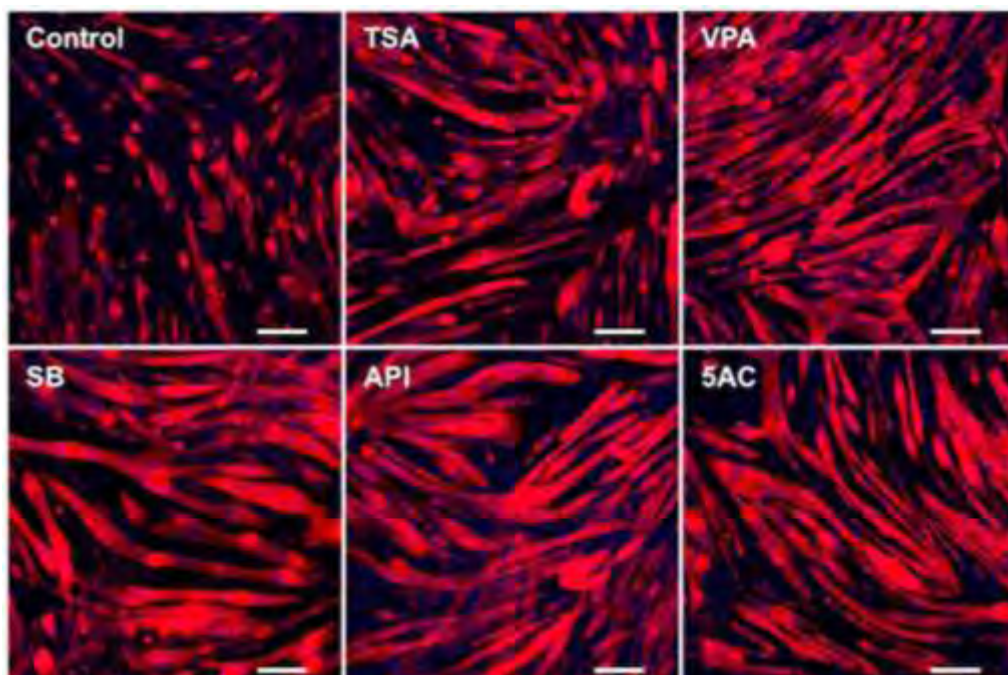




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της επίδρασης του υποχλωριώδους οξέος σε μυϊκά  
κύτταρα**



Χριστοδούλου Χριστίνα

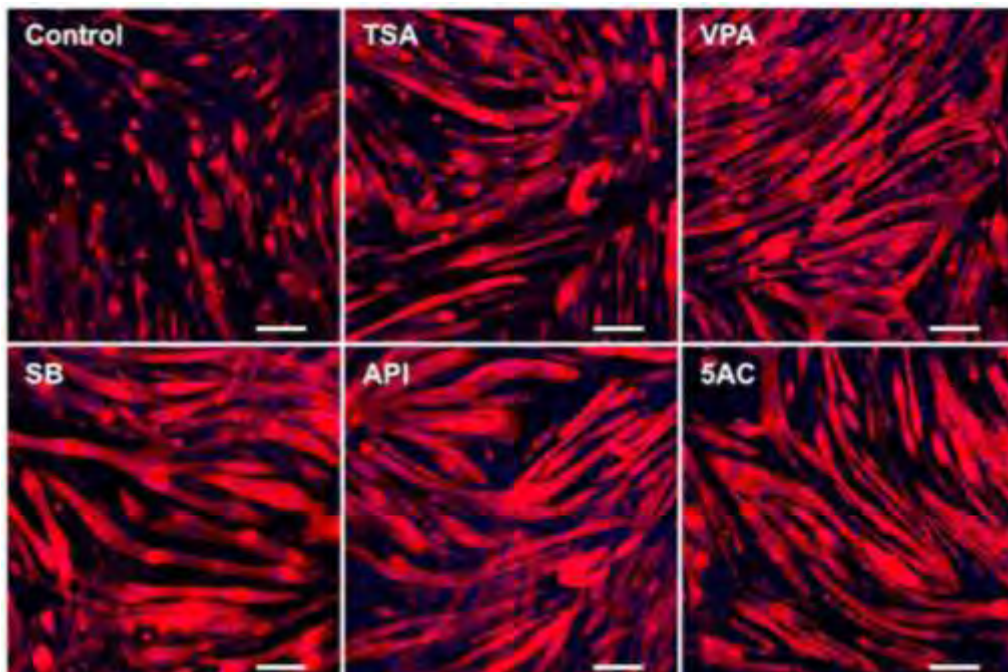
Λάρισα, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

**DIPLOMA THESIS**

**Study of the effect of hypochlorous acid on muscle cells**



Christodoulou Christina

Larisa, 2019

## Τριμελής επιτροπή

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (Επιβλέπουσα)

**Βεσκούκης Αριστείδης:** Συμβασιούχος Διδάσκοντας Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

---

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος, και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Λιαδάκη Καλλιόπη για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή και να εκπαιδευτώ σε ένα πολύ ενδιαφέρον για μένα μοντέλο έρευνας, αλλά και για την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει, επίσης, να πω και στον κ Βεσκούκη Αριστείδη για την πολύτιμη βοήθειά και τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη των δύο εργαστηρίων που χρειάστηκε να δουλέψω για τη βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη ανοχή τους και για το γεγονός ότι βρίσκονται συνεχώς δίπλα μου δείχνοντας την αγάπη και την στήριξή τους, ακόμη και αν δεν κατανοούν πλήρως τις εργαστηριακές μου ανησυχίες.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1  ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1  Μυϊκό σύστημα.....	8
1.1.1  Δομή σκελετικού μυός.....	9
1.2  Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.2.1  Ορισμός ελευθέρων ριζών.....	11
1.2.2  Αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	11
1.2.2.1  Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	12
1.2.3  Δραστικές μορφές οξυγόνου ως σηματοδοτικά μόρια.....	14
1.2.4  Υποχλωριώδες οξύ (HClO).....	16
1.2.4.1  Σύνθεση και ιδιότητες HClO.....	16
1.2.4.2  Αντιδράσεις HClO με βιολογικά μόρια.....	17
1.2.4.2.1  Αντιδράσεις με πρωτεΐνες.....	17
1.2.4.2.2  Αντιδράσεις με νουκλεϊκά οξέα.....	18
1.2.4.2.3  Αντιδράσεις με λιπαρά οξέα.....	18
1.2.4.2.4  Αντίδραση με γλουταθειόνη.....	19
1.3  Οξειδωτικό στρες.....	20
1.4  Αντιοξειδωτικά μόρια.....	22
1.4.1  Ορισμός αντιοξειδωτικών.....	22
1.4.2  Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	22
1.4.3  Γλουταθειόνη (GSH).....	23
1.5  Σκοπός εργασίας.....	25
2  ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1  Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά.....	26
2.2  Κυτταρική σειρά C2C12.....	28
2.3  Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια.....	29

2.4  Μακροχρόνια συντήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας.....	31
2.4.1  Πάγωμα κυττάρων.....	32
2.4.2  Απόψυξη κυττάρων.....	33
2.5  Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου.....	33
2.6  Έλεγχος μόλυνσης καλλιέργειας από μυκόπλασμα.....	35
2.6.1  Πειραματική διαδικασία.....	36
2.7  Παρασκευή διαλυμάτων HClO.....	38
2.8  Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	38
2.8.1  Αρχή της μεθόδου.....	39
2.8.2  Πειραματική διαδικασία.....	40
2.8.3  Επεξεργασία- Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	41
2.9  Επώαση κυττάρων C2C12 με HClO για εκτίμηση ελευθέρων ριζών (ROS) και γλουταθειόνης (GSH).....	42
2.10  Προσδιορισμός ελευθέρων ριζών (ROS) και γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής.....	42
2.10.1  Αρχή της μεθόδου.....	42
2.10.2  Πειραματική διαδικασία.....	44
3  ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
3.1  Αποτελέσματα ελέγχου μόλυνσης από μυκόπλασμα.....	46
3.2  Αποτελέσματα προσδιορισμού κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	47
3.3  Αποτελέσματα προσδιορισμού ελεύθερων ριζών (ROS) και γλουταθειόνης (GSH) με χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	49
4  ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
4.1  Μελλοντικοί στόχοι.....	56
5  ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή του υποχλωριώδους οξέος (HClO), μίας σημαντικής δραστικής μορφής χλωρίου, από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση των φαγοκυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή. Το μόριο αυτό υπεύθυνο για την ιδιότητα των κυττάρων αυτών να εξουδετερώνουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Εκτός από αυτή τη βιολογική δράση, στο HClO έχει αποδοθεί ένας επιπρόσθετος ρόλος με βάση την κυτταρική οξειδοαναγωγική σηματοδότηση καθώς έχει συσχετιστεί με την αναγέννηση ιστών. Ωστόσο, το ζήτημα αυτό δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, επομένως, σκοπός ήταν η δημιουργία ενός *in vitro* συστήματος που προσομοιάζει τη φλεγμονώδη απόκριση προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του HClO στην αύξηση βιωσιμότητα μυοβλαστών ποντικού της σειράς C2C12 σκελετικών μυϊκών κυττάρων και η σύνδεσή της με μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και γλουταθειόνης (GSH). Τα κύτταρα επωάστηκαν με ένα ευρύ εύρος συγκεντρώσεων HClO (628 pM - 4 M) για 10 min, 1h και 24 h. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των 6,28 μM ήταν αυτή από την οποία η κυτταρική βιωσιμότητα, που μετρήθηκε με το αντιδραστήριο ΧΤΤ, άρχισε να έχει αυξητική τάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις ο ρόλος της γλουταθειόνης και των ROS που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, αν και φαίνεται ότι είναι σημαντικός, δεν είναι αποφασιστικός. Στη συγκέντρωση των 3 mM, όμως, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 10 min και μάλιστα με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από το οξειδοαναγωγικό προφίλ των κυττάρων. Επομένως, από τα αποτελέσματά μας παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις HClO πολύ χαμηλότερες από αυτές που έχουν παρατηρηθεί *in vivo* σε ιστούς. Ωστόσο, οι δραστικές μορφές φαίνεται ότι έχουν πιο άμεση συμμετοχή όταν χορηγηθούν 3 mM HClO στα μυϊκά κύτταρα. Το μοντέλο που φτιάξαμε σε αυτό το πείραμα αποδεικνύεται ιδιαίτερα ευαίσθητο για την εκτίμηση της αναγεννητικής δράσης του HClO.

### Λέξεις – Κλειδιά

Υποχλωριώδες οξύ (HClO), μυελοπεροξειδάση (MPO), δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), γλουταθειόνη (GSH), μυοβλάστες ποντικού C2C12, ΧΤΤ, κυτταρομετρία ροής (FACS)

## ABSTRACT

The production of hypochlorous acid (HClO), which is a crucial reactive chlorine species, by the enzyme myeloperoxidase present in phagocytes plays a vital role in inflammation. HClO is responsible for the ability of these cells to face pathogens. Apart from this biological action, HClO has been also linked to tissue regeneration through redox signaling, however this issue is rather overlooked. Therefore, the main aim of the present dissertation was to create an *in vitro* system that simulates *in vivo* inflammatory response in order to study the putative effects of HClO on the growth enhancement of C2C12 mouse myoblasts and its association with alterations in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH). The cells were incubated with a wide range of HClO concentrations (628 pM - 4 M) for 10 min, 1h and 24 h. According to our results, the cell growth measured using the XTT reagent was increased in concentrations higher than 6.28  $\mu$ M. Interestingly, after incubation with 3 mM of HClO for 10 min we observed the highest cell growth through a redox related mechanism as indicated our results in ROS and GSH, which were measured through flow cytometry. We report that an increase in cell viability was observed in concentrations lower than those measured *in vivo*. Conclusively, the *in vivo*-like model created in this study seems to be very suitable and sensitive for the evaluation of the regenerative properties of HClO.

### Keywords

Hypochlorous acid (HClO), myeloperoxidase (MPO), reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), C2C12 skeletal muscle cell line, XTT, flow cytometry (FACS)



# 1 | Εισαγωγή

## 1.1 | Μυϊκό σύστημα

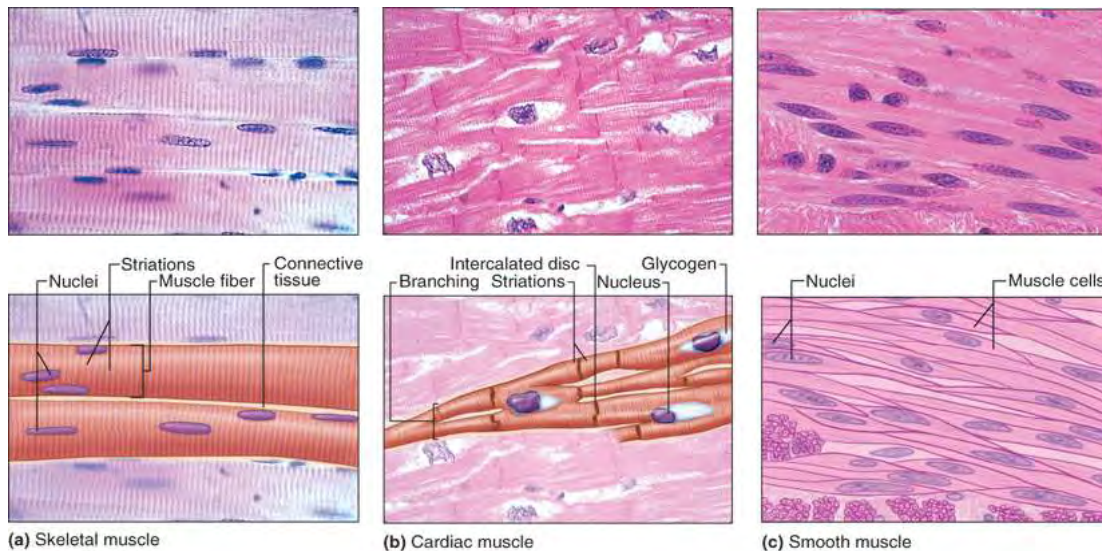
Οι μύες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα ιστών του σώματος και αντιστοιχούν περίπου στο μισό του σωματικού βάρους ενός ανθρώπου (Sherwood, 2010) Ο μυς αποτελείται κυρίως από νερό (75%), πρωτεΐνη (20%) και άλλες ουσίες όπως ανόργανα άλατα, μέταλλα, λιπαρά και υδατάνθρακες (5%). (Frontera et al, 2014). Υπάρχουν τρεις τύποι μυϊκού ιστού (εικόνα 1):

α) Σκελετικός

β) Λείος: εντοπίζεται κυρίως στα τοιχώματα κοίλων οργάνων (ουροδόχος κύστη, έντερο, στομάχι) και η σύσπαση τους ασκεί πίεση στα τοιχώματα, ρυθμίζοντας την προώθηση του περιεχομένου τους.

γ) Καρδιακός: συναντάται μόνο στη καρδιά και είναι επιφορτισμένος με την κυκλοφορία του αίματος.

Παρόλο που οι παραπάνω τύποι εμφανίζουν αρκετές δομικές και λειτουργικές διαφορές, μπορούν να ομαδοποιηθούν βάση δύο κριτηρίων. Το πρώτο αφορά τη μορφολογία τους κατά την εξέτασή τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Αν οι μύες εμφανίζουν εναλλασσόμενες φωτεινές και σκοτεινές ζώνες (γραμμώσεις), ομαδοποιούνται στους γραμμωτούς μύες που περιλαμβάνουν τον σκελετικό και τον καρδιακό μυ. Οι μύες που δεν εμφανίζουν την συγκεκριμένη μορφολογία κατατάσσονται στους μη γραμμωτούς μύες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των λείων μυών. Το δεύτερο κριτήριο αφορά το κατά πόσο νευρώνονται από το σωματικό νευρικό σύστημα, υπόκεινται δηλαδή σε εκούσιο έλεγχο και ονομάζονται κατ' επέκταση εκούσιοι, ή νευρώνονται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και δεν υπόκεινται σε εκούσιο έλεγχο, γι' αυτό και αναφέρονται ως ακούσιοι. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι σκελετικοί μύες, ενώ στην δεύτερη οι λείοι και ο καρδιακός.



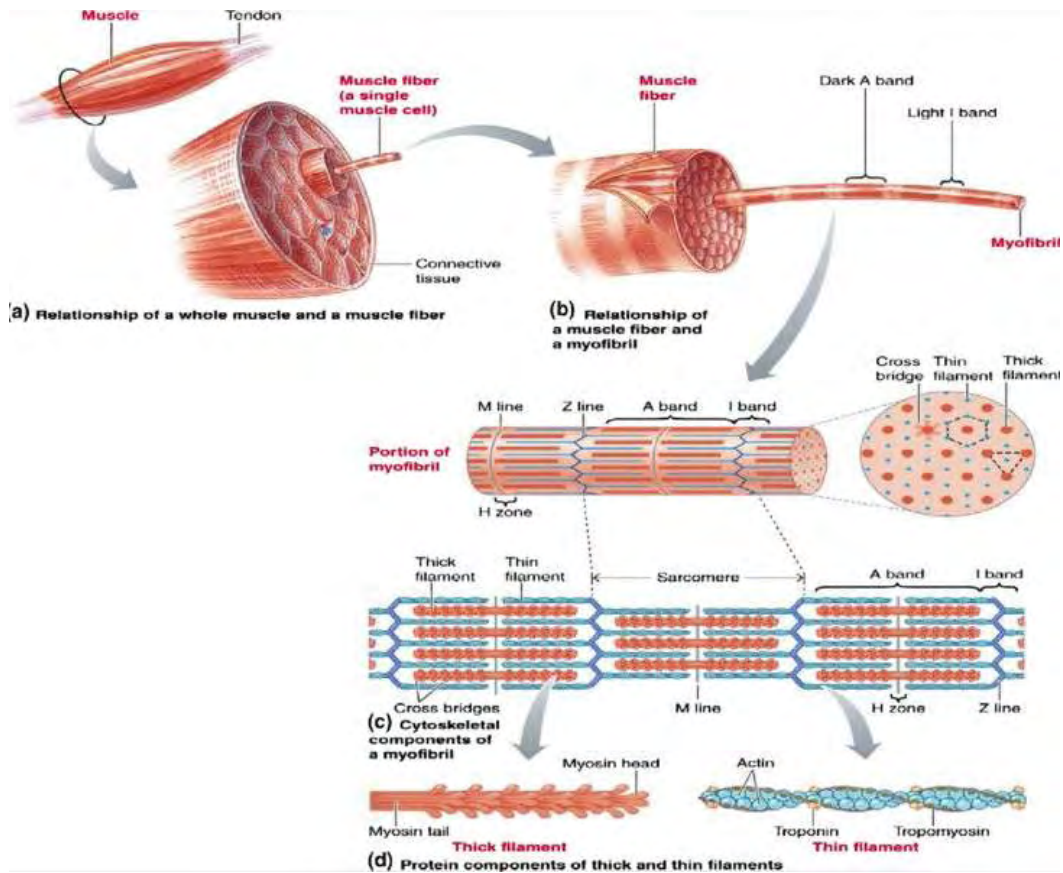
**Εικόνα 1:** Δομή των τριών τύπων μυϊκών ιστών α) σκελετικού, β) καρδιακού γ) λείου υπό το πρίσμα οπτικού μικροσκοπίου, συνοδευόμενες από σχηματική απεικόνιση των αντίστοιχων κυττάρων. (πηγή: Antony L. Mescher: Junqueira's Basic Histology, 14th edition, [www.accessmedicine.com](http://www.accessmedicine.com)).

### 1.1.1| Δομή σκελετικού μύος

Οι σκελετικοί μύες προσφύονται στα οστά του σκελετού. Η σύσπασή τους (συστολή) κινεί τα οστά αυτά, καθιστώντας τους υπεύθυνους για μεγάλη ποικιλία κινήσεων στο σώμα που εκτείνεται από τη βόδιση μέχρι και την αναπνοή. Οι σκελετικοί μύες αποτελούν δέσμες μυϊκών ινών παράλληλα διαταγμένες μεταξύ τους, που περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, γνωστό ως επιμύιο (εικόνα 2). Κάθε δέση μυϊκών ινών περικλείεται με τη σειρά της από το περιμύιο, ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού, όπως αντίστοιχα κάθε ίνα από το ενδομύιο. Ως μυϊκή ίνα χαρακτηρίζεται κάθε μεμονωμένο κύτταρο του σκελετικού μυ. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι ότι διαθέτει πολλούς πυρήνες, καθώς οι μυϊκές ίνες σχηματίζονται από την σύντηξη μικρότερων κυττάρων, των μυοβλαστών, κατά την περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι μυϊκές ίνες εμφανίζονται ως μεγάλα, επιμήκη, κύτταρα κυλινδρικού σχήματος, διαμέτρου 10-100 μm και μήκους που μπορεί να φτάσει τα 0,75 m.

Κάθε ίνα περιέχει, επίσης, πολλές κυλινδρικές ενδοκυττάρια δομές που εκτείνονται σε όλο το μήκος της και ονομάζονται μυϊκά ινίδια ή αλλιώς μυοϊνίδια (εικόνα 2). Η μυϊκή ίνα περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη που ονομάζεται σαρκείλημα, ενώ το κυτταρόπλασμα που περιβάλλει τα μυοϊνίδια είναι γνωστό ως σαρκόπλασμα. Το μυϊκό ινίδιο διαμορφώνεται από δύο τύπους κυτταροσκελετικών μικροϊνιδίων διατεταγμένων παράλληλα μεταξύ τους και οργανωμένων με τέτοιο τρόπο, ώστε να εμφανίζουν δομική και οπτική μεταμέρεια. Συναντώνται δύο τύποι μικροϊνιδίων τα παχέα νημάτια μωσίνης και τα λεπτά νημάτια ακτίνης. Αυτά τα

νημάτια συγκροτούν το σαρκομερίδιο που αποτελεί την λειτουργική μονάδα του μυ και ευθύνεται για τη συστολή του.



**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του σκελετικού μύς με τα επιμέρους εσωτερικά δομικά στοιχεία του.

(ανακτήθηκε από <https://humananatomy-libs.com/gross-anatomy-of-the-skeletal-muscles2/>).

Στις περιοχές αλληλοεπικάλυψης των νηματίων (εικόνα 3) εντοπίζονται οι εγκάρσιες γέφυρες, κεφαλές μορίων μυοσίνης που εκτείνονται κάθετα από κάθε παχύ νηματίο προς τα γειτονικά λεπτά. Για να επιτευχθεί η συστολή του μυ θα πρέπει να συνδεθεί μια γέφυρα μυοσίνης στις ειδικές περιοχές σύνδεσης των σφαιρικών μορίων ακτίνης. Τα μόρια της ακτίνης εμφανίζονται οργανωμένα σε δύο αλυσίδες περιελιγμένες μεταξύ τους που σχηματίζουν τον κορμό κάθε λεπτού νηματίου. Τα λεπτά νηματία φέρουν, ακόμη, τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες τροπομυοσίνη και τροπονίνη. Τα μόρια της μυοσίνης είναι νηματοειδή και εκτείνονται από το ένα άκρο της έλικας στο άλλο. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη χάλαση των μυικών ινών, παρεμποδίζοντας την σύνδεση ακτίνης-μυοσίνης που οδηγεί σε μυϊκή συστολή. Η χάλαση επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικής κάλυψης των περιοχών αλληλεπίδρασης των μορίων της ακτίνης με τις εγκάρσιες γέφυρες μυοσίνης. Η δεύτερη ρυθμιστική πρωτεΐνη ονομάζεται τροπομυοσίνη και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Η μια από αυτές προσδένεται στην ακτίνη, η δεύτερη

στην τροπομυοσίνη και η τρίτη διαθέτει ικανότητα δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$ . Απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , η τροπονίνη σταθεροποιεί την τροπομυοσίνη στις περιοχές αλληλεπίδρασης της ακτίνης, αποτρέποντας την μυϊκή συστολή, ενώ η παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  διευκολύνει την συστολή. Η πρόσδεση του  $\text{Ca}^{2+}$  προκαλεί μεταβολή στο σχήμα της τροπονίνης, μετατοπίζοντας την τροπομυοσίνη από τις θέσεις δέσμευσης μυοσίνης, ευνοώντας έτσι την αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης. Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, οι γραμμωτοί μύες υπό το πρίσμα ενός μικροσκοπίου εμφανίζουν μία χαρακτηριστική μορφολογία που αντιστοιχεί σε ένα πρότυπο εναλλασσόμενων φωτεινών και σκοτεινών ζωνώσεων (εικόνα 2). Η σκοτεινή ζώνη αναφέρεται ως ζώνη A. Εκτείνεται μεταξύ των δύο άκρων μιας δέσμης παχέων νηματίων συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα λεπτών νηματίων. Στο κέντρο της ζώνης A εντοπίζεται η ζώνη H αποτελούμενη μόνο από τα κεντρικά τμήματα των παχέων νηματίων. Η ζώνη H περιέχει ένα σύστημα υποστηρικτικών πρωτεϊνών που αναλαμβάνουν να διατηρήσουν τα παχέα νημάτια σε παράλληλη μεταξύ τους διάταξη. Το σύστημα αυτό είναι γνωστό ως γραμμή M. Η φωτεινή ζώνη που γίνεται ορατή το μικροσκόπιο αναφέρεται ως ζώνη I και αποτελείται από τα εναπομείναντα τμήματα των λεπτών νηματίων που δεν συγκροτούν την ζώνη A. Στη μέση της, αντίστοιχα, βρίσκεται η γραμμή Z που θεωρείται πως οριοθετεί το σαρκομερίδιο. Συγκεκριμένα, ως σαρκομερίδιο ορίζεται η περιοχή αναμεσα σε δύο γραμμές Z.

## 1.2 | Ελεύθερες ρίζες

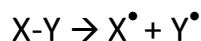
### 1.2.1 | Ορισμός ελευθέρων ριζών

Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή στοιχείο που φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα τροχιακά του (Halliwell & Gutteridge, 1990) Χαρακτηρίζονται ως ασταθείς ενώσεις μεγάλης δραστηριότητας που συμπεριφέρονται ως οξειδωτικοί είτε ως αναγωγικοί παράγοντες. Έχουν, δηλαδή, την ικανότητα να προσφέρουν είτε αντίστοιχα να δεσμεύσουν ένα ηλεκτρόνιο από οποιοδήποτε γειτονικό τους άτομο ή μόριο, προκειμένου να αποκτήσουν συμπληρωμένη εξωτερική στιβάδα. Λόγω της μεγάλης τους δραστηριότητας έχουν μικρή διάρκεια ζωής, καθώς δρουν εξαιρετικά γρήγορα και κοντά στη θέση παραγωγής του (Pryor, 1986) ς Μερικές, ωστόσο, αποδεικνύονται σχετικά σταθερές με ικανότητα διάχυσης σε κοντινές αποστάσεις στο εσωτερικό του κυττάρου.

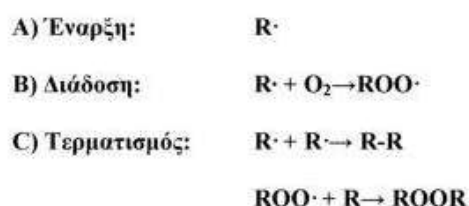
### 1.2.2 | Αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι φορτισμένες αρνητικά, θετικά ή να είναι ηλεκτρικά ουδέτερες. Σχηματίζονται με ανταλλαγή ηλεκτρονίων μέσω δύο μηχανισμών (Cheeseman, 1993):

- ο Ομολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού σε κανονικό μόριο. Η αντίδραση απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας και συμβαίνει συχνά υπο την επίδραση κάποιου είδους ακτινοβολίας. Συνέπεια αυτής, τα ηλεκτρόνια του δεσμού να διαμοιράζονται σε κάθε μόριο.



- ο Οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Συναντάται κατεξοχήν στα βιολογικά συστήματα και περιλαμβάνει την προσθήκη ή την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου σε κανονικό μόριο που συνεπάγεται την παραγωγή νέων ριζών. Μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων συνεχίζεται μέχρι τη δημιουργία προϊόντων χωρίς ελεύθερες ρίζες. (Makris, 2010)

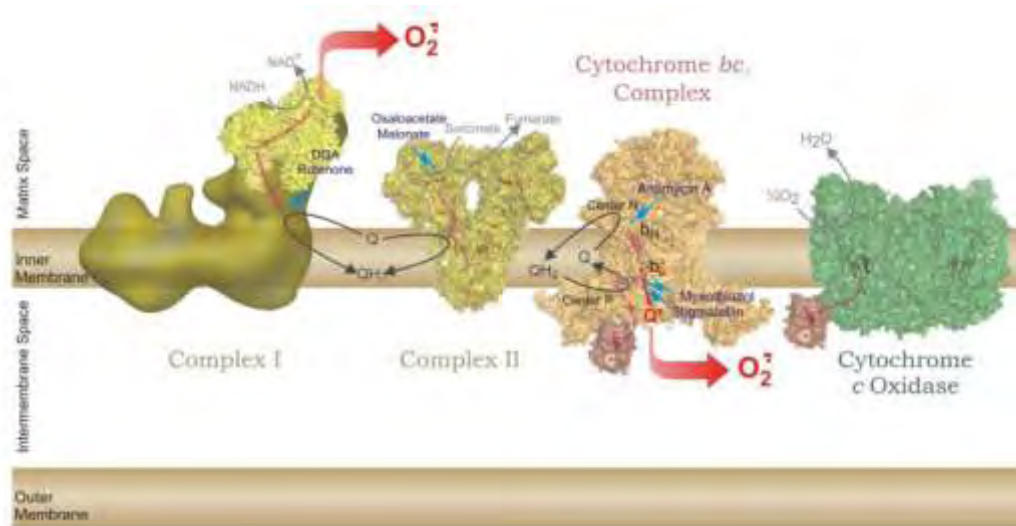


Από την πληθώρα των πειραματικών ερευνών φαίνεται πως δύο κατηγορίες οξειδωτικών μορίων/ελευθέρων ριζών έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον: οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) (Irshad & Chaudhuri, 2002). Τα οξυγονούχα δραστικά παράγωγα περιλαμβάνουν τόσο ελεύθερες ρίζες, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), η ρίζα μεροξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ) και η ρίζα αλκοξυλίου ( $RO^{\bullet}$ ) όσο και μη ριζικά μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το όζον ( $O_3$ ) ή το υποχλωριώδες οξύ ( $HClO$ ), εξίσου δραστικά με τα πρώτα. Τα οξειδωτικά αυτά μόρια είναι απόρροια επίδρασης εξωγενών παραγόντων όπως η ακτινοβολία, το κάπνισμα, οι περιβαλλοντικοί ρύποι και οι ξеноβιοτικές ουσίες (Lobo et al, 2010). Προκύπτουν, όμως, και μέσα από διαδικασίες ζωτικής σημασίας για την φυσιολογία του κυττάρου. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία το ενδιαφέρον εστιάζεται στις ROS, για τις οποίες θα γίνει λόγος στις επόμενες παραγράφους.

#### 1.2.2.1 | Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου

Η κυριότερη πηγή ROS εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Kaushal & Ratan, 2015) Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electronic Transport Chain, ETC) είναι ζωτικής σημασίας, αφού αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας (ATP) των ζωικών κυττάρων. Αποτελεί, όμως, και μία ατελή διαδικασία, καθώς υπάρχουν δύο σημεία, το σύμπλοκο I (NADH δευδρογονάση) και το σύμπλοκο III (ουβικινόνη- ρεδουκτάση κυτοχρώματος c ή σύμπλοκο κυτοχρώματος  $bc_1$ ), από τα οποία ένας μικρός αριθμός

ηλεκτρονίων διαρρέει πρόωρα στο  $O_2$ , σχηματίζοντας την ελεύθερη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (εικόνα 3). Η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου είναι τόσο έντονα φορτισμένη και δραστική που μπορεί να διαπεράσει την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και να εξέλθει στο κυτταρόσολιο. Η ρίζα που δημιουργήθηκε θα μετατραπεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$  αυθόρμητα ή με ενζυμική κατάλυση, με τη διαμεσολάβηση του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). (Valko et al., 2007) Η ποσότητα των ηλεκτρονίων που διαρρέουν της ETC ποικίλει ανάλογα το είδος και τη μεταβολική κατάσταση του οργανισμού (Lushchak, 2014)



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση παραγωγής ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ). Το σύμπλοκο I και το σύμπλοκο κυτοχρώματος  $bc_1$  της αναπνευστικής αλυσίδας θεωρούνται ως η κύρια πηγή σχηματισμού  $O_2^{\cdot-}$ . Στο σύμπλοκο I, το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται κατά την οξείδωση της φλαβίνης, προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Η παραγωγή του στο σύμπλοκο III λαμβάνει χώρα στο κέντρο οξείδωσης της ουβικινόλης και απελευθερώνεται κατόπιν στο διαμεμβρανικό χώρο. (πηγή: Dröse & Brandt (2008); The Mechanism of Mitochondrial Superoxide Production by the Cytochrome  $bc_1$  Complex).

Οι (Kaushal & Ratan, 2015) βασισμένοι στο άρθρο ανασκόπησης των (Valko et al, 2006) αναφέρουν συνοπτικά και τις υπόλοιπες πιθανές ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS:

- ✚ Αυτό-οξείδωση ανηγμένων μορφών φλαβίνης, θειολών και άλλων μικρών μορίων.
- ✚ Συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων ενδοπλασματικού δικτύου και πυρήνα.
- ✚ Υπεροξειδιοσώματα: παραγωγή  $H_2O_2$  ως παρα-προϊόν της  $\beta$ -οξείδωσης λιπαρών οξέων. (Beckmann & Ames, 1998)
- ✚ Αναπνευστική έκρηξη: Ως απόκριση σε ορισμένα ερεθίσματα, τα φαγοκύτταρα αυξάνουν τον ρυθμό πρόσληψης οξυγόνου με συνέπεια την

παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Thomas, 2017).

- ✚ Μέταλλα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός με τον σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ ) (Valko et al, 2006).
- ✚ Οξειδάσες, όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η οικογένεια ενζύμων του κυτοχρώματος P-450. Κατά την οξείδωση υποστρωμάτων παράγονται παράλληλα ρίζες υπεροξειδίου με μηχανισμό παρόμοιο με τα μιτοχόνδρια (Beckmann & Ames, 1998).

### 1.2.3| Δραστικές μορφές οξυγόνου ως σηματοδοτικά μόρια

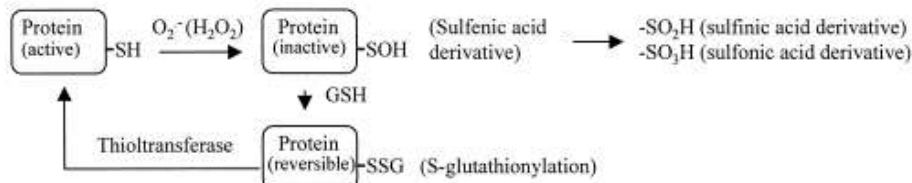
Αν και ιστορικά οι ROS θεωρήθηκαν ως καταστροφικοί κυτταρικοί παράγοντες, είναι πλέον γνωστό πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις βοηθούν την εύρυθμη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και την άμυνα του οργανισμού (Thannickal & Fanburg, 2000). Πληθώρα αναπτυξιακών παραγόντων και κυτοκινών διεγείρουν την παραγωγή ROS σε μη φαγοκυτταρικές σειρές μέσω ενός προσδετο-εξαρτώμενου μηχανισμού. Στην διέγερση αυτή διαμεσολαβούν οι μεμβρανικοί τους υποδοχείς κίνησης τυροσίνης και αντίστοιχα υποδοχείς συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες. Οι ROS που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της διέγερσης, λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι μονοπατιών μεταγωγής σήματος που εμπλέκουν πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφατάσες, κανάλια ιόντων και μεταγραφικούς παράγοντες. Λειτουργούν, δηλαδή, ως σηματοδοτικοί ρυθμιστές σε μεταγωγικούς καταρράκτες που σχετίζονται με διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, η απόκριση σε καταπονήσεις, η φλεγμονή, η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση (Valko et al., 2007). Μπορούμε να συνοψίσουμε τη δράση των ROS σε δυο γενικούς μηχανισμούς (Thannickal & Fanburg, 2000).

#### 1) Οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών

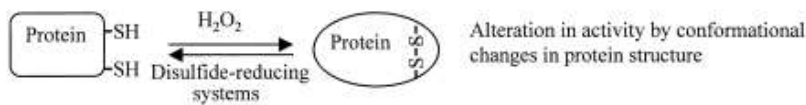
Άμεσο στόχο των ROS αποτελούν τα κατάλοιπα κυστεΐνης που εντοπίζονται στα καταλυτικά κέντρα διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) αμινοξέων κυστεΐνης οξειδώνονται σε παράγωγα σουλφενικού (-SOH), σουλφινικού (-SO<sub>2</sub>H) και σουλφονικού οξέος (-SO<sub>3</sub>H), καθώς και S-γλουταθειονυλιωμένα (-SSG) παράγωγα (εικόνα 4). Οι τροποποιήσεις αυτές λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, επηρεάζοντας την ενζυμική δραστηριότητα. Στην περίπτωση των μεταγραφικών παραγόντων, όταν τα κατάλοιπα κυστεΐνης βρίσκονται εντός της περιοχής πρόσδεσης στο DNA, επηρεάζει την ικανότητα αναγνώρισης και πρόσδεσης στο DNA και κατ' επέκταση τη μεταγραφική δραστηριότητα. Πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης μπορούν να οξειδωθούν σε μία ή περισσότερες πρωτεΐνες, σχηματίζοντας ενδο- ή διαμοριακές δισουλφιδικές γέφυρες (-S-S-). Οι εμπλεκόμενες πρωτεΐνες μπορεί να είναι είτε ταυτόσημες είτε διαφορετικού είδους και η παραπάνω αλλαγή της διαμόρφωσής τους επιφέρει όμο-

ή ετεροδιμερισμό που θα οδηγήσει τελικά σε πιθανή ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή τους. Φαίνεται πως στις τροποποιήσεις συμμετέχουν και κατάλοιπα τυροσίνης (εικόνα 5), με τις ROS να καταλύουν τον σχηματισμό διτυροσίνης με παράλληλο cross-linking υποστρωμάτων. Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί φυσικά και η μεταλλο-επαγόμενη οξείδωση ρυθμιστικών μεταλλοπρωτεϊνών που μέσω της αντίδρασης Fenton ουβικιτινώνονται και αποικοδομούνται.

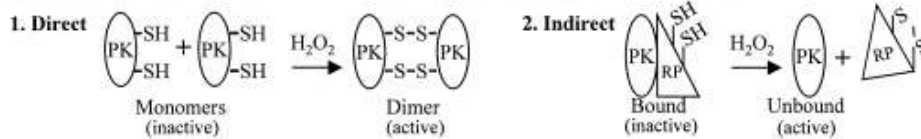
**A MODIFICATION OF PROTEINS BY OXIDATION OF CYSTEINE RESIDUES**



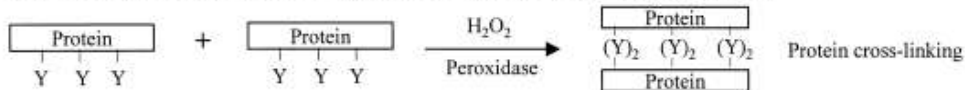
**B FORMATION OF INTRA-MOLECULAR DISULFIDE LINKAGES**



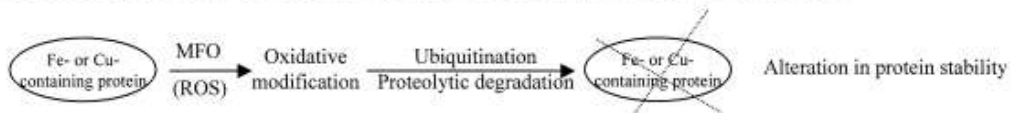
**C PROTEIN DIMERIZATION BY INTER-MOLECULAR DISULFIDE LINKAGES**



**D DITYROSINE FORMATION BY H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PEROXIDASE-DEPENDENT REACTIONS**



**E METAL-CATALYZED OXIDATION OF PROTEINS BY "FENTON-LIKE" CHEMISTRY**



**Εικόνα 4:** Οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. α) οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης, β) σχηματισμός ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών, γ) σχηματισμός διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών δ) σχηματισμός διτυροσίνης, ε) οξείδωση πρωτεϊνών καταλυμένη από μέταλλα.

(πηγή: Thannickal & Fanburg 2000; Reactive oxygen species in cell signaling)

2) Αλλοίωση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Παρότι η αρχική ενεργοποίηση σηματοδοτικών καταρρακτών ενισχύεται από ήπια οξειδωτικές συνθήκες, η τελική εκτέλεση της διαδικασίας φαίνεται πως προϋποθέτει αναγωγικές συνθήκες (Dröge, 2002). Στο εσωτερικό των κυττάρων οι

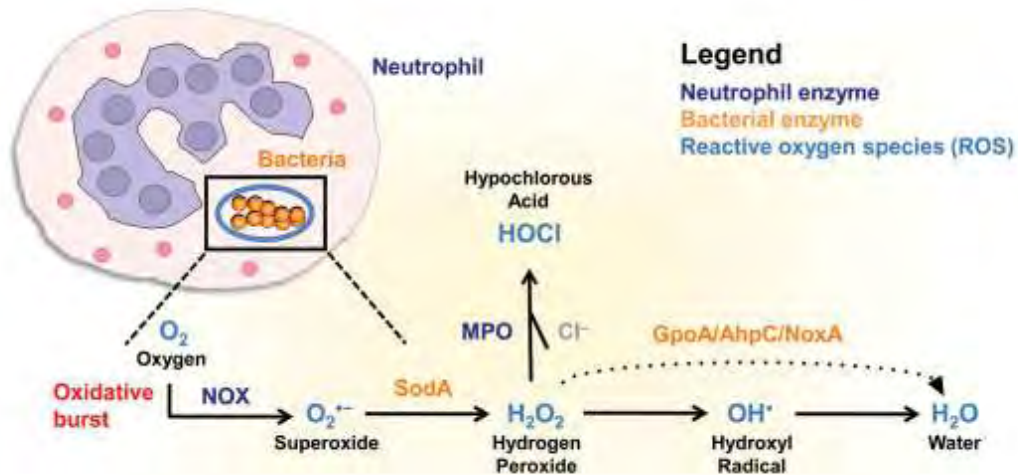


αναγωγικές συνθήκες ελέγχονται αυστηρά από την παρουσία αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών και μορίων. Όμως σύμφωνα με τον Finkel (Finkel, 2011) τα αντιοξειδωτικά μόρια δεν αποτελούν μόνο παθητικούς διαλύτες οξειδωτικών ουσιών αλλά θεωρούνται ως ενεργοί συμμετοχοί στη σηματοδοτική διαδικασία. Ως απόκριση σε αυξημένα επίπεδα ROS, αντιοξειδωτικά μόρια προσδένονται σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες μεταγωγικών μονοπατιών και τις απενεργοποιούν. Αντιστρέφουν, επίσης, τους μοριακούς διακόπτες που τροποποιήθηκαν από τα δραστικά μόρια των ελευθέρων ριζών, ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αυτά δημιούργησαν, επαναφέροντας την πρωτεΐνη στην αρχική της κατάσταση.

#### 1.2.4| Υποχλωριώδες οξύ (HClO ή HOCl)

##### 1.2.4.1| Σύνθεση και ιδιότητες υποχλωριώδους οξέος

Το υποχλωριώδες οξύ (HClO ή HOCl) παράγεται *in vivo* από τα ανοσοποιητικά κύτταρα του ανθρώπινου σώματος για την καταπολέμηση μολύνσεων (Eryilmaz & Palabiyik, 2013). Τα φαγοκυτταρικά λευκά αιμοσφαίρια και ειδικότερα τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά τα πρώτα (οξέα) στάδια της φλεγμονώδους απόκρισης. Επιτίθενται σε παθογόνα που εισβάλλουν μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Κατά τη διάρκεια της παρατηρείται αύξηση στην κατανάλωση  $O_2$ , με επακόλουθη ενεργοποίηση του συμπλόκου της NADPH οξειδάσης της κυτταρικής μεμβράνης και παραγωγή υπεροξειδικής ρίζας ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Thomas, 2017). Την φαγοκυττάρωση συνοδεύει και η απελευθέρωση διαλυτών αντιμικροβιακών παραγόντων με κυριότερους εκπροσώπους τις πρωτεΐνες των κοκκίων. Μια από τις σημαντικότερες αυτές πρωτεΐνες αποτελεί το ένζυμο μυελοπεροξειδάση (myeloperoxidase, MPO), που εκφράζεται άφθονα στα ουδετερόφιλα και περιέχει αίμη. (Veen et al., 2009). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από την ένωση 2 ριζών  $O_2^{\bullet-}$ , χρησιμοποιείται από την μυελοπεροξειδάση για την οξείδωση αλογονιδίων και την παραγωγή υποαλογονικών οξέων (Erstein & Weiss, 1989). Καθώς στο πλάσμα η συγκέντρωση του χλωριδίου ( $Cl^-$ ) υπερσχύει των υπολοίπων αλογονιδίων, το ( $Cl^-$ ) αποτελεί το πιο πιθανό υπόστρωμα για το σύστημα MPO- $H_2O_2$ , δίνοντας γένεση στο υποχλωριώδες οξύ (εικόνα 6). Το HClO βρίσκεται σε ισορροπία με τη συζυγή του βάση το υποχλωριώδες  $OCl^-$  καθώς και με το αέριο χλώριο  $Cl_2$ . Διαθέτει  $pK_a$  ίσο με 7.5. Σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε ίση ποσότητα με το υποχλωριώδες, ενώ το χλώριο εμφανίζει σημαντικά ποσοστά μόνο σε μικρότερες τιμές pH (Moris, 1966) Το υποχλωριώδες οξύ και η συζυγής του βάση αποτελούν έναν ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια τόσο σε βακτήρια όσο και σε μεγάλο εύρος άλλων παθογόνων (Albrich & Hurst, 1982);(McKenna & Davies, 1988) (Albrich et al, 1981);(Ono et al, 2012); (Taharaguchi et al, 2014).



**Εικόνα 6:** Παραγωγή υποχλωριώδους οξέος από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση κατά την φαγοκύτωση βακτηρίων από ουδετερόφιλα. (πηγή: Henningham et al 2015; Mechanisms of group A Streptococcus resistance to reactive oxygen species).

Σε εμπορική κλίμακα το HOCl είναι ευρέως γνωστό ως το δραστικό συστατικό σε οικιακά καθαριστικά και λευκαντικά (Fukuzaki, 2006) χρησιμοποιείται σε κατάλληλες μη τοξικές συγκεντρώσεις ως φαρμακευτικό σκεύασμα για την απολύμανση και την επούλωση τραυμάτων, καθώς θεωρείται μη διαβρωτικό και δεν προκαλεί ερεθισμούς (Ergilmaz & Palabiyik, 2013) (Wang et al., 2007) (Robson et al., 2007) (Severing et al., 2018). Όμως η ισχυρή και διάχυτη αντιμικροβιακή του φύση θέτει σε κίνδυνο και τον ίδιο τον ξενιστή, προκαλώντας ιστική βλάβη, μέσω των ίδιων μηχανισμών που χρησιμοποιούνται για την καταστροφή εισβαλλόντων παθογόνων (Schraufstätter et al., 1990); (Hasegawa et al., 2005) (Hammerschmidt et al, 2002). Επίσης υποστηρίζεται ότι η υπερβολική ή λανθασμένη παραγωγή του HClO σχετίζεται με την εξέλιξη πολυάριθμων διαταραχών συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της αρθρίτιδας καθώς και κάποιων μορφών καρκίνου. (Cervantes Gracia et al., 2017), (Bauerová & Bezek, 1999) (Schiller et al., 1996), (Güngör et al., 2010). Το αποτέλεσμα της κυτταρικής έκθεσης στο ζεύγος HClO/OCl<sup>-</sup> δείχνει να εξαρτάται από την δόση του οξειδωτικού, με υψηλές τιμές να προκαλούν νέκρωση, ενδιάμεσες απόπτωση, ενώ σχετικά μικρές δόσεις πιθανώς να προκαλέσουν παροδική αναστολή της ανάπτυξης (Vissers et al., 1999).

#### 1.2.4.2| Αντιδράσεις του υποχλωριώδους οξέος με βιολογικά μόρια

##### 1.2.4.2.1| Αντιδράσεις με πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες φαίνεται να είναι κύριος στόχος του HClO, λόγω της μεγάλης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσής τους (Pattinson & Davies, 2011) Η υψηλή μεταξύ τους δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων,

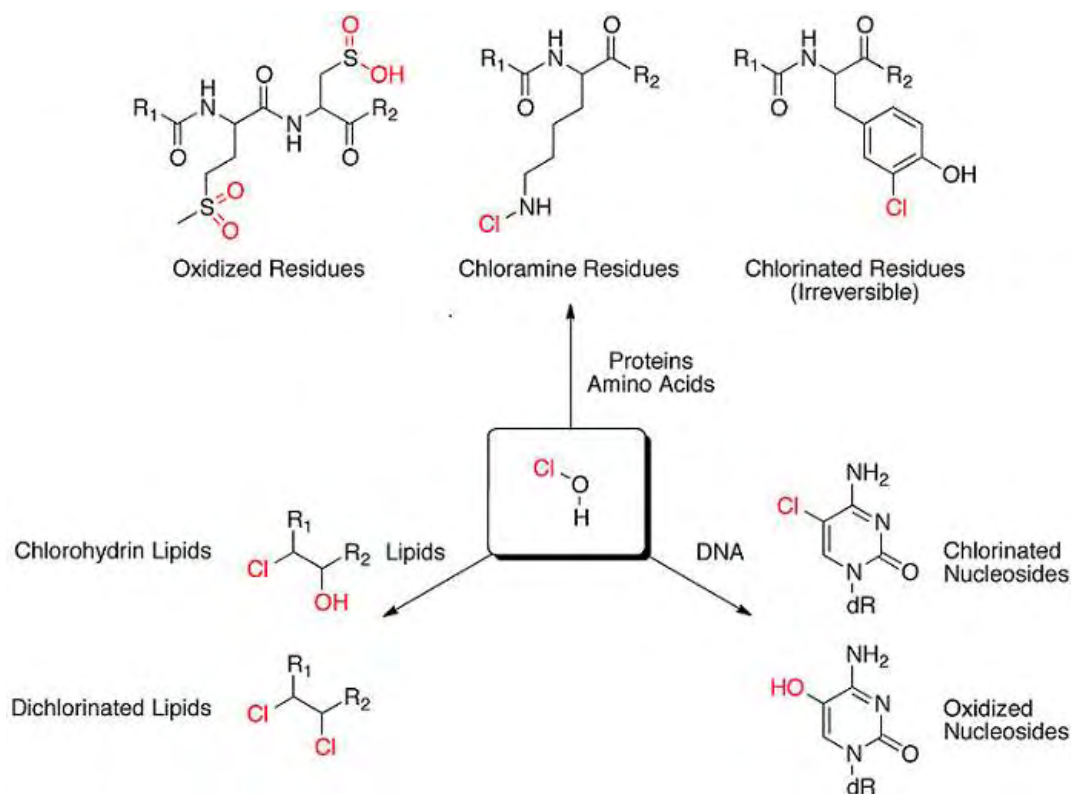
κατακερματισμό του πρωτεϊνικού σκελετού και μη αντιστρεπτή διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών άμεσα σχετιζόμενη με κυτταρική λύση (Vissers et al. C. , 1998) (Hawkins et al., 2003). Φαίνεται πως αμινοξικά κατάλοιπα που φέρουν σουλφυδρυλ-ομάδες όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη οξειδώνονται πιο εύκολα σε (δι-)σουλφίδια. Η αντίδραση του με την τυροσίνη και ο σχηματισμός 3-χλωροτυροσίνης αποτελεί μάλιστα και δείκτη ενεργοποίησης ουδετερόφιλων *in vitro*. Η λυσίνη όπως και οι NH<sub>3</sub>-τελικές αμίνες αντιδρούν με το HClO προς δημιουργία μόνο- και δίχλωραμινών. Οι μακρόβιες χλωραμίνες με τη σειρά τους εμπλέκονται σε δευτερογενείς αντιδράσεις οξείδωσης θειολών, επεκτείνοντας τη δραστικότητα του υποχλωριώδους οξέος.

#### 1.2.4.2.2| Αντιδράσεις με νουκλεϊκά οξέα

Οι αντιδράσεις, αντιθέτως, του HClO με το DNA και το RNA εμφανίζονται να είναι αργές και αφορούν την χλωρίωση των νουκλεοτιδικών βάσεων. Αρχικά χλωριώνονται ετεροκυκλικές >NH ομάδες βάσεων και κατόπιν το χλώριο μεταφέρεται σε βάσεις που περιέχουν αμινοτελικές -NH<sub>2</sub> ομάδες. Η χλωρίωση των νουκλεοτιδικών βάσεων οδηγεί στην διάσπαση του δεσμού υδρογόνου και επακόλουθα στην αποδιάταξη της διπλής έλικας (Prütz, 1998). Το οξειδωτικό δυναμικό του HClO διατηρείται και από τις προαναφερθείσες χλωραμίνες που πιθανώς μεσολαβούν στην χλωρίωση και την οξειδωτική βλάβη(καταστροφή) των ζωτικών αυτών μακρομορίων (Prütz, 1996).

#### 1.2.4.2.3| Αντιδράσεις με λιπαρά οξέα

Αντικείμενο έρευνας των Spicket et al 2000 αποτέλεσε η αντίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και χοληστερόλης με το υποχλωριώδες οξύ (Spickett et al., 2000). Τα πειραματικά αποτελέσματα ανέδειξαν τον διπλό δεσμό των λιπιδίων ως την περιοχή αντίδρασης με το υποχλωριώδες οξύ, με τη χλωρίωση τους να ευνοεί τον σχηματισμό χλωρουδρινών από ότι την υπεροξείδωσή του. Οι Winterbourn et al 1992 (Winterbourn et al., 1992)και ακολούθως οι Vissers et al 1994 (Vissers et al, 1994) συνδέουν την δημιουργία χλωρουδρινών από μεμβρανικά λιπίδια και την τροποποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με διαταραχή της δομής και της ακεραιότητας των βιολογικών μεμβρανών, την πιθανή διάρρηξή τους και την τελική λύση των κυττάρων.



**Εικόνα 7:** Ενδεικτικές αντιδράσεις οξείδωσης και χλωρίωσης βιομορίων διαμεσολαβούμενες από υποχλωριώδες οξύ.  
(πηγή: [http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/hca.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/hca.html))

#### 1.2.4.2.4 | Αντίδραση υποχλωριώδους οξέος με γλουταθειόνη

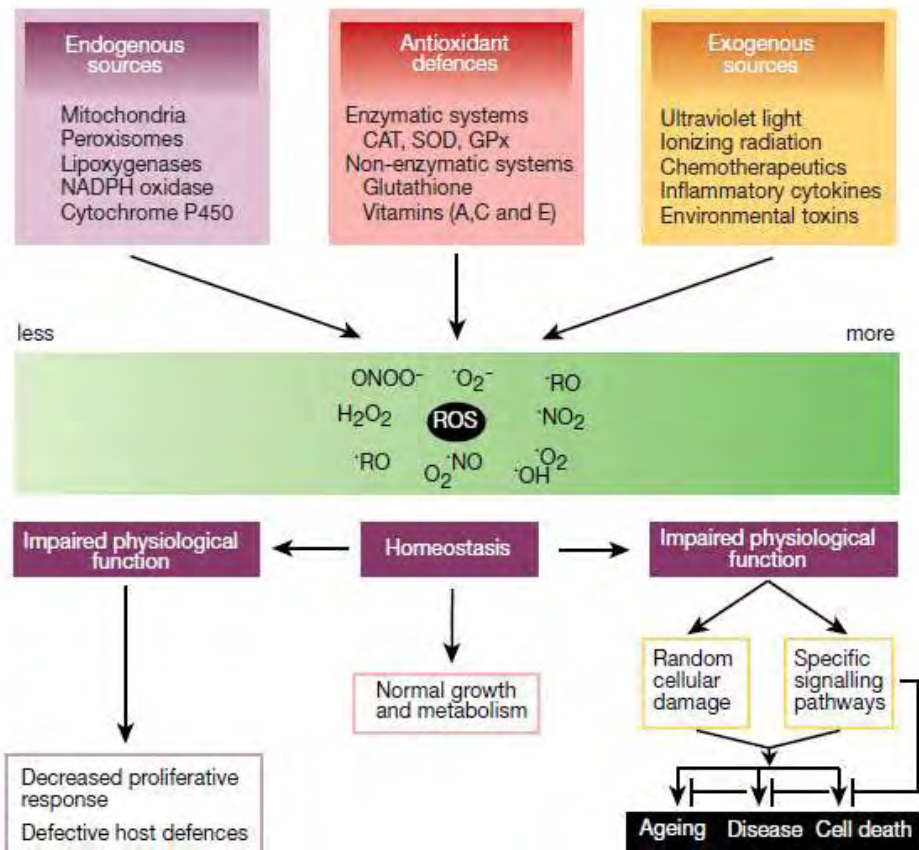
Για πολλά χρόνια οι ερευνητές είχαν την πεποίθηση πως οι κυτταρικές μεμβράνες λειτουργούσαν ως προστατευτικός φραγμός των ενδοκυτταρικών συστατικών από την δραστικότητα του υποχλωριώδους οξέος. Η μελέτη, όμως, των Vissers & Winterbourn 1995 (Vissers & Winterbourn, 1995) ανέτρεψε την πεποίθηση αυτή, αναδεικνύοντας την ιδιότητα του οξέος να διαπερνά τις μεμβράνες και να αντιδρά μάλιστα ταχύτατα με την ενδοκυτταρική γλουταθειόνη προς σχηματισμό του αντίστοιχου δισουλφιδίου (GSSG). Οι Winterbourn & Brennan 1997 (Winterbourn & Brennan, 1997) και Harwood et al 2006 (Harwood et al., 2006) βρήκαν αργότερα ότι το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης μπορεί να υποστεί περαιτέρω οξείδωση και ταυτοποίησαν τρία σταθερά παράγωγα του, το σουλφοναμίδιο της γλουταθειόνης, τη θειοθειική γλουταθειόνη και τη δευδρογλουταθειόνη. Η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενάντια στο HClO έγκειται τόσο στη φύση των οξειδωτικών προϊόντων των θειολών όσο και στην πιθανότητα αναγέννησής τους από τις αρχικές (Vissers & Winterbourn, 1995). Τα τρία σταθερά παράγωγα φαίνεται να μην ανάγονται από την αναγωγή της GSH (Yuan et al., 2009). Απεναντίας έχουν την τάση να συσσωρεύονται, οδηγώντας σε τοπική εξάντληση της γλουταθειόνης (που αντικαθίσταται μόνο με νέα σύνθεσή της) και πτώση της αντιοξειδωτικής άμυνας.

### 1.3 | Οξειδωτικό στρες-Οξειδωτική βλάβη

Όλοι οι υγιείς αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν ευαίσθητα ρυθμιστικά συστήματα προκειμένου να ελέγξουν και να διατηρήσουν τα RS σε χαμηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα (Volodymyr, 2014). Τα ρυθμιστικά συστήματα συγκροτούν τους λεγόμενους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και βρίσκονται σε αναλογική ισορροπία με την παραγωγή των RS. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες η ισορροπία αυτή δεν καθίσταται εφικτή. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, ορίζεται από τον Sies (1997) ως οξειδωτικό στρες (Sies, 1997). Θεωρητικά, το οξειδωτικό στρες μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 επιμέρους κατηγορίες (Volodymyr, 2014)):

- ❖ Βασικό οξειδωτικό στρες (basal oxidative stress, BOS).
- ❖ Χαμηλής έντασης οξειδωτικό στρες (low intensity oxidative stress, LOS).
- ❖ Μέτριας έντασης οξειδωτικό στρες(intermediate intensity oxidative stress, IOS).
- ❖ Υψηλής έντασης οξειδωτικό στρες(high intensity oxidative stress, HOS).

Μέτρια και υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες συνήθως οδηγούν σε κυτταρική ή ιστική βλάβη. Αναφερόμαστε σε αυτή ως οξειδωτική βλάβη και αφορά “την βλάβη που προκαλείται στα βιομόρια από την επίθεση ελευθέρων ριζών σε συστατικά ζωντανών οργανισμών” (Halliwell & Whiteman, 2004). Σε αντίθεση με τη συνήθη χρήση του όρου για την περιγραφή μη εξειδικευμένης βλάβης σε μεγάλο εύρος βιομορίων, οι ελεύθερες ρίζες παρουσιάζουν εξαιρετικά ειδική στόχευση (Halliwell, 2007). Εκτενώς χαρακτηρισμένοι και κύριοι στόχοι των RS αποτελούν τα λιπίδια (Yin et al., 2011), οι πρωτεΐνες (Davies, 2016) και τα νουκλεϊκά οξέα (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να σχετίζεται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων (Dröge, 2002), ενώ άρρηκτη είναι και η σύνδεση του με τη διαδικασία της γήρανσης που αντικατοπτρίζεται από μία αναλογική σχέση μεταξύ της παραγωγής RS και του ορίου διαβίωσης (εικόνα 8) (Beckmann & Ames, 1998).



**Εικόνα 8:** Πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου ROS και οι αποκρίσεις των κυττάρων παρουσία τους. Οι ROS παράγονται τόσο από εξωγενής πηγές (UV ή ιονίζουσα ακτινοβολία, περιβαλλοντικές τοξίνες) όσο και ως παραπροϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού (μιτοχόνδρια, υπεροξειδιοσώματα) καθώς και από διάφορα κυτταροπλασματικά ένζυμα. Αυξημένα επίπεδα ROS εμπλέκονται στην εμφάνιση ασθενειών, την επιτάχυνση της γήρανσης καθώς και στον κυτταρικό θάνατο. Παράλληλα είναι πιθανό να δημιουργούν ένα στρεσογόνο σήμα που ενεργοποιεί ειδικά οξειδοαναγωγικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Το αποτέλεσμα των σημάτων μπορεί να είναι καταστροφικό ή προστατευτικό για τα κύτταρα. Το κύτταρο διαθέτει ενζυμικά και μη συστήματα άμυνας προκειμένου να ρυθμίσει τα επίπεδα ROS και να διατηρήσει την ομοιόσταση. Η μείωση, όμως, των ROS κάτω από το ομοιοστατικό όριο, διαταράσσει τον πολλαπλασιασμό και την άμυνα του κυττάρου. (πηγή: Finkel & Holbrook 2000; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing)

## 1.4 | Αντιοξειδωτικά

### 1.4.1 | Ορισμός αντιοξειδωτικών

Οι Halliwell & Gutteridge (Halliwell, 2007) κατάφεραν να αποσαφηνίσουν τον όρο του αντιοξειδωτικού, σύμφωνα με τον οποίο ως αντιοξειδωτικός παράγοντας χαρακτηρίζεται “οποιαδήποτε ουσία καθυστερεί, αποτρέπει ή καταργεί την οξειδωτική βλάβη ενός μορίου στόχου”. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε μορίου εξαρτάται άμεσα από την μεθοδολογία που εφαρμόζεται σε μία ανάλυση. Αλλάζοντας τη μεθοδολογία, οι ίδιες ουσίες παρουσιάζουν και διαφορετική ικανότητα.

Τα αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται με βάση τη διαλυτότητα τους σε υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά (Kumar et al., 2012). Ένα δεύτερο κριτήριο για την ομαδοποίηση τους αποτελεί η φύση τους, ανάλογα με την οποία ομαδοποιούνται σε φυσικά, συνθετικά, αντιοξειδωτικά του σώματος (που αναφέρονται κυρίως σε ένζυμα), μέταλλα και ιχνοστοιχεία.

### 1.4.2 | Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα κύτταρα και κατ' επέκταση οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικές στρατηγικές προκειμένου να προστατευτούν ή να αντιμετωπίσουν μια οξειδωτική πρόκληση. Οι αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί κατηγοριοποιούνται σε τρεις επιμέρους στρατηγικές την πρόληψη, την διακοπή και την επιδιόρθωση (Sies, Oxidative Stress, 2017).

#### Πρόληψη (prevention)

Μια πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις δραστικές ρίζες οξυγόνου είναι, προφανώς, η αποφυγή του σχηματισμού τους. Υπάρχουν ορισμένοι φραγμοί που χρησιμοποιούν τα βιολογικά συστήματα για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η κεράτινη στιβάδα του δέρματος των θηλαστικών για ελαχιστοποίηση έκθεσης σε εξωγενείς παράγοντες ή η σύνθεση μελανίνης για προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Το στάδιο της πρόληψης περιλαμβάνει και τη δέσμευση μετάλλων, με σκοπό την παρεμπόδιση αλυσιδωτών αντιδράσεων των ριζών που οδηγούν σε υπεροξείδωση των λιπιδίων (Halliwell, Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), 1999)( Neeraj et al., 2013). Σημαντικός είναι, επίσης, ο μηχανισμός πρόληψης της εκτροπής, όπου αντιοξειδωτικά καθοδηγούν την αντίδραση των ελευθέρων ριζών σε λιγότερο επιβλαβή προϊόντα, μειώνοντας τον κίνδυνο περαιτέρω βλάβης.

#### Διακοπή (interception)

Η δεύτερη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει ενζυμικά και μη αντιοξειδωτικά με κύριο ρόλο στην απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών σε τελικά μη δραστικά προϊόντα, με στόχο την καταστολή της έναρξης ή/και την διάρρηξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων διάδοσης (Krinsky, 1992). Στα πλαίσια της δράσης τους

περιλαμβάνεται και η μεταφορά δραστικών μεταβολιτών από ευαίσθητους βιολογικά στόχους σε υποκυτταρικά μέρη όπου η δράση τους θα είναι λιγότερο επιβλαβής (Sies, 2017). Διάφορα αντιοξειδωτικά αντιπροσωπεύουν τον μηχανισμό της διακοπής όπως οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή (Ordoian & Escriche, 2015), οι θειόλες καθώς και ένζυμα όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση (Benzie, 2000).

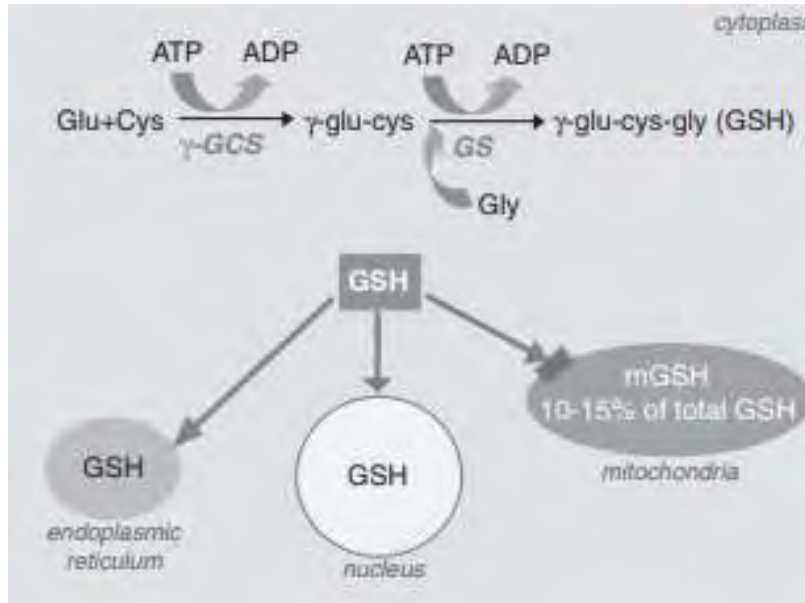
#### Επιδιόρθωση (repair)

Αφορά την αποκατάσταση των οξειδωτικών βλαβών που προκλήθηκαν από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου. Λόγω κάποιας αναποτελεσματικότητας των δύο προηγούμενων διαδικασιών, παράγεται πάντοτε ένα μικρό ποσοστό οξειδωτικών προϊόντων με κίνδυνο συσσώρευσης. Τα λεγόμενα αντιοξειδωτικά τρίτης γραμμής περιλαμβάνουν επιδιορθωτικά και *de novo* ένζυμα, απαραίτητα για την αποκατάσταση και αναπλήρωση οξειδωμένων βιομορίων (που έχουν υποστεί βλάβη) και την ανασύσταση των κυτταρικών μεμβρανών (Irshad & Chaudhuri, 2002). Στην κατηγορία αυτών των ενζύμων εμπίπτουν πρωτεολυτικά ένζυμα που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν επιλεκτικά οξειδωμένες πρωτεΐνες στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (πρωτεάσωμα). Συγκαταλέγονται λιπάσες που αφαιρούν οξειδωμένα μεμβρανικά λιπίδια, ενώ το οξειδωτικό τροποποιημένο DNA υπόκειται σε μονοπάτια επιδιόρθωσης μέσω ανασυνδυασμού ή εκτομής βάσεων που εμπλέκουν πλήθος ενζύμων (Pacifci & Davies, 1991).

#### 1.4.3| Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί ένα τριπεπτίδιο, το μόριο του οποίου συνίσταται από τρία διαφορετικά αμινοξέα: το γλουταμινικό οξύ, την κυστεΐνη και την γλυκίνη. Συναντάται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών σε διαφορετικές αλλά υψηλές συγκεντρώσεις από 1 έως 10 mM και θεωρείται η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη που συμμετέχει στην εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες (Shelly, 2013). Η *de novo* σύνθεσή της συμβαίνει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα μέσω δύο διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων εξαρτώμενων από ATP (Ribas et al., 2014) (εικόνα 9). Η πρώτη αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γ-GCS) και αφορά την σύνδεση καταλοίπων κυστεΐνης με γλουταμικό οξύ προς σχηματισμό γ-γλουταμυλκυστεΐνης. Κατά τη δεύτερη αντίδραση, η ήδη σχηματισμένη γ-γλουταμυλκυστεΐνη συνδέεται ομοιοπολικά σε ένα κατάλοιπο γλυκίνης μέσω του ενζύμου συνθετάση της γλουταθειόνης (GS). Μετά τη σύνθεσή του, το τριπεπτίδιο μεταφέρεται και διανέμεται σε διάφορα όργανα (Marie et al., 2013), καθώς και υποκυτταρικά οργανίδια, με κυριότερα το ενδοπλασματικό δίκτυο, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια (Mari et al., 2009).

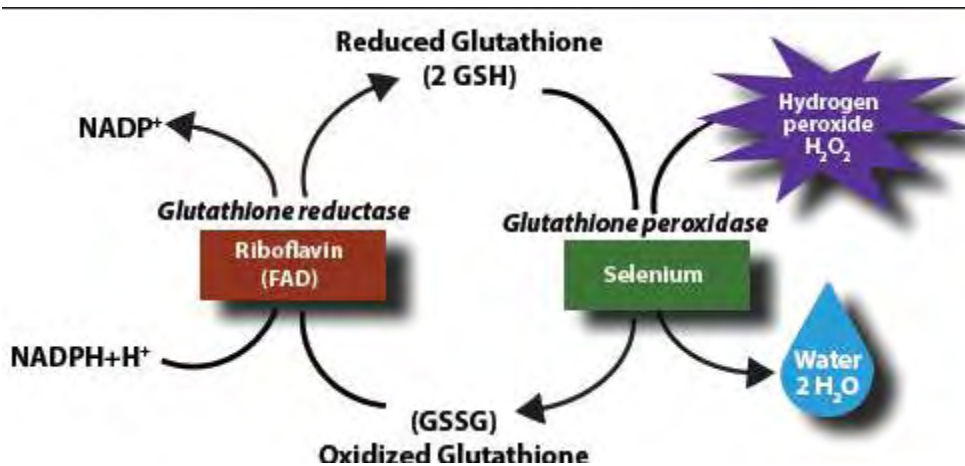




**Εικόνα 9.** Σύνθεση και διαμερισματοποίηση της γλουταθειόνης (GSH). Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα ένζυμα συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεϊνης (γ-GCS) και συνθετάση της γλουταθειόνης (GS), μέσω δύο αντιδράσεων που απαιτούν ATP. Μόλις συντεθεί, η γλουταθειόνη διανέμεται σε ενδοπλασματικό δίκτυο, πυρήνα και μιτοχόνδρια.

(πηγή: Mari et al 2009; mgsh, a key survival antioxidant).

Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε δύο μορφές, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη ή όπως συχνά ονομάζεται δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) (Pizzorno, 2014). Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της οφείλονται στην σουλφυδρυλική ομάδα που εντοπίζεται στο κατάλοιπο κυστεΐνης και εμπλέκεται σε αναγωγικές και αντιδράσεις σύζευξης (Forman et al., 2010). Η GSH λειτουργεί ως δότης H σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και των μεταβολιτών τους, που καταλύονται από ένζυμα του συστήματος της γλουταθειόνης όπως υπεροξειδάσες και τρανσφεράσες. (Deponde, 2013). Στις αντιδράσεις αυτές η GSH οξειδώνεται αντιστρεπτά από ηλεκτρονιόφιλες ουσίες και μεταπίπτει στην GSSG μορφή. Η συσσώρευση της οξειδωμένης μορφής σε υψηλά επίπεδα προκαλεί οξειδωτικό στρες και είναι τοξική για το κύτταρο. Επομένως, η αναλογία GSH/GSSG μπορεί να αποτελέσει έναν ικανοποιητικό δείκτη της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου. Την ευθύνη για την επαναφορά της στη ανηγμένη μορφή επωμίζεται ένα NADPH-εξαρτώμενο ένζυμο, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GSR) (εικόνα 10) (Ribas et al., 2014). Η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών (Pizzorno, 2014) (Wu et al., 2004). Αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής διαίρεσης (Ballatori et al., 2009) και διαφοροποίησης (Huh et al., 2006), ενώ πυροδοτεί στα μιτοχόνδρια τον κυτταρικό θάνατο μέσω του αποπτωτικού (Franco & Cidlowski, 2012). Διαταραχές στην ομοιοστάση της εμπλέκονται στην αιτιολογία ή/και την εξέλιξη ενός σημαντικού αριθμού ασθενειών που αφορούν τον άνθρωπο (Ballatori et al., 2009).



**Εικόνα 10:** Αναπαράσταση αντιδράσεων ενζύμων συστήματος της γλουταθειόνης. Το NADPH-εξαρτώμενο ένζυμο ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης ανάγει την οξειδωμένη μόρφή του τριπεπτιδίου, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό, ανάγοντας το υπεροξειδιο του υδρογόνου σε νερό.

(προσαρμοσμένη από [http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/gp.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/gp.html))

### 1.5 | Σκοπός εργασίας

Η κυτταρική αναγέννηση μέσω της φλεγμονώδους διαδικασίας είναι μελετημένη, ωστόσο, ο ρόλος ενός παράγοντα φλεγμονής και ταυτόχρονα μίας ελάχιστα μελετημένης δραστικής μορφής χλωρίου, του HClO, το οποίο παράγεται ενδοκυτταρικά από κύτταρα του ανοσοποιητικού και ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα δεν έχει διευκρινιστεί. Επομένως, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία ενός *in vitro* συστήματος προσομοίωσης της φλεγμονώδους απόκρισης σε μυϊκά κύτταρα και η μελέτη του ρόλου του HClO στην πιθανή αύξηση της βιωσιμότητάς τους. Στόχο της εργασίας αυτής αποτελεί, επίσης, η διερεύνηση της συσχέτισης του αναγεννητικού αυτού ρόλου του HClO με το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων.

## 2 | Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 | Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

#### ▽ **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X)**

Βασικό θρεπτικό καλλιέργειας κυττάρων σε υγρή μορφή. Διαθέτει 4500 mg/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ. Περιέχει τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης ως ένδειξη αλλαγής του pH της καλλιέργειας (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 41966-052).

#### ▽ **Βόειος εμβρυϊκός ορός (FBS, Fetal Bovine Serum)**

Πηγή αυξητικών παραγόντων απαραίτητων για την ανάπτυξη, την προσκόλληση και τη διατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 10270-106). Προστίθεται στο θρεπτικό υλικό σε τελική συγκέντρωση 10% κατ' όγκον (v/v). Πριν από τη χρήση του ορού προηγείται η θερμική απενεργοποίηση του (heat inactivation) σε υδατόλουτρο στους 55 °C για 30 λεπτά., προκειμένου να απενεργοποιηθούν συστατικά που δρουν ως πιθανοί αναστολείς ανάπτυξης. Ο όρος μπορεί κατόπιν να διαχωριστεί σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και να αποθηκευτεί στους -20 °C.

#### ▽ **Στρεπτομικίνη-Πενικιλίνη**

Τα δύο αντιβιοτικά παρέχονται από την εταιρεία Gibco, σε κοινό διάλυμα συγκέντρωσης 100X (αριθμός καταλόγου 15140-122). Συμπληρώνουν το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας προσδίδοντας του προληπτικό ρόλο ενάντια σε βακτηριακές μολύνσεις. Το διάλυμα προστίθεται στο θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 1X, με την τελική συγκέντρωση των δύο αντιβιοτικών να είναι 100 units/mL πενικιλίνης και 100 µg/mL στρεπτομικίνης.

#### ▽ **Διάλυμα τρυψίνης 0,5% v/v (10X) σε EDTA**

Περιέχει 5 g/L τρυψίνη (1:250), 2 g/L EDTA 4Na, 8.5 g/L NaCl (10X) (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 15400-054). Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κύτταρων τόσο από τα τοιχώματα της φλάσκας όσο και από την μεταξύ τους προσκόλληση, με μία διαδικασία που ονομάζεται τρυψινοποίηση. Η τρυψίνη αποτελεί ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (πρωτεάση σερίνης-θρεονίνης) που διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό κυρίως άκρο των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη. Το EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) δρα ως χηλικός παράγοντας, ενισχύοντας τη δράση του ενζύμου. Είναι έτοιμο για χρήση σε συγκέντρωση 1X κατόπιν αραιώσης με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

#### ▽ **PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X)**

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 20012-019). Διαθέτει 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> με pH 7,4. Χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της

τρυψινοποίησης για τις εκπλύσεις των κυττάρων, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού που είναι ικανά να αναστείλουν την ακόλουθη δράση της τρυψίνης.

▽ **Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)**

Λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας κατά το πάγωμα των κυττάρων. Ειδικότερα, αλλάζει την δομή των κυτταρικών μεμβρανών αυξάνοντας τη διαπερατότητα τους. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπει την εκροή νερού από το κύτταρο, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Λόγω της υψηλής τοξικότητας του χρησιμοποιείται μόνο σε συγκέντρωση 10% (v/v) κατ' όγκον στο μέσο παγώματος. Στην παρούσα εργασία το DMSO προμηθεύτηκε από την εταιρία εταιρεία Sigma, αριθμός καταλόγου D2650.

▽ **XTT Cell Proliferation Kit II**

Χρησιμοποιείται ως μια μη ραδιενεργή, χρωματομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας. Εστιάζει στη μελέτη των αλλαγών του αριθμού και της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Το συγκεκριμένο κιτ προμηθεύτηκε από την εταιρεία Roche, με αριθμό καταλόγου 11 465 015 001.

▽ **Υποχλωριώδες οξύ (HClO ή HOCl)**

Το αντιδραστήριο αγοράστηκε από την εταιρεία Merck με αριθμό καταλόγου 1056142500.

▽ **DCF-DA ( 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate)**

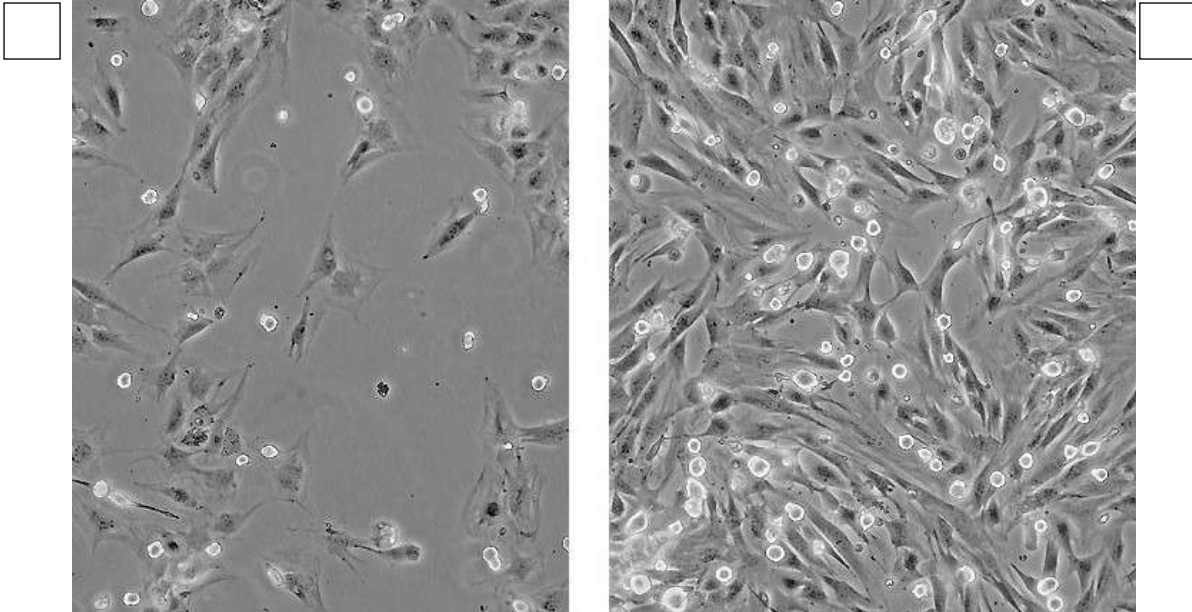
Χρησιμοποιείται για την μέτρηση παραγόμενων ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS σε ζωντανά κύτταρα. Αποτελεί έναν οξειδοαναγωγικά ευαίθητο, μη φθορίζοντα ιχνηθέτη, ικανό να διαχέεται μέσα στο κύτταρο. Ο ιχνηθέτης αυτός οξειδώνεται από τις υπάρχουσες ROS σε μια φθορίζουσα χρωστική το DCF (2', 7'-dichlorofluorescein) και ποσοτικοποιείται με τη βοήθεια κυτταρομέτρου ροής. Για την Παρασκευή του 1,94 mg χρωστικής διαλύονται σε 10 ml μεθανόλης.

▽ **Mercury Orange**

Η φθορίζουσα αυτή χρωστική χρησιμοποιείται για την ανάλυση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου σε γλουταθειόνη με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Η μη ενζυματική αντίδραση με την γλουταθειόνη οδηγεί στη δημιουργία ενός S-γλουταθειονυλιωμένου παραγώγου που εκπέμπει πορτοκαλί φθορισμό όταν διεγερθεί από μπλε φως (στα 488 nm). Για την παρασκευή του διαλύονται 1,93 mg Mercury Orange σε 10 ml ακετόνης.

## 2.2 | Κυτταρική σειρά C2C12

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C2C12. Το μυοσκελετικό σύστημα είναι από τα πιο διαδεδομένα μοντέλα για τη μελέτη της έντονης άσκησης και των φλεγμονωδών μυοπαθειών. Για τη μελέτη του μυϊκού συστήματος χρησιμοποιούνται *in vitro* καθώς και *in vivo* μοντέλα. Ένα ευρέως γνωστό εγκαθιδρυμένο *in vitro* μοντέλο σκελετικών μυοβλαστών είναι τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα C2C12. Η κυτταρική αυτή σειρά αποτελεί υποκλώνο μυοβλαστών που απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τους ερευνητές Yaffe και Saxel το 1997, στην προσπάθειά τους να απομονώσουν μυογενετικά κύτταρα από μύες ενήλικων ποντικών με μυϊκή δυστροφία (Yaffe & Saxel, 1997). Πρόκειται για κύτταρα που προέρχονται από σκελετικούς μύες ποντικού, με δυνατότητα καλλιέργειας υπό ποικίλες συνθήκες για την επαγωγή αντίστοιχων ειδικών αποκρίσεων ανάλογα με το ερευνητικό ενδιαφέρον (Nedachi et al., 2008). Η δυνατότητα διαφοροποίησης σε συγκύτια μυοκυττάρων, τα καθιστά πολύτιμα εργαλεία για την μελέτη της μυογενετικής διαδικασίας και την δημιουργία ενός λειτουργικού μοντέλου σκελετικού μυϊκού ιστού (Veliça & Bunce, 2011). Η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται μετά από αντικατάσταση της υψηλής συγκέντρωσης ορού εμβρυϊκού βοός (FBS 10%), με χαμηλή συγκέντρωση ορού αλόγου (HS 2-5%) (Yaffe & Saxel, 1997). Σε αδιαφοροποίητη κατάσταση τα κύτταρα C2C12 εμφανίζουν επίπεδη μορφή και αστερόμορφο-ατρακτοειδές σχήμα με διακλαδώσεις μακρών ινών που εκτείνονται σε πολλές κατευθύνσεις (εικόνα 11). Πολλαπλασιάζονται σε μονόστιβες καλλιέργειες και είναι στενά προσκολλημένα στο υπόστρωμα. (Burattini et al., 2004). Η παρούσα κυτταρική σειρά προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma. Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) επιπέδου βιοασφάλειας II της εταιρείας Tel Star AV-30/70. Ο θάλαμος αποστειρώνεται στην αρχή και το τέλος κάθε πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας UV και καθαρίζεται πάντα με διάλυμα 70% αιθανόλη.



**Εικόνα 11:** Απεικόνιση μορφολογίας κυττάρων C2C12 (α) σε χαμηλή και (β) σε υψηλή πυκνότητα καλλιέργειας αντίστοιχα. Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο. (προσαρμογή εικόνας από εταιρία ATCC, αριθμός καταλόγου CRL-1772™).

### 2.3. | Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα καλλιεργούνται και διατηρούνται μέσα σε επίπεδες και αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες T<sub>25</sub> ή T<sub>75</sub>, με τις ονομασίες να αντιστοιχούν στο εμβαδόν επιφάνειας τους που είναι 25 cm<sup>2</sup> και 75 cm<sup>2</sup> αντίστοιχα (εικόνα 12). Τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού (full media) που αποτελείται από θρεπτικό μέσο DMEM, ενισχυμένο με βόειο εμβρυικό ορό FBS σε τελική συγκέντρωση 10% v/v. Πριν από τη χρήση του, ο όρος έχει απενεργοποιηθεί με θέρμανση (heat inactivation) στους 55 °C, με σκοπό την απενεργοποίηση συστατικών που λειτουργούν ως πιθανοί αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα το συμπλήρωμα του όρου που μπορεί να ενεργοποιηθεί στην καλλιέργεια. Επιπλέον το θρεπτικό μέσο εμπλουτίζεται με μείγμα των αντιβιοτικών πενικιλίνη (P) και στρεπτομυκίνη (S) σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/mL και 100 μg/mL αντίστοιχα. Η ποσότητα του πλήρους θρεπτικού υλικού που προστίθεται στην φλάσκα ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος της. Ενδεικτικά χρησιμοποιούνται 5 ml για T<sub>25</sub> και 15 ml για T<sub>75</sub>. Όλα τα αντιδραστήρια πριν από τη χρήση τους θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C και οι συσκευασίες διατήρησής τους όπως και όλος ο πειραματικός εξοπλισμός αποστειρώνεται με διάλυμα 70% αιθανόλη, πριν την τοποθέτηση του στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Είναι σημαντικό στην εξωτερική επιφάνεια της κάθε φλάσκας να αναγράφεται το πέρασμα (passage), η ημερομηνία καθώς και η ποσότητα των κυττάρων που καλλιεργείται κάθε φορά. Οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο (εταιρία RS BIOTECH) σε συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5 % CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία 95%. Η κατάσταση και η μορφολογία των κυττάρων εξετάζονται καθημερινά σε

ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (εταιρίας Kruss), ενώ το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας ανανεώνεται ανά 2 ημέρες κατά μέσο όρο σε φυσιολογικές συνθήκες. Στο χρονικό αυτό διάστημα, η ανάπτυξη των κυττάρων καλύπτει περίπου το 70%-80% της επιφάνειας της φλάσκας.



**Εικόνα 12 :** Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων T<sub>25</sub> και T<sub>75</sub>  
(πηγή: <https://www.usascientific.com/cytoone-t75-tc-flask.aspx> )

Επιλέγουμε να ανανεώσουμε το θρεπτικό μέσο στην συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης όπου η καλλιέργεια διατηρεί μια σχετική πυκνότητα, αλλά υπάρχει ακόμη διαθέσιμος χώρος στην φλάσκα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Σε περίπτωση που η ανάπτυξη υπερκεράσει το προεπιλεγμένο όριο του 70%-80% κάλυψης, παρατηρείται συσσώρευση και επαφή των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση του περαιτέρω πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής ανάπτυξης και είναι γνωστό με τον όρο αναστολή εξ επαφής. Επιπλέον, ειδικότερα για τα κύτταρα C2C12 η αυξημένη πυκνότητα μπορεί να οδηγήσει την καλλιέργεια σε διαφοροποίηση. Για τους λόγους αυτούς πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια, δηλαδή επανακαλλιέργεια μια ποσότητας των αρχικών κυττάρων σε νέα φλάσκα. Η ανακαλλιέργεια οδηγεί σε νέο πέρασμα και στην παρούσα πειραματική διαδικασία ταυτίζεται με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης, διότι η κυτταρική αποκόλληση συντελείται με τη βοήθεια του πρωτεολυτικού ενζύμου τρυψίνη. Η τρυψινοποίηση στοχεύει στην αποκόλληση των κυττάρων τόσο από το στερεό τους υπόστρωμα όσο και στην μεταξύ τους αποκόλληση. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: Αρχικά απομακρύνεται από τη φλάσκα καλλιέργειας το υπάρχον θρεπτικό μέσο με αναρρόφηση με τη βοήθεια μια γυάλινης πιπέτας Pasteur προσαρμοσμένης σε αντλία κενού. Έπειτα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X)

στην φλάσκα, την οποία ανακινούμε ήπια με το χέρι. Η προσθήκη PBS αποσκοπεί στην έκπλυση των κυττάρων και την απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού από τη φλάσκα που λειτουργούν ανασταλτικά στη δράση της τρυψίνης, γιατί την απενεργοποιούν. Η ποσότητα του ρυθμιστικού που επιλέγεται είναι ανάλογη του εμβαδού επιφάνειας της επιλεχθείσας φλάσκας, με ενδεικτικές τιμές 4 mL για μια φλάσκα καλλιέργειας T<sub>25</sub> και 12 mL για μια φλάσκα T<sub>75</sub>. Ακολούθως, η αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος γίνεται επίσης με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur προσαρμοσμένης σε αντλία κενού. Κατόπιν προστίθεται το ένζυμο τρυψίνη και η φλάσκα αναδεύεται ήπια, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη ενζυμική δράση. Και σε αυτήν την περίπτωση η ποσότητα του ενζύμου που προστίθεται εξαρτάται από το εμβαδό επιφάνειας της φλάσκας. Συνήθως επιλέγεται 0,6 mL τρυψίνης για μια φλάσκα T<sub>25</sub> και 1,5 mL για μια T<sub>75</sub>. Η βέλτιστη δράση του ενζύμου παρατηρείται στους 37 °C, γι' αυτό και η φλάσκα τοποθετείται κατά κύριο λόγο σε επωαστικό κλίβανο (σε συνθήκες 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία) για τρία περίπου λεπτά. Εναλλακτικά διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για παρόμοιο χρονικό διάστημα, μετά το πέρας του οποίου χτυπιούνται ελαφρά τα τοιχώματα της φλάσκας, ώστε να ενισχυθεί το ενζυμικό αποτέλεσμα. Η αποκόλληση των κυττάρων καθίσταται φανερή μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, με το στρογγυλό σχήμα και την κίνηση των κυττάρων να προδίδουν την πλήρη αποκόλληση τους από το υπόστρωμα. Δεν είναι όμως λίγες οι φορές που δεν επιτυγχάνεται πλήρης αποκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και δημιουργούνται ορατά συσσωματώματα. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη η μηχανική ανάδευση τους με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, προκειμένου να διασπαστούν τα συσσωματώματα και να επιτευχθεί μια ομοιόμορφη κυτταρική κατανομή στη φλάσκα. Για να τερματιστεί η δράση της τρυψίνης προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και ακόλουθη ανάδευση με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, ώστε να διασπαστούν συσσωματώματα που πιθανώς να μην αποκολλήθηκαν τελείως στο προηγούμενο βήμα. Το κυτταρικό εναιώρημα (συνήθως χωρητικότητας 15 ml) που δημιουργήθηκε μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο τύπου falcon και αναδεύεται ήπια με το χέρι για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κυτταρική κατανομή και να προληφθεί η τάση μερικών κυτταρικών τύπων να προσκολλώνται στον πάτο του σωληναρίου. Λαμβάνοντας υπόψη τον κυτταρικό τύπο και τις ανάγκες του πειράματος, μεταφέρεται μία ποσότητα εναιωρήματος σε νέα φλάσκα καλλιέργειας και προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό σε τελικό όγκο 5 ml για μια φλάσκα T<sub>25</sub> και 15 ml για μια φλάσκα T<sub>75</sub>. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι φλάσκες καλλιέργειας τοποθετούνται και πάλι στον επωαστικό κλίβανο.

#### 2.4 | Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας

Υπάρχει δυνατότητα διατήρησης των κυττάρων και εκτός καλλιέργειας με τη μέθοδο της κρυοσυντήρησης. Ειδικότερα, τα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν σε ειδικά σωληνάρια γνωστά με την ονομασία cryovials και να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικούς καταψύκτες σε συνθήκες -80 °C. Εάν



επιθυμούμε μια πιο μακροχρόνια αποθήκευση επιλέγουμε να συντηρήσουμε τα κύτταρα σε υγρό άζωτο, με τη θερμοκρασία να πέφτει στους  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες χρησιμεύουν στην επιβράδυνση της κυτταρικής διαίρεσης και άλλων μεταβολικών μηχανισμών, χωρίς ωστόσο να σταματήσουν απόλυτα τις κυτταρικές διεργασίες. Η παραδοσιακή κρυοσυντήρηση αφορά την επικάλυψη του προς κατάψυξη υλικού με κρυοπροστατευτικούς παράγοντες, κύριο εκπρόσωπο των οποίων αποτελεί το προαναφερθέν διμεθυλσουλφίδιο (DMSO). Για να μπορέσουν να διατηρηθούν επιτυχώς τα κύτταρα είναι σημαντικό να διαθέτουν μικρό αριθμό περασμάτων και να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα. Για αυτόν τον λόγο επιλέγονται κύτταρα που καλύπτουν το 60% της επιφάνειας μιας φλάσκας καλλιέργειας.

#### 2.4.1| Πάγωμα κυττάρων

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για το πάγωμα των κυττάρων αποτελείται από τα εξής βήματα: Απομακρύνεται αρχικά το υπάρχον πλήρες θρεπτικό από τη φλάσκα με αναρρόφηση από γυάλινη πιπέτα Pasteur προσαρμοσμένη σε αντλία κενού. Προστίθεται, έπειτα, ρυθμιστικό διάλυμα PBS (4 mL για φλάσκα  $T_{25}$ , 12 mL για  $T_{75}$ ) για έκλυση κυττάρων από υπολείμματα ορού προς αποφυγή απενεργοποίησης της τρυψίνης. Αφαιρείται με τον ίδιο τρόπο αναρρόφησης και το ρυθμιστικό διάλυμα από τη φλάσκα και προστίθεται η τρυψίνη (0,6 mL για φλάσκα  $T_{25}$ , 1,5 mL για  $T_{75}$ ). Η φλάσκα τοποθετείται για τρία λεπτά στον επωαστικό κλίβανο είτε παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να δράσει το ένζυμο (σε συνθήκες  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95% υγρασία). Επιβεβαιώνεται η αποκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και από την επιφάνεια της φλάσκας με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Για την διαδικασία παγώματος είναι απαραίτητη η επιπρόσθετη μηχανική ανάδευση για την εξασφάλιση ομοιομορφίας του δείγματος που θα καταψυχθεί. Το ένζυμο απενεργοποιείται με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού και ακολουθεί καλή ανάδευση με αποστειρωμένη πιπέτα πριν την μεταφορά του εναιωρήματος σε σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητα 15 mL. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται (φυγόκεντρος Eppendorf) στις 1000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Μετά τη φυγοκέντρηση αναρροφάται προσεκτικά το υπερκείμενο με γυάλινη πιπέτα Pasteur και αντλία κενού. Το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα επαναδιαλύεται σταδιακά σε μικρές ποσότητες ενός ειδικού μέσου παγώματος (freezing medium). Το μέσο παγώματος αποτελείται από 90% v/v ορό βόειου εμβρύου FBS και 10% v/v DMSO. Αφού επαναδιαλυθεί το ίζημα, τα παγωμένα πλέον κύτταρα μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια του 1 mL (cryovials) στα οποία αναγράφονται οι απαραίτητες πληροφορίες των κυττάρων που πρόκειται να καταψυχθούν, όπως το όνομα της κυτταρικής σειράς, το πέρασμα στο οποίο καταψύχθηκαν, η ποσότητά τους, αλλά και η ημερομηνία κατάψυξής τους. Τα cryovials αποθηκεύονται προσωρινά για δύο ώρες σε κατάψυξη στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και κατόπιν μεταφέρονται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ώστε η ψύξη τους να είναι σταδιακή. Στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μπορούν να αποθηκευτούν από μία μέρα μέχρι και λίγους μήνες, ενώ

για μακροχρόνια αποθήκευση του επιλέγεται η τοποθέτηση του σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο.

#### 2.4.2| Απόψυξη - Ξεπάγωμα κυττάρων

Με το ξεπάγωμα επαναφέρονται άθικτες όλες οι φυσιολογικές λειτουργίες ενός μεγάλου ποσοστού των κυττάρων που καταψυχθήκαν. Το ξεπάγωμα θα πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες κυτταρικού θανάτου. Σύμφωνα με τη διαδικασία απόψυξης, τα κύτταρα μεταφέρονται από το μέσο κρυοσυντήρησης τους (βαθιά κατάψυξη  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ή δοχείο υγρού αζώτου  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η απόψυξη πραγματοποιείται με συνεχή ανακίνηση του cryovial με γρήγορες κινήσεις μέσα στο υδατόλουτρο. Μόλις υγροποιηθεί το δείγμα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 15 mL, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί πλήρες θρεπτικό μέσο. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές ανα λεπτό για 5 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθεί το κρυοπροστατευτικό DMSO καθώς είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκείμενου το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε φλάσκες T<sub>25</sub> ή T<sub>75</sub> (ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων που περιέχει το cryovial), η κάθε μία από τις οποίες συμπληρώνεται με πλήρες θρεπτικό μέσο μέχρι τα 5 mL και τα 15 mL αντίστοιχα. Σημειώνονται ο τύπος της κυτταρικής σειράς, ο αριθμός του περάσματος και η ημερομηνία απόψυξης στην εξωτερική επιφάνεια κάθε φιάσκας και τοποθετούνται κατόπιν σε επωαστικό κλίβανο (σε συνθήκες  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία).

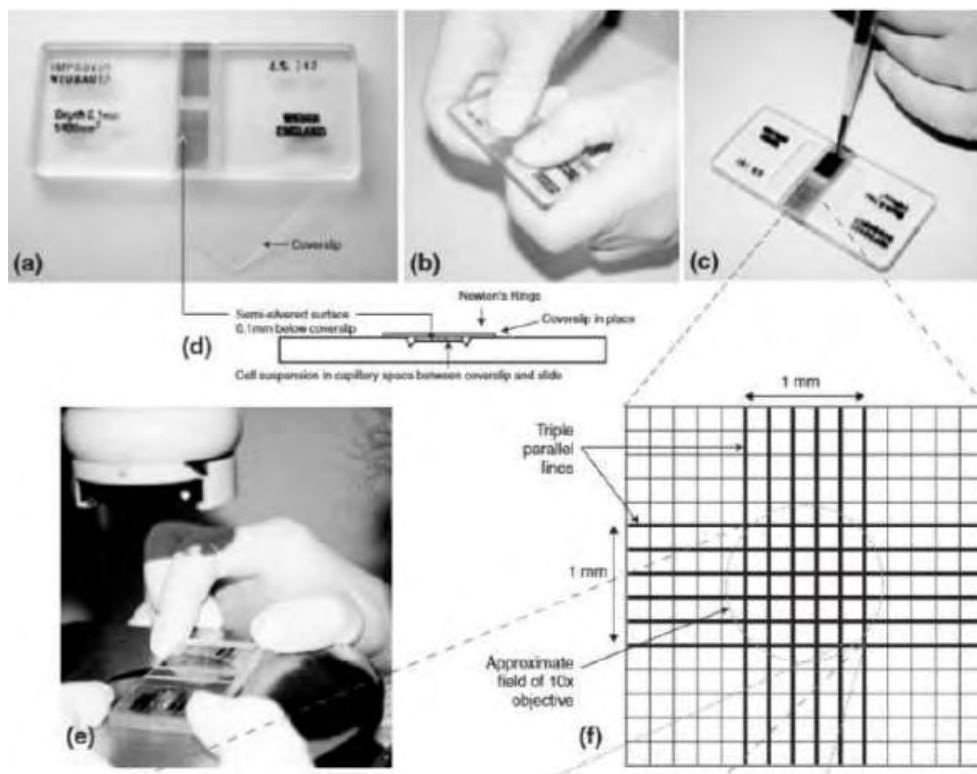
#### 2.5| Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Για την ακριβή και επιτυχή εκτέλεση πειραμάτων που αξιοποιούν μοντέλα κυτταροκαλλιιεργειών καθίσταται απαραίτητη η μέτρηση των κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Καθώς η μέτρηση όλων των κυττάρων ενός πληθυσμού αποτελεί εξοντωτική διαδικασία, μετριέται ο αριθμός των κυττάρων σε ένα μικρό δείγμα γνωστού όγκου. Με βάση τον αριθμό αυτό υπολογίζεται και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που περιέχονται στο αρχικό εναιώρημα. Η διαδικασία της μέτρησης διεξάγεται σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες που ονομάζονται αιμοκυτταρόμετρα (haemocytometers) ή διαφορετικά πλάκες Neubauer.

Το αιμοκυτταρόμετρο διαθέτει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Υπάρχει, ακόμη, μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Η κοίλη επιφάνεια δημιουργεί ένα κενό χώρο ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το κυτταρικό εναιώρημα και καλύπτει κατόπιν όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια λόγω τριχοειδών φαινομένων. Εστιάζοντας με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, σε κάθε λεία επιφάνεια φανερώνονται 9 μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm,

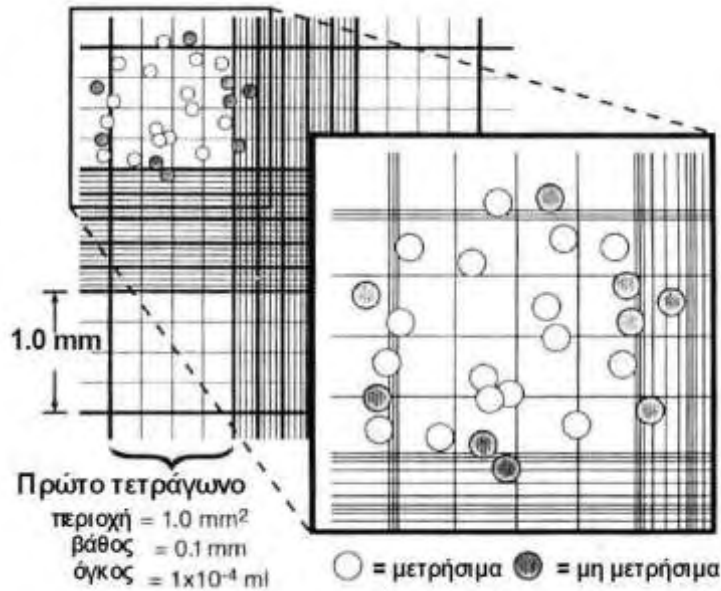
μερικά από τα οποία φαίνεται να σχηματίζουν έναν σταυρό (εικόνα 13). Το σχήμα αυτό διευκολύνει τον εντοπισμό των κυττάρων διότι καθίστανται ορατά 4 μεγάλα γωνιακά τετράγωνα εκτός του σταυρού. Καθένα από τα τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα με μήκος πλευράς 0,25 mm. Στις μετρήσεις χάριν ευκολίας τα τετράγωνα ονομάζονται Α, Β, Γ, Δ και σε αυτά λαμβάνει χώρα η μέτρηση των κυττάρων. Κάθε τετράγωνο από τα 9 μεγάλα διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα μέσω 3 παράλληλων γραμμών απόστασης 2,5 μm μεταξύ τους. Με βάση αυτά τα όρια καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός του πεδίου μέτρησης ή όχι (εικόνα 14).

Η διαδικασία που ακολουθείται για την μέτρηση των κυττάρων είναι η εξής (εικόνα 14): Αφαιρείται από την φιάσκα καλλιέργειας το θρεπτικό μέσο με τον τρόπο που αναφέρθηκε στα προηγούμενα πρωτόκολλα και τα κύτταρα ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Ακολουθεί η απομάκρυνση του PBS και η επώαση των κυττάρων με τρυψίνη σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία) για 3 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Μετά την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου και προσεκτική μηχανική ανάδευση, το περιεχόμενο της φιάσκας μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου falcon για να φυγοκεντρηθεί στις 1000 στροφές ανά λεπτό για διάρκεια 10 λεπτών. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Από το κυτταρικό εναιώρημα που δημιουργήθηκε μεταφέρεται μια ποσότητα 10 μL στο αιμοκυτταρομέτρο που τοποθετείται τέλος σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.



**Εικόνα 13:** Διαδικασία μέτρησης κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρομέτρου

(προσαρμογή εικόνας από τεχνικές 2018, μάθημα κυτταροκαλλιέργειες, πανεπιστήμιο Θεσσαλίας τμήμα βιοχημείας και βιοτεχνολογίας)



**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση της μέτρησης κυττάρων σε πλάκα Neubauer.

(προσαρμοσμένη από Τσίγκου 2016, μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία; Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης αναλόγων της αρτεμισίνης σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού).

Για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων στον αρχικό όγκο εναιωρήματος, υπολογίζεται ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν στα 4 τετράγωνα Α, Β, Γ, Δ  $(A+B+Γ+Δ/4)$  και πολλαπλασιάζεται με το  $10^4$ . Ο τύπος που εφαρμόζεται είναι ο εξής:

$$(A+B+Γ+Δ)/4 \times 10^4 \text{ κύτταρα/mL}$$

## 2.6 | Έλεγχος μόλυνσης κυτταροκαλλιεργειών από μυκόπλασμα

Τα μυκοπλάσματα θεωρούνται ως οι απλούστεροι και μικρότεροι σε μέγεθος αυτοδιπλασιαζόμενοι, ελεύθεροι μικροοργανισμοί (Drexler & Uphoff, 2002). Ανήκουν στην βακτηριακή κλάση των Mollicutes, τα μέλη των οποίων χαρακτηρίζονται από την έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος. Τα πρώτα στελέχη μυκοπλάσματος απομονώθηκαν από το ιστιτούτο Pasteur το 1898 και μέχρι σήμερα τουλάχιστον 20 από τα 190 γνωστά είδη έχουν αναγνωρισθεί ως πιθανοί μολυσματικοί παράγοντες εργαστηριακών κυτταροκαλλιεργειών (Invinogen, 2016). Λειτουργούν ως υποχρεωτικά παράσιτα, εκμεταλλευόμενα τα κύτταρα του ξενιστή για να ικανοποιήσουν τις ενεργειακές και βιοσυνθετικές τους απαιτήσεις. Το μικρό

τους μέγεθος (0,3-0,8 μm) τα καθιστά μη ορατά με γυμνό μάτι ακόμη και με απλό οπτικό μικροσκόπιο, ενώ σε συνδυασμό με την ευελιξία της κυτταρικής τους μεμβράνης διευκολύνεται η διόδος τους μέσω των συμβατικών αντιμικροβιακών φίλτρων (Drexler & Urhooff, 2002). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα βακτήρια αναπτύσσονται με αργούς ρυθμούς και εμφανίζουν ορατές αποικίες μετά από περίπου μία εβδομάδα. Η έλλειψη του τοιχώματος τους προσδίδει ανθεκτικότητα στα κοινά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη. Η μόλυνση με μυκόπλασμα προκαλεί αναρίθμητες κυτταροπαθογόνες μεταβολές στα κυτταρικά χαρακτηριστικά του ξενιστή (van Kuppeveld et al., 1994), επηρεάζοντας διαφορετικού είδους κύτταρα με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό (Drexler & Urhooff, 2002). Εκτός από την απώλεια χρόνου και χρημάτων για την καταπολέμηση της μόλυνσης, η ίδια οδηγεί και ως επί το πλείστον σε απώλεια της κυτταρικής καλλιέργειας. Επίσης τα πειραματικά αποτελέσματα επηρεάζονται από την μόλυνση και οδηγούν συχνά σε παραπλανητικά συμπεράσματα. Μια από τις κυριότερες πηγές μόλυνσης με μυκόπλασμα θεωρείται ο ορός εμβρυϊκού βοδιού, με τις εταιρίες προμήθειάς του να κάνουν προσπάθειες ελέγχου και πρόληψης της. Αξίζει να τονιστεί ότι η πιθανότερη πηγή διάδοσης του μυκοπλάσματος αποτελεί ο εργαστηριακός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια. Για την ανίχνευση μόλυνσης με μυκόπλασμα έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές (Drexler & Urhooff, 2000). Μια εύκολη και γρήγορη τεχνική που εφαρμόζεται για έναν τακτικό έλεγχο ρουτίνας είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

### 2.6.1| Πειραματική διαδικασία

Για τον έλεγχο της καθαρότητας της κυτταροκαλλιέργειας λαμβάνεται συνήθως μία μικρή ποσότητα κυττάρων μετά την τρυψινοποίηση. Το DNA τους απομονώθηκε με τη χρήση του NucleoSpin® Tissue “ Genomic DNA from tissue” kit της εταιρίας Macherey-Nagel, με βάση το πρωτόκολλο Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells. Το DNA που απομονώθηκε αποθηκεύεται προσωρινά στο ψυγείο στους 4 °C, ενώ σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθεί άμεσα αποθηκεύεται στον καταψύκτη στους -20 °C. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικά Eppendorf tubes. Σε ένα από αυτά παρασκευάστηκε ένα μίγμα (master mix) που περιείχε όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά, πολλαπλασιαζόμενα επί των αριθμό των επιθυμητών αντιδράσεων. Αναλυτικά τα συστατικά και οι ποσότητες τους για μία αντίδραση αναγράφονται στον πίνακα 1.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση
Kappa buffer 10 X (+15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,4 μL
dNTPs (10 mM)	0,8 μL
Myc-For (50 pmole/μl)	1 μL
Kapa Taq πολυμεράση (5 units/μl)	0,2 μL
DNA μήτρα	2 μL
ddH <sub>2</sub> O	Τελικός όγκος: 25 μL

**Πίνακας 1:** Σύσταση διαλύματος master mix για την αντίδραση PCR για τον έλεγχο μυκοπλάσματος.

Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης καθώς και οι αλληλουχία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον πίνακα 2 και 3 αντίστοιχα. Για να εκτιμήσουμε την ποιότητα του DNA που απομονώθηκε και παράλληλα την αξιοπιστία της αντίδρασης για τον έλεγχο της καθαρότητας, χρησιμοποιήθηκε ένα ιδιοσυστατικό γονίδιο (housekeeping gene). Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης. Ειδικής αλληλουχίας εκκινήτες για την ακτίνη (πίνακας 3) προστέθηκαν σε ίδιας σύστασης mastermix και η αντίδραση διεξάχθηκε σε ίδιες συνθήκες PCR.

Στάδια	Θερμοκρασίες-Χρόνοι
Αποδιάταξη	95°C για 40 sec
Υβριδοποίηση	55°C για 40 sec
Επιμήκυνση	72°C για 30 sec
(40 κύκλοι)	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10 min

**Πίνακας 2:** Συνθήκες PCR προγράμματος MYCOPLASMA

Όνομα	Αλληλουχία εκκινητών	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (T <sub>m</sub> )
Myc-For	5'-CCR TGC ACC AYC TGT CWH HHB GWW AAC CTC-3'	T <sub>m</sub> =55°C
Myc-Rev	5'-GAA AGY GTG GGG AGC AAA YAG GAT TAG ATA CCC T-3'	T <sub>m</sub> =70°C
Act- For	5'- CAT CCT GCG TCT GGA CCT-3'	T <sub>m</sub> =64°C
Act- Rev	5'- TGA TGA CCT GGC CGT CAG-3'	T <sub>m</sub> =58°C

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες εκκινητών για τον έλεγχο του μυκοπλάσματος

Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε 2% πηκτή αгарόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (agarose/EtBr gel). Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρα μοριακού βάρους 2-log DNA ladder της εταιρείας New England Biolabs, για τον προσδιορισμό των επιθυμητών ζωνών. Η εμφάνιση των ζωνώσεων του πηκτώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ακτινοβολίας UV.

## 2.7| Παρασκευή διαλυμάτων υποχλωριώδους οξέος

Προκειμένου να μελετηθούν οι συνέπειες του υποχλωριώδους οξέος στην κυτταρική σειρά C2C12, παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Για την επίτευξη των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων, το αρχικό διάλυμα του υποχλωριώδους αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα οργανοφωσφορικών (PBS) με pH 7,4.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 292 nm σε κυψελίδα χαλαζία. Στα 292 nm το υποχλωριώδες οξύ παρουσιάζει συντελεστή μοριακής απόσβεσης ( $\epsilon$ ) 350 L/mol/cm. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του νόμου Beer-Lambert.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Όπου το A αντιστοιχεί στην απορρόφηση, το  $\epsilon$  είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης, l το μήκος κυψελίδας σε cm και c η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (σε mole/l).

## 2.8 | Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ

### 2.8.1 | Αρχή της μεθόδου

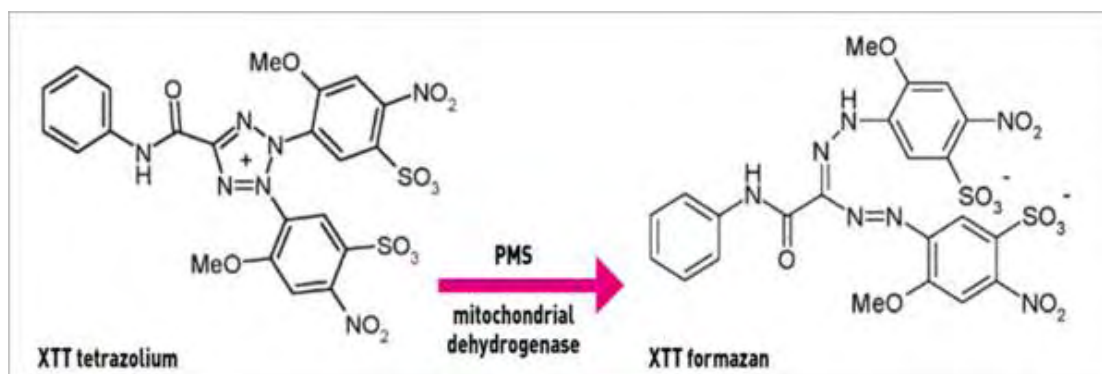
Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και ανάπτυξης εφαρμόστηκε μια χρωματομετρική μέθοδος βασισμένη στο αντιδραστήριο ΧΤΤ (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxide). Το ΧΤΤ αποτελεί ένα δεύτερης γενιάς είδος τετραζολικού άλατος που χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για την ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και για την εκτίμηση της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων (Marshall et al., 1999). Το 1988 περιγράφεται από τον Scudiero και την υπόλοιπη ερευνητική ομάδα ως μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος εκτίμησης της ανάπτυξης και της ευαισθησίας σε φαρμακευτικούς παράγοντες μια σειράς καρκινικών κυττάρων (Scudiero et al., 1988).

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το cell proliferation kit II (Roche, 11465015001) που περιλαμβάνει 2 αντιδραστήρια. Ένα πορτοκαλί χρώματος αντιδραστήριο, το ΧΤΤ labeling reagent, που για τις ανάγκες του πειράματος θα αναφέρεται ως αντιδραστήριο Α και το οποίο περιέχει 1 mg/mL (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640, χωρίς την παρουσία της χρωστικής ερυθρό της φαινόλης. Επιπλέον διαθέτει το κίτρινου χρώματος αντιδραστήριο Β που αναγράφεται ως electron-coupling reagent και περιέχει 0,383 mg/mL PMS (N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate) σε αποστειρωμένο PBS. Το αντιδραστήριο Β λειτουργεί ως ο δότης ηλεκτρονίων, διαμεσολαβώντας στην αντίδραση αναγωγής του ΧΤΤ και χρησιμοποιείται για βελτιστοποίηση του αποτελέσματος της μεθόδου.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αναγωγή του ελαφρώς κίτρινου χρώματος άλατος ΧΤΤ και τον σχηματισμό της φορμαζάνης, ενός υδατοδιαλυτού προϊόντος με έντονο πορτοκαλί χρωματισμό (εικόνα 15). [“Cell Proliferation Kit II( ΧΤΤ)”, colorimetric assay (ΧΤΤ based) for the non – radioactive quantification of the cell proliferation and viability, cat,No 11.465.015.001, Version August 2005]. Η αναγωγή του ΧΤΤ καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο αφυδρογονάση, με τα ζωντανά κύτταρα να παρουσιάζουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα και κατ' επέκταση ταχεία διάσπαση του θετικά φορτισμένου τεταρτοταγούς τετραζολικού δακτυλίου του άλατος. Αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης, καθώς η αφυδρογονάση απενεργοποιείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον θάνατο του κυττάρου. Η υδατοδιαλυτότητα της φορμαζάνης επιτρέπει την άμεση ποσοτικοποίηση της που πραγματοποιείται με απευθείας μέτρηση της απορρόφησης με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (multi-well plate reader). Η τιμή της οπτικής πυκνότητας αντανακλά την μεταβολική ενεργότητα και συνεπώς την κυτταρική βιωσιμότητα, παρουσιάζοντας έτσι μια ανάλογη σχέση με τον αριθμό των ζώντων κυττάρων. Η τεχνική αυτή προτιμάται έναντι των υπολοίπων που χρησιμοποιούν επίσης άλατα τετραζολίου εξαιτίας της ασφάλειας και της



απλότητας της, αφού εξαλείφει την χρήση ραδιενεργών ισotόπων και επιπρόσθετων σταδίων έκπλυσης. Πρόκειται για μια μέθοδο ευαίσθητη με ικανότητα ανίχνευσης ακόμη και πολύ μικρών αριθμών κυττάρων αλλά και αρκετά ακριβής, αφού το αποτέλεσμα δίνεται άμεσα. Ακόμη επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή.



**Εικόνα 15:** Αναγωγή άχρωμου αντιδραστήριου ΧΤΤ στο έγχρωμο άλας φορμαζάνης (από [www.creative-bioarray.com](http://www.creative-bioarray.com))

### 2.8.2 | Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ έχει συνολική διάρκεια δύο ημερών. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται τρυψινοποίηση που ακολουθείται από την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας και την επιστροφή συγκεκριμένου αριθμού αυτών σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Η επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων ποικίλει στις διάφορες κυτταρικές σειρές και προϋποθέτει πρωτίστως την διεξαγωγή πειραμάτων τιτλοδότησης. Στα πειράματα αυτά μελετάται η ανάπτυξη διαφόρων αριθμών κυττάρων σε συνδυασμό διαφορετικών ωρών επώασης με το αντιδραστήριο ΧΤΤ. Σημαντικό είναι κατά τη διάρκεια του πειράματος τα κύτταρα να διαθέτουν καλό μεταβολικό ρυθμό, ένδειξη του οποίου αποτελεί η ομοιόμορφη κάλυψη 40-60 % του τρυβλίου 96 θέσεων. Κατόπιν σειράς πειραματικών δοκιμών αποδείχθηκε πως ο αριθμός των 6000 κυττάρων ανά θέση στο τρυβλίο και η τετράωρη επώασή τους με το αντιδραστήριο ΧΤΤ εξυπηρετεί επαρκώς τις ανάγκες του πειράματος. Επόμενο βήμα μετά την επιλογή αριθμού κυττάρων είναι ο υπολογισμός του όγκου που θα καταλάβουν σε μία θέση (πηγαδάκι) τελικού όγκου 150 μl που συμπληρώνεται έπειτα με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα επιστρωμένα κύτταρα επώαζονται για ένα 24 ώρες σε κλίβανο (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία), ώστε να προσκολληθούν στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας. Την δεύτερη ημέρα το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται από διαλύματα υποχλωριώδους οξέος αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, με εύρος

συγκεντρώσεων 628 pM έως 4 M. Ειδικότερα, για κάθε πηγαδάκι ετοιμάστηκε μείγμα τελικού όγκου 100 μl, που περιέχει 90 μl θρεπτικό υλικό DMEM, παρουσία αντιβιοτικών και απουσία ορού, μαζί με 10 μl καθενός από τα υπό εξέταση διαλύματα υποχλωριώδους οξέος. Το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ισχύς και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Σε κάθε πείραμα, διαφορετικές σειρές θέσεων στο πιάτο καλλιέργειας επώαστηκαν με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων υποχλωριώδους, ενώ κάθε πείραμα περιλάμβανε και ένα δείγμα ελέγχου (control) αποτελούμενο μόνο από κύτταρα που επώάζονται σε 100 μl DMEM παρουσία αντιβιοτικών. Το πιάτο καλλιέργειας τοποθετείται ακολούθως για επώαση σε κλίβανο για 10 λεπτά, 1 ώρα ή 24 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης, το αντιδραστήριο ΧΤΤ παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας Roche. Για τον σκοπό αυτόν αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια Α και Β του kit σε αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο ΧΤΤ, λόγω της φωτοευαισθησίας του συστατικού PMS, παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του και ακολούθως το τρυβλίο τοποθετείται στον κλίβανο για μια τετράωρη επώαση. Το πείραμα ολοκληρώνεται με την φωτομέτρηση του τρυβλίου στα 450 και 630 nm σε φασματοφωτόμετρο multiplate reader, με χρήση του λογισμικού της εταιρείας Biotech.

### 2.8.3| Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Την πειραματική διαδικασία διαδέχεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με στόχο των υπολογισμό του ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης που προκάλεσε το κάθε διάλυμα υποχλωριώδους οξέος στα κύτταρα C2C12. Το ποσοστό της αναστολής υπολογίζεται με τη βοήθεια του ακόλουθου τύπου:

$$\frac{O.D.control - O.D.average}{O.D.control} \times 100$$

Όπου,

**O.D. control (average):** ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων ελέγχου (control) που περιέχουν μόνο κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς προσθήκη υποχλωριώδους. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος ελέγχου προκύπτει από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την αντίστοιχη απορρόφηση στα 450 nm.

**O.D. average:** ο μέσος όρος της τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Υπολογίζεται με την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm, για κάθε δείγμα προσθήκης διαλύματος υποχλωριώδους ίδιας συγκέντρωσης και

την επακόλουθη εύρεση του μέσου όρου αυτών των διαφορών για κάθε διαφορετική συγκέντρωση.

## **2.9| Επώαση κυττάρων C2C12 με HClO για εκτίμηση γλουταθειόνης (GSH) και ελεύθερων ριζών (ROS)**

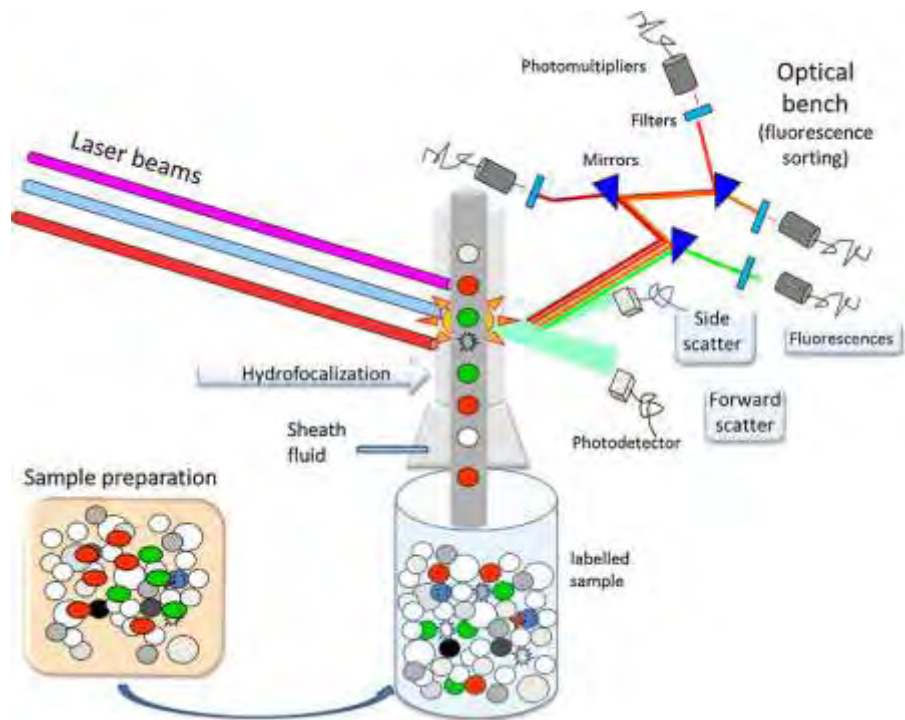
Για να εκτιμηθεί η ποσότητα των ελεύθερων ριζών που παράγονται από την επίδραση του υποχλωριώδους οξέος σε κύτταρα C2C12, καθώς και της γλουταθειόνης που καταναλώθηκε για την μείωσή του (scavenging). Κύτταρα C2C12 επώαστηκαν για διαφορετικές χρονικές περιόδους με διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξέος. Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκες T<sub>25</sub> για δύο ημέρες, μέχρι να καλύψουν περίπου το 40-60% της φλάσκας. Ακολούθως αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Μετά προστίθενται οι διαφορετικές επιλεγμένες συγκεντρώσεις HClO αναμιγμένες με θρεπτικό υλικό (DMEM) δίχως την παρουσία FBS. Κατόπιν οι φλάσκες με τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο για 10 λεπτά, 1 ώρα ή 24 ώρες (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Η ποσότητα των διαλυμάτων επώασης είναι σημαντικό να καλύψει την επιφάνεια των κυττάρων στη φλάσκα. Ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκε μείγμα όγκου 1 ml. Τα μείγματα που παρασκευάστηκαν για τις επώσεις 24 ωρών έγιναν σε τελικό όγκο 1,5 ml, λόγω πιθανής εξάτμισης μεγάλου μέρους τους από την πολύωρη επώαση. Δείγματα ελέγχου (control) παρασκευάστηκαν, επίσης, για κάθε διαφορετικό χρόνο επώασης και περιείχαν αποκλειστικά θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία αντιβιοτικών. Το πέρας της επώασης ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 2 mL PBS και προσθήκη 0,75 mL τρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται για 4 λεπτά προκειμένου να δράσει το ένζυμο και μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου falcon, αφού πρώτα προστεθεί σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό (τελικός όγκος 5 mL). Κάθε σωληνάρια falcon αντιστοιχεί και σε μία φλάσκα μεταχειρισμένη με διαφορετικό μείγμα. Τα falcon φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 160 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία 28 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται κατόπιν 3-4 mL PBS για να ακολουθήσει ακόμη μία δεκάλεπτη φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ξανά με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur προσαρμοσμένης σε αντλία κενού αέρος και αποθηκεύεται στους -80 °C για μελλοντική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

## **2.10| Προσδιορισμός γλουταθειόνης (GSH) και ελεύθερων ριζών (ROS) σε κύτταρα C2C12 με κυτταρομετρία ροής**

### **2.10.1| Αρχή της μεθόδου**

Η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry, FACS) αποτελεί ένα εκλεπτυσμένο εργαλείο μέτρησης πολλαπλών φυσικών χαρακτηριστικών των κυττάρων (Adan et al., 2016). Η λειτουργία της βασίζεται στην εκπομπή φθορίζοντος φωτός όταν προσπίπτει στα υπό εξέταση κύτταρα και το φως που εκπέμπεται προέρχεται από τη διέγερση

φθορίζοντων χρωστικών ουσιών που δεσμεύονται εξειδικευμένα σε ενδοκυτταρικά ή μόρια της εξωτερικής επιφάνειας. Η κυτταρομετρία ροής είναι ιδιαίτερα σημαντική σε βιολογικές μελέτες καθώς επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική εξέταση ολόκληρων κυττάρων αλλά και κυτταρικών συστατικών (Jaroszeski & Radcliff, 1999). Πλεονεκτεί των υπολοίπων τεχνικών ανίχνευσης που παραθέτουν μια συλλογή μαζικών μετρήσεων, διότι διαθέτει την ικανότητα επεξεργασίας χιλιάδων μεμονωμένων σωματιδίων σε λίγα δευτερόλεπτα. Κάθε κυτταρόμετρο μπορεί γενικά να περιγραφεί ως ένα μηχάνημα αποτελούμενο από 4 αλληλένδετα επιμέρους συστήματα. Το πρώτο σύστημα ονομάζεται σύστημα ροής (fluidics system) και είναι επιφορτισμένο με την μεταφορά των κυττάρων από το επιθυμητό δείγμα (εναιώρημα) διαμέσου ενός θαλάμου ροής προς την φωτεινή πηγή. Η μεταφορά γίνεται με τη βοήθεια του υγρού περιβλήματος (sheath fluid), ενός διαλύτη, κατά κύριο λόγο PBS, που κατευθύνεται με την πίεση του αέρα προς τον θάλαμο ροής παρασέρνοντας μαζί τα κύτταρα. Η πίεση που ασκεί το υγρό είναι τέτοια ώστε να εισέρχονται στο θάλαμο ροής μεμονωμένα σωματίδια κάθε φορά. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως υδροδυναμική εστίαση. Το δεύτερο σύστημα ονομάζεται οπτικό σύστημα (optics system) και περιλαμβάνει την εστιασμένη φωτεινή πηγή, που κατά κύριο λόγο είναι ένα λέιζερ ιόντων αργού, ρυθμισμένο να εκπέμπει φως σε μήκος κύματος 488 nm. Η εστίαση του λέιζερ σε μία δέσμη είναι αποτέλεσμα ενός συστήματος φακών και εξασφαλίζει την σταθερότητα της έντασης και τον συγκεκριμένο προσανατολισμό παραγωγής φωτός. Το οπτικό σύστημα επωμίζεται να κατευθύνει και να συλλέγει το φως και τον φθορισμό που προκύπτουν όταν η δέσμη του λέιζερ προσκρούσει σε ένα κύτταρο. Το φως που σκεδαζείται προς την κατεύθυνση ροής των κυττάρων μετά την πρόσκρουση ορίζεται ως σκεδαζόμενο φως εμπρόσθιας γωνίας (forward scatter channel, FSC). Η μέτρησή του δίνει μια εκτίμηση του μεγέθους ενός κυττάρου. Το φως που συλλέγεται υπό γωνία 90° προς τη δέσμη διέγερσης ονομάζεται πλευρικά σκεδαζόμενο φως (side scatter channel, SSC). Το SSC παρέχει πληροφορίες για την πολυπλοκότητα του κυττάρου (ύπαρξη εσωτερικών δομών ή κοκκιώδης εμφάνιση). Τα FSC και SSC συλλέγονται σε ανιχνευτές που ονομάζονται φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tube, PMT) και αποτελούν μοναδικό συνδυασμό για κάθε κύτταρο, βάση του οποίου διαφοροποιείται και από τα υπόλοιπα μέσα στο δείγμα. Η εξειδίκευση της ανίχνευσης ελέγχεται από οπτικά φίλτρα που αποκλείουν ορισμένα μήκη κύματος, επιτρέποντας την διάδοση συγκεκριμένων. Τρίτο στη σειρά βρίσκεται το ηλεκτρονικό σύστημα (electronics) που ερμηνεύουν τα σήματα των φθορισμών και τα μετατρέπει σε ψηφιακά δεδομένα και πληροφορίες που αποθηκεύονται στον υπολογιστή από το τέταρτο και τελευταίο σύστημα ανάλυσης δεδομένων (data analysis). Τα δεδομένα που αποθηκεύτηκαν επεξεργάζονται και αναλύονται περαιτέρω από ειδικά λογισμικά.



**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση των βασικών αρχών της κυτταρομετρίας ροής. Το δείγμα σημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική και εγχέεται σε ένα λεπτό ρεύμα υδροδυναμικά εστιασμένο από τη ροή του περιβάλλοντα υγρού. Ειδικές ακτίνες λέιζερ πέφτουν πάνω στα κύτταρα και ο φθορισμός που εκπέμπεται καθώς και το σκεδασμένο φως ανιχνεύονται από ειδικούς ανιχνευτές τοποθετημένους στην κατεύθυνση ροής και πλευρικά αυτής. Τα σήματα ενισχύονται από φωτοπολλαπλασιαστές και αναλύονται με κατάλληλα λογισμικά. (πηγή: Depince-Berger et al 2016; New tools in cytometry).

### 2.10.2| Πειραματική διαδικασία

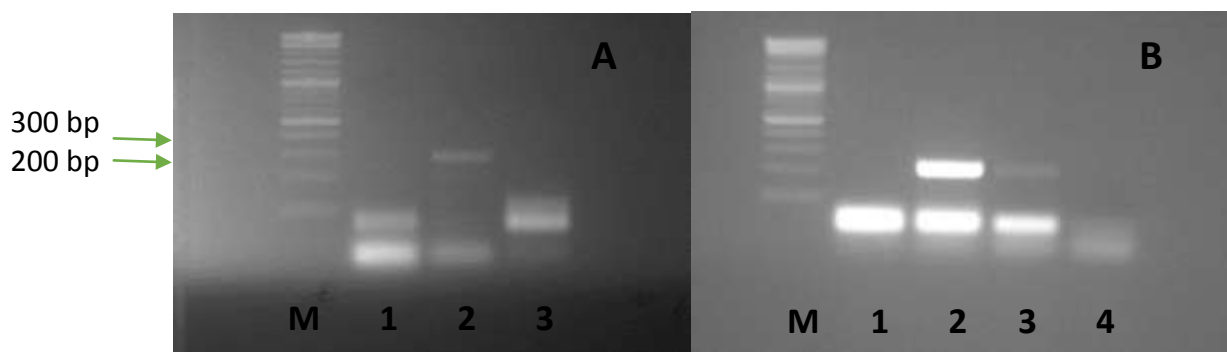
Για να είναι εφικτή η ανάλυση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου των επιπέδων ROS και GSH απαραίτητη είναι η χρώση των κυττάρων με διαλύματα εξειδικευμένων χρωστικών. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την παρούσα μέτρηση είναι η DCF και η Mercury Orange για την ανίχνευση των ROS και της GSH αντίστοιχα. Τα διαλύματα των χρωστικών παρασκευάζονται με την προσθήκη 1,94 mg αντιδραστηρίου DCF σε 10 ml μεθανόλης και εν αναλογία 1,93 mg Mercury Orange σε 10 ml ακετόνης. Εφόσον παρασκευαστούν τα διαλύματα χρωστικών, συλλέγονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  τα φιαλίδια falcon που περιέχουν τα κύτταρα και τοποθετούνται απευθείας στον πάγο. Σε κάθε falcon προστίθεται 300  $\mu\text{L}$  PBS και ακολουθεί ήπια μηχανική ανάδευση με χρήση πιπέτας ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί πλήρως το παγωμένο κυτταρικό ίζημα. Το περιεχόμενο κάθε falcon διαχωρίζεται, στη συνέχεια, σε δύο φιαλίδια κατάλληλα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής. Τα επιμέρους φιαλίδια περιέχουν 150  $\mu\text{L}$  κυτταρικού εναιωρήματος και χρησιμοποιούνται το ένα για την μέτρηση των ROS και το άλλο

για τη μέτρηση της GSH. Ακολουθεί η προσθήκη 15  $\mu\text{L}$  χρωστικής DCF στα φιαλίδια, που θα γίνει μέτρηση των ROS και 15  $\mu\text{L}$  χρωστικής Mercury Orange στα φιαλίδια, στα οποία θα μετρηθούν τα επίπεδα της GSH. Τα φιαλίδια ανακινούνται απαλά με το δάχτυλο προκειμένου να αναμιχθούν οι χρωστικές με τα κύτταρα και επωάζονται μετέπειτα στον κλίβανο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, προστίθεται σε κάθε φιαλίδιο 250  $\mu\text{L}$  PBS για να ακολουθήσει φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 300 rcf και σε θερμοκρασία  $5^{\circ}\text{C}$ , με σκοπό την έκπλυση περίσσειας χρωστικής που δεν έχει δεσμευτεί στα κύτταρα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με απλό αναποδογύρισμα των φιαλιδίων, προστίθεται εκ νέου 250  $\mu\text{L}$  PBS σε κάθε φιαλίδιο και μεταφέρονται, τέλος, μέσα σε πάγο στο κυτταρόμετρο της εταιρείας Becton-Dickinson.

### 3| Αποτελέσματα

#### 3.1| Αποτελέσματα ελέγχου μόλυνσης από μυκόπλασμα

Τα αποτελέσματα ελέγχου καθαρότητας των κυτταροκαλλιεργειών έγιναν ορατά μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 2% πηκτή αγαρόζης (agarose/EtBr gel) και εμφάνιση των ζωνώσεων αυτής με χρήση UV ακτινοβολίας (παράγραφος 2.5.1). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται και στην εικόνα 17. Η εικόνα (A) φανερώνει τα αποτελέσματα της PCR με εκκινητές ειδικούς για το μυκόπλασμα, ενώ αντίστοιχα η εικόνα (B) τα αποτελέσματα της PCR ίδιων συνθηκών για το ιδιοσύστατο γονίδιο της ακτίνης. Τα δείγματα 1,2,3 στην εικόνα (A) αποτελούν το υπό εξέταση δείγμα της καλλιέργειάς μας (1), ένα δείγμα ίδιας κυτταρικής καλλιέργειας θετικό ως προς το μυκόπλασμα (2), καθώς και το αρνητικό δείγμα ελέγχου που περιέχει απεσταγμένο νερό. Τα δείγματα αυτά βρίσκουν αναλογία στα 1,2 για το εξεταζόμενο δείγμα, 3 για το θετικό και 4 για το αρνητικό control που απεικονίζονται στην εικόνα (B). Το μυκόπλασμα γίνεται ορατό ως μία ζώνη με μοριακό βάρος 260 bp, ενώ η ακτίνη εμφανίζεται στα 224 bp και διασταυρώνονται με τη βοήθεια ενός μάρτυρα μοριακού βάρους (M) (2-log DNA ladder, New England Biolabs). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά παρατηρούμε πως το δείγμα του ενδιαφέροντος μας (1) στην εικόνα (A) δεν εμφανίζει τη ζώνη του μυκοπλάσματος σε αντίθεση με το θετικό control στο οποίο φαίνεται καθαρά. Η εμφάνιση διμερών εκκινητών στο κάτω μέρος της πηκτής φανερώνει ότι η αντίδρασή έχει δουλέψει, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του γονιδίου της ακτίνης. Με βάση την ακτίνη αποδεικνύεται και η αξιοπιστία της αντίδρασης ελέγχου μόλυνσης.

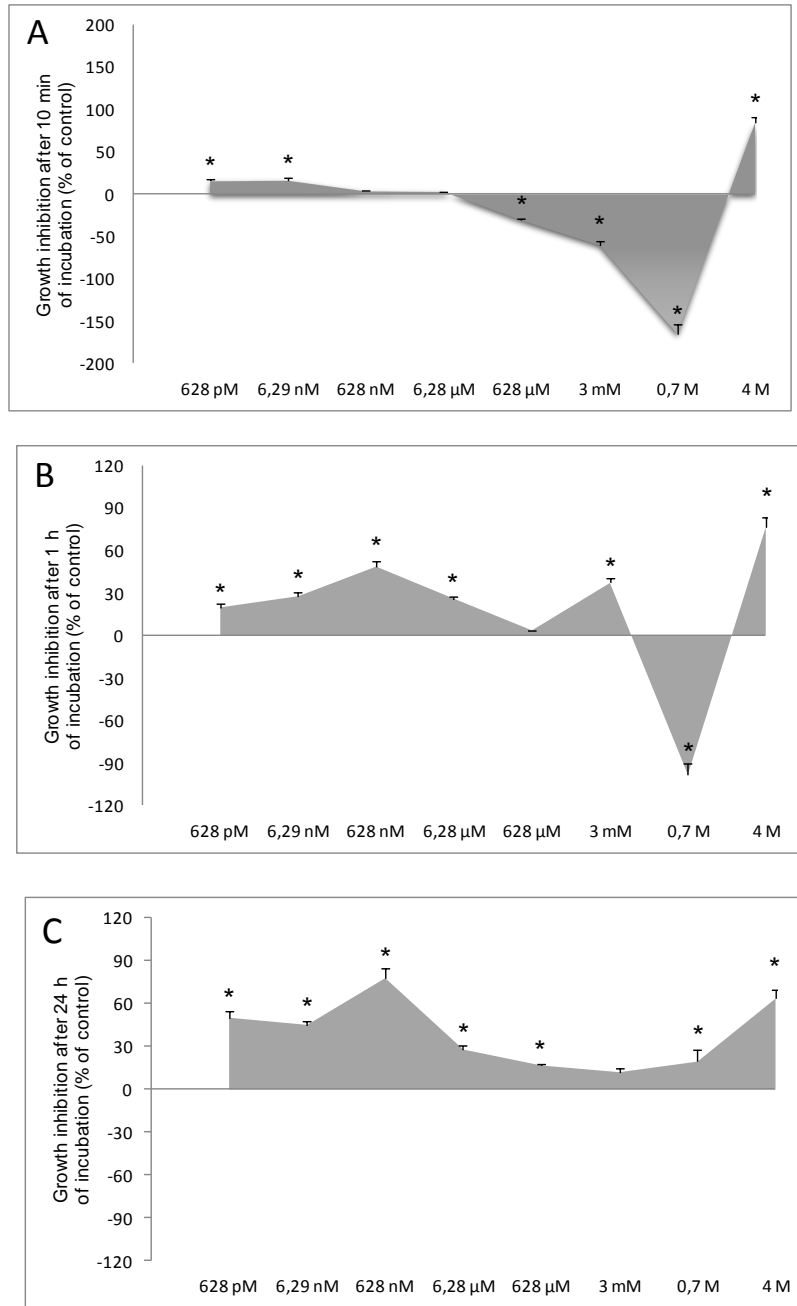


**Εικόνα 17:** Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον έλεγχο καθαρότητας των κυτταροκαλλιεργειών. (A) αποτελέσματα PCR για το μυκόπλασμα (B) αποτελέσματα PCR για το ιδιοσύστατο γονίδιο ακτίνης. M: μάρτυρας μοριακού βάρους 1: 1μl DNA απομονωμένο από τις εξεταζόμενες καλλιέργειες κυττάρων C2C12 ( 1,2 για εικόνα B), 2: 2μl DNA απομονωμένο από καλλιέργειες κυττάρων C2C12 θετικές για μόλυνση με μυκόπλασμα (θετικό δείγμα ελέγχου), 3: αρνητικό δείγμα ελέγχου (απεσταγμένο νερό).

### 3.2| Αποτελέσματα προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ

Προκειμένου να προσδιοριστεί και εν δυνάμει να ποσοτικοποιηθεί η βιωσιμότητα και η ανάπτυξη των κυττάρων μετά από επώαση με μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων  $\text{HClO}$  (628  $\mu\text{M}$  - 4 M), εφαρμόστηκε η χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ (παράγραφος 2.7). Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 18) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου που ακολούθησαν την 10 λεπτή (Α), 1 ώρας (Β) και την 24 ωρη επώαση των κυττάρων με τα διαλύματα  $\text{HClO}$ . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το ποσοστό % της κυτταρικής βιωσιμότητας που παρατηρείται στα επιμέρους κυτταρικά διαλύματα των θέσεων του τρυβλίου, σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία  $\text{HClO}$ ) (παράγραφος 2.7.3). Στην εικόνα (Α) παρατηρούμε πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $\text{HClO}$  μικρή είναι αντίστοιχα και η ανασταλτική του δράση. Καθώς, όμως, πλησιάζουμε σε συγκεντρώσεις κοντά στα 0,7 M βλέπουμε πως η δράση του οξέος σταδιακά "αντιστρέφεται" και από ανασταλτική πιθανώς να αποκτά κάποια διεγερτικά οφέλη για τα κύτταρα, αφού όχι μόνο σταματά η αναστολή της ανάπτυξής τους αλλά διαφαίνεται και μια διέγερσή στον πολλαπλασιασμό τους. Στη συνέχεια, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του  $\text{HClO}$  επανέρχεται σταδιακά και η ανασταλτική του δράση, η οποία κορυφώνεται σε συγκέντρωση 4 M. Στο ίδιο σχετικά μοτίβο κινούνται και τα αποτελέσματα της ωριαίας επώασης στην εικόνα (Β) όπου σε συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες των 3 mM και στα 4 M, το  $\text{HClO}$  αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη σε διαφορετικό βαθμό. Και σε αυτή την επώαση παρόλο αυτά παρατηρείται το φαινόμενο της απώλειας την ανασταλτικής δράσης και της διέγερσης της ανάπτυξης των κυττάρων που είναι μέγιστη στην ίδια πάλι συγκέντρωση 0,7 M. Στην 24 ωρη επώαση, εικόνα (Γ), φαίνεται εμφανώς ο ισχυρά ανασταλτικός χαρακτήρας του  $\text{HClO}$  ακόμη και στην περίπτωση των συγκεντρώσεων που στις δύο προηγούμενες επώσεις του προσέδωσαν διαφορετικό ρόλο.

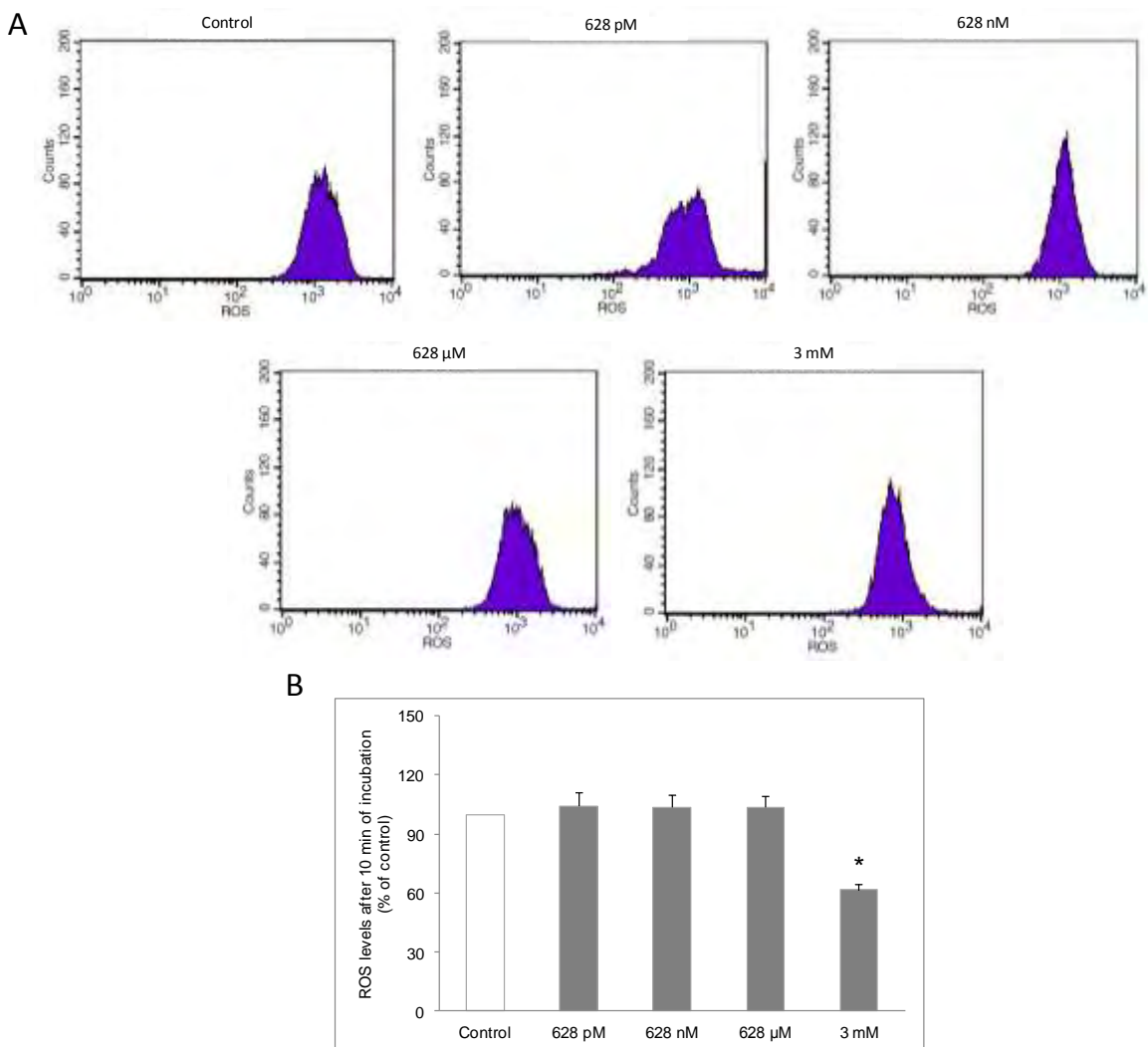




**Εικόνα 18:** Αναστολή ανάπτυξης μυϊκών κυττάρων C2C12 με χρήση HClO μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων (628 pM - 4 M) ύστερα από επώαση (A) 10 λεπτών, (B) 1 ώρας και (Γ) 24 ωρών, εκφραζόμενα ως % της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control).

### 3.3 | Αποτελέσματα προσδιορισμού γλουταθειόνης (GSH) και ελεύθερων ριζών (ROS) σε κύτταρα C2C12 με χρήση κυτταρομετρίας ροής

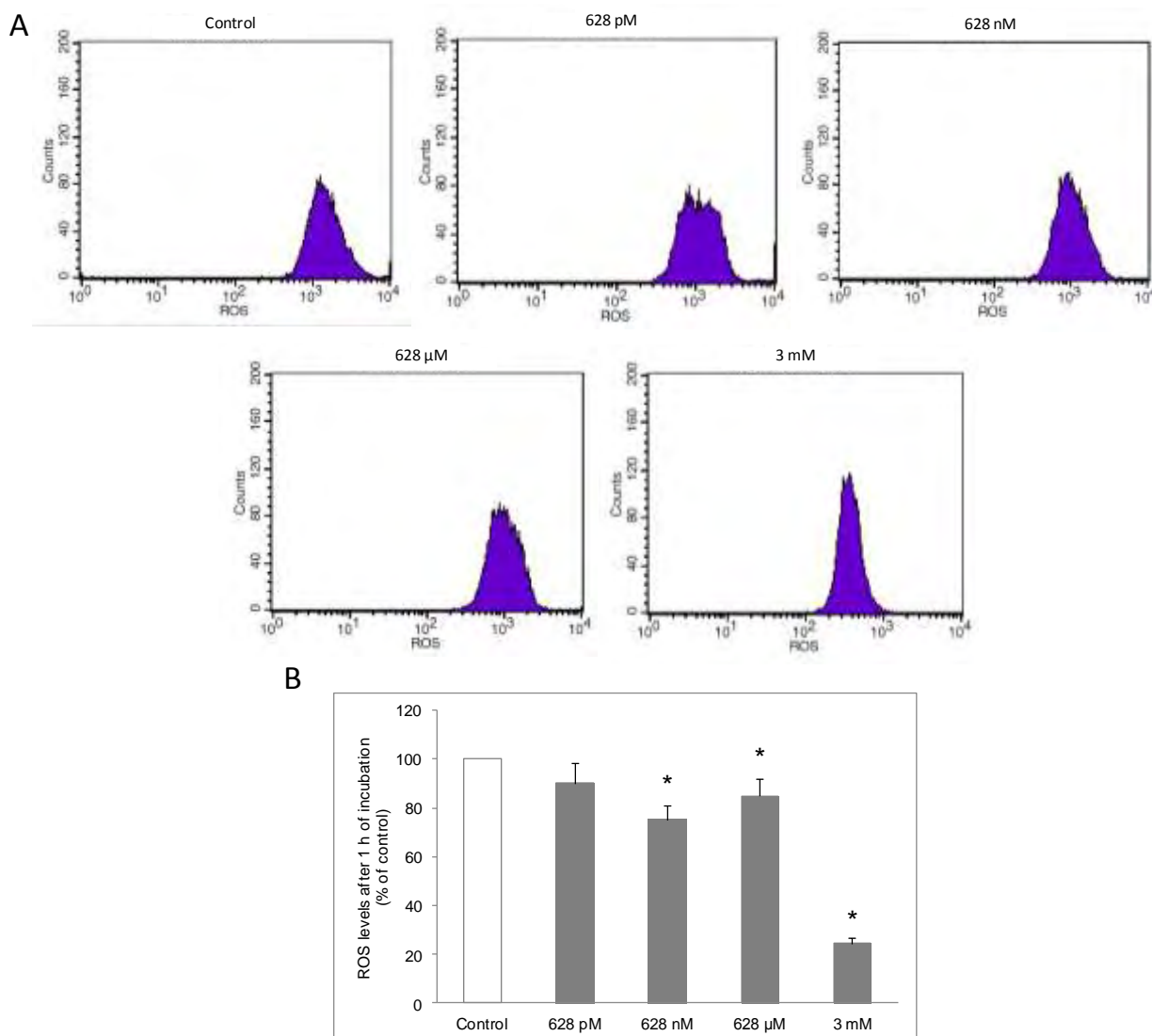
Τα αποτελέσματα μέτρησης με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS καθώς και GSH σε διαφορετικές χρονικές περιόδους επώασης των κυττάρων με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις HClO (628 pM, 628 nM, 628  $\mu$ M and 3 mM) (παράγραφος 2.9.2) απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες 19-23 με μορφή ιστογραμμάτων (A) καθώς και ραβδογραμμάτων (B). Στην δεκάλεπτη επώαση με διαλύματα HClO συγκεντρώσεων 628 pM-628 mM παρατηρείται μια αναμενόμενα ελάχιστη αύξηση στα επίπεδα των ROS σε σχέση με το control. Στατιστικά σημαντική, όμως, είναι η μείωση των επιπέδων αυτών στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.



**Εικόνα 19:** Η επίδραση της επώασης των C2C12 μυοβλαστών με HClO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (628 pM, 628 nM, 628  $\mu$ M and 3 mM) για 10 λεπτά στα επίπεδα ROS με χρήση κυτταρομετρίας ροής. (A) Ιστογράμματα αριθμού κυττάρων (γεγονότων) (10,000) έναντι φθορισμού. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα επίπεδα των ROS από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις HClO, εκφραζόμενα ως % των δειγμάτων ελέγχου (C2C12 κύτταρα

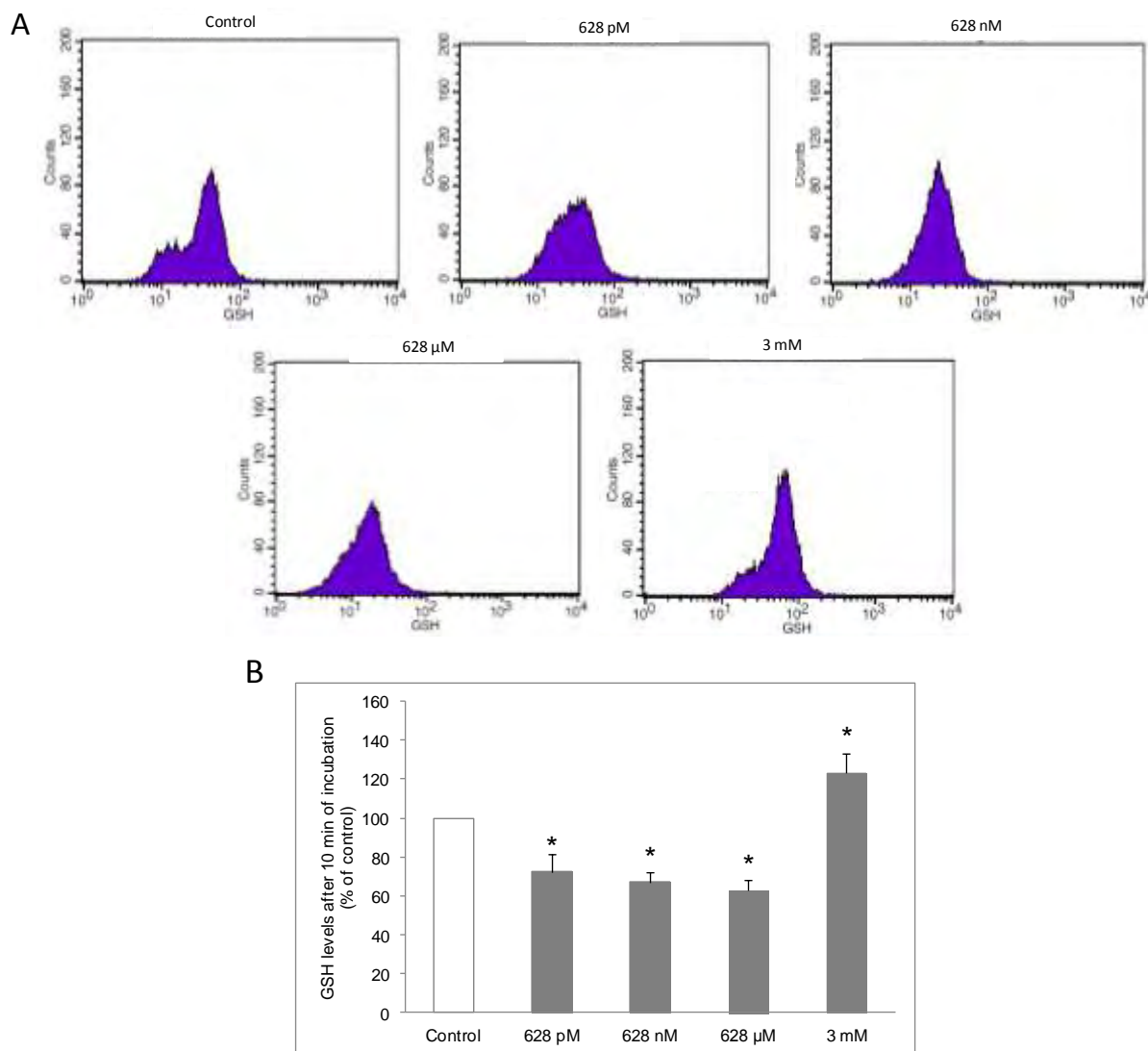
επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control).

Η μείωση αυτή μεγαλώνει περισσότερο σε μακρότερης διάρκειας επώαση (1 ώρα) των κυττάρων με την ίδια συγκέντρωση (3 mM), ενώ παρατηρείται και μία ενδιαφέρουσα μείωση των επιπέδων ROS σε συγκέντρωση HClO ίση με 628 nM που δεν φαίνεται να συμβαδίζει ανάλογα με την αύξηση συγκέντρωσης, καθώς φαίνεται πως στα 628  $\mu$ M η μείωση των επιπέδων ROS είναι μικρότερη.



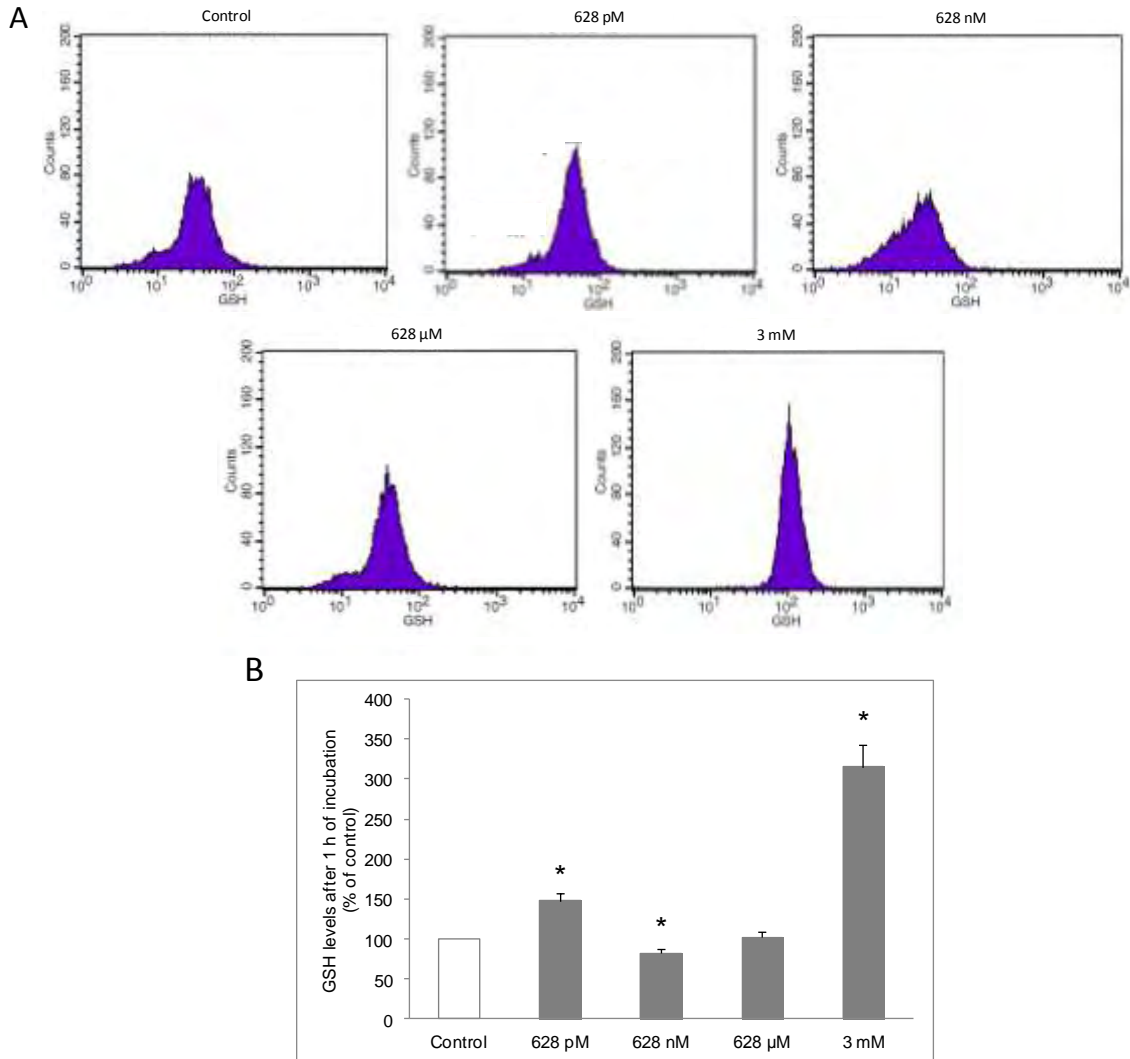
**Εικόνα 20:** Η επίδραση της επώασης των C2C12 μυοβλαστών με HClO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (628 pM, 628 nM, 628  $\mu$ M and 3 mM) για 1 ώρα στα επίπεδα ROS με χρήση κυτταρομετρίας ροής. (A) Ιστογράμματα αριθμού κυττάρων (γεγονότων) (10,000) έναντι φθορισμού. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα επίπεδα των ROS από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις HClO, εκφραζόμενα ως % των δειγμάτων ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control).

Τόσο από το ιστογράμμα όσο και από το ραβδόγραμμα διαφαίνεται πως σε μια επώαση δέκα λεπτών με συγκεντρώσεις HClO μέχρι 628  $\mu$ M, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλουταθειόνης στα C2C12 κύτταρα μειώνονται με μία σχέση αναλογική προς την αύξηση της συγκέντρωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές γίνονται σε σύγκριση με το control. Το ενδιαφέρον παρόλο αυτά ενέχεται στην συγκέντρωση HClO 3 mM όπου η γλουταθειόνη στα κύτταρα φαίνεται να αυξάνεται κατακόρυφα, ξεπερνώντας κατά πολύ τα επίπεδα του τριπεπτιδίου στις μετρήσεις του δείγματος ελέγχου (control).



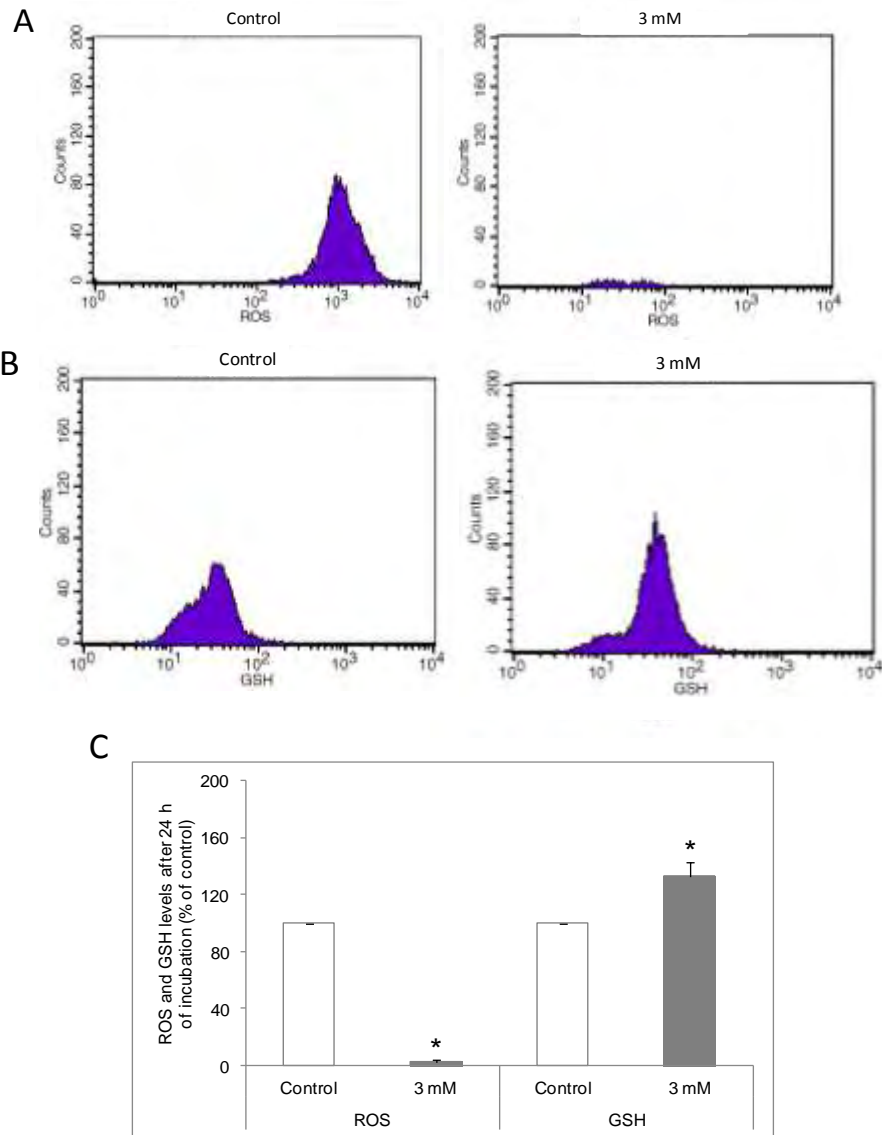
**Εικόνα 21:** Η επίδραση της επώασης των C2C12 μυοβλαστών με HClO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (628 pM, 628 nM, 628  $\mu$ M and 3 mM) για 10 λεπτά στα επίπεδα GSH με χρήση κυτταρομετρίας ροής. (A) Ιστογράμματα αριθμού κυττάρων (γεγονότων) (10,000) έναντι φθορισμού. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα επίπεδα των ROS από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις HClO, εκφραζόμενα ως % των δειγμάτων ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control).

Και στην περίπτωση της ωριαίας επώασης παρατηρείται σχεδόν τριπλάσια αύξηση της GSH στην υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με το control, μια παρατήρηση που φαίνεται να ισχύει σε μικρότερο ποσοστό και για την ελάχιστη συγκέντρωση HClO. Παράδοξη, επίσης, είναι η μείωση των επιπέδων του αντιοξειδωτικού στα 628 nM, ενώ στην αμέσως επόμενη συγκέντρωση (628 μM) δεν υπάρχει κάποια αισθητά σημαντική αλλαγή.



**Εικόνα 22:** Η επίδραση της επώασης των C2C12 μυοβλαστών με HClO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (628 pM, 628 nM, 628 μM and 3 mM) για 1 ώρα στα επίπεδα GSH με χρήση κυτταρομετρίας ροής. (A) Ιστογράμματα αριθμού κυττάρων (γεγονότων) (10,000) έναντι φθορισμού. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα επίπεδα των ROS από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις HClO, εκφραζόμενα ως % των δειγμάτων ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control).

Τέλος, η δράση της υψηλότερης συγκέντρωσης HClO, η οποία μας έδωσε και τα πιο ενδιαφέροντα μέχρι τώρα αποτελέσματα, εξετάστηκε στα κύτταρα μετά από επώαση 24 ωρών. Στα ακόλουθα διαγράμματα αναπαρίστανται τα αποτελέσματα του πειράματος από όπου εύκολα μπορεί να διαπιστώσει κανείς πως σε σχέση με το control τα επίπεδα των ROS είναι μηδαμινά, ενώ αντίθετα τα επίπεδα της GSH αρκετά ανεβασμένα.



**Εικόνα 23:** Η επίδραση της επώασης των C2C12 μυοβλαστών με HClO στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (628 pM, 628 nM, 628 μM and 3 mM) για 24 ώρες στα επίπεδα ROS και GSH με χρήση κυτταρομετρίας ροής. (A) Ιστογράμματα αριθμού κυττάρων (γεγονότων) (10,000) έναντι φθορισμού. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα επίπεδα των ROS από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις HClO, εκφραζόμενα ως % των δειγμάτων ελέγχου (C2C12 κύτταρα επωασμένα με PBS, δίχως την παρουσία HClO). \*: Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (control). GSH: ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης; PBS: ρυθμιστικό διάλυμα οργανοφωσφορικών αλάτων.

## 4 | Συμπεράσματα-Συζήτηση

Για τη μελέτη της επίδρασης του HClO στην ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς C2C12 σκελετικών μυών ποντικών, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους (10 λεπτά, 1 ώρα, 24 ώρες) με ένα εύρος συγκεντρώσεων (628 pM - 4 M), σε μία προσπάθεια να δημιουργήσουμε ένα *in vitro* που προσομοιάζει τη φλεγμονώδη απόκριση *in vivo*. Μετά από 10 min επώασης των κυττάρων με το HOCl πήραμε τα εξής αποτελέσματα. Φαίνεται ότι μετά από επώαση των κυττάρων με τις μικρότερες συγκεντρώσεις του HOCl, δηλαδή τις 628 pM και 6,29 nM προκαλείται μείωση της βιωσιμότητάς τους. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ελάττωση της ενδογενούς συγκέντρωσης της GSH ενώ οι ROS δεν επηρεάστηκαν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα αυτά διότι φαίνεται ότι η GSH ασκεί τη βιολογική της δράση σε αυτές τις συγκεντρώσεις μην επιτρέποντας την αύξηση των ROS, η οποία θα ήταν αναμενόμενη λόγω του κυτταρικού θανάτου που παρατηρήθηκε. Στις συγκεντρώσεις 628 μM και 3 mM παρατηρείται αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και άρα αύξηση του αριθμού των κυττάρων και, γενικώς, ενδιαφέροντα ευρήματα. Στην πρώτη συγκέντρωση ακολουθείται το παραπάνω πρότυπο ενώ μετά από επώαση με 3 mM του HOCl αυξάνεται πολύ η GSH και μειώνονται οι ROS, αποτέλεσμα ιδιαίτερα σημαντικό καθώς καταδεικνύεται ένας πιθανός ρόλος των δραστικών μορφών στην κυτταρική αναγέννηση λόγω του HOCl. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (7 M) που είναι και αυτή με τη μικρότερη βιολογική αξία παρατηρείται λογικά εκ νέου αύξηση του κυτταρικού θανάτου. Συνολικά, το HOCl παρουσιάζει δράση που ακολουθεί το φαινόμενο της όρμησης (hormesis), το οποίο παρατηρείται και στη βιολογική δράση των δραστικών μορφών. Συγκεκριμένα, ενώ οι μικρές και η υψηλότερη συγκέντρωση του HOCl αποδεικνύονται επιβλαβείς για τα κύτταρα, υπάρχουν κάποιες ενδιάμεσες, βέλτιστες συγκεντρώσεις οι οποίες έχουν θετική επίδραση στην αναγέννηση των κυττάρων και μάλιστα με μηχανισμό που πιθανότατα εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση.

Μετά από επώαση των κυττάρων με το HOCl για 1 h οι επιδράσεις στην κυτταρική βιωσιμότητα είναι πιο δριμυιές σε σχέση με τα 10 min καθώς μόνο στη συγκέντρωση των 0,7 M αυτή αυξάνεται. Στις υπόλοιπες μειώνεται σε μεγάλα ποσοστά. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στα 628 pM η γλουταθειόνη των κυττάρων αυξάνεται ενώ στα 628 nM μειώνεται με ταυτόχρονη πτώση των ROS γεγονός που σημαίνει πιθανότατα ότι ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση για να προστατεύσει τα κύτταρα από τις δυσμενείς επιδράσεις των ROS που παράγονται λόγω κυτταρικού θανάτου. Στη συγκέντρωση των 3 mM παρατηρήθηκε ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα με την επώαση των 10 min, δηλαδή η GSH αυξάνεται και οι ROS είναι ιδιαίτερα χαμηλές.

Μετά από 24 h επώασης η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις του HOCl, εκτός από τα 3 mM όπου δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε ώστε να

αξιολογηθεί το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων μέσω του υπολογισμού των πιθανών μεταβολών των GSH και ROS. Βρέθηκε ότι η GSH αυξάνεται και οι ROS μειώνονται, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και μετά από επώαση 10 min και 1 h.

Τα δεδομένα αυτά τονίζουν, επίσης, την ιδιαίτερη βιολογική σημασία της συγκέντρωσης HOCl στα 3 mM μετά από 10 min επώασης κυρίως καθώς, τουλάχιστον στο *in vitro* σύστημα προσομοίωσης της κυτταρικής αύξησης λόγω του HOCl που είναι ένας φλεγμονώδης παράγοντας φαίνεται ότι δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν με έναν εξαρτώμενο από τις δραστικές μορφές τρόπο. Ο σχετιζόμενος με το οξειδοαναγωγικό προφίλ των κυττάρων τρόπος δράσης του HOCl φαίνεται στην ίδια συγκέντρωση και μετά από επώαση 1 h, ωστόσο το χρονικό διάστημα αυτό είναι πολύ μεγάλο και η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται. Το αποτέλεσμα των 10 min παρατηρείται και μετά από 24 h επώασης χωρίς όμως αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων αλλά και χωρίς αυτά να θανατώνονται όπως συνέβη σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Το φαινόμενο της όρμησης, δηλαδή, παρατηρείται συνολικά στο πείραμα μετά από επώαση των κυττάρων με 3 mM HClO.

Συμπερασματικά, η εργασία αυτή είχε ως στόχο να δημιουργήσει ένα *in vitro* σύστημα για την προσομοίωση της φλεγμονώδους απόκρισης, η οποία εξαρτάται από το HClO, και να μελετήσει την πιθανή αναγεννητική δράση του μορίου αυτού στα μυϊκά κύτταρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια μίας φλεγμονώδους αντίδρασης παράγεται HClO *in vivo* σε συγκέντρωση 340 μM. Στο *in vitro* σύστημα που δημιουργήσαμε, όμως, η συγκέντρωση των 6,28 μM ήταν αυτή από την οποία η κυτταρική βιωσιμότητα άρχισε να έχει αυξητική τάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις ο ρόλος της γλουταθειόνης και των ROS, αν και φαίνεται ότι είναι σημαντικός, δεν είναι αποφασιστικός. Στη συγκέντρωση των 3 mM, όμως, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 10 min και μάλιστα με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από το οξειδοαναγωγικό προφίλ των κυττάρων και ακολουθώντας το φαινόμενο της όρμησης. Επομένως, από τα αποτελέσματά μας παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις HClO πολύ χαμηλότερες από αυτές που έχουν παρατηρηθεί *in vivo* σε ιστούς. Ωστόσο, οι δραστικές μορφές φαίνεται ότι έχουν πιο άμεση συμμετοχή όταν χορηγηθούν 3 mM HClO στα μυϊκά κύτταρα. Το μοντέλο που φτιάξαμε σε αυτό το πείραμα αποδεικνύεται ιδιαίτερα ευαίσθητο για την εκτίμηση της αναγεννητικής δράσης του HClO και σε επόμενο στάδιο θα μελετηθεί ο ρόλος του στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην ιδιότητα των μυϊκών κυττάρων δηλαδή να συντήκονται και να παράγουν μικροσωληνίσκους.



#### 4.1 | Μελλοντικοί στόχοι

Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν αναγκαία τη διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι υποθέσεις που θέλουν το HOCl ως σηματοδοτικό μόριο σε ελεγχόμενες κυτταρικές αποκρίσεις των μυϊκών κυττάρων, καθώς και να ταυτοποιηθούν τα μόρια που ευθύνονται για την τοξικότητα του. Τα μελλοντικά πειράματα προσανατολίζονται στη διερεύνηση της επίδρασης του HOCl στην διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων, με στόχο να προετοιμάσουν το έδαφος για την μελέτη πιθανής συμμετοχής του μορίου σε μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μυϊκή αποκατάσταση και αναγέννηση, που βρίσκουν εφαρμογή σε περίπτωση τραυματισμού ή ασθενειών του μυϊκού συστήματος, όπως η μυϊκή δυστροφία.

## 5 | Βιβλιογραφία

1. Adan et al., A. K. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 163-176.
2. Albrich et al., .. M. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 210-214.
3. Albrich, & Hurst. (1982). Oxidative inactivation of Escherichia coli by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. *FEBS Letters*, 157-161.
4. Ballatori et al., K. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 191-214.
5. Bauerová, & Bezek. (1999). Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *General Physiology and Biophysics*, 15-20.
6. Beckmann, & Ames. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 547-581.
7. Benzie. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 53-61.
8. Burattini et al., F. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development:. *European Journal of Histochemistry*, 223-234.
9. Cervantes Gracia et al., L.-C. (2017). CVD and Oxidative Stress. *Journal of Clinical Medicine*.
10. Cheeseman. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 481-493.
11. Davies. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 41-47.
12. Davies. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 805-825.
13. Deponde. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3217-3266.
14. Dizdaroglu, & Jaruga. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 382-419.
15. Drexler, & Uphoff. (2000). Contamination of cell culture, mycoplasma. *Encyclopedia of Cell Technology*, 609-627.
16. Drexler, & Uphoff. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 75-90.
17. Dröge. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 47-95.

18. Epstein, & Weiss. (1989). Tissue Destruction by Neutrophils. *The New England Journal of Medicine*, 365-376.
19. Eryilmaz, & Palabiyik. (2013). Hypochlorous Acid- Analytical Methods and Antimicrobial Activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 123-126.
20. Finkel. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 7-15.
21. Forman et al., Z. (2010). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 1-12.
22. Franco, & Cidlowski. (2012). Glutathione Efflux and Cell Death. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 1694-1713.
23. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. (2007). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44-84.
24. Frontera et al. (2014). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, 183-195.
25. Fukuzaki. (2006). Mechanism of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 147-157.
26. Grösch et al., F. K. (1998). Apurinic Endonuclease (Ref-1) Is Induced in Mammalian Cells by Oxidative Stress and Involved in Clastogenic Adaptation. *Cancer Research*, 4410-4416.
27. Güngör et al., K. H. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 149-154.
28. Halliwell. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 261-272.
29. Halliwell. (2007). Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochemical Society Transactions*, 1147-1150.
30. Halliwell, & Gutteridge. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Στο J. Abelson, *Methods in enzymology* (σ. 1). Academic Press.
31. Halliwell, & Whiteman. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 231-255.
32. Hammerschmidt et al, .. W. (2002). Tissue Lipid Peroxidation and Reduced Glutathione Depletion in Hypochlorite-Induced Lung Injury. *CHEST Journal*, 573-581.
33. Harwood et al., K. . (2006). Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method. *Biochemical Journal*, 161-168.
34. Hasegawa et al., M. (2005). Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic

- preconditioning. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, G760-G767.
35. Hawkins et al., P. (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 259-274.
  36. Huh et al., K. ,. (2006). Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death & Diffenetiatiion*, 1138-1146.
  37. Invivogen. (2016, August). Ανάκτηση από Invivogen: <https://www.invivogen.com/review-mycoplasma>
  38. Irshad, & Chaudhuri. (2002). Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1233-1239.
  39. Jaroszeski, & Radcliff. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*, 37-53.
  40. Kannan, & Jain. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 153-163.
  41. Kaushal, & Ratan. (2015). Stress, Oxidative Injury and Disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 3-10.
  42. Krinsky. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 248-254.
  43. Kumar et al., S. (2012). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1-12.
  44. Lobo et al, P. P. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*.
  45. Lushchak. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemo-Biological Interactions*, 164-175.
  46. Makris. (2010). Nitric oxide stimulates interleukin-6 production in skeletal myotube. *Journal og interferone & cytokine research*.
  47. Mari et al., M.-R.-C. (2009). Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidant & Redox Signaling*, 2685-2700.
  48. Marie et al., M.-R.-C. (2013). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3317-3328.
  49. Marshall et al., G. (1999). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Plant Growth Regulation*, 69-84.
  50. McKenna & Davies. (1988). The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid: Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochemical Journal*, 685-692.
  51. Moris. (1966). The acid ionization constant of HClO from 5 to 35°. *The Journal of Physical Chemistry*, 3798-3805.

52. Nedachi et al., F. (2008). Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, E1191-E1204.
53. Neeraj et al., P. (2013). ANTIOXIDANTS TO THE RESCUE OF CELL UNDER INVASION OF FREE RADICALS-A REVIEW. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 190-200.
54. Ono et al., .. Y. (2012). Microbicidal effect of weak acid hypochlorous solution on various microorganisms. *Biocontrol Science*, 129-133.
55. Oroian, & Escriche. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 10-36.
56. Pacifici, & Davies. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 166-180.
57. Pattinson, & Davies. (2011). Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chemical Research in Toxicology*, 1453-1464.
58. Pizzorno. (2014). Glutathione! *Integrative Medicine: A Clinician's Journal* , 8-12.
59. Prütz. (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 110-120.
60. Prütz. (1998). Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183-191.
61. Pryor. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annual Review of Physiology*.
62. Pullar et al., W. (1999). Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, H1505-H1512.
63. Ribas et al., G.-R.-C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*.
64. Robson et al., P. K. (2007). Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part II. Stabilized Hypochlorous Acid:Its Role in Decreasing Tissue Bacterial Bioburden and Overcoming the Inhibition of Infection on Wound Healing. *Journal of Wounds and Burns*.
65. Schiller et al., A. . (1996). NMR studies on human, pathologically changed synovial fluids: role of hypochlorous acid. *Magnetic Resonance in Medicine*, 848-853.
66. Schoonbroodt et al., L.-P. B.-B. (1997). Activation of the NF-kB transcriptional factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, 777-785.
67. Schraufstätter et al., B. H. (1990). Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 554-562.

68. Scudiero et al., S. . (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 4827-4833.
69. Severing et al., R. (2018). Safety and efficacy profiles of different commercial sodium hypochlorite/hypochlorous acid solutions (NaClO/HClO): antimicrobial efficacy, cytotoxic impact and physicochemical parameters in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 365-372.
70. Shelly. (2013). GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3142-3153.
71. Sherwood, L. (2010). *Introduction to Human Physiology*. Brooks/Cole.
72. Sies. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 291-295.
73. Sies. (2017). Oxidative Stress. *Annual Reviews of Biochemistry*, 715-748.
74. Spickett et al., J. t. (2000). The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochimica Polonica*, 889-899.
75. Taharaguchi et al, .. T.-N. (2014). Effect of weak acid hypochlorous solution on selected viruses and bacteria of laboratory rodents. *Experimental Animals*, 141-147.
76. Thannickal, & Fanburg. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, L1005–L1028.
77. Thomas. (2017). The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters*, 88-96.
78. Valko et al, .. R. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemo-Biological Interactions*, 1-40.
79. Valko et al., L. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 44-84.
80. van Kuppeveld et al., J. G. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 149–152.
81. Veen et al., W. H. (2009). Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Actions and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2899–2937.
82. Veliça, & Bunce. (2011). A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Nerve*, 366-370.
83. Vile et al., R. K. (1998). Hypochlorous Acid Activates the Tumor Suppressor Protein p53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 51-56.

84. Vile et al., R. K. (2000). Initiation of Rapid P53-Dependent Growth Arrest in Cultured Human Skin Fibroblasts by Reactive Chlorine Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122-128.
85. Vissers et al., .. D. (1994). Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medical*, 703-712.
86. Vissers et al., C. (1998). Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. *Biochemical Journal*, 131-138.
87. Vissers et al., P. H. (1999). Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth. *Biochemical Journal*, 443-449.
88. Vissers, & Winterbourn. (1995). Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, 57-62.
89. Volodymyr. (2014). Classification of oxidative stress based on its intensity. *Experimental and Clinical Science Journal*, 922-937.
90. Wang et al., B. (2007). Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part I. Stabilized Hypochlorous Acid: A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity. *Journal of Burns and Wounds*.
91. Wiese et al., P. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 231-240.
92. Winterbourn et al., v. d. (1992). Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 547-555.
93. Winterbourn, & Brennan. (1997). Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochemical Journal*, 87-92.
94. Wu et al., F. . (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 489-492.
95. Yaffe, & Saxel. (1997). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*, 159-166.
96. Yaffe, & Saxel. (1997). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 725-727.
97. Yin et al., X. P. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 5944-5972.
98. Yuan et al., W. (2009). Hypochlorous acid converts the gamma-glutamyl group of glutathione disulfide to 5-hydroxybutyrolactam, a potential marker for neutrophil activation. *Journal of Biological Chemistry*, 26908-26917.