που προκαλείται από δυσλειτουργία των τελομερών ή αλλιώς αναδιπλασιαστική γήρανση και την πρόωρη κυτταρική γήρανση που προκαλείται από στρεσογόνους παράγοντες (Ben-Porath, 2005).

Η αναδιπλασιαστική γήρανση παρατηρήθηκε αρχικά όταν ο Hayflick και οι συνεργάτες του έδειξαν πως ανθρώπινα κύτταρα και συγκεκριμένα ινοβλάστες δε μπορούσαν να διατηρούνται επ' άπειρον σε καλλιέργεια. Αυτά τα κύτταρα θεωρήθηκε πως είχαν περιορισμένη ικανότητα αναδιπλασιασμού. Ο αριθμός των διαιρέσεων που δύνανται να ολοκληρώσουν τα κύτταρα ονομάστηκε Hayflick limit (Hayflick, 1965). Πλέον είναι γνωστό πως το περιορισμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό που έχουν τα κύτταρα οφείλεται στη βράχυνση των τελομερών (Campisi, 2012). Τα τελομερή είναι αλληλουχίες στο τέλος των χρωμοσωμάτων που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια και έχουν προστατευτικό ρόλο καθώς προστατεύουν από τη φθορά ή τη σύντηξη με άλλα χρωμοσώματα. Στον

άνθρωπο αυτή η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία τους είναι η '5TTAGGG'3 (Ou et al., 2021). Το πρόβλημα προκύπτει από την ιδιότητα των πολυμερασών να μπορούν να αντιγράψουν το DNA μόνο όταν υπάρχει αλληλουχία-εκμαγείο και έτσι στο τέλος των χρωμοσωμάτων αδυνατούν να αντιγράψουν τις τελικές αλληλουχίες των τελομερών. Αποτέλεσμα αυτού είναι σε κάθε διπλασιασμό του DNA στο τέλος κάθε χρωμοσώματος να χάνονται κάποιες βάσεις (Levy, 1992).

Τα τελομερή παραμένουν άθικτα σε κύτταρα που εκφράζουν την τελομεράση, μία αντίστροφη μεταγραφάση που μπορεί να αναπληρώσει το τελομερικό DNA de novo (Collins, 2000). Ο αριθμός και τα είδη των κυττάρων που εκφράζουν τελομεράση ποικίλλουν ανάμεσα στα διάφορα είδη (Weng, 2000). Στα ποντίκια για παράδειγμα, πολλά είδη κυττάρων εκφράζουν τελομεράση, παρόλα αυτά τα κύτταρα αυτά είναι σπάνια. Στον άνθρωπο αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνουν τα καρκινικά κύτταρα, εμβρυικά βλαστοκύτταρα, συγκεκριμένα ενήλικα βλαστοκύτταρα και ορισμένα σωματικά κύτταρα (Zeng, 2007).

Τα λειτουργικά τελομερή αποτρέπουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA να αναγνωρίσουν το τέλος των χρωμοσωμάτων ως δίκλωνη ρήξη στο DNA, γεγονός που επάγει άμεση απόκριση του κυττάρου για επιδιόρθωση (DNA Damage Response DDR). Έτσι επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις ενός κυττάρου απουσία τελομεράσης τελικά θα οδηγήσει στο να μειωθεί σημαντικά το μήκος των τελομερών και επομένως να μην είναι λειτουργικά (Blackburn, 1991).



Εικόνα 5: Παράγοντες που προκαλούν παύση του κυτταρικού κύκλου (Ben-Porath, 2005)

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί και από άλλους πολλούς παράγοντες, όπως είναι το οξειδωτικό στρες που προκαλεί την επαγόμενη από στρες

πρόωρη κυτταρική γήρανση (Oxidative Stress Induced Premature Senescence - OSIPS), η εκτεταμένη βλάβη του DNA και η αποδιοργάνωση της χρωματίνης που προκαλείται από γενοτοξικούς παράγοντες, τα ισχυρά μιτογόνα/στρεσογόνα ερεθίσματα, η έκφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων που οδηγεί στην επαγόμενη από ογκογονίδια πρόωρη γήρανση (Oncogene Induced Premature Senescence) καθώς και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Schmitt, 2003, Ben-Porath, 2005).

Η γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια μπορεί να οφείλεται είτε στην έκφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων είτε στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Παράδειγμα αποτελεί η έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου Ras, του οποίου φυσιολογική πρωτεΐνη ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK κινασών (Serrano, 1997) καθώς και άλλα μόρια που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια αυτών των κινασών και υπερεκφράζονται ή είναι παρόντα με τις ογκογόνες μορφές τους (Braig, 2006). Μία περίπτωση απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η απώλεια του παράγοντα PTEN που σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την πρόκληση κυτταρικής γήρανσης in vivo (Parisotto et al., 2018).

Γενοτοξικούς παράγοντες αποτελούν φάρμακα ή/και ακτινοβολίες που χρησιμοποιούνται πολλές φορές ως θεραπευτικές προσεγγίσεις σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. Η δράση αυτών των παραγόντων οδηγεί σε βλάβες στο DNA με απόρροια την ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (Corré, 2010).

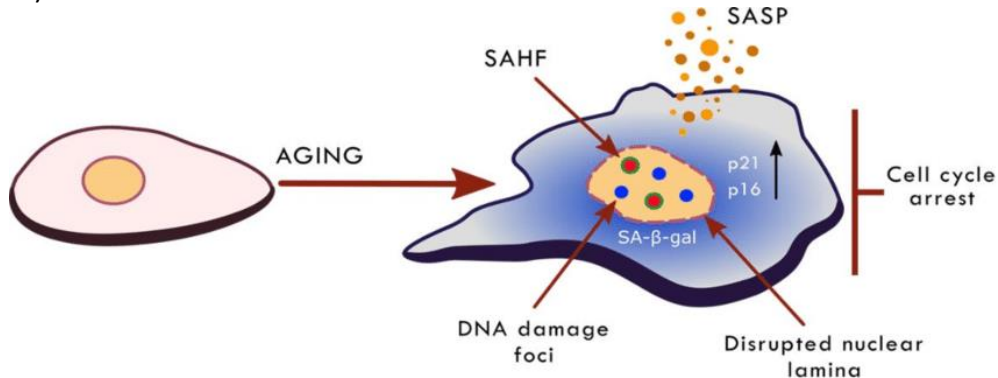
Το οξειδωτικό στρες οφείλεται στις δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου που επίσης δημιουργούν βλάβες στο DNA και επάγουν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω.

2.2 Φαινοτυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης

Τι χαρακτηρίζει λοιπόν ένα κύτταρο ως γηρασμένο όσον αφορά την μορφολογία του; Σε συνδυασμό με την παύση του κυτταρικού κύκλου και την έλλειψη δεικτών πολλαπλασιασμού υπάρχουν κι άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά που συναντάμε σε ένα γηρασμένο κύτταρο, όπως είναι η πεπλατυσμένη και ακανόνιστη μορφολογία, η αύξηση του όγκου αλλά και αλλαγές στην σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον ένα γηρασμένο κύτταρο εκκρίνει ποικίλους παράγοντες που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και αναφέρονται συνολικά ως εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με την γήρανση (SASP – Senescence Associated Secretory Phenotype) (Campisi, 2013).

Αύξηση του όγκου

Ανεξάρτητα με το κάθε οργανίδιο ξεχωριστά, η κυτταρική γήρανση επιφέρει τροποποιήσεις εντός του κυττάρου όπως ολική αύξηση της μάζας των οργανιδίων και μη φυσιολογική σηματοδότηση (Hwang, 2009).



Εικόνα 6: Αλλαγή της μορφολογίας γηρασμένων κυττάρων (Gadecka, & Bielak, 2019)

Αρχικά αυτή η αύξηση της μάζας των οργανιδίων είναι πιθανό να σχετίζεται με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και με τις μη φυσιολογικές αναβολικές διεργασίες, οι οποίες με τη σειρά τους καταλήγουν σε πρόσθετο στρες εντός των κυττάρων και απορρύθμιση της βιογένεσης των διάφορων οργανιδίων (Machado-Oliveira et al., 2020). Αλλαγές των μιτοχονδρίων περιλαμβάνουν την διόγκωση τους και αύξηση της μάζας τους (Tandler, 1986) και παρότι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί και τα μονοπάτια της μιτοχονδριακής γήρανσης, έχει προταθεί πως αυτές οι αλλαγές οφείλονται σε επιπλοκές του μηχανισμού της αυτοφαγίας (Kurz et al., 2008).

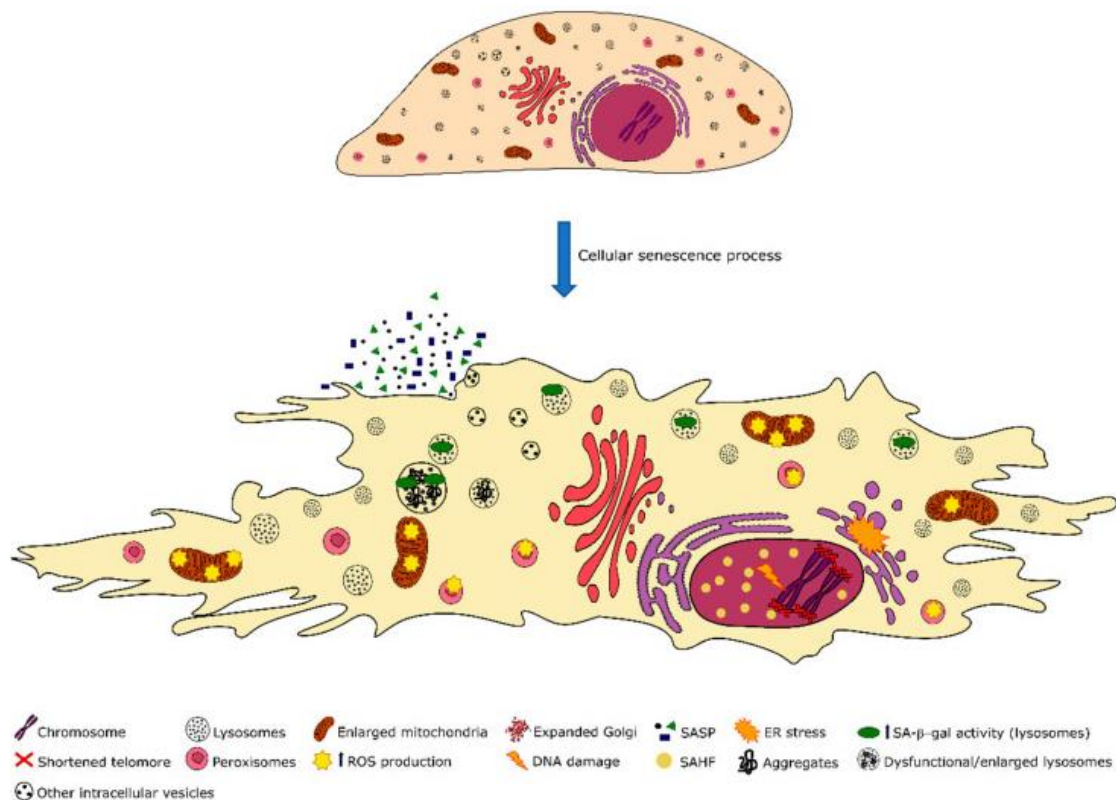
Τα λυσοσώματα εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και θεωρούνται τα κύρια καταβολικά οργανίδια του κυττάρου (Carmona-Gutierrez et al., 2016) που περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα και υπό όξινες συνθήκες αποικοδομούν μία πληθώρα υποστρωμάτων (Saftig, 2009). Έρευνες που διενεργήθηκαν τόσο in vitro όσο και in vivo έδειξαν αύξηση της μάζας των λυσοσωμάτων σε γηρασμένα σωματικά κύτταρα (Schmucker, 2002). Η αύξηση αυτή φαίνεται πως οφείλεται κυρίως σε αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων που περιέχουν ποσότητα λιποφουσκίνης (lipofuscin) που δεν πέπτεται ή αλλιώς πυκνά σωματίδια (Terman et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως η λιποφουσκίνη φάνηκε πως προκαλεί την έκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 καταλήγοντας στην υπόθεση πως η συγκέντρωση της λιποφουσκίνης μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική γήρανση (McHugh, 2018). Επίσης το γεγονός πως η βιογένεση των λυσοσωμάτων είναι αυξημένη υποστηρίζεται και από την αυξημένη ενεργότητα της σχετιζόμενης με τη γήρανση β-

γαλακτοσιδάσης (Senescence Associated SA-β-gal), έναν δείκτη που δείχνει αυξημένη λυσοσωμική ενεργότητα (Dimri et al., 1995).

Ακόμη, λόγω της γήρανσης αλλαγές συμβαίνουν και στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο στις οποίες οδηγεί το μονοπάτι γνωστό ως Unfolded Protein Response (UPR) που προκύπτει από μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες λόγω του στρες το οποίο και έχει ως συνέπεια την αύξηση του μεγέθους του Ενδοπλασματικού Δικτύου του (Kwon et al., 2019).

Αλλαγές στην πλασματική μεμβράνη

Η πλασματική μεμβράνη αποτελεί το όριο του κυττάρου και συμμετέχει στην μεταφορά μορίων εντός και εκτός των κυττάρων. Η μεμβράνη αποτελείται από διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων, σάκχαρα και πρωτεΐνες και περιέχει δομές όπως είναι τα μικροσπήλαια (caveolae). Τα μικροσπήλαια αποτελούν σχεδίες λιπιδίων με μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης που σχηματίζουν εγκοπλώσεις στην μεμβράνη (Ohno-Iwashita et al., 2010). Σε αυτά υπάρχει η πρωτεΐνη καβεολίνη-1 της οποίας τα επίπεδα έκφρασης φαίνεται να αλλάζουν στα γηρασμένα κύτταρα, κάτι που έχει δειχθεί και σε ινοβλάστες ποντικών (Volonte et al., 2002).



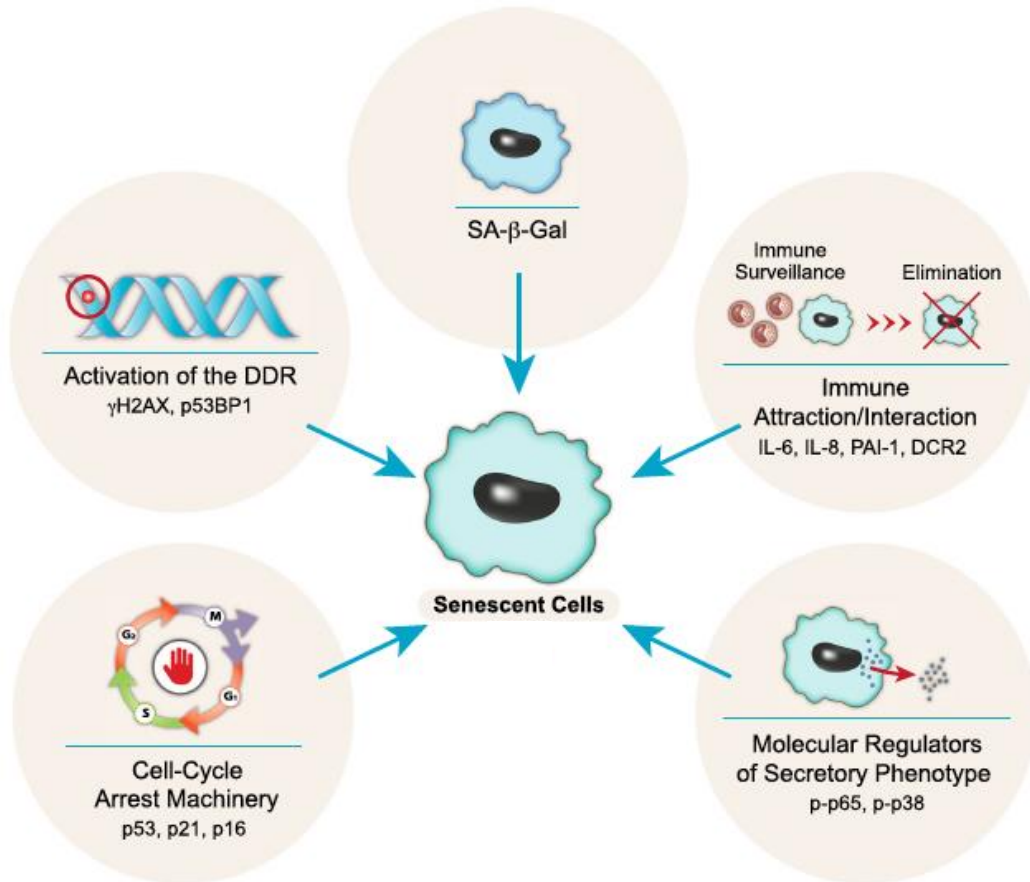
Εικόνα 7: Ενδοκυτταρικές αλλαγές γηρασμένων κυττάρων (Machado-Oliveira et al., 2020)

Αλλαγές στον πυρήνα

Τα γηρασμένα κύτταρα παρουσιάζουν αλλαγές και στην δομή και την οργάνωση της χρωματίνης. Χαρακτηριστικές είναι οι περιοχές της χρωματίνης που ονομάζονται σχετιζόμενες με την κυτταρική γήρανση εστίες ετεροχρωματίνης (Senescence-Associated Heterochromatin Foci-SAHF) και αποτελούν περιοχές ετεροχρωματίνης εμπλουτισμένες με πρωτεΐνες που έχουν κατασταλτικό ρόλο και μετατρέπουν εκείνες τις περιοχές του DNA στις οποίες είναι συνδεδεμένες σε μεταγραφικά ανενεργές περιοχές, όπως η τριμεθυλίωση στη λυσίνη 9 στην ιστόνη 3 (H3K9me3) ή η πρωτεΐνη HP1 (Narita M et al., 2003). Παρόλα αυτά οι SAHF δεν είναι καθολικός δείκτης της γήρανσης σε κυτταρικό επίπεδο καθώς συναντώνται και όταν υπάρχει ενεργοποίηση ογκογονιδίων και ο αρχικός τους ρόλος θεωρήθηκε πως ήταν η καταστολή γονιδίων που επάγουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Narita M et al., 2003, Zhang, 2007).

Ο Wang και οι συνεργάτες του παρατήρησαν σε ινοβλάστες που αντιμετώπιζαν αναδιπλασιαστική γήρανση ή πρόωρη γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια πως υπήρχε μείωση της έκφρασης της λαμίνης B1, πρωτεΐνης που βρίσκεται στην πυρηνική μεμβράνη (Wang et al., 2017). Λόγω λοιπόν αυτής της μείωσης αποσταθεροποιείται η μεμβράνη και αυξάνεται η διαπερατότητα του πυρήνα. Αποτέλεσμα αυτού είναι η εξαγωγή θραυσμάτων χρωματίνης στον κυτταροπλασματικό χώρο (CCFs) τα οποία φαίνεται να επάγουν τον SASP κατά την κυτταρική γήρανση (Dou et al., 2017, Gluck et al., 2017).

2.3 Βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης



Εικόνα 8: Βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης (Burton DG, Krizhanovsky, 2014)

- 1) Ένας βιοδείκτης που χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων είναι η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal), ενός λυσοσωμικού ενζύμου που ελέγχεται από το γονίδιο GLB1 του οποίου η έκφραση αυξάνεται κατά την κυτταρική γήρανση (Lee et al., 2006). Η β-γαλακτοσιδάση είναι μια υδρολάση που στα φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να διασπά τα υποστρώματα της σε pH=4. Αντίθετα στα γηρασμένα κύτταρα λόγω της αυξημένης λυσοσωμικής ενεργότητας το ένζυμο αυτό λειτουργεί και σε pH=6. Η δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να μετρηθεί προσθέτοντας ένα τεχνητό υπόστρωμα του, το χρωμογόνο 5-βρόμο-4-χλώρο-3-ινδολύλιο-β-D-γαλακτοσίδη (X-Gal), το οποίο καταλήγει σε μπλε χρώμα μετά από διάσπαση του από την β-γαλακτοσιδάση και να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ιστούς προσφέροντας την δυνατότητα ανίχνευσης της κυτταρικής γήρανσης και in vivo. Βέβαια η μέθοδος αυτή πρέπει

να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους ανίχνευσης των γηρασμένων κυττάρων (βιοδεικτών) για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. (Itahana, 2013, Debaq-Chainiaux, 2009).

- 2) Ανίχνευση των επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των κύριων μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης, όπως είναι για παράδειγμα οι πρωτεΐνες p16 και p53 οι οποίοι λειτουργούν καθοριστικά για την επαγωγή της γήρανσης και την παύση του κυτταρικού κύκλου. Τα μόρια αυτά δρουν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές όπως θα αναλυθεί λεπτομερώς και παρακάτω (Rossi, 2021).
- 3) Ανίχνευση μορίων που σχετίζονται με την παρουσία των βλαβών του DNA που έχει συγκεντρώσει ένα κύτταρο καθώς μεγάλη συσσώρευση οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου. Τέτοια μόρια είναι η γ -H2AX που είναι ενδεικτική των δίκλωνων ρήξεων του DNA. Η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται από κινάσες όπως η ATM που ανήκει στο PI3K μονοπάτι και αποτελεί το 1^ο βήμα για τον εντοπισμό δίκλωνης ρήξης. Ο εντοπισμός της ύπαρξης και συσσώρευσης της γ -H2AX γίνεται συνήθως με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού μέσω ειδικού για την γ -H2AX αντισώματος (Kuo, 2008).
- 4) Ανίχνευση μορίων που εκκρίνονται και αποτελούν μόρια του SASP φαινοτύπου.

Συνδυαστικά η ανίχνευση των αλλαγών που περιγράφηκαν παραπάνω μπορούν με ασφάλεια να καταδείξουν την παρουσία γηρασμένων κυττάρων.

2.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης

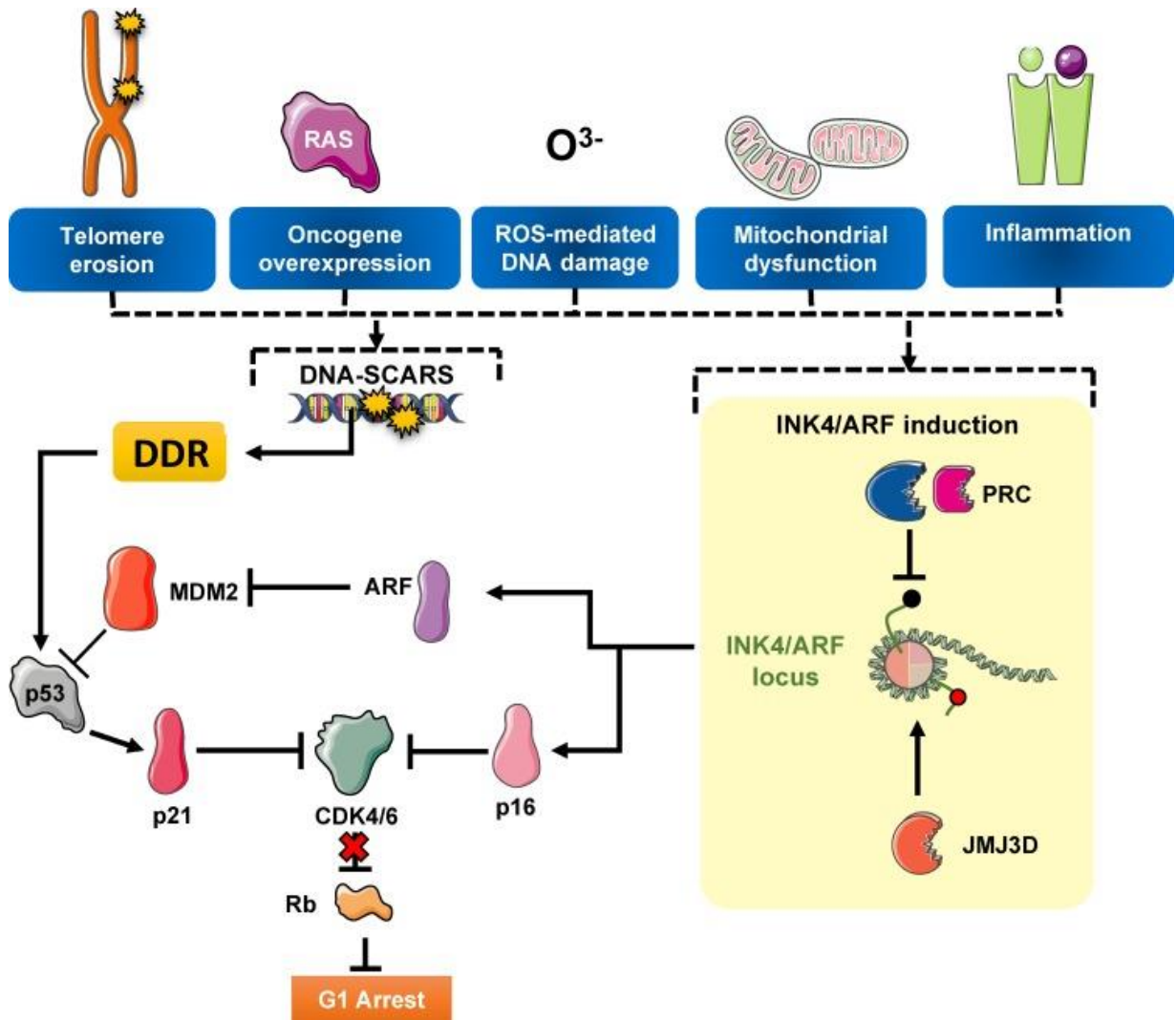
Όπως προαναφέρθηκε η κυτταρική γήρανση ενεργοποιείται φυσιολογικά ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες. Μόλις τα κύτταρα μπου στο στάδιο της γήρανσης παύουν να διαιρούνται και υφίστανται δραματικές μορφολογικές και μεταβολικές αλλαγές (Ben-Porath, 2005). Δύο είναι τα κύρια μονοπάτια με τα οποία το κύτταρο παύει να εκτελεί τον φυσιολογικό κύκλο του, το μονοπάτι p53/p21 και το p16/pRB. Τα μονοπάτια αυτά θεωρούνται και ογκοκατασταλκτικά εφόσον σταματούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ο οποίος κατά την εμφάνιση όγκων είναι ανεξέλεγκτος.

a) Μονοπάτι p53/p21

Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού μπορεί να γίνει τόσο από τον μηχανισμό απόκρισης του κυττάρου σε βλάβες όσο και από την ARF πρωτεΐνη.

Παράγοντες που επάγουν την γήρανση όπως η σμίκρυνση των τελομερών, το οξειδωτικό στρες και η έκφραση ογκογονιδίων προκαλούν βλάβες στο DNA. Αυτές οι βλάβες μπορεί να είναι μονόκλωνες ή δίκλωνες και έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και ATR κινασών. Η ATM κινάση φωσφορυλιώνει την H2AX ιστόνη γεγονός που οδηγεί στην στρατολόγηση περισσότερων ATM κινασών. Υπεύθυνη πρωτεΐνη για την στρατολόγηση τους είναι η 53BP1 (p53 binding protein 1). Όταν η συγκέντρωση των κινασών φτάσει σε μία συγκεκριμένη τιμή τότε ενεργοποιούνται άλλες κινάσες, οι Checkpoint 1 (CHK1) και Checkpoint 2 (CHK2) που με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν άλλα σηματοδοτικά μόρια συντελώντας την μεταγωγή του σήματος και σε πιο μακρινά σημεία. Στόχος αυτών των κινασών είναι και η πρωτεΐνη p53 (d'Adda di Fagagna, 2008, Fumagalli et al., 2012). Ο p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που δρα ως τετραμερές και ενεργοποιεί την μεταγραφή του παράγοντα p21. Ο p21 αποτελεί αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών-CDKs οι οποίες ρυθμίζουν τις μεταβάσεις του κυτταρικού κύκλου και έτσι το κύτταρο εξέρχεται από τον κυτταρικό του κύκλο (Vermeulen et al., 2003).

Ταυτόχρονα επαγωγή του παράγοντα p53 μπορεί να γίνει και μέσω του γενετικού τόπου INK4/ARF. Αυτός ο τόπος δίνει τρία μετάγραφα, την p16^{INK4a}, p15^{INK4b} και ARF πρωτεΐνες. Οι δύο πρώτες αποτελούν και αυτές αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Αντίθετα η ARF αποτρέπει την σύνδεση της MDM2 στον παράγοντα p53. Η MDM2 είναι λιγάση ουβικουιτίνης και με την πρόσδεσή της στον παράγοντα p53 τον οδηγεί τελικά σε αποστολή στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση του (Baar et al., 2017). Με αυτό τον τρόπο η αύξηση της ARF οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του p53 και άρα παύση του κύκλου. Ο p53 ρυθμίζει την ARF μέσω ενός αρνητικού κύκλου ανατροφοδότησης αφού έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα της σε p53^{-/-} ποντίκια (Harris & Levine, 2005).



Εικόνα 9: Μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης (McHugh, 2018)

b) Μονοπάτι p16/pRB

Από τον γενετικό τόπο INK4/ARF το δεύτερο μετάγραφο, η πρωτεΐνη αποτελεί αναστολέα των κυκλοεξαρτώμενων κινασών CDK4/6 οι οποίες φυσιολογικά φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB. Η υποφωσφορυλιωμένη πλέον pRB προσδένεται σε μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια E2F έτσι και δεν επιτρέπεται η είσοδος τους στον πυρήνα και μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την εναλλαγή των διάφορων φάσεων (McHugh, 2018).

2.5 Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με την γήρανση

Εκτός από την παύση του κυτταρικού κύκλου, η παραγωγή και έκκριση πολλαπλών μορίων και παραγόντων αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της κυτταρικής γήρανσης και ονομάζεται εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με την γήρανση (senescence-associated secretory phenotype – SASP). Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν εκατοντάδες παράγοντες συμπεριλαμβανομένου κυτοκινών, χημειοκινών (IL-6, CXCL8), αναπτυξιακών παραγόντων και πρωτεασών (Kuilman and Peeper, 2009, Corré et al., 2010). Ο συνδυασμός των παραγόντων που εκκρίνονται φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το αρχικό ερέθισμα επαγωγής της γήρανσης, με την γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια να έχει τη μεγαλύτερη επαγωγή έκκρισης παραγόντων. Παρόλα αυτά πολλοί βασικοί τελεστές του SASP και κύριοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι κοινοί ανάμεσα στα κύτταρα (Corpe et al., 2008).

Ο εκκριτικός φαινότυπος SASP συμμετέχει στην σηματοδότηση των κυττάρων τόσο αυτοκρινώς όσο και παρακρινώς, στην επαγωγή ανοσολογικών αποκρίσεων αλλά και στην καρκινογένεση έχοντας διττό ρόλο (Xue et al., 2007; Kang et al., 2011). Ο SASP είναι υπεύθυνος για τις θετικές αλλά και για τις αρνητικές λειτουργίες που αποδίδονται στα γηρασμένα κύτταρα (Kuilman and Peeper, 2009).

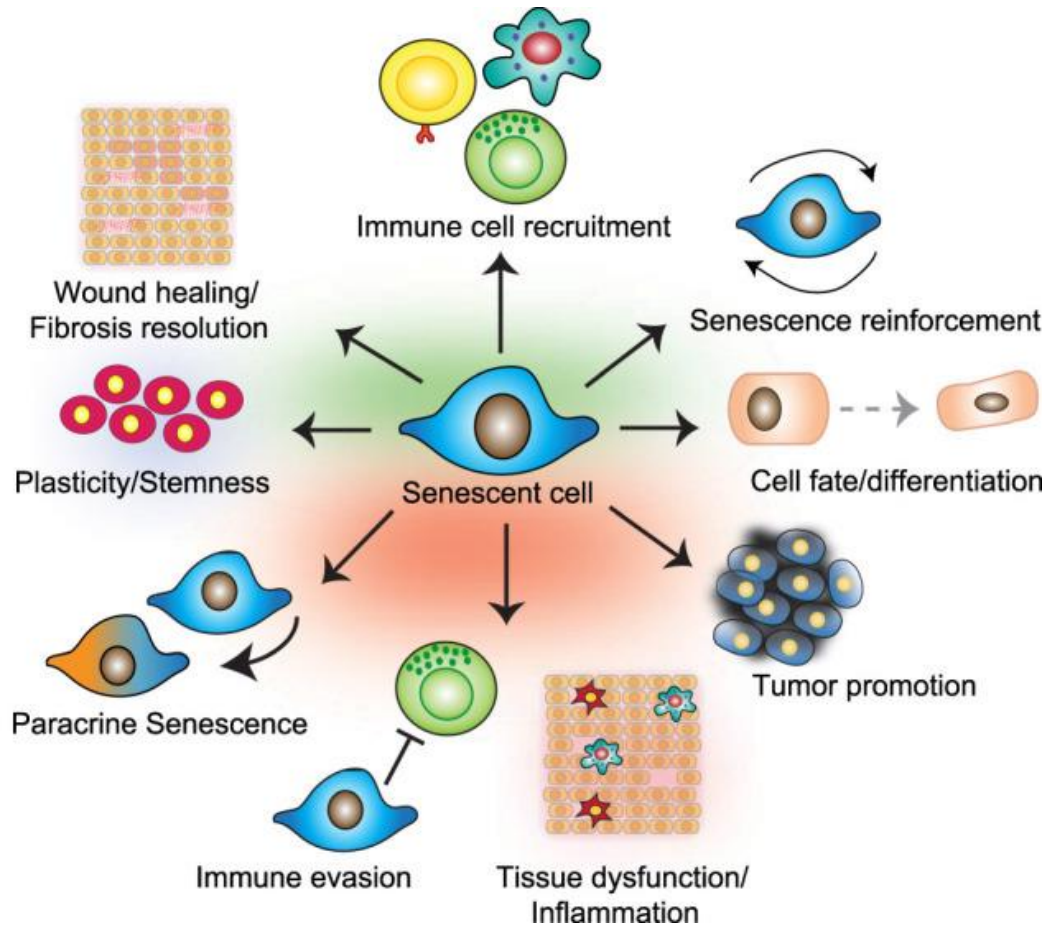
Αρχικά τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να επάγουν την ανανέωση, επούλωση (wound healing) αλλά και τον επαναπρογραμματισμό των ιστών ως απάντηση στις βλάβες που εμφανίζονται σε αυτούς (Ritschka et al., 2017). Η έκκριση ιντερλευκινών 6 και 8 μπορεί να δράσει σαν περαιτέρω σήμα κυτταρικής γήρανσης στο ίδιο το κύτταρο (αυτοκρινής) και μέλη της οικογένειας TGF-β, ο παράγοντας VEGF και χημειοκίνες όπως CCL2 και CCL20 μπορούν να σηματοδοτήσουν την έναρξη της κυτταρικής γήρανσης και σε διπλανά φυσιολογικά κύτταρα (παρακρινής) (Acosta et al. 2013).

Ο φαινότυπος SASP δεν περιλαμβάνει μόνο μόρια που επάγουν τη φλεγμονή και απόκριση αλλά και ένζυμα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (MMPs) (Corpe JP et al., 2010), αναστολείς των πρωτεϊνών σερίνης/κυστεΐνης (SERPINS) (Eren, 2014) κ.α. Μετά από μελέτες πρωτεομικής φάνηκε πως οι τελεστές που απελευθερώνονται μέσω SASP βρίσκονται είτε ως διαλυτά μόρια είτε υπάρχουν μέσα σε εξωσώματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρατηρείται κατά την διάρκεια γήρανσης ενός οργανισμού όπου παρατηρείται και συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων (Ozcan et al., 2016).

Τέλος, μέσω αυτού επάγεται η στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού, που όπως στην περίπτωση της ογκογένεσης μπορούν να δράσουν ως εξωτερικός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός (Xue et al., 2007; Kang et al., 2011). Η στρατολόγηση προγονικών μυελοειδών κυττάρων για

παράδειγμα που μεσολαβείται από τον SASP έχει ογκοκατασταλτικές συνέπειες στον καρκίνο του προστάτη και του ήπατος (Di Mitri et al., 2014, Eggert et al., 2016).

Από την άλλη, ο SASP φαινότυπος μπορεί να επάγει ογκογένεση προωθώντας την αγγειογένεση μέσω παραγόντων όπως ο VEGF και CCL5 (Corré et al., 2006, Eyman et al., 2009) ή προωθώντας την



Εικόνα 10: Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με την γήρανση (Birch, 2020)

αύξηση ήδη σχηματισμένων όγκων με παράγοντες όπως ο GROα και η Osteopontin. (Krtolica et al., 2001, Pazolli et al., 2009).

3.Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία ανισορροπία ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται και στο αντιοξειδωτικό οπλοστάσιο εντός του κυττάρου. Προκαλείται κυρίως από δύο κατηγορίες μορίων, τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου ή αλλιώς ROS και RNS και τα μη δραστικά μόρια όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου - H_2O_2 . Οι ελεύθερες ρίζες έχουν ελεύθερα ηλεκτρόνια και δύνανται πολύ εύκολα να αντιδράσουν με άλλα μόρια σε μία αντίδραση που ονομάζεται οξείδωση. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) φυσιολογικά διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στο εσωτερικό των κυττάρων όπως είναι για παράδειγμα η σηματοδότηση (Sato et al., 2013). Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται είτε από ενδοκυτταρικές διεργασίες είτε από εξωκυτταρικές πηγές. Η κύρια ενδοκυτταρική πηγή είναι τα μιτοχόνδρια όπου συντελείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση κατά την οποία διαρρέουν ηλεκτρόνια οδηγώντας στην παραγωγή ROS. Άλλοι τρόποι παραγωγής τους είναι η NADPH οξειδάση και τα υπεροξειδισώματα (Upadhyayula et al., 2019). Το NO παράγεται από τις συνθάσες του οξειδίου του αζώτου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το αμινοξύ L-αργινίνη και O_2 (Tejero, 2019). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η UV και η ιονίζουσα ακτινοβολία, βαρέα μέταλλα αλλά και ξеноβιοτικά (Navarro-Yepes et al., 2014). Όταν τα ROS/RNS υπάρχουν σε χαμηλές ποσότητες μέσα στον οργανισμό συντελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες (κύρια σηματοδότηση) ενώ εάν αυξηθούν μπορεί να προκαλέσουν βλάβες σε σημαντικές ενδοκυτταρικές δομές όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα (Rajendran et al., 2014, Wu et al., 2013).

3.1 Επαγόμενη γήρανση από οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με την κυτταρική γήρανση καθώς μετά την εφαρμογή εξωγενούς H_2O_2 σε διαφορετικά είδη κυττάρων προκλήθηκε φαινότυπος γήρανσης, υποδεικνύοντας πως το H_2O_2 μπορεί να αποτελεί επαγωγέα της κυτταρικής γήρανσης (Höhn et al., 2017). Η κυτταρική γήρανση που επάγεται με υπο-τοξικές (sub-toxic) συγκεντρώσεις ενός οξειδωτικού παράγοντα ονομάζεται κυτταρική γήρανση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες (Oxidative Stress Induced Premature Senescence).

4. Τα φύκη

Τα φύκη έχουν την ικανότητα παραγωγής πλήθους χημικών ενώσεων και δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή οι οποίες συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων και έχουν αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριδιακές, αντιπηκτικές, αντιπικτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί το ενδιαφέρον σε αυτά καθώς με τη μελέτη και την ταυτοποίηση των μορίων που περιέχουν μπορεί να ανακαλυφθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που προέρχονται από φυσικές πηγές.

4.1 *Gigartina teedei*

Το *Gigartina teedei* αποτελεί ένα είδος άλγης που ανήκει στο φύλο των ροδοφυκών, στην οικογένεια των Gigartinaceae του γένους *Gigartina*. Η παρουσία των ροδοφυκών είναι μεγαλύτερη σε τροπικά και θερμά νερά και υπολογίζονται ότι υπάρχουν περίπου 5.000-6.000 γνωστά είδη. Η κύρια μέθοδος ανάπτυξης τους περιλαμβάνει κυρίως προσκόλληση σε βράχους ή άλλα φύκη και σπάνια υπάρχουν και κάποιες επιπλέουσες μορφές τους. Είναι γνωστό πως πολλά ροδοφύκη παράγουν τοξικά είδη τερπενοειδών που χρησιμεύουν για την απομάκρυνση φυτοφάγων οργανισμών του θαλάσσιου οικοσυστήματος. Πολλά από αυτά τα τερπενοειδή δρουν εναντίον των όγκων και για αυτό σήμερα μπορεί να αποτελούν πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα (Raven, 2009). Άλλες ουσίες που περιέχουν τα ροδοφύκη είναι το β-καροτένιο και οι φαινολικές ενώσεις που αποτελούν αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα ο Schagen μελέτησε την σύνδεση ανάμεσα στο β-καροτένιο και στην



Εικόνα 11: *G. pistillata* προσκολλημένη σε βράχο (Cotas et al., 2020)

μείωση της γήρανσης στο δέρμα (Schagen, 2012). Σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει στο *Gigartina teedei* και στο συγγενικό της είδος *Gigartina pistillata*, έχουν βρεθεί μεγάλες ποσότητες ζεαξανθίνης,

ενός καροτενοειδούς και καραγενάνης (Carrageenan) ενός πολυσακχαρίτη που περιέχει σουλφιδικές ομάδες. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες καραγενάνης: η γιώτα, η κάπα και η λάμδα των οποίων η διαφορά έγκειται στον αριθμό των σουλφιδικών ομάδων. Στο *Gigartina teedei* υπάρχει κυρίως η κ-καραγενάνη στα αρχικά στάδια ανάπτυξης και η λ-καραγενάνη στα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια. Η καραγενάνη χρησιμοποιείται ως προσθετικό σε τροφές αλλά και σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα (van de Velde, 2005) και φαίνεται πως μπορεί να έχει αντικαρκινική και ανοσορυθμιστική δράση (Zhou, 2003).

4.2 *Codium fragile*

Το *Codium fragile* αποτελεί ένα είδος άλγης που ανήκει στο φύλο των χλωροφυκών, στην οικογένεια *Codiaceae* του γένους *Codium*. Τα χλωροφύκη αριθμούν 17.000 είδη με τα περισσότερα να είναι υδρόβια. Παρόλα αυτά ορισμένα είδη αναπτύσσονται σε ποικίλους βιότοπους όπως κορμοί δέντρων και το έδαφος. Το *Codium fragile* αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και κυριαρχεί στα νερά της εύκρατης ζώνης με τη μορφολογία του να θυμίζει τούφες (Raven, 2009). Σε πρωταρχικές έρευνες που έχουν γίνει στο συγκεκριμένο είδος έχει προσδιοριστεί η παρουσία φαινολικών ενώσεων και καροτενοειδών αλλά φαίνεται πως η αντιοξειδωτική του δράση είναι αρκετά ήπια (Koz, 2009).



Εικόνα 12: *C. Fragile* (Har, 1889)

5. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής αλλά και αντιγηραντικής δράσης εκχυλισμάτων από τα φύκη *Gigartina teedei* και *Codium fragile* σε βλαστοκύτταρα μεσεγχυματικού τύπου προερχόμενα από την γέλη του Wharton. Τα δύο αυτά είδη περιέχουν πολλές ενώσεις που μειώνουν τον αριθμό των ελεύθερων ριζών όπως έχει προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες. Πρωταρχικό βήμα για να διαπιστωθεί η επίδραση τους στα βλαστοκύτταρα είναι ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση που

αποτελεί τον πιο κοινό δείκτη της κυτταρικής γήρανσης. Έπειτα θα επιχειρηθεί ο προσδιορισμός των επιπέδων των βλαβών του DNA σε κύτταρα στα οποία έγινε εξωγενής προσβολή με H₂O₂. Αυτό επιτευχθεί μέσω του εντοπισμού της πρωτεΐνης 53BP1 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, προσδιορίζοντας έτσι τα επίπεδα των βλαβών του DNA τόσο σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία και απουσία των εκχυλισμάτων των φυκών. Έτσι θα μπορέσει να γίνει φανερό και αν διαδραματίζουν κάποιο προστατευτικό ρόλο τα εκχυλίσματα φυκών.

Ο απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν μέσω του συνδυασμού των παραπάνω μεθόδων και συνθηκών να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα για την επίδραση και μέσω επιπλέον μελετών και την ανίχνευση των μοριακών μηχανισμών επίδρασης των εκχυλισμάτων από φύκη στη γήρανση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

6. Υλικά και μέθοδοι

6.1 Κυτταρικό μοντέλο

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρικό μοντέλο στη συγκεκριμένη μελέτη είναι μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Ο Takechi και οι συνεργάτες του σε μελέτη τους έδειξαν πως τα κύτταρα αυτού του τύπου όταν ενσωματωθούν σε περιβάλλον πλούσιο σε κολλαγόνο έχουν την μορφολογία ινοβλαστών (Takechi, 1993). Επιπλέον τα WJ-MSCs αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδα με όριο πληρότητας το 80% της επιφάνειας καλλιέργειας τους. Εάν ξεπεράσουν αυτή την τιμή υπάρχει ανάγκη ανακαλλιέργειας με σκοπό την αποφυγή έκκρισης μορίων που αναστέλλουν την ανάπτυξη τους (contact inhibition). Τα συγκεκριμένα κύτταρα αποτελούν κύτταρα με υψηλό δυναμικό διαφοροποίησης διατηρώντας την πολυδυναμία τους για πολλές γενιές (passages) in vitro, εύκολα ως προς την απομόνωση τους και δεν εγείρουν ηθικούς προβληματισμούς ως προς την χρήση τους (Karahuseyinoglu, 2007). Επιπλέον τα κύτταρα αυτά μπορούν να συλλεχθούν σε μεγάλες ποσότητες χωρίς να τραυματίσουν τον δότη. Τα WJ-MSCs γενικά παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα τόσο γενετικά όσο και φαινοτυπικά, διαφέροντας όμως ως προς τον χρόνο διπλασιασμού τους (Liau, 2020).

6.2 Μέσα ανάπτυξης

Θρεπτικό μέσο

Είναι απαραίτητο για την σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Έγινε χρήση του Dulbecco's Modified Eagle Medium της εταιρείας Biowest (DMEM, BioWest). Για να εξασφαλιστεί η ύπαρξη όλων των αναπτυξιακών παραγόντων το μέσο εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός σε τελική συγκέντρωση 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco). Για να αποφευχθεί η επαγωγή μολύνσεων του θρεπτικού μέσου γίνεται προσθήκη των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1% v/v.

Διάλυμα Hank's Balanced Solution

Είναι το διάλυμα Phosphate Buffer Solution (PBS, Lonza) το οποίο αποτελεί υδατικό διάλυμα από άλατα που συμβάλλει στην διατήρηση σταθερού pH. Η συντήρηση γίνεται στους 25°C.

Θρυψίνη

Η θρυψίνη είναι ένζυμο με πρωτεολυτική δράση διασπώντας πεπτιδικούς δεσμούς. Η δράση του αποσκοπεί στην αποκόλληση των βλαστοκυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας τους. Ιδανική θερμοκρασία για την δράση του ενζύμου είναι οι 37°C ενώ για αποθήκευση 4°C.

6.3 Διαχείριση δειγμάτων

Συνθήκες ανάπτυξης

Χρησιμοποιήθηκε θάλαμος καθέτου νηματικής ροής τάξης II με τον οποίο εξασφαλίζεται η σωστή διαχείριση των δειγμάτων με αποφυγή του κινδύνου επιμόλυνσης λόγω της αποστείρωσης με UV ακτινοβολία και του φιλτραρίσματος του αέρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες πολυστυρενίου που διαθέτουν φίλτρο ώστε να επιτρέπεται η οξυγόνωση χωρίς επιμολύνσεις από το περιβάλλον.

Ο κλίβανος επώασης χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων σε σταθερή θερμοκρασία, υγρασία και συγκέντρωση 5% CO₂. Η πρόοδος της ανάπτυξης των κυττάρων παρατηρείται με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

Εφόσον απομονωθούν τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από την γέλη του Wharton του ομφάλιου λώρου οδηγούνται για αποθήκευση σε τράπεζα υγρού αζώτου σε θερμοκρασία -150°C . Για να επιτευχθεί αυτό τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) με τον αριθμό τους να ανέρχεται περίπου στα $4 \cdot 10^6$ κύτταρα ανά 1 ml θρεπτικού μέσου. Στα φιαλίδια προστίθενται ακόμα FBS-Fetal Bovine Serum (30%v/v) και DMSO-Dimethyl Sulfoxide (10%v/v). Το DMSO αποτελεί οργανικό διαλύτη που αποτρέπει την απότομη ψύξη των κυττάρων και έτσι αποφεύγεται η δημιουργία κρυστάλλων πάγου. Τέλος επειδή τα cryovials δεν εμπεριέχουν αντιβιοτικά μετά την απόψυξη συστήνεται η άμεση καλλιέργειά τους.

Απόψυξη κυττάρων

Αρχικά μεταφέρονται τα cryovials που περιέχουν τα βλαστοκύτταρα από την ψύξη στο υδατόλουτρο για 10-15 λεπτά ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (37°C). Σε falcon των 15ml τοποθετούνται 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και προστίθενται τα κύτταρα μετά το υδατόλουτρο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά (25°C) στο τέλος της οποίας απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο. Στο ίζημα που απομένει προστίθενται 5ml διαλύματος FBS και γίνεται επαναδιάλυση. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές και πάλι για 5-7 λεπτά (25°C). Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται με 2ml θρεπτικού μέσου DMEM. Τέλος τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα πολυστυρενίου που αποτελεί το μέσο καλλιέργειας, συμπληρώνονται με 3ml θρεπτικού μέσου DMEM και επωάζονται στον ειδικό κλίβανο. Όπως προαναφέρθηκε το όριο πληρότητας των κυττάρων είναι 80% και πέρα από αυτό υπάρχει ανάγκη για ανακαλλιέργεια των κυττάρων ώστε να αποφευχθεί το contact inhibition που οδηγεί πολλά κύτταρα στο θάνατο.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Αρχικά απομακρύνεται το παλιό θρεπτικό μέσο των κυττάρων και γίνεται διπλή πλύση με 5ml διαλύματος PBS. Για να επιτευχθεί αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα, τα κύτταρα επωάζονται με 1,5ml θρυψίνης για 3,5 λεπτά στον κλίβανο και ελέγχεται στο μικροσκόπιο η δράση της. Στη συνέχεια τοποθετούνται και 5ml θρεπτικού μέσου DMEM το οποίο απενεργοποιεί την πρωτεολυτική δράση της θρυψίνης. Με μηχανικό τρόπο επιτυγχάνεται το σπάσιμο των συσσωματωμάτων των κυττάρων που μπορεί να δημιουργήθηκαν μετά την δράση της θρυψίνης και

το περιεχόμενο μοιράζεται εκ νέου σε φλάσκες. Συμπληρώνεται ο κατάλληλος όγκος με θρεπτικό μέσο και οι φλάσκες οδηγούνται στον κλίβανο για επώαση.

6.4 Δείγματα από φύκη

Τα φύκη υπάρχουν υπό τη μορφή σκόνης έχοντας υποστεί επεξεργασία και διαλυτοποίηση με μεθανόλη. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα και των δύο ειδών φυκών διαλυμένα σε θρεπτικό μέσο με τις εξής συγκεντρώσεις:

<i>Gigartina teedei</i>	<i>Codium fragile</i>
0,2mg/ml	0,2mg/ml
0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
1 mg/ml	1 mg/ml
2 mg/ml	2 mg/ml
3 mg/ml	3 mg/ml

Table 1: Συγκεντρώσεις φυκών

6.5 Μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal

Το πρώτο βήμα για την εξακρίβωση της δράσης των εκχυλισμάτων από τα φύκη με τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα είναι ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύνου β-γαλακτοσιδάση (SA-β-gal) που όπως αναλύθηκε και πιο πάνω έχει αυξημένη δραστικότητα στα κύτταρα που υπόκεινται σε κυτταρική γήρανση με υπό-βέλτιστο pH ίσο με 6 ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα το βέλτιστο είναι 4. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πιο κοινή μέθοδος ανίχνευσης της κυτταρικής γήρανσης και στηρίζεται στο χρωμογόνο υπόστρωμα 5-βρόμο-3ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal) που όταν διασπάται υπό pH= 6 εμφανίζει μπλε χρώμα.

Τα κύτταρα στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος ήταν κύτταρα στα οποία δεν έγινε επίδραση με καμία ουσία οπότε είναι το control και κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με τα εκχυλίσματα από τα φύκη σε όλες τις συγκεντρώσεις που παρασκευάστηκαν και επωάστηκαν για 24 ώρες. Όλα τα κύτταρα ήταν από passage 19.

	1	2	3	4
A	NT cells	NT cells	G.t. 0,2mg/ml	G.t. 0,5mg/ml
B	G.t. 1mg/ml	G.t. 2mg/ml	G.t. 3mg/ml	C.f. 0,2mg/ml
C	C.f. 0,5mg/ml	C.f. 1mg/ml	C.f. 2mg/ml	C.f. 3mg/ml

NT: no treatment

G.t.: Gigartina Teedei

C.f.: Codium fragile

(σε όλα τα wells υπάρχουν
κύτταρα passage 19)

Table 2: Δοκιμασία SA-β-gal

Υλικά για τον προσδιορισμό SA-β-gal

-Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιούμε 0,2% φορμαλδεΰδη και 0,2% γλουταραλδεΰδη διαλυμένες σε PBS.

-Για την χρώση χρησιμοποιούμε διάλυμα που περιέχει:

Διάλυμα που ρυθμίζει το pH με σύσταση 40 mM Κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό Νάτριο

5mM $C_6N_6FeK_4$

5mM $C_6N_6FeK_3$

150 mM NaCl

2 mM $MgCl_2$

1mg/ml 5-βρόμο-3ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζιτής (Xgal, Sigma Aldrich: B4252 250MG)

Διαδικασία

Σε 12 well plate καλλιεργούνται τα κύτταρα σε συγκέντρωση $0,5-2 \cdot 10^5$ ανά well. Αφού απομακρυνθεί με πιπέτα το θρεπτικό υλικό γίνεται διπλή πλύση με κρύο διάλυμα PBS. Μονιμοποιούνται τα κύτταρα με το κατάλληλο διάλυμα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί ξανά διπλή πλύση με κρύο PBS και γίνεται η χρώση των κυττάρων με το

αντίστοιχο διάλυμα (1-2ml). Σε ειδικό κλίβανο χωρίς CO₂ τα κύτταρα επωάζονται για 6-24 ώρες. Τέλος, απομακρύνεται το διάλυμα πλύσης, γίνεται τριπλή πλύση των κυττάρων με κρύο PBS και παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο.

6.6 Οξεία εξωγενής προσβολή με H₂O₂

Για την μελέτη της αντιγηραντικής/αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από φύκη έγινε οξεία εξωγενής προσβολή από οξειδωτικό στρες σε κύτταρα passage 26 χρησιμοποιώντας H₂O₂.

Υλικά

- Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης DMEM χωρίς FBS και pen/strep (σκέτο) (Gibco)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (BioWest)
- Διάλυμα H₂O₂ (9,8M, Sigma Aldrich)

Προετοιμασία διαλύματος που περιέχει H₂O₂

Συγκέντρωση 300μM: σε ποσότητα 50ml σκέτου DMEM προστίθεται 1,5ml του H₂O₂

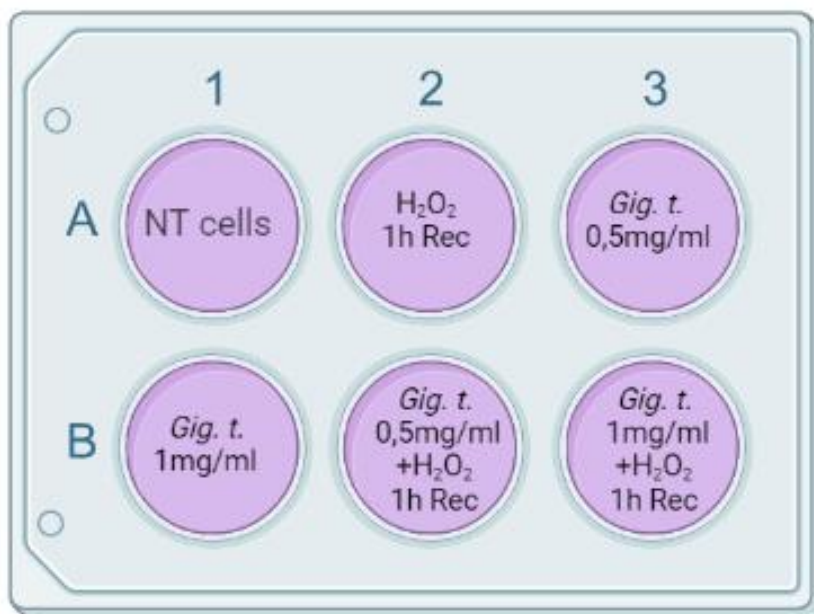
Η διαδικασία προσβολής θα περιγραφεί ταυτόχρονα με την διαδικασία ανοσοφθορισμού.

6.7 Ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 53BP1

Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο και στη συνέχεια μεταφέρονται σε 6 well plate όπου θα προστεθεί το εκχύλισμα από το φύκος *Gigartina teedei*, διάλυμα H₂O₂ συγκέντρωσης 300μM και σε άλλα αμφότερα.

Διαδικασία πριν τον ανοσοφθορισμό

Σε 6 well plate τοποθετούνται καλυπτρίδες σε κάθε well ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν πάνω από αυτές. Το 6 well plate αποστειρώνεται με ακτινοβολία UV για 20 λεπτά στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα που καλλιεργούνται τα κύτταρα. Γίνεται διπλή πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος PBS και ακολουθεί προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επώαση στο κλίβανο για 3,5 λεπτά. Αφού επιβεβαιωθεί η δράση της θρυψίνης μέσω παρατήρησης σε ανάστροφο μικροσκόπιο στο well plate προστίθενται τα κύτταρα με αριθμό 2*10⁵ ανά well.



NT: no treatment

Gig. t.: *Gigartina teedei*

1h Rec: 1 ώρα ανάκαμψη

(σε όλα τα wells υπάρχουν
κύτταρα passage 26)

Στα wells που τοποθετούνται τα φύκη, η επώαση γίνεται για 24 ώρες ενώ η επίδραση με το διάλυμα H₂O₂ γίνεται για 30 λεπτά σε ειδικό κλίβανο. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφήνονται για μία ώρα ώστε να ανακάμψουν από την προσβολή με το H₂O₂.

Για την μονιμοποίηση

-Διάλυμα μεθανόλης στους -20°C

-Διάλυμα PBS στους -4°C

Από το 12 well plate αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται σε κάθε well το διάλυμα μεθανόλης περίπου 300μl. Το well plate τοποθετείται στους -20°C για 10 λεπτά και έπειτα αφαιρείται το διάλυμα μεθανόλης. Σε κάθε well τοποθετείται 1ml PBS για έκπλυση και αφαιρείται με πολλή ακρίβεια ώστε να παραμείνει στεγνό το περιεχόμενο. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει η διαδικασία του ανοσοφθορισμού.

Υλικά ανοσοφθορισμού

- Triton-X-100 σε συγκέντρωση 1% διαλυμένο σε PBS
- Tween20 σε συγκέντρωση 0,02% διαλυμένο σε PBS
- Blocking buffer: Tween20 σε συγκέντρωση 0,02% διαλυμένο σε PBS και 1% BSA για να δεσμευτούν οι τυχόν μη ειδικές θέσεις σύνδεσης των δύο ειδών αντισωμάτων

Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού

Σε κάθε πηγαδάκι του 12 well plate γίνεται πλύση με 1ml διαλύματος PBS για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια προστίθενται 50ml διαλύματος 1% Triton-X-100 σε PBS και γίνεται επώαση για 10 λεπτά στους 25°C. Τα κύτταρα υφίστανται έκπλυση με 1 ml Tween20 σε συγκέντρωση 0,02% διαλυμένο σε PBS για 5 λεπτά. Γίνεται προσθήκη στη συνέχεια 1ml Blocking buffer σε κάθε well για επώαση για 10 λεπτά και μετά αφαιρείται. Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος (αραίωση 1:500) ποσότητας 50μl για 1 ώρα. Μόλις τελειώσει ο χρόνος το αντίσωμα απομακρύνεται και τα κύτταρα υφίστανται έκπλυση με το Tween20 σε συγκέντρωση 0,02% διαλυμένο σε PBS για 5 λεπτά με ταυτόχρονη ανάδευση. Σειρά έχει το δευτεροταγές αντίσωμα το οποίο προστίθεται σε ποσότητα επίσης 50μl (αραίωση 1:500) και η επώαση γίνεται για 45-60 λεπτά σε σκοτεινό μέρος. Τα κύτταρα εκπλένονται και πάλι με 1 ml Tween20 σε συγκέντρωση 0,02% διαλυμένο σε PBS για 5 λεπτά και πάλι αναδεύοντας και αφαιρούνται οι καλυπτρίδες από κάθε well.

Αφού στεγνώσει η κάθε καλυπτρίδα τοποθετούνται από πάνω της 10μl χρωστικής DAPI με την οποία επιτυγχάνεται χρωματισμός των πυρήνων των κυττάρων. Με ειδική λαβίδα η κάθε καλυπτρίδα γυρίζει ανάποδα και τοποθετείται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα άκρα τους σφραγίζονται και μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C σε σκιερό μέρος.

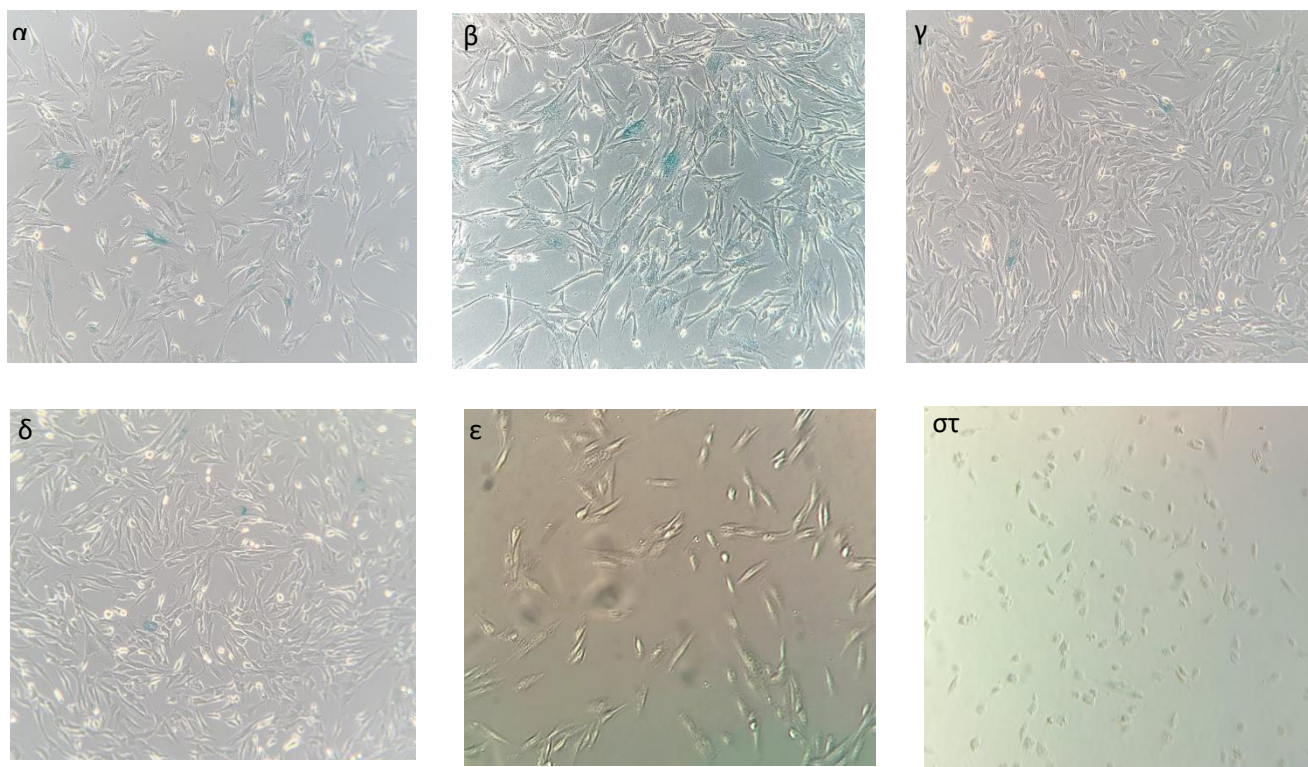
1^ο ταγες αντίσωμα	2^ο ταγες αντίσωμα
mouse monoclonal anti-53BP1 (1:500, clone BP13, Millipore, Burlington, MA, USA)	Anti-mouse Alexa fluor 488nm dye conjugated antibody green 1:500

Table 4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

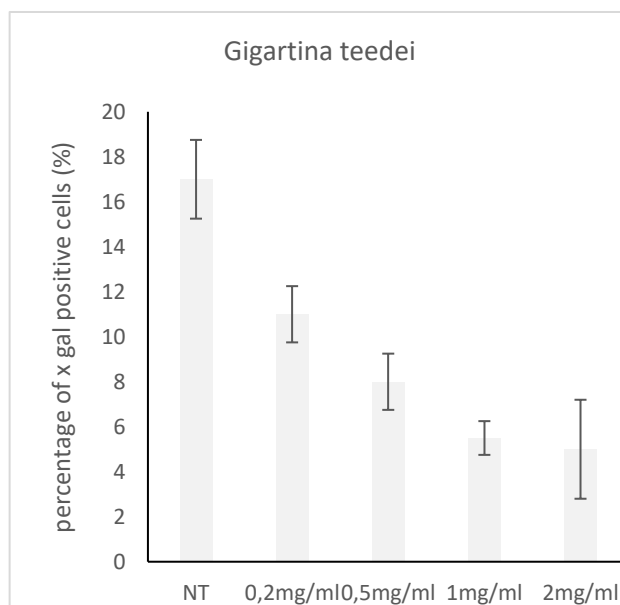
7. Αποτελέσματα

7.1 Προσδιορισμός της δραστηριότητας SA-β-gal

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των *Gigartina teedei* και *Codium fragile* στα βλαστοκύτταρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν έγινε καμία επίδραση και κύτταρα που επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα των *Gigartina teedei* και *Codium fragile* για 24 ώρες σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως περιγράφεται και στον πίνακα 1 (Table 1).



Εικόνα 13: Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος του φύκου *Gigartina teedei* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις α) no treatment, β) 0,2mg/ml, γ) 0,5mg/ml, δ) 1mg/ml, ε) 2mg/ml, στ) 3mg/ml



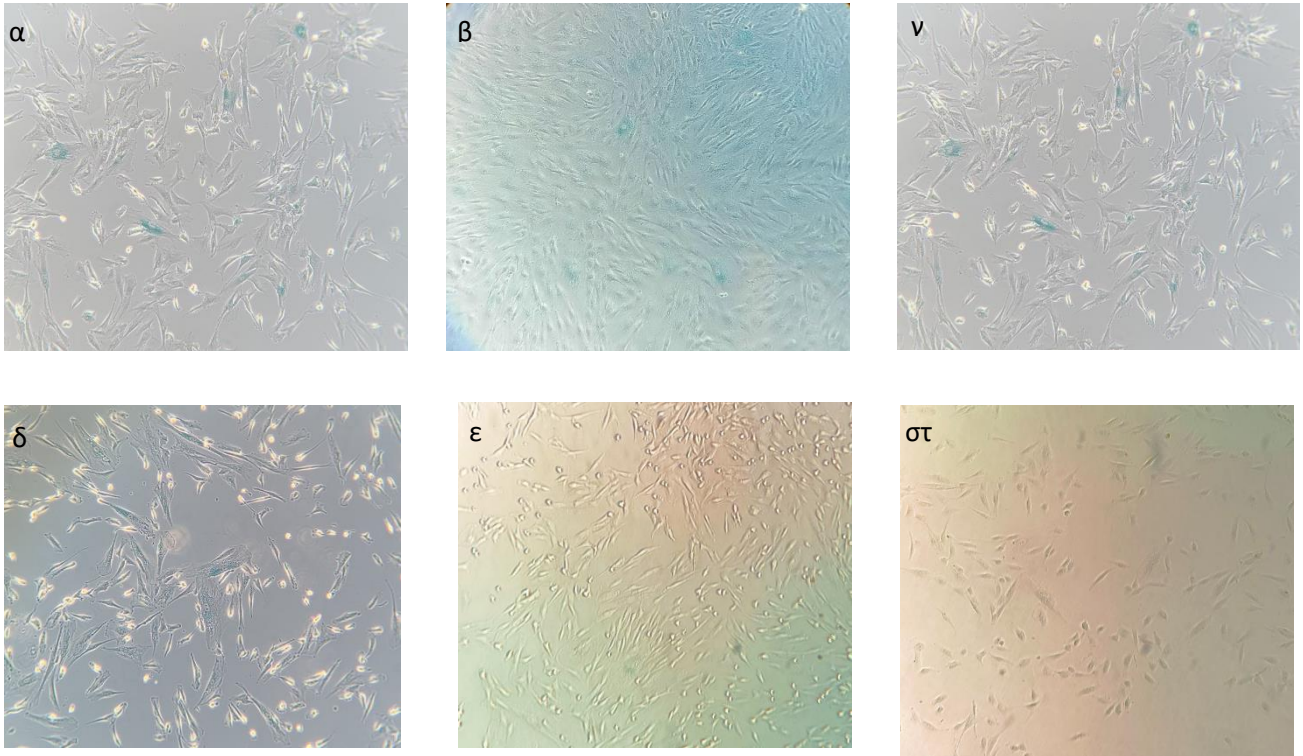
Διάγραμμα 1: Ποσοστό των x gal θετικών κυττάρων σε κύτταρα υπό την επίδραση του φύκου *Gigartina teedei* και σε κύτταρα χωρίς καμία επίδραση

Αρχικά, τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι passage 19 και εμφανίζουν μικρά ποσοστά γήρανσης άρα και μικρό αριθμό μπλε βαμμένων κυττάρων στην κατάσταση no treatment η οποία λειτουργεί ως control.

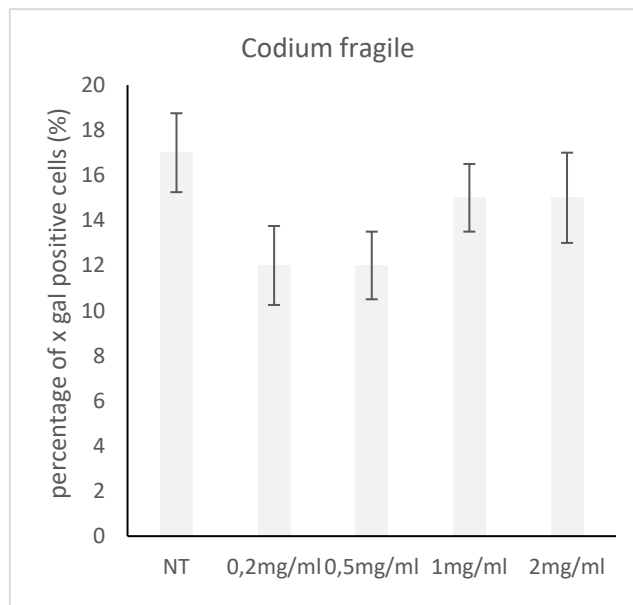
Στο *Διάγραμμα 1* φαίνεται μείωση του αριθμού των x gal θετικών κυττάρων, δηλαδή των γηρασμένων κυττάρων, στις συγκεντρώσεις 0,2mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml και 2mg/ml.

Από την *Εικόνα 13* ε,στ φαίνεται πως η μορφολογία των κυττάρων δεν είναι καλή στις συγκεντρώσεις 2mg/ml και 3mg/ml καθώς σε αυτά τα επίπεδα ξεκινά η επίδραση του *Gigartina teedei* να είναι κυτταροτοξική. Συγκεκριμένα στην συγκέντρωση 3mg/ml τα περισσότερα κύτταρα είναι νεκρά.

Έτσι, οι συγκεντρώσεις που παρατηρείται η μεγαλύτερη αντιγηραντική δράση, καθώς υπάρχει μεγαλύτερη μείωση των x gal θετικών κυττάρων, χωρίς να εμφανίζεται και κυτταροτοξικότητα για το φύκος *Gigartina teedei* είναι οι 0,5mg/ml και 1mg/ml.



Εικόνα 14: Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος του φύκου *Codium fragile* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις α) No Treatment, β) 0,2mg/ml, γ) 0,5mg/ml, δ) 1mg/ml, ε) 2mg/ml, στ) 3mg/ml



Διάγραμμα 2: Ποσοστό των x gal θετικών κυττάρων σε κύτταρα υπό την επίδραση του φύκου *Codium fragile* και σε κύτταρα χωρίς καμία επίδραση

Τα κύτταρα είναι και πάλι passage 19 οπότε δεν εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά γήρανσης άρα και μικρό αριθμό μπλε βαμμένων κυττάρων.

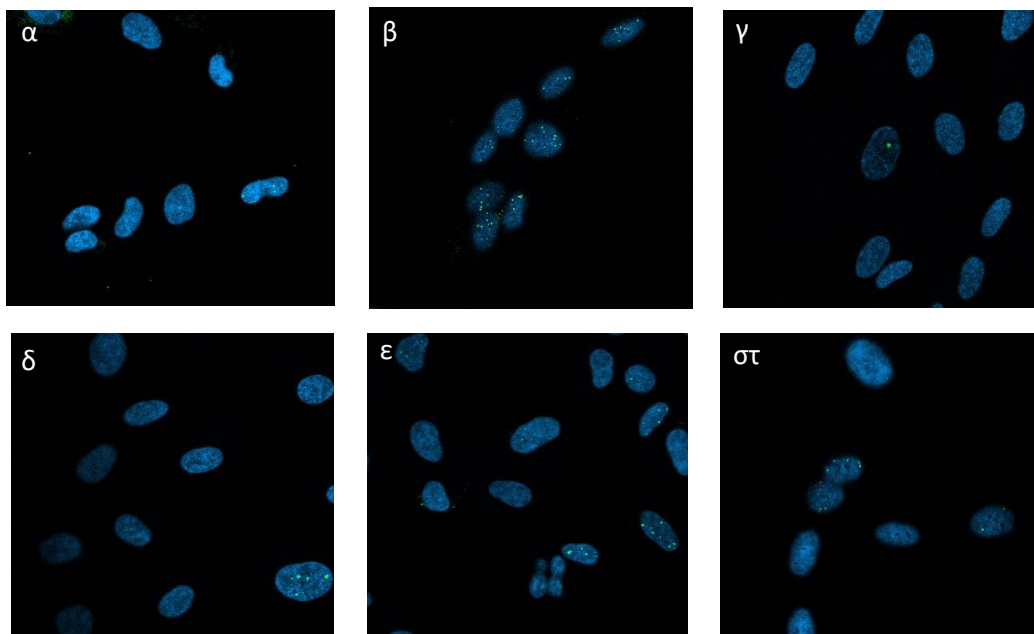
Στο Διάγραμμα 2 φαίνεται μείωση των x gal θετικών κυττάρων στις συγκεντρώσεις 0,2mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml και 2mg/ml.

Από την Εικόνα δ,ε,στ φαίνεται πως η μορφολογία των κυττάρων δεν είναι καλή στις συγκεντρώσεις 1mg/ml 2mg/ml και 3mg/ml καθώς η επίδραση του φύκους *Codium fragile* είναι κυτταροτοξική.

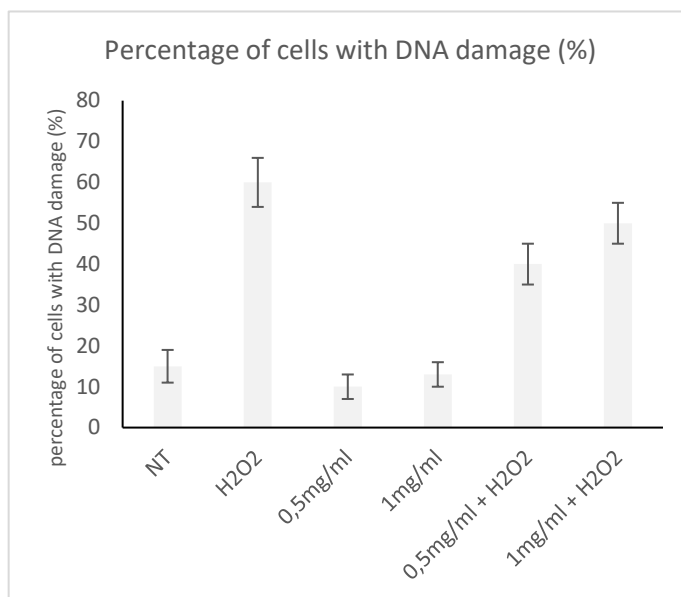
Οι καλύτερες συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται μείωση των x gal θετικών κυττάρων είναι οι 0,2mg/ml και 0,5mg/ml αλλά η μείωση αυτή είναι μικρή και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η επίδραση του φύκους είναι κυτταροτοξική.

7.2 Ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 53BP1

Με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη 53BP1 που συμμετέχει στο μονοπάτι επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, μπορούν να φανούν τα επίπεδα των βλαβών σε κύτταρα στα οποία έχει προκληθεί εξωγενής προσβολή με H_2O_2 , και πως αυτά επηρεάζονται από την επώαση ή μη των κυττάρων με το εκχύλισμα του φύκους *Gigartina teedei*.



Εικόνα 15: Προσδιορισμός των επιπέδων των βλαβών σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη 53BP1. α) No Treatment, β) κύτταρα υπό την επίδραση H_2O_2 , γ) κύτταρα με *G. Teedei* σε 0,5mg/ml, δ) κύτταρα με *G. Teedei* σε 1mg/ml, ε) κύτταρα με *G. Teedei* σε 0,5mg/ml και επίδραση H_2O_2 , στ) κύτταρα με *G. Teedei* σε 1mg/ml και επίδραση H_2O_2



Διάγραμμα 3: Ποσοστό των κυττάρων που το DNA τους έχει υποστεί βλάβες σε κάθε συνθήκη, κύτταρα χωρίς καμία επίδραση, κύτταρα με H₂O₂, κύτταρα με τα φύκη και κύτταρα με φύκη και H₂O₂

Αρχικά τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία του ανοσοφθορισμού ήταν passage 26, οπότε στην *Εικόνα 15 α* και στο *Διάγραμμα 3* στην κατάσταση no treatment στα κύτταρα υπάρχει ένα μικρό ποσοστό βλαβών στο DNA, περίπου 13-15%.

Στα κύτταρα τα οποία έγινε εξωγενής προσβολή με H₂O₂ για 30 λεπτά, συγκέντρωσης, το ποσοστό των βλαβών ανέρχεται περίπου στο 60%.

Τα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες με το φύκος *Gigartina teedei* στις συγκεντρώσεις 0,5mg/ml και 1mg/ml χωρίς να επαχθεί περαιτέρω πρόκληση των βλαβών με προσβολή με H₂O₂ παρουσίασαν ελαφρώς μικρότερα ποσοστά βλαβών περίπου 6-12% (0,5mg/ml – 6%, 1mg/ml – 12%).

Τέλος, τα κύτταρα τα οποία πρώτα επώαστηκαν με το *Gigartina teedei* και στην συνέχεια ακολούθησε προσβολή με το H₂O₂ παρουσίασαν μείωση του ποσοστού των βλαβών σε σχέση με τα κύτταρα με H₂O₂ χωρίς το εκχύλισμα του φύκου. Σε αυτές τις συνθήκες το ποσοστό ήταν περίπου 38-50% (0,5mg/ml – 38%, 1mg/ml – 50%).

8. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα βλαστοκύτταρα διαθέτουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης και μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης. Η απομόνωση βλαστοκυττάρων είναι μία σχετικά εύκολη διαδικασία όπως στην περίπτωση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που προέρχονται είτε από τον μυελό των οστών είτε από τον ομφάλιο λώρο. Τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν προκαλούν σοβαρές ανοσολογικές αποκρίσεις και η απομόνωσή τους δεν εγείρει ηθικούς προβληματισμούς (Beyer Nardi, 2006). Συνεπώς μπορούν να έχουν ποικίλες εφαρμογές σε κλινικές περιπτώσεις όπως είναι η επούλωση και η ανάπλαση των ιστών μετά από μεταμοσχεύσεις αλλά και σε άλλες παθήσεις όπως για παράδειγμα η οστεοαρθρίτιδα. Παρόλα αυτά κατά την ανάπτυξη τους, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, πολλοί παράγοντες μπορούν να τα οδηγήσουν στη κυτταρική γήρανση. Σε αυτούς περιλαμβάνεται και το οξειδωτικό στρες που προκαλεί βλάβες στο DNA και επάγει μία σειρά αντιδράσεων ενδοκυτταρικά ώστε να επιδιορθωθούν οι βλάβες.

Πολλές ουσίες μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν μέσα στον οργανισμό και οδηγούν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες. Τέτοιες ουσίες είναι για παράδειγμα οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή οι οποίες έχει βρεθεί πως υπάρχουν και σε ορισμένα είδη άλγης. Συγκεκριμένα τα είδη *Gigartina teedei* και *Codium fragile* περιέχουν β-καροτένιο, καραγενάνη και πολυφαινόλες και από την βιβλιογραφία είναι γνωστό πως έχουν ήπια αντιοξειδωτική δράση (Schagen, 2012). Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αντιγηραντικής και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από τα δύο αυτά είδη φύκους σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα.

Σε μία έρευνα ο J Cotas και οι συνεργάτες του (Cotas et al., 2020), έδειξαν πως ένα συγγενικό είδος της *Gigartina teedei*, η *Gigartina pistillata*, μπορεί να έχει αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες λόγω της ύπαρξης της ουσίας καραγενάνη. Η ίδια ουσία στις διάφορες ισομορφές της είναι βασική ουσία κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φύκους *Gigartina teedei* (van de Velde, 2005).

Για το *Codium fragile* σε έρευνα που έγινε από τον Koz και τους συνεργάτες του πραγματοποιώντας δοκιμασίες για τον έλεγχο της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών φάνηκε πως περιέχει φαινολικές ενώσεις και καροτενοειδή αλλά φαίνεται πως η αντιοξειδωτική του δράση είναι αρκετά ήπια (Koz et al., 2009).

Πρώτο βήμα λοιπόν για την έρευνα της αντιγηραντικής και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα ήταν ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, ενός κοινού βιοδείκτη της κυτταρικής γήρανσης. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τα εκχυλίσματα των φύκων σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα ήταν πως για το είδος *Gigartina teedei* στις συγκεντρώσεις 0,5mg/ml και 1mg/ml παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση στο ποσοστό των κυττάρων που βιάφτηκαν μπλε, άρα ήταν και γηρασμένα, χωρίς όμως να υπάρξει κυτταροτοξικότητα όπως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η κυτταροτοξικότητα γίνεται φανερή από την κακή μορφολογία των κυττάρων και από τον αριθμό των νεκρών κυττάρων (Εικόνα 13). Άρα το *Gigartina teedei* εμφανίζει αντιγηραντική δράση στα βλαστοκύτταρα με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις να είναι 0,5mg/ml και 1mg/ml.

Για το είδος *Codium fragile* στις συγκεντρώσεις 0,2mg/ml και 0,5mg/ml το ποσοστό των κυττάρων που βιάφτηκαν μπλε ήταν λίγο μικρότερο από τις άλλες συνθήκες ενώ σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα καθώς τα κύτταρα δεν έχουν καλή μορφολογία και πεθαίνουν. Ακόμα όμως και σε αυτές τις συγκεντρώσεις το *Codium fragile* προκαλεί μικρή μείωση του αριθμού των γηρασμένων κυττάρων (Εικόνα 14).

Με τη μέθοδο προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση προσδιορίσαμε αν τα δύο είδη άλγης έχουν αντιγηραντική δράση και σε ποιες συγκεντρώσεις αυτή εκδηλώνεται περισσότερο.

Στη συνέχεια ακολούθησε εξωγενής προσβολή με H₂O₂ σε κύτταρα με σκοπό την πρόκληση βλαβών και τον προσδιορισμό των επιπέδων τους με και χωρίς την επίδραση μόνο του *Gigartina teedei*. Το φύκος αυτό εμφάνισε αντιγηραντική δράση στα βλαστοκύτταρα χωρίς να εμφανίσει κυτταροτοξικότητα στις συγκεντρώσεις 0,5mg/ml και 1mg/ml.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των βλαβών επιτυγχάνεται με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη 53BP1 η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα που δεν είχε γίνει καμία επίδραση, σε κύτταρα που προσβλήθηκαν από εξωγενές H₂O₂, σε κύτταρα με την επίδραση του *G. teedei* σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε κύτταρα και με επίδραση του φύκους και με προσβολή με H₂O₂.

Όπως φαίνεται από την *Εικόνα 15* και το *Διάγραμμα 3* το φύκος εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση όταν δρα μόνο του στα κύτταρα, καθώς το ποσοστό των βλαβών του DNA είναι μικρότερο από αυτό των κυττάρων στην συνθήκη no treatment.

Ακόμη παρατηρούμε πως ενώ το ποσοστό των βλαβών στα κύτταρα τα οποία προσβλήθηκαν με H₂O₂ είναι αρκετά μεγάλο (60%), μειώνεται σε κύτταρα τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με το εκχύλισμα του φύκου στις συγκεντρώσεις 0,5mg/ml (38%) και 1mg/ml (50%). Η ιδιότητά του αυτή δείχνει πως το φύκος μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και να μειώνει τα ποσοστά των βλαβών που δημιουργούνται.

Συμπερασματικά, το είδος *Gigartina teedei* φαίνεται πως βοηθά κυρίως στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και έχει αντιγηραντική δράση στις συγκεντρώσεις 0,5mg/ml και 1mg/ml. Η δράση του αυτή συμφωνεί με τις προηγούμενες μελέτες που υπάρχουν και υποστηρίζουν ήπια αντιοξειδωτική δράση χάρη στα καροτενοειδή και τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτό (Schagen, 2012). Το *Codium fragile* περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες όπως έχει φανεί από αναλύσεις (Koz, 2009) αλλά δεν επιδεικνύει αξιοσημείωτη αντιγηραντική και αντιοξειδωτική δράση στα βλαστοκύτταρα.

Κλείνοντας είναι σημαντικό να τονιστεί πως για την εξαγωγή ακριβέστερων αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η χρήση μεγαλύτερου αριθμού δοτών και η διεξαγωγή των πειραμάτων σε διαφορετικές συνθήκες όπως για παράδειγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων αλλά και με διαφορετικούς χρόνους επώασης. Θα μπορούσε επίσης να διεξαχθεί μελέτη εστιάζοντας στον επιδιορθωτικό ρόλο του φύκου *Gigartina teedei* στις βλάβες του DNA.

9. Βιβλιογραφία

Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface*. 2010

Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, et al. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*

Baar M.P., Brandt R.M.C., Putavet D.A., Klein J.D.D., Derks K.W.J., Bourgeois B.R.M., Stryeck S., Rijksen Y., van Willigenburg H., Feijtel D.A., et al.. 2017. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2005

Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Investig*. 2004

Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008 Apr 10

Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98–105.

Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020 Dec 1

Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991

Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. 2006

Burton DG, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Nov 71(22):4373-86

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013, 75:685-705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653. Epub 2012 Nov 8

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013

Carmona-Gutierrez D., Hughes A.L., Madeo F., Ruckenstuhl C. The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.* 2016

Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011a). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15> Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011b). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67.

Collins K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol.* 2000

Coppé J.P., Kauser K., Campisi J., and Beauséjour C.M.. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.*

Coppe JP et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE* 5, e9188 (2010)

Coppe JP et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6, 2853–2868, 2008

Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010

Cotas J, Marques V, Afonso MB, Rodrigues CMP, Pereira L. Antitumour Potential of *Gigartina pistillata* Carrageenans against Colorectal Cancer Stem Cell-Enriched Tumourspheres. *Mar Drugs.* 2020 Jan 12

d’Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev Cancer*, 2008.

David A. Sassoon, *Stem Cell Biology: Structure and Function – The Adult Stem Cell Niche: Multiple Cellular Players in Tissue Homeostasis and Regeneration*, Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2022,

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J., Campisi, J. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4, 1798–1806, 2009

Di Mitri D., Toso A., Chen J.J., Sarti M., Pinton S., Jost T.R., D’Antuono R., Montani E., Garcia-Escudero R., Guccini I., et al.. 2014. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature.*

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

Dou Z., Ghosh K., Vizioli M.G., Zhu J., Sen P., Wangenstein K.J., Simithy J., Lan Y., Lin Y., Zhou Z., et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature.* 2017

Dziechciaż M, Filip R. Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann Agric Environ Med.* 2014

Eggert T., Wolter K., Ji J., Ma C., Yevsa T., Klotz S., Medina-Echeverz J., Longerich T., Forgues M., Reisinger F., et al.. 2016. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*

Eren M et al. PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 7090–7095 (2014)

Eyman D., Damodarasamy M., Plymate S.R., and Reed M.J.. 2009. CCL5 secreted by senescent aged fibroblasts induces proliferation of prostate epithelial cells and expression of genes that modulate angiogenesis. *J. Cell. Physiol.*

Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in bone marrow. In: Heersche JNM, Kanis JA, editors. *Bone and Mineral Research.* Amsterdam: Elsevier; 1990

Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., Barozzi S., Cittaro D., Kaplunov J.M., Bucci G., Dobрева M., Matti V., Beausejour C.M., et al.. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol,* 2012.

Gadecka, & Bielak, Anna. (2019). Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome. *Nutrients.*

Gluck S., Guey B., Gulen M.F., Wolter K., Kang T.W., Schmacke N.A., Bridgeman A., Rehwinkel J., Zender L., Ablasser A. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* 2017

Harris S.L., and Levine A.J.. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965

Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. Trends Cell Biol. 2018 Jun;28

Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T, Castro JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. Redox Biol. 2017 Apr

Hwang E.S., Yoon G., Kang H.T. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. Cell Mol. Life Sci. 2009

Itahana K., Itahana Y., Dimri G.P. Colorimetric Detection of Senescence-Associated β Galactosidase. Methods Mol. Biol. 2013

Jones, Richard et al. "Stem cells." Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation vol. 16,1 Suppl (2010)

Kang T.-W., Yevsa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., Hohmeyer A., Gereke M., Rudalska R., Potapova A., et al.. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. Nature

Koz, F. F. Y., Yavasoglu, N. U. K., & Demirel, Z. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Chlorophyta) essential oil and extracts. Asian Journal of Chemistry, 21(2), 1197.

Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., and Campisi J.. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

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

Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 2008 May-Jun

Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. Biochim. Biophys. Acta. 2008

Kwon S.M., Hong S.M., Lee Y.K., Min S., Yoon G. Metabolic features and regulation in cell senescence. BMB Rep. 2019

L.L. Liao, B.H.I. Ruszymah, M.H. Ng, J.X. Law, Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells, *Current Research in Translational Medicine*, Volume 68, Issue 1, 2020, Pages 5-16

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008

Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S. Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase. *Aging Cell*. 2006

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217

Machado-Oliveira G, Ramos C, Marques ARA, Vieira OV. Cell Senescence, Multiple Organelle Dysfunction and Atherosclerosis. *Cells*. 2020

Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, Castaldi SG, Serio B, Bianco R, Guida M, Selleri C. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells*. 2019 Jul 31

Mark Denham, Brock Conley, Fredrik Olsson, Timothy J. Cole, Richard Mollard, *Stem Cells: An Overview*, First published: 15 October 2005

McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018 Jan 2

Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 21

MNHN & OFB [Ed]. 2003-2022. Sheet of *Codium fragile* (Suringar) Har., 1889. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN).

Mora C, Serzanti M, Consiglio A, Memo M, Dell'Era P. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biol Toxicol*. 2017

Narita M et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716, 2003

Navarro-Yepes J., Zavala-Flores L., Anandhan A., Wang F., Skotak M., Chandra N. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014

Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hayashi, M., & Inomata, M. (2010). Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatrics & Gerontology International*, 10(s1), S41–S52

Ou HL, Hoffmann R, González-López C, Doherty GJ, Korkola JE, Muñoz-Espín D. Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. *Mol Oncol*. 2021 Oct

Ozcan S et al. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging* 8, 1316–1329 (2016)

Parisotto M et al. PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. *J. Exp. Med* 215, 1749–1763, 2018

Pazolli E., Luo X., Brehm S., Carbery K., Chung J.J., Prior J.L., Doherty J., Demehri S., Salavaggione L., Piwnica-Worms D., and Stewart S.A.. 2009. Senescent stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. *Cancer Res*

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003

Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., Lakshminarasaiah U. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2014

Ramakrishna RR, Abd Hamid Z, Wan Zaki WMD, Huddin AB, Mathialagan R. Stem cell imaging through convolutional neural networks: current issues and future directions in artificial intelligence technology. *PeerJ*. 2020 Nov 18

Raven Peter, Evert F. Ray, Eichhorn E. Susan, *Biology of Plants*, 2009, W.H. Freeman & Company

Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif*. 2004

Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, Sansom OJ, Zender L, Keyes WM. 2017. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*

Rizal, R., Syaidah, R., Evelyn, E., Hafizh, A., Frederich, J., 2020. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells: Differentiation Capacity Showing its Role in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Technology*. Volume 11(5), pp. 1005-1014

Rossi M, Abdelmohsen K. The Emergence of Senescent Surface Biomarkers as Senotherapeutic Targets. *Cells*. 2021 Jul 9

Saftig P., Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009

Sato H., Shibata H., Shimizu T., Shibata S., Toriumi H., Ebine T. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*, 2013

Schagen SK, Zampeli VA, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Discovering the link between nutrition and skin aging. *Derm Endocrinol* 2012;4:298–307. <https://doi.org/10.4161/derm.22876>.

Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy—cutting the lifelines of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2003

Schmucker D.L., Sachs H. Quantifying dense bodies and lipofuscin during aging: A morphologist's perspective. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2002

Sercin Karahuseyinoglu, Ozgur Cinar, Emine Kilic, Fadil Kara, Guvem Gumus Akay, Duygu Özel Demiralp, Ajlan Tukun, Duygu Uckan, Alp Can, Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys, *Stem Cells*, Volume 25, Issue 2, February 2007, Pages 319–331

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997

Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, 1993

Tandler B., Hoppel C.L. Studies on giant mitochondria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986

Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1

Terman A., Dalen H., Eaton J.W., Neuzil J., Brunk U.T. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: The role of autophagocytosis. *Exp. Gerontol.* 2003

Upadhyayula Sai Srinivas, Bryce W.Q. Tan, Balamurugan A. Vellayappan, Anand D. Jeyasekharan, ROS and the DNA damage response in cancer, *Redox Biology*, Volume 25, 2019

van de Velde, F.; De Rooter, D.G.A. De Carrageenan. In *Biopolymers Online*; Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbüchel, A., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2005

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 2003.

Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002

Wang AS, Ong PF, Chojnowski A, Clavel C, Dreesen O. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci Rep*. 2017 Nov 15

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000

Weng NP, Hodes RJ. The role of telomerase expression and telomere length maintenance in human and mouse. *J Clin Immunol*. 2000

Wu J. Q., Kosten T. R., Zhang X. Y. Free radicals, antioxidant defense system, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2013

Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., and Lowe S.W.. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 68.

Zeng X, Rao MS. Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience*. 2007

Zhang R, Chen W & Adams PD Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol* 27, 2343–2358, 2007

Zhou, G. «In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*». *Pharmacological Research*, 2003