

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη της κυτταρικής γήρανσης στον Μεσοσπονδύλιο Δίσκο»**



**ΒΕΡΟΥΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2020**

## **«Μελέτη προσδιορισμού της κυτταρικής γήρανσης στον Μεσοσπονδύλιο Δίσκο»**

### **Τριμελής επιτροπή**

- Κλέτσας Δημήτριος, Ερευνητής Α, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»
- Ευαγγέλου Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή - Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας – Διευθυντής Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή - Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **“Ευχαριστίες”**

Η παρούσα πτυχιακή με τίτλο “ Μελέτη προσδιορισμού της κυτταρικής γήρανσης στον Μεσοσπονδύλιο Δίσκο ” εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020 στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού πρόγραμματος «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία». Θα ήθελα να ευχαριστήσω, αρχικά, την διδάκτορα της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ Κα. Σοφία Ρίζου για την εκπαίδευση μου, τη συνεχή υποστήριξη και την βοήθεια όπου μου παρείχε πρόθυμα κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Ακόμα, τον διδάκτορα της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ κ. Αναστάσιο Κουρουμάλη για την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση καθ’οή τη διάρκεια του πειραματικού και συγγραφικού μέρους της πτυχιακής εργασία καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην τριμελή επιτροπή της παρούσας εργασίας ξεκινώντας από τον Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» κ. Δημήτριο Κλέτσα για την εμπιστοσύνη την οποία μου έδειξε για την εκπόνηση του συγκεκριμένου ερευνητικού θέματος. Αναπόσπαστο κομμάτι για την ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας αποτελεί ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Κωνσταντίνος Ευαγγέλου όπου με τις πολύτιμες συμβουλές του και τις καίριες παρεμβάσεις του συνέβαλε στην ολοκλήρωση της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω των καθηγητή κ. Κουτσιλιέρη Μιχαήλ για την συνεχή υποστήριξη του κατά τα δύο χρόνια όπου διήρκησε το μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Επιθυμώ να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον καθηγητή κ. Γοργούλη Βασίλειο για την διετή υποστήριξη και καθοδήγηση κατά την παραμονή μου στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας. Τέλος, θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πλήρη στήριξη και υπομονή τους κατά την διάρκεια σπουδών μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία».

## Περίληψη

Η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου συνιστά μια από τις σημαντικότερες αιτίες εμφάνισης οσφυαλγίας η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια και επίμονο πόνο. Βασικό παράγοντα στην πρόοδο της εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου συνιστά η κυτταρική γήρανση η οποία χαρακτηρίζεται γενικά από την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η κυτταρική γήρανση αποτελεί ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε φυσιολογικές διαδικασίες αλλά και πολλές παθολογικές καταστάσεις. Πολλά στρεσογόνα ερεθίσματα έχουν αποδειχθεί ικανά να επάγουν γήρανση στα κύτταρα του δίσκου, μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται το οξειδωτικό, το γενοτοξικό, το διατροφικό αλλά και το μηχανικό στρες. Δεδομένης της ανάγκης να θεραπευτούν οι παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από την εκφύλιση του δίσκου κρίνεται αναγκαίως ο ποσοτικός προσδιορισμός των γηρασμένων κυττάρων στον ιστό του δίσκου. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ανεξήγητα υψηλά ποσοστά γήρανσης χρησιμοποιώντας κυρίως τη χρώση SA-β-Gal (>40%). Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν τα ποσοστά γήρανσης σε ιστούς μεσοσπονδύλιων δίσκων νεαρών και γηρασμένων αρουραίων, σε βιοπτικά ιστοτεμάχια παθολογικών και φυσιολογικών ανθρώπινων δίσκων καθώς επίσης και σε πρωτογενείς σειρές νεαρών και γηρασμένων κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η κυτταρική γήρανση προσδιορίστηκε με βάση τη χρώση SA-β-Gal και την προσφάτως ανεπτυγμένη χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13. Τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μεθόδων παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με το αντιδραστήριο GL13 να αποδίδει με μεγαλύτερη ειδικότητα μικρότερα ποσοστά γήρανσης συγκριτικά με τη χρώση SA-β-Gal τόσο σε επίπεδο ιστού αλλά και στα πρωτογενή κυτταρικά συστήματα. Επίσης, η χρώση με GL13 απέδωσε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό γηρασμένων κυττάρων στον ινώδη δακτύλιο, συγκριτικά με τον πηκτοειδή πυρήνα τόσο των γηρασμένων ιστών αλλά και των παθολογικών ιστοτεμαχίων. Ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων ανέπτυξαν τα χαρακτηριστικά χρώματα και των δύο χρώσεων μόλαταυτα ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων σημάνθηκε μόνο για μια εκ των δύο χρώσεων. Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη αναθώρησε τα ανεξήγητα υψηλά ποσοστά γήρανσης στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου με τη χρήση της χρώσης GL13 αναδεικνύοντας συνολικά μειωμένα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης στο σύνολο του μεσοσπονδύλιου δίσκου αλλά με μεγαλύτερο ποσοστό γήρανσης στο τμήμα του ινώδους δακτυλίου.

## ABSTRACT

Intravertebral disk degeneration, causing discogenic back pain, constitutes a major underlying cause of degenerative chronic low back pain. A newly recognised contributing factor responsible for its degenerative course is cellular senescence, a cellular state of generally irreversible cell cycle arrest. Although the latter is only one of its four (4) hallmarks, it is well known that cellular senescence is implicated in both physiologic and pathologic conditions including cancer and other age-related diseases. With regards to disc degeneration specifically, a group of stressors can induce senescence in disk's cells including but not limited to oxidative, genotoxic, nutrient-related, and mechanical stress. Given the debilitating nature accompanying disc degeneration, appropriate medical treatment can only be guided by a better disease understanding through quantifying the senescence cell population within the disk. To this end, many studies have sought to determine these cell populations by immunohistochemistry using SA-b-Gal staining, an insensitive nor specific biomarker of cellular senescence leading to inaccurate and unexpectedly high levels thereof (>40%). In this study, cellular senescence levels were quantified in both tissue and cellular systems; bioptic tissue specimens of normal and degenerative intravertebral disks acquired from young and aged rats and humans were tested along with young and aged primary disk cell lines. Cellular Senescence was detected using SA- $\beta$ -Gal stain in combination with GL13, a newly developed and highly specific compound for senescence tracing, which was done for comparison purposes. Results demonstrated significant inter-compound variability in terms of senescent cell tracing in both cells and tissues, with GL13 detecting lower percentages of senescent cells with higher specificity to SA- $\beta$ -Gal. In addition, GL13 revealed higher percentages of senescent cells localised in the annulus fibrosus compared to nucleus pulposus in both aged and degenerative tissue samples. Co-staining was observed in a large proportion of cells, some of which were only single-stained. To sum up, this current study has redefined the percentage and the location of intravertebral disk cellular senescence to a lower absolute value than previously thought (by using GL13) and within the annulus fibrosus, respectively.

## **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

NP: Πηκτοειδής Πυρήνας

AF: Ινώδης Δακτύλιος

Sen.NP: Γηρασμένα κύτταρα/ ιστός πηκτοειδούς πυρήνα

Sen.AF: Γηρασμένα κύτταρα/ ιστός ινώδους δακτυλίου

Young NP: Νεαρά κύτταρα/ ιστός πηκτοειδούς πυρήνα

Young AF: Νεαρά κύτταρα/ ιστός ινώδους δακτυλίου

DNA damage: Βλάβες στο DNA

SASP: Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με την κυτταρική γήραση

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.	Οσφυαλγία .....	Σελ.8
1.2.	Μεσοσπονδύλιος δίσκος .....	Σελ.9
1.2.1	Δομή και φυσιολογία μεσοσπονδύλιου δίσκου .....	Σελ.9
1.2.2	Οντογένεση και μοριακή βιολογία μεσοσπονδύλιου δίσκου .....	Σελ.11
1.3	Κυτταρική γήρανση .....	Σελ.13
1.3.1	Είδη κυτταρικής γήρανσης.....	Σελ.13
1.3.2	Χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης .....	Σελ.16
1.3.2.1	Διακοπή κυτταρικού κύκλου .....	Σελ.16
1.3.2.2	Έκκρινόμενος φαινότυπος σχετιζόμενος με την γήρανσης (SASP) .....	Σελ.17
1.3.2.3	Βλάβη μακρομορίων .....	Σελ.18
1.3.2.4	Λιποφουσκίνη .....	Σελ.19
1.4	Μέθοδοι ανίχνευσης της κυτταρικής γήρανσης .....	Σελ.21
1.4.1	Χρώση για σχετιζόμενη με γήρανση β-γαλακτοσιδάση (SA- β- Gal).....	Σελ.21
1.4.2	Sudan Black B .....	Σελ.22
1.4.3	Προσδιορισμός αναστολέων κυτταρικού κύκλου .....	Σελ.23
1.4.4	Χρώση με GL13 .....	Σελ.24
1.5	Μηχανισμοί επαγωγής γήρανσης στον μεσοσπονδύλιο δίσκο .....	Σελ.25
1.5.1	Οξειδωτικό στρες .....	Σελ.26
1.5.2	Γενοτοξικό στρες .....	Σελ.27
1.5.3	Φλεγμονώδες στρες.....	Σελ.27
1.5.4	Μηχανικό στρες .....	Σελ.28
1.5.5	Διατροφικό στρες .....	Σελ.28

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Κυτταρικές σειρές .....	Σελ.30
2.2	Δείγματα ιστών .....	Σελ.30
2.3	Επαγωγή γήρανσης σε κυτταρικές σειρές .....	Σελ.31
2.4	Παρασκευή αντιδραστήριου GL13 .....	Σελ.31
2.5	Ανοσοϊστοχημική χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 .....	Σελ.31
2.6	Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης (Brd Uincorporation assay) .....	Σελ.34
2.7	Χρώση με SA- β- Gal .....	Σελ.36
2.8	Αντισώματα .....	Σελ.36
2.9	Στατιστική ανάλυση .....	Σελ.36

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- 3.1 Προσδιορισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιαστικού δυναμικού με την μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU incorporation assay)..... Σελ.37
- 3.2 Προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε ιστό και σε πρωτογενείς σειρές του μεσοσποδνύλιου δίσκου αρουραίου ..... Σελ.39
- 3.3 Προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε ιστό και σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές του μεσοσποδνύλιου δίσκου ανθρώπου..... Σελ.44

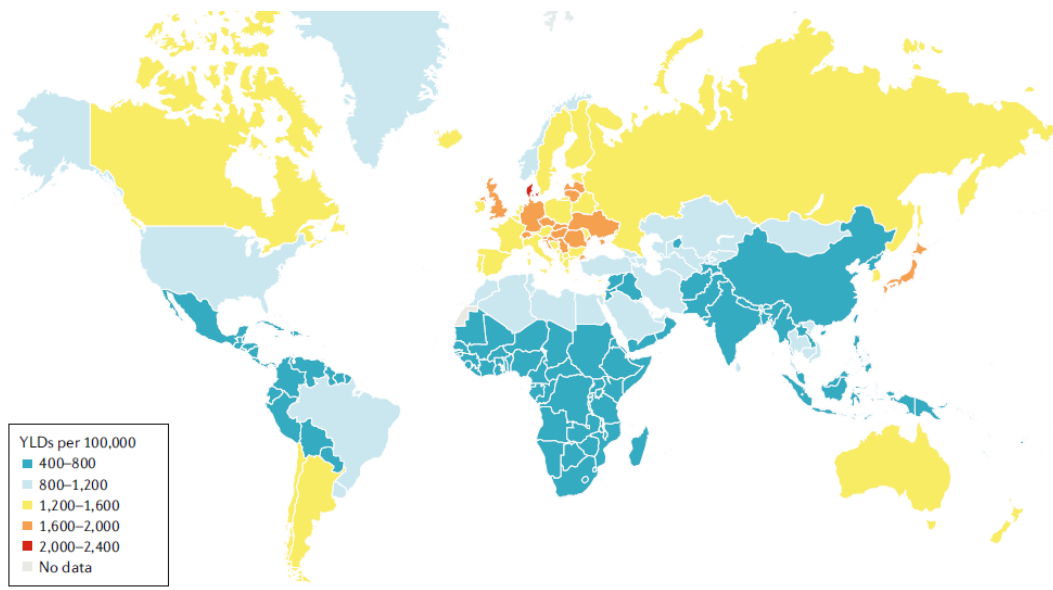
### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... Σελ.49**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... Σελ.53**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Οσφυαλγία

Ο χρόνιος πόνος αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες πηγές ταλαιπωρίας της ανθρώπινης υγείας στην σύγχρονη κοινωνία. Ως οσφυαλγία καλείται συνήθως ο πόνος, η μυϊκή ένταση ή δυσκαμψία που εντοπίζεται κάτω από το πλευρικό τόξο και πάνω από τις κατώτερες πτυχές των γλουτών, συνοδευόμενο συνήθως από ισχιαλγία (πόνος προκαλούμενος από βλάβη στο ισχιακό νεύρο που εκτείνεται από χαμηλά στην πλάτη, στο ισχίο, τους γλουτούς και το κάτω μέρος του ποδιού) (Vlaeyen, J. et., al 2018). Σχεδόν κάθε άνθρωπος παρουσιάζει ένα σύντομο και οξύ επεισόδιο οσφυαλγίας στη ζωή του. Οι πλειοψηφία αυτών αναρρώνει εντός ενός έτους και λίγοι θα αναπτύξουν χρόνια πρόβλημα το οποίο χαρακτηρίζεται από περιοδικούς και επίμονους πόνους είτε χαμηλής, είτε υψηλής έντασης οι οποίοι διακόπτονται από μεγάλες χρονικές περιόδους απουσίας του πόνου (Kongsted, A. et., al 2016).



**Εικόνα 1.** Αριθμός ατόμων που ζούν χρονίως με οσφυαλγία. Η οσφυαλγία συνιστά μια βασική αιτία που οδηγεί στη δια βίου αναπηρία (Years Lived with Disability, YLDs) σε περιοχές υψηλού, μεσαίου και μικρομεσαίου εισοδήματος (Vlaeyen, J. et., al 2018).

Μια εκ των πιο πρόσφατων μελετών κατατάσσει την οσφυαλγία ως πρώτη από τις ηλικιοεξαρτώμενες παθολογίες παγκοσμίως αναδεικνύοντας την σε ένα μείζον πρόβλημα με μεγάλες τόσο κοινωνικο-οικονομικές συνέπειες όσο και κλινικές συντελώντας στην προοδευτική υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των ασθενών (Vos T. et., al 2012; Vlaeyen, J. et., al 2018).). Στην Αυστραλία το συνολικό κόστος για την αντιμετώπιση της οσφυαλγίας υπολογίστηκε στα 9 δισεκατομμύρια αυστραλιανά



δολάρια το 2001 και μόνο το 11% αυτών αφορούσε την ιατροφαρμακευτική δαπάνη (Walker B F. et., al 2003; Maetzel A. et., al 2001). Επίσης παρόμοια οικονομικά δεδομένα παρατηρούνται σε χώρες όπως η Ολλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο για την αντιμετώπιση του φαινομένου (Dagenais, S. et., al 2007; Maniadaakis, N. et., al 2000; van Tulder, M. W. et., al 1995). Στον γενικό ελληνικό πληθυσμό τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η οσφυαλγία συνιστά ένα σύνηθες σύμπτωμα με τη συχνότητα εμφάνισης της και δριμύτητα της να εξαρτώνται από κοινωνικό-δημογραφικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η ηλικία, το φύλο και το είδος της εργασίας (Stranjalis, G. et., al 2004).

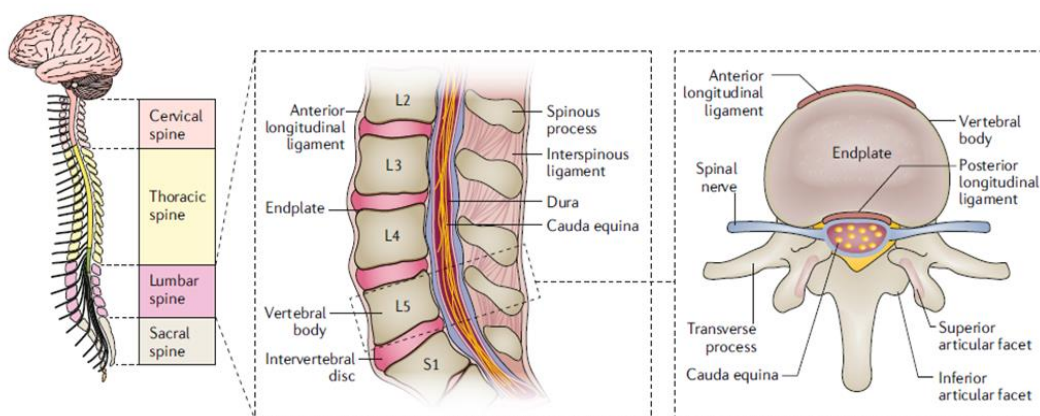
Η παθολογία της οσφυαλγίας αποτελεί μέχρι σήμερα ένα πεδίο έρευνας για πολλά ερευνητικά εργαστήρια παγκοσμίως καθώς στις περισσότερες των περιπτώσεων, συμπεριλαμβανομένων ατόμων που αναζητούν ιατρική περίθαλψη για οξύ ή επαναλαμβανόμενο πονο, παραμένει άγνωστη. Καθώς ο πόνος στη πλάτη συνιστά ένα σύμπτωμα, η αιτιολογία του μπορεί να επηρεάζεται από μια πλειάδα τοπικών ή συστημικών συμπτωμάτων όπως δομικές αλλοιώσεις του μυοσκελετικού ιστού, τη φλεγμονή, τις ανοσολογικές απαντήσεις, τη γενετική προδιάθεση, την υπερβολική στατική ή δυναμική επιβάρυνση καθώς και τη συναισθηματική διάθεση του ατόμου (Battié, M. C. et., al 2014; Battié MC et., al 2009). Εξέχοντα ρόλο στις αιτίες της οσφυαλγίας διαδραματίζει η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Luoma, K. et., al 2000). Δεδομένα από μελέτη βασιζόμενη σε μαγνητική τομογραφία υποδεικνύουν ότι ένα άτομο με τουλάχιστον ένα εκφυλισμένο μεσοσπονδύλιο δίσκο έχει 1,5 φορές πιθανότητα να παρουσιάσει οσφυαλγία σε σχέση με ένα άτομο με φυσιολογικούς δίσκους. Απαιτείται να σημειωθεί ότι, η παραπάνω πιθανότητα αυξάνεται στις περιπτώσεις όπου ο ασθενής φέρει παραπάνω του ενός εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων μπορεί να διαφέρει ως προς τα συμπτώματα καθώς μπορεί να είναι ασυμπτωματική, να παρουσιάσει ήπια συμπτώματα έως και ακραίες καταστάσεις (εξωκλήη). Αποτέλεσμα της εμφάνισης συμπτωμάτων είναι η διαταραχή της φυσιολογίας της σπονδυλικής στήλης. Η εκφύλιση των δίσκων φαίνεται να συντελεί στη στένωση των σπονδυλικών σωμάτων μακροπρόθεσμα σύμφωνα με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης τους σε ασθενείς με αναπηρία ή ηλικιωμένους (Urban, J. P. et., al 2003).

## **1.2. Μεσοσπονδύλιος δίσκος**

### **1.2.1. Δομή και φυσιολογία μεσοσπονδύλιου δίσκου**

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι (IVD) αποτελούν τις κυτταρικές δομές όπου εντοπίζονται μεταξύ των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης. Παρέχουν ευελιξία στην σπονδυλική στήλη επιτρέποντας την περιστροφική κίνηση, την καθοδική κίνηση και διανέμουν συμπιεστική φόρτωση στα γειτονικά σπονδυλικά σώματα (Newell N. et., al 2017). Η ανθρώπινη σπονδυλική στήλη αποτελείται από 12

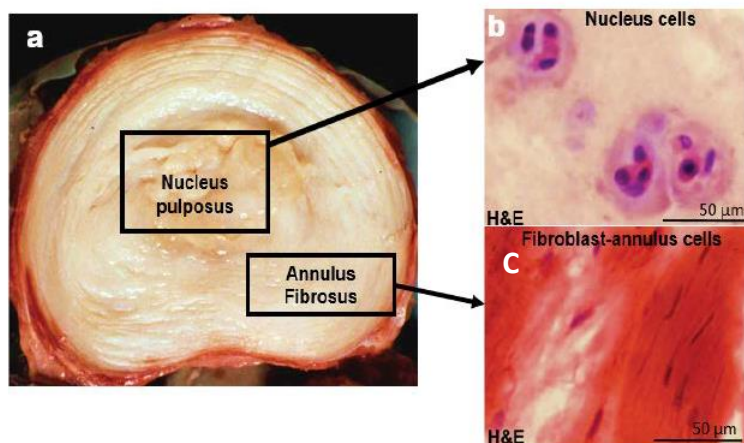
θωρακικούς, 7 τραχηλικούς, 5 οσφυϊκούς, 5 συντηγμένους ιερούς και 3-5 συντηγμένους κοκκυγικούς σπονδύλους. Το 20-30% του μήκους της σπονδυλικής στήλης του ανθρώπου καλύπτεται από συνολικά 23 μεσοσπονδύλιους δίσκους (Εικόνα 2). Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι είναι σύνθετες δομές αποτελούμενοι από δύο κύρια διακριτά μέρη. Το ένα τμήμα αποτελείται από ένα παχύ εξωτερικό δακτύλιο ινώδους χόνδρου και καλείται ινώδης δακτύλιος (Annulus Fibrosus, AF). Το δεύτερο διακριτό τμήμα εντοπίζεται στο εσωτερικό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και περιλαμβάνει μια μαλακή, πλούσια σε νερό δομή τον πηκτοειδή πυρήνα (Nucleus Pulposus, NP) (Raj P. P. 2008). Οι ανθρώπινοι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι αναπτύσσονται κατά την διαδικασία της εμβρυογένεσης. Συγκεκριμένα, ο ινώδης δακτύλιος προέρχεται από το μεσέγγυμα ενώ ο πηκτοειδής πυρήνας από τα κύτταρα της νωτιαίας χορδής (WALMSLEY R. 1953). Μια ακόμη διακριτή μορφολογική δομή που εντοπίζεται πάνω και κάτω από τον μεσοσπονδύλιο δίσκο είναι οι τελικές χόνδρινες πλάκες. Οι τελευταίες αποτελούν λεπτές στρώσεις, λιγότερες του 1 mm πάχους, υαλώδους χόνδρου που συχνά εντοπίζεται ασβεστοποιημένο. φέρουν αιμοφόρα αγγεία τα οποία επιτρέπουν την μεταφορά θρεπτικών προς τα κύτταρα του δίσκου (Nachemson A. et., al 1970; Raj P. P. 2008).



**Εικόνα 2.** Ανατομία σπονδυλικής στήλης (Vlaeyen JWS et., al 2018).

Ο κεντρικός πηκτοειδής πυρήνας αποτελείται από ίνες κολλαγόνου κυρίως τύπου II αλλά εντοπίζονται και οι τύποι κολλαγόνου III, VI, και IX (Colombier P. et., al 2014; Roberts S. et., al 1991; 20. Nerlich A. G et., al 1997) οι οποίες οργανώνονται ακανόνιστα και ίνες ελαστίνης οι οποίες διατάσσονται ακτινωτά και είναι έγκλειστες σε μια εκτεταμένη γέλη ενυδατωμένη αποτελούμενη από αγκρεκάνη (Inoue H. 1981; Yu, J. et., al 2002). Επι πρόσθετα ανιχνεύονται πρωτεογλυκάνες όπως η λουμικάνη, η β γλυκάνη, ντεκορίνη, και η φιβρομοντουλίνη (Sztrolonics R.et., al 1999). Τα κύτταρα του πυρήνα είναι διασπαρμένα σε χαμηλή πυκνότητα (περίπου 3000 κύτταρα/mm<sup>3</sup>) και παρουσιάζουν μορφολογία παρόμοια με τα χονδροκύτταρα. Επιλέον σε παθολογικούς δίσκους με κήλη έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα οργανώνονται εντός του πυρήνα σε συστάδες κυττάρων (clusters)

πολλά εκ των οποίων έχουν εισαχθεί στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης (Roberts S. et., al 2016). Εκτός του πυρήνα εντόπίζεται ο ινώδης δακτύλιος και το όριο των δύο περιοχών είναι μια διακριτή και ξεχωριστή δομή στα νεαρά άτομα (<10 ετών) (Raj P. P. 2008).



**Εικόνα 3.** Φυσιολογικός ανθρώπινος δίσκος μεσοσπονδυλίου δίσκος (A). Απεικονίζεται ο πηκτοειδής πυρήνας με τις χαρακτηριστικές συστάδες κυττάρων (B) καθώς και οι ινοβλάστες του ινώδους δακτυλίου (C).

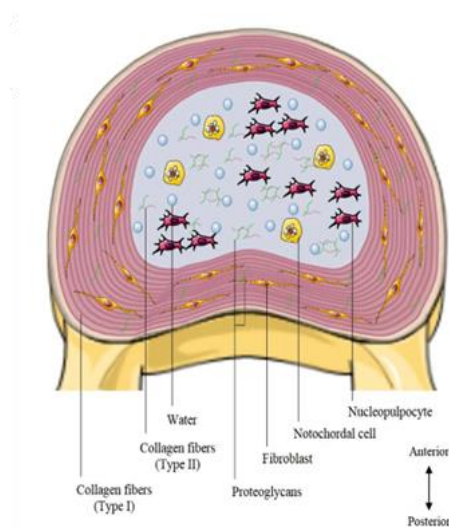
Σε αντίθεση με την σχετικά απλή δομή του πηκτοειδούς πυρήνα, ο ινώδης δακτύλιος είναι ένας αρκετά ετερογενής ιστός σε επίπεδο κυτταρικού φαινοτύπου, βιοχημείας και δομής (Li, J. et., al 2014). Μικροσκοπικά ο δακτύλιος αποτελείται από 15-25 ομόκεντρες τοξοειδής σειρές αποτελούμενες από εναλλάξ ευθυγραμμισμένες πλάγιες ίνες κολλαγόνου ανανεμιγμένες με πρωτεογλυκάνες (Bhattacharjee M. et., al 2012). Τα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου παρουσιάζουν μορφολογία παρόμοια με εκείνη των ινοβλαστών (Εικόνα 3C.). Ο ινώδης δακτύλιος μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους τμήματα τον εξωτερικό και τον εσωτερικό ινώδη δακτύλιο (Outer και Inner AF). Τα εξωτερικά τμήματα του δίσκου παρουσιάζουν καλύτερο προσανατολισμό σε σχέση με εκείνα του εσωτερικού. Επιπλέον, ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος είναι περισσότερο ινώδης και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I, ενώ ο εσωτερικός είναι περισσότερο χονδρώδης, αποτελούμενος κυρίως από κολλαγόνο τύπου II και αγκρεκάνη, συστατικά που απουσιάζουν σχεδόν πλήρως από τον εξωτερικό (Chu G. et., al 2018).

### 1.2.2. Οντογένεση και μοριακή βιολογία μεσοσπονδύλιου δίσκου

Η ανάπτυξη του μεσοσπονδύλιου δίσκου ξεκινά από τα εμβρυϊκό μεσέγγυμα και τα κύτταρα της νωτιαίας χορδής. Κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ο πηκτοειδής πυρήνας (NP) αποτελείται κυρίως από κύτταρα της νωτοχορδής. Η εικόνα αυτή αλλάζει ριζικά κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και τα κύτταρα της νωτιαίας χορδής αντικαθίστανται από τα τελικά κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα, τα οποία εμφανίζουν φαινότυπο αντίστοιχο με εκείνο των χονδροκυττάρων, μέχρι

το τέλος της εφηβείας (Ghosh P. et., al 1988).

Σε συγκεκριμένα είδη ζώων μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι μη χονδροδυστροφικοί σκύλοι, οι αρουραίοι, οι λαγοί και τα ποντίκια τα κύτταρα της νωτιαίας χορδής παραμένουν στον πηκτοειδή πυρήνα του δίσκου καθ'όλη τη διάρκεια ζωής του ζώου. Η παρουσία αυτών φαίνεται να προστατεύει από την ανάπτυξη νόσου οφειλούμενης σε εκφυλισμένο δίσκο καθώς τα κύτταρα της νωτοχορδής εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες που μεσολαβούν στην διατήρηση της ομοιόστασης του δίσκου (An, H. S. et., al 2006; Erwin, W. M. et., al 2006). Στον αντίποδα σε είδη όπως τα άλογα ή ο άνθρωπος τα κύτταρα της νωτοχορδής εξαφανίζονται από το τον πηκτοειδή πυρήνα κατά την γέννηση ή τα πρώτα χρόνια της ζωής, αντίστοιχα (WALMSLEY R. 1953). Κατά την νεανική ζωή ο πηκτοειδής πυρήνας είναι μια ζελατινοειδής και πλούσια σε νερό δομή και φτωχή σε κύτταρα (Εικόνα 4). Μόλις το 1-3% αποτελούν το κυτταρικό τμήμα του ιστού, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αντιστοιχεί στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και σε νερό. Με την πάροδο του χρόνου, η δομή του πηκτοειδούς πυρήνα αλλάζει λόγω του αυξανόμενου εκφυλισμού των κυττάρων του. Ταυτόχρονα παρατηρούνται η μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό, ο μειωμένος αριθμός βιώσιμων κυττάρων και σημαντική αλλαγή στην έκφραση πολλών μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Erwin, W. M. et., al 2014).



**Εικόνα 4.** Στον ανθρώπινο ινώδη δακτύλιο (AF) τα κύτταρα που μορφολογικά μοιάζουν με ινοβλάστες οργανώνονται σε σειρά και παράλληλα με τα ινίδια κολλαγόνου σχηματίζοντας ομόκεντρους κύκλους. Στον ιστό του πηκτοειδούς πυρήνα (NP), μεγάλα κενοτοπιοειδή (vacuolated) κύτταρα της νωτοχορδής και κύτταρα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα (nucleopulposocytes) τα οποία συνηπάρχουν εξασφαλίζοντας την ομοιόστασης της εξωκυττάριας μήτρας (Henry N. et., al 2018).

Τα περιφερικά ινίδια του ινώδους δακτυλίου αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο τύπου II, ενώ τα ινίδια του πηκτοειδούς πυρήνα από κολλαγόνο τύπου II.

Λόγω της σταδιακής προόδου των ινών του δακτυλίου στον πυρήνα και της αλλαγής στη βιοσύνθεση του κολλαγόνου των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα, το ποσοστό του τύπου II αντικαθίσταται τελικά από τον τύπο I. Η σημασία του κολλαγόνου τύπου II στην κανονική λειτουργία του πηκτοειδούς πυρήνα οφείλεται στην πολύπλοκη δομή και ικανότητά του να αλληλεπιδρά με την υψηλή περιεκτικότητα σε νερό εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του πυρήνα με τρόπο ανάλογο με εκείνου που αλληλεπιδρά με τον υαλώδη χόνδρο (Erwin, W. M. et., al 2014).

### **1.3. Κυτταρική γήρανση**

Ο όρος κυτταρική γήρανση αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorhead όταν παρατήρησαν την πεπερασμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών σε συνθήκες καλλιέργειας. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «κυτταρική γήρανση» και εικάστηκε ότι πιθανή αιτία αυτού ήταν ο πεπερασμένος αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων (HAYFLICK, L. et., al 1961). Είναι πλέον γνωστό ότι η παραπάνω παρατήρηση αποτελεί ένα από τα πολλά είδη κυτταρικής γήρανσης (αναδιπλασιαστική/ replicative) και οφείλεται στη μείωση του μήκους των τελομερών λόγω της μειωμένης δραστηριότητας της ενδογενούς τελομεράσης των ινοβλαστών, ύστερα από κάθε κυτταρική διαίρεση (Muñoz-Espín D. et., al 2014). Για πολλά χρόνια υπήρχε η παγιωμένη άποψη ότι η κυτταρική γήρανση αποτελεί το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται μη αναστρέψιμη καθήλωση του κυτταρικού κύκλου με την ταυτόχρονη ενεργή μεταβολική δραστηριότητα του (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007). Πρόσφατα μια πλειάδα μελετών καταδεικνύουν ότι το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης είναι πειραματικά ανστρέψιμο με κυριο χαρακτηριστικό την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Komseli et al., 2018; Galanos et al., 2016; Gorgoulis et al., 2019). Τα γηρασμένα κύτταρα παρουσιάζουν τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά: (1) την διακοπή του κυτταρικού κύκλου, (2) την βλάβη των μακρομορίων, (3) τον ειδικό εκκρινόμενο φαινότυπο (SASP) και (4) τον διαταραχμένο μεταβολισμό (Εικόνα 5). Η κυτταρική γήρανση είναι ένα φαινόμενο το οποίο εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες και ένα ευρύ φάσμα ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η μελέτη της με σκοπό την βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου.

#### **1.3.1. Είδη κυτταρικής γήρανσης**

Η κυτταρική γήρανση θεωρείται μια διαδικασία του οργανισμού ως απόκριση στην έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες οι οποίοι προκαλούν βλαπτικά ερεθίσματα για τον οργανισμό και διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες την αναδιπλασιαστική (replicative) και την πρόωρη γήρανση (prematures enescence). Η πρόωρη γήρανση ανάλογα με το ερέθισμα μπορεί να διακριθεί σε: γήρανση προκαλούμενη από βλάβες στο DNA (DNA damage-induced senescence), γήρανση

προκαλούμενη από ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Oncogene-induced senescence, OIS), γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες (Oxidative stress-induced senescence), γήρανση προκαλούμενη από χημειοθεραπεία (Chemotherapy-induced senescence), γήρανση προκαλούμενη από δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Mitochondrial dysfunction-associated senescence, MiDAS), γήρανση προκαλούμενη από επιγενετικές τροποποιήσεις (Epigenetically induced senescence), γήρανση προκαλούμενη από την παρακρινή δράση του SASP (Paracrine senescence).

Η αναδιπλασιαστική γήρανση (Replicative senescence) αναφέρεται στο μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό που παρατηρείται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μετά από πολλαπές κυτταρικές διαιρέσεις που οδηγούν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η βράγχυνση των τελομερών είναι το βασικό αίτιο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης λόγω της χαμηλής ενζυμικής δραστηρότητας της ενδογενούς τελομεράσης (Sharpless N. E., & Sherr C. J. 2015).

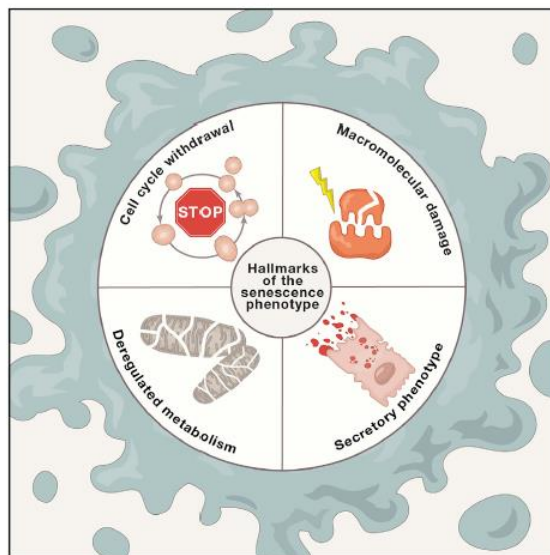
Οι βλάβες στο DNA μπορούν να προκαλέσουν γήρανση (DNA damage-induced senescence) αλλά και απόπτωση, ανάλογα την έκταση της βλάβης. In vitro, χρησιμοποιούνται πολλαπλοί παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA για την πρόκληση αυτού του τύπου γήρανση. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι η ακτινοβολία (ιονίζουσα και υπεριώδης) ή φάρμακα όπως αυτά που χρησιμοποιούνται στις χημειοθεραπείες (chemotherapy-induced senescence) (Sharpless N. E., & Sherr C. J. 2015; Muñoz-Espín D. et., al 2014).

Το 1997 παρατηρήθηκε από τον M. Serrano και τους συναδέλφους του ότι η έκτοπη έκφραση του ογκογονιδίου H-RAS<sup>G12V<sub>in</sub></sup> σε φυσιολογικούς ινοβλάστες προκαλούσαν γήρανση η οποία όπως αποδείχθηκε ήταν ανεξάρτητη από τη βράγχυνση των τελομερών. Αυτός ο τύπος γήρανσης όπου προκαλείται την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων ονομάστηκε γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια (oncogene-induced senescence, OIS) και συσχετίζεται με τις προκαρκινικές βλάβες (Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Εκτός του γονιδίου H-RAS<sup>G12V<sub>in</sub></sup>, μελέτες έχουν αναδείξει γονίδια όπως RAF, MEK, MOS, BRAF ως ικανά να προκαλέσουν γήρανση (Michaloglou et al., 2005; Lin, A. W. et al. 1998). Μαζί με την απόπτωση που προκαλείται από το ογκογόνα ερεθίσματα, η OIS δρα ως βασικός φραγμός στον καρκίνο. (Gorgoulis V. G. & Halazonetis T. D. 2010).

Ένα ακόμα τύπος κυτταρικής γήρανσης αποτελεί εκείνη που επάγεται από το οξειδωτικό στρες. Κύριοι παράγοντες επαγωγής της αποτελούν είτε γνωστά οξειδωτικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, είτε γνωστοί οξειδωτικοί παράγοντες (π.χ. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Οι οξειδωτικοί παράγοντες φαίνεται να προκαλούν βλάβες στο DNA, αλλά και να μεταβάλουν άλλα κυτταρικά συστατικά και διαδικασίες (Hernandez-Segura, A. et., al 2017).

Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα έχει αποδειχθεί είναι ικανά να προκαλέσουν γήρανση. Φάρμακα όπως η μπλεομυκίνη και η δοξορουβικίνη προκαλούν βλάβες στο DNA, ενώ άλλα φάρμακα όπως το abemaciclib και το palbociclib αναστέλλουν την δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών με αποτέλεσμα την καθήλωση του

κυτταρικού κύκλου. Το φαινόμενο αυτό καλείται γήρανση επαγόμενη από χημειοθεραπεία και αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας καθώς επηρεάζει την πρόοδο των καρκινοπαθών (Chemotherapy-induced senescence) (Petrova, N. V. et., al 2016).



**Εικόνα 5.** Χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης. Τα γηρασμένα κύτταρα παρουσιάζουν: (1) διακοπή του κυτταρικού κύκλου, (2) βλάβη των μακρομορίων, (3) ειδικό εκκρινόμενο φαινότυπο (SASP), (4) διαταραχμένο μεταβολισμό (Gorgoulis et., al 2019)

Σχετικά πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια είναι ικανά να οδηγήσουν το κύτταρο στη διαδικασία της γήρανσης. Τα γηρασμένα αυτά κύτταρα παρουσίαζαν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, ειδικά ως προς το SASP, ο οποίος αποτελούσε ειδικό χαρακτηριστικό για στον συγκεκριμένο τύπο γήρανσης (Wiley C. D. et., al 2016)

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποδείχτηκε ότι είναι ικανές να προκαλέσουν γήρανση (Epigenetically induced senescence). Συγκεκριμένα, αναστολείς των μεθυλασών του DNA όπως η 5-aza-20-deoxycytidine αλλά και των αποακετυλασών των ιστονών όπως το suberoylanilide hydroxamic acid και το sodium butyrate είναι γνωστό ότι επάγουν την διαδικασία της γήρανσης (Petrova, N. V. et., al 2016). Τέλος, το σύνολο των εκκρινόμενων ενώσεων από τα γηρασμένα κύτταρα (SASP) είναι ικανό να προκαλέσει γήρανση (Paracrine senescence) επαναπροσδιορίζοντας το την μοίρα των γειτονικών κυττάρων έχοντας παρακρινή δράση (Acosta, J. C. et., al 2013).

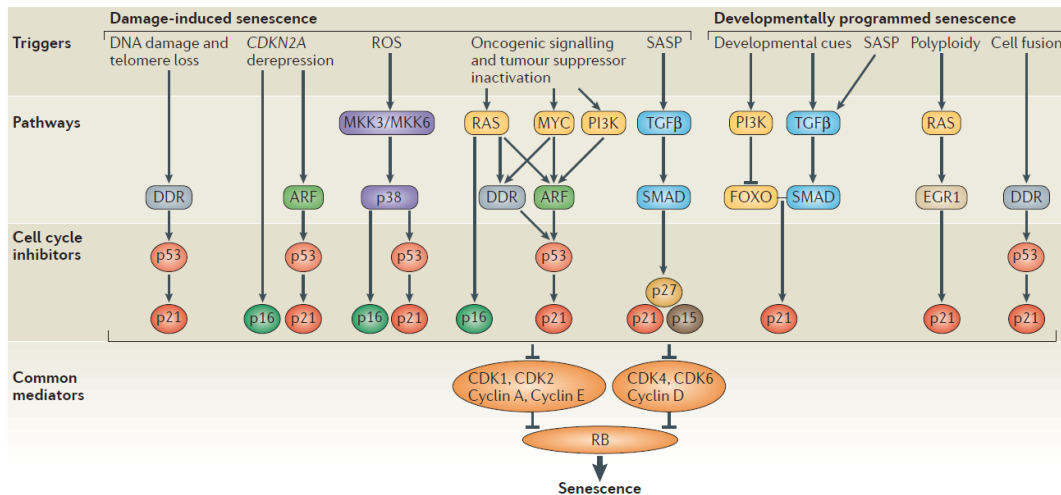
### 1.3.2. Χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης

#### 1.3.2.1 Διακοπή κυτταρικού κύκλου

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων συνιστά η γενικά μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε βλαπτικά ερεθίσματα με σκοπό την αναστολή του πολλαπλασιασμού έως ότου το κύτταρο επιδιορθώσει την κυτταρική βλάβη. Η παύση του κυτταρικού κύκλου διαφέρει από το φαινόμενο «ηρεμίας/αδράνειας (“Quiescence”)» κατά το οποίο γίνεται παροδική καθήλωση του κυτταρικού κύκλου και το κύτταρο συνεχίζεται να πολλαπλασιάζεται δεχόμενο νέα κατάλληλα ερεθίσματα. Παρά το γεγονός ότι η γήρανση χαρακτηρίζεται από αναστολή του κυτταρικού κύκλου, πολλές μελέτες έχουν πλέον αναδείξει ότι υπο ορισμένες συνθήκες τα κύτταρα μπορούν να ξεφύγουν από την γήρανση (escape) και να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται αποκτώντας ένα νέο φαινότυπο πιο επιθετικό (Medema J. P. 2018).

Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι πρωτεΐνες του Ρετινοβλαστώματος (RB) και η p53 είναι σημαντικές για την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της γήρανσης (Rodier and Campisi, 2011). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (RB1, RBL1, RBL2) από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDK4, CDK6, CDK2) μειώνει την ικανότητα της RB1 να καταστείλει τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F, οι οποίοι απαιτούνται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Sharpless N. E., & Sherr C. J. 2015). Στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται συσσώρευση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες p21WAF1/Cip1 (CDKN1A) και p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A) οι οποίες αναστέλλουν τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK2 και CDK4/6 αντίστοιχα, ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες της οικογένειας RB και της πρωτεΐνης p53 με αποτέλεσμα των σχηματισμό ετεροχρωματίνης στα γονίδια στόχους του μεταγραφικού παράγοντα E2F, την έκκριση κυτταροκινών από τα γηρασμένα κύτταρα και τέλος την διαρκή παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (Takahashi et al., 2006). Η ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών όπως η RB ή η p53 δεν αποτελούν δείκτη κυτταρικής γήρανσης καθώς ενεργοποιούνται και σε άλλες βιολογικές διαδικασίες που εμπεριέχουν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Rodier and Campisi, 2011). Επίσης, οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p21 και p16 έχει αποδειχθεί ότι παράγονται και από κύτταρα τα οποία δεν είναι γηρασμένα (Hernandez-Segura et al., 2017). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, κρίνεται αναγκαία να εξετάζονται πολλαπλοί παράγοντες ώστε να ταυτοποιηθεί ότι η παύση του κυτταρικού κύκλου συσχετίζεται με το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης.





**Εικόνα 6.** Μοριακά μονοπάτια της γήρανσης. Πολλαπλοί παράγοντες πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης RB.

### 1.3.2.2. Εκκρινόμενος φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP)

Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν μια πληθώρα παραγόντων μεταξύ των οποίων συγκεταλέγονται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χυμοκίνες, αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες, και μεταλλοπρωτεΐνάσες, το σύνολο αυτών καλείται Εκκρινόμενος φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP) (Πίνακας 1). Ο SASP συνιστά ένα βασικό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων και κατέχει σημαίνοντα ρόλο στη ρύθμιση πολλών παθο-φυσιολογικών επιδράσεων τους. Οι παράγοντες του SASP μεσολαβούν στην εγκαθίδρυση γήρανσης δρώντας με αυτοκρινή ή παρακρινή δράση σε γειτονικά κύτταρα αλλά και στην αναδιαμόρφωση του ιστικού περιβάλλοντος επηρεάζοντας την πλαστικότητα του, διαμορφώνοντας ταυτόχρονα ένα χρόνια φλεγμονώδες περιβάλλον (Gorgoulis et al., 2019). Μια ακόμη λειτουργία του SASP είναι η ενεργοποίηση ανοσολογικών αποκρίσεων η οποία στοχεύει στον περιορισμό των γηρασμένων κυττάρων. Επιπλέον, οι εκκρινόμενοι από τα γηρασμένα κύτταρα παράγοντες δύναται να στρατολογήσουν ανοσο-κατασταλτικά κύτταρα (Di Mitri et al., 2014; Eggert et al., 2016), τα οποία διεγείρουν την ογκογένεση προάγοντας την αγγειογένεση και την μετάσταση (Corpe et al., 2010).

Ο κυτταρικός κύκλος είναι στενά ρυθμιζόμενος από τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια των p53 και p16INK4A/Rb, ενώ ο SASP υπόκειται στον έλεγχο συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB, ο C/EBPb, ο GATA4 (Ito et al., 2017; Kang et al., 2015; Kuilman and Peeper, 2009; Salama et al., 2014) καθώς και τον σηματοδοτικών μονοπατιών mTOR και p38MAPK (Freund et al., 2011; Ito et al., 2017; Kuilman and Peeper, 2009). Επομένως, η ταυτοποίηση των παραγόντων του SASP μπορεί να συμβάλλει στην ανακάλυψη νέων μοριακών χαρακτηριστικών των γηρασμένων κυττάρων ερευνώντας τα μοριακά μονοπάτια τα οποία πυροδοτεί.

Class	Component
Interleukins	IL-6; IL-7; IL-1; IL-1b; IL-13; IL-15
Chemokines	IL-8; GRO-a, -b, -g; MCP-2; MCP-4; MIP-1a; MIP-3a; HCC-4; eotaxin; eotaxin-3; TECK; ENA-78; I-309; I-TAC
Other inflammatory molecules	TGFβ; GM-CSF; G-CSF; IFN-γ; BLC; MIF
Growth factors; regulators	Amphiregulin; epiregulin; heregulin; EGF; bFGF; HGF; KGF (FGF7); VEGF; angiogenin; SCF; SDF-1; PIGF; NGF; IGF1BP-2, -3, -4, -6, -7
Proteases and regulators	MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14; TIMP-1; TIMP-2; PAI-1, -2; tPA; uPA; cathepsin B
Receptors; ligands	ICAM-1, -3; OPG; sTNFR1; sTNFR2; TRAIL-R3; Fas; uPAR; SGP130; EGF-R
Non-protein molecules	PGE2; nitric oxide; ROS
Insoluble factors	Fibronectin; collagens; laminin

**Πίνακας 1.** Συστατικά εκκριτικού φαινοτύπου σχετιζόμενου με την γήρανση (SASP) (Coore et., al 2010)

### 1.3.2.3. Βλάβη Μακρομορίων

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων αποτελούν οι βλάβες σε μακρομόρια του κυττάρου όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Το πρώτο μοριακό γεγονός που συνδέεται με τη γήρανση είναι η βράγχυση των τελομερών κατά τις διαδοχικές διαιρέσεις των κυττάρων (Shay and Wright, 2019). Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που σχηματίζουν βρόγχους στα άκρα των χρωμοσωμάτων, οι οποίοι σταθεροποιούνται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Shelterin. Η δομή αυτή καθιστά τα τελομερή μη-αναγνωρίσιμα από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (de Lange, 2018; Shay and Wright, 2019). Η τελομεράση που ρυθμίζει το μέγεθος των τελομερών δεν εκράζεται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα, αλλά εκφράζεται κατ'έξοχήν στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν ξεφύγει από το στάδιο της γήρανσης. Επιπλέον, η επαναδραστηριοποίηση της τελομεράσης οδηγεί σε επιμήκυνση των τελομερών, αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής των κυττάρων στην καλλιέργεια (Bodnar et al., 1998; Shay and Wright, 2019).

Ένα βασικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων και ευρύτερα του γήρατος αποτελεί η τοξικότητα των πρωτεϊνών, δηλαδή η παρουσία «βλαμμένων» πρωτεϊνικών μορίων (Kaushik and Cuervo, 2015). Κύρια πηγή των πρωτεϊνικών βλαβών συνιστούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες οξειδώνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα μεθειονίνης και κυστεΐνης αλλάζοντας την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια τη λειτουργία τους (Höhn A., et al., 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνιστούν πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (PTPs) που φέρουν κατάλοιπα κυστεΐνης και απενεργοποιούν το μόριο όταν οξειδωθούν ενεργοποιώντας την γήρανση μέσω της υπερνεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK/MAPK έχοντας παρόμοιο αποτέλεσμα με την δράση ενεργοποιημένων ογκογονιδίων (Deschênes-Simard X., et al., 2013). Επί πρόσθετα, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, παρουσία μετάλλων, διαθέτουν την ικανότητα να καρβουλιώνουν αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης, θρεονίνης, λυσίνης καθώς και αργινίνης. Αποτέλεσμα της καρβουλίωσης είναι η αποκάλυψη υδροφοβικών δομών, οδηγώντας στο «ξεδίπλωμα» της πρωτεΐνης (Nyström T, 2005). Αξίζει να

τονιστεί ότι, τα καρβονυλικά κατάλοιπα αντιδρούν με αμινοξέα που φέρουν βάσεις Schiff, συμβάλλοντας στη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωμάτων τα οποία καλούνται «Λιποφουσκίνη» και συσσωρεύονται με την πάροδο της κυτταρικής γήρανσης.

Τα λιπίδια αποτελούν μια βασική κατηγορία μακρομορίων για την λειτουργία των κυττάρων καθώς αποτελούν βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας και μόριο κλειδί για την μεταγωγή σήματος. Πολλές ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες χαρακτηρίζονται από διαταραχές στον μεταβολισμό των λιπιδίων (Ademowo et al., 2017). Κύρια αίτια της αλλαγής του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων συνιστούν τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, τα οποία κατά τη διάρκεια της κυτταρικής γήρανσης, οδηγούν παραγωγή ROS υπεύθυνων για βλάβες στα λιπιδικά μακρομόρια, εναποθέσεις λιπιδίων (Correia-Melo et al., 2016; Ogrodnik et al., 2017) και τη συσσώρευση λιποφουσκίνης (Gorgoulis et al., 2018). Μια σειρά μεθόδων είναι πλέον διαθέσιμες για τον προσδιορισμό των λιπιδικών διαταραχών σε ιστούς και κυτταρικές σειρές, αλλά η χρήση τους ως βιοδείκτης της κυτταρικής γήρανσης είναι περιορισμένη εξαιτίας της μεγάλης ποικιλότητας των λιπιδικών προφίλ τα οποία είναι συνδεδεμένα με την γήρανση. Χαρακτηριστικά, οι λιπιδικοί μεταβολήτες μεταξύ της επαγόμενης από ογκογονίδιο γήρανσης (OIS) και της αναδιπλασιαστικής γήρανσης διαφέρουν σημαντικά (Quijano et al., 2012).

#### **1.3.2.4. Λιποφουσκίνη**

Η Λιποφουσκίνη αποτελεί ένα μείγμα αποτελούμενο από διασυνδεδεμένα οξειδωμένα μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια και σάκχαρα) προερχόμενα από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια με χαρακτηριστική ικανότητα αυτοφθορισμού (Höhn et al., 2010; König et al., 2017; Rodolfo et al., 2018). Ο όρος λιποφουσκίνη προέρχεται από από το ελληνικό "lipo" που σημαίνει λίπος και "fuscus" που σημαίνει σκοτάδι (Gorgoulis et., al 2019). Τα επιμέρους συστατικά της λιποφουσκίνης είναι οργανωμένα σε αδρανή κοκκία των οποίων η φύση και η δομή διαφέρει μεταξύ των ιστών, εμφανίζοντας χρονική ετερογένεια στην σύνθεση τους από οξειδωμένες πρωτεΐνες (30-70%), λιπίδια (20-50%), κατιόντα ( $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) (2%) και κατάλοιπα σακχάρων (Benavides et al., 2002; Double et al., 2008). Τα αλληλοσυνδεδεμένα και πολυμερικά συστατικά της λιποφουσκίνης την καθιστούν μη αποικοδομήσιμη από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης του κυττάρου, αποτέλεσμα αυτού είναι η συσσώρευση της εντός των λυσοσωμάτων και του κυτταροπλάσματος των μετα-μιτωτικών και γηρασμένων κυττάρων. Στον αντίποδα, τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα διαλύουν τα συσσωματώματα λιποφουσκίνης διαμοιράζοντας την στα νέα κύτταρα που προκύπτουν. Έτσι, τα νεαρά ηλικιακά κύτταρα είτε δεν παρουσιάζουν, είτε έχουν χαμηλή συσσώρευση κοκκίων λιποφουσκίνης (Moreno-García, A. et., al 2018). Η λιποφουσκίνη είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της πρωτεόστασης λόγω βλαβών στο σύστημα

αποικοδόμησης ουβικουτίνης- πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) και της αποδόμησης μη φυσιολογικού κυτταρικού περιεχομένου από τα λυσοσώματα μέσω της αυτοφαγίας (Mizushima et al., 2004; Mizushima, 2007). Με την πρόοδο του γήρατος, η κυτταρική πρωτεόσταση γίνεται όλο και πιο αναποτελεσματική παρεμποδίζοντας την αποικοδόμηση των μη- ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες εν συνεχεία εκθέτουν τις υδρόφοβες επικράτειες τους τείνοντας να σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες περιπυρηνικές ή κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες τα οποία έχουν την ροπή να σχηματίζουν συσσωματώματα (Moreno-García, A. et., al 2018). Στη συνέχεια, τα σχηματιζόμενα αδρανή κοκκία προσλαμβάνονται μέσω της διαδικασίας της μακροαυτοφαγίας από τα λυσοσώματα, όταν όμως ανασταλεί η μακροαυτοφαγία η λιποφουσκίνη αρχίζει να συσσωρεύεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα (Höhn and Grune, 2013).

Το οξειδωτικό στρες όπως και η συσσώρευση βλαβών στο DNA των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της ζωής οδηγούν στα διαταραχές στον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην παραγωγή περαιτέρω οξειδωτικού στρες μέσω της παραγωγής ROS μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το κύτταρο προκειμένου να επαναφέρει την ομοιόσταση ενεργοποιεί την μιτοφαγία με σκοπό τον περιορισμό των μη-λειτουργικών μιτοχονδρίων από το σύστημα των λυσοσωμάτων (Atkins et al., 2016; Rodolfo et al., 2018). Μετά την ενεργοποίησή τους, τα λυσοσώματα δεσμεύουν και συσσωρεύουν τα μη- αποικοδομήσιμα μόρια όπως η μικρή μιτοχονδριακή υδροφοβική υπομονάδα C της ATP-συνθάσης (mitochondrial small hydrophobic ATP-synthase subunit-c), η οποία συνιστά ένα βασικό χαρακτηριστικό των κοκκίων λιποφουσκίνης που εντοπίζονται στην Νευρονική Σεροειδή Λιποφουσκίνοση (Neuronal ceroid lipofuscinosis) (Ezaki et al., 1995; Vidal-Donet et al., 2013). Κατά το γήρας, τα συστήματα επιδιόρθωσης των μιτοχονδριακών βλαβών χαρακτηρίζονται από μια περαιτέρω γενικευμένη μείωση της μακροαυτοφαγίας και από τη μειωμένη δράση συγκεκριμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών (Moreno-García, A. et., al 2018). Συνοψίζοντας, παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ της μιτοχονδριακής και λυσοσωμικής λειτουργίας κατά την κυτταρική γήρανση η οποία περιλαμβάνει άμεσα την λιποφουσκίνη (Terman et al., 2010). Η συσσώρευση της τελευταίας, οδηγεί στη μείωση της αυτοφαγίας και σε χαμηλότερο κύκλο εργασιών των λειτουργικών μιτοχονδρίων. Αντίθετα, τα μη-λειτουργικά μιτοχόνδρια παράγουν αυξημένα επίπεδα ROS επάγοντας την διαδικασία της λιποφουσκινογένεσης σε έναν βρόχο επανατροφοδότησης από δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια και λυσοσώματα οδηγώντας στην ενίσχυση του οξειδωτικού στρες, χαμηλότερη παραγωγή ενέργειας και δυσλειτουργίας των καταβολικών μονοπατιών (Brunk and Terman, 2002; Terman et al., 2010).

Η κλινική σημασία της λιποφουσκίνης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί παρά την πανταχού παρούσα παρουσία της στη γήρανση και σε ορισμένες ασθένειες στις

οποίες η συσσώρευση λιποφουσκίνης θεωρείται ότι αποτελεί μόνιμο παράγοντα κινδύνου. Οι εκ γενετής Νευρονικές Σεροειδής Λιποφουσκινώσεις (Congenital neuronal ceroid lipofuscinoses, NCLs) όπως η νόσος Batten και η νόσος Niemann-Pick C, έχουν τις ισχυρότερες ενδείξεις για την επίπτωση του άμεσου ρόλου της λιποφουσκίνης στην παθολογία. Αυτές οι διαταραχές πρώιμης έναρξης λυσοσωμικής αποθήκευσης προκαλούν μια μαζική, αναπόφευκτη και προοδευτική συσσώρευση λιποφουσκίνης ορατής στη βιοψία η οποία οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατο σε νεαρή ηλικία (Moreno-García, A. et., al 2018). Ο ρόλος της λιποφουσκίνης στις περισσότερες παθολογίες παραμένει ασαφής. Ο συσχετισμός του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία με τη συσσώρευση λιποφουσκίνης έχει παρατηρηθεί, αλλά παραμένει εξαιρετικά αμφιλεγόμενος. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η συσσώρευση λιποφουσκίνης αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση των επιθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς χυτώνα και ότι ο αυτοφθορισμός της ευαισθητοποιεί τα λυσοσώματα στο φάσμα του ορατού φωτός, οδηγώντας σε κυτταρική αστάθεια (Brunk U.T et., al 2002; Jung T. et.,al 2007; Satoh, M. et., al 2001). Ωστόσο, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση λιποφουσκίνης δεν συσχετίζεται με τον ρυθμό εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας. (Smith R. T., 2016). Παρ' ότι οι παραπάνω παθολογίες μπορεί να έχουν μια μοναδική σχέση με τη λιποφουσκίνη, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η κλινική σημασία της εύρεσης λιποφουσκίνης σε μια βιοψία δεν περιορίζεται στην παρουσία κυτταρικής γήρανσης ή οξειδωτικού στρες. Η παρουσία λιποφουσκίνης ενδεχομένως σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο ή ασθενή μεγάλης ηλικίας μπορεί να αποτελεί φυσιολογικό εύρημα χωρίς να υποδεικνύει κάποια παθολογική κατάσταση (Snyder AN. et., al 2020).

#### **1.4. Μέθοδοι ανίχνευσης της κυτταρικής γήρανσης**

##### **1.4.1. SA-β-Gal**

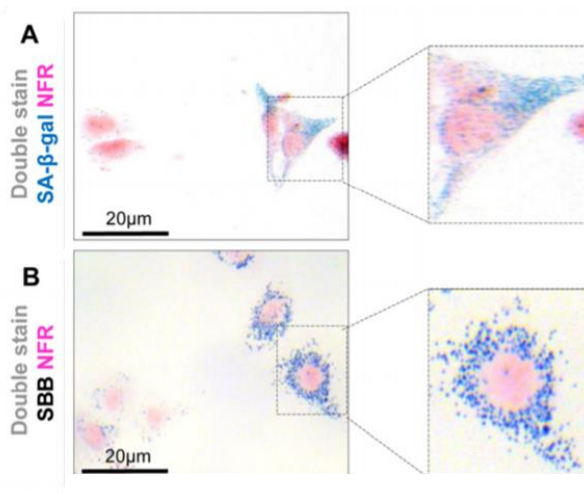
Μια από τις βασικότερες μεθόδους προσδιορισμού της κυτταρικής γήρανσης βασίζεται στην δραστικότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση υπό συγκεκριμένες συνθήκες pH σύμφωνα με τη μελέτη του Dimri και των συνεργατών του. Συγκεκριμένα εκτίμησαν την έκφραση του ενζύμου σε κύτταρικές καλλιέργειες και παρατήρησαν ότι το ένζυμο ήταν ενεργό στα κύτταρα τα οποία είχαν εισέλθει σε διαδικασία γήρανσης και το pH στο οποίο πραγματοποιούνταν η αντίδραση είχε τιμή 6. Στα κύτταρα λάμβανε χώρα η αντίδραση παρατηρούνταν μπλέ χρώση του κυτταροπλάσματος. Η μελέτη του Dimri αποτελεί σημείο καμπής για την μελέτη της κυτταρικής γήρανσης καθώς καθιέρωσε την β-γαλακτοσιδάση ως βιοδείκτη για τον προσδιορισμό των γηρασμένων κυττάρων σημειώνοντας τον όρο β-γαλακτοσιδάση σχετιζόμενη με την γήρανση (Senescence-associated beta-galactosidase, SA-β-gal), εφόσον η συσσώρευση της παρατηρήθηκε να αυξάνεται με την ηλικία (Dimri et al., 1995). Παρά το ότι η SA-β-gal φαίνεται να εκφράζεται από τα γηρασμένα κύτταρα, σαν μέθοδος προσδιορισμού της γήρανσης έχει αποδειχθεί από συγκεκριμένες

μελέτες να έχει συγκεκριμένα μειονεκτήματα αποδίδοντας είτε ψευδώς αρνητικά, είτε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χρήση νωπού ιστού για την πραγματοποίηση της χρώσης καθώς βασίζεται σε ενζυμική αντίδραση (Debaq-Chainiaux et al., 2009) αποκλείοντας την μελέτη ιστοτεμαχίων που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη (FFPE) ή έχουν ομαδοποιηθεί σε μικροσυστοιχίες (Gorgoulis and Halazonetis, 2010). Μια ακόμη αρνητική πτυχή της χρώσης με SA-β-gal αποτελούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που αποδίδει η μέθοδος εάν τα κύτταρα επωαστούν με τον ενζυμικό υπόστρωμα X-gal για εκτεταμένο χρονικό διάστημα. Επομένως, τα αποτελέσματα απαιτείται να ελέγχονται με τον κατάλληλο χρόνο επώασης με το ενζυμικό υπόστρωμα με σκοπό να παράγεται σήμα λόγω της φυσιολογικής ενζυμικής δραστηριότητας των γηρασμένων κυττάρων αποδίδοντας ειδικό σήμα και όχι καθολική χρώση των κυττάρων. (Lee et al., 2006; Georgakopoulou et al., 2013). Επίσης, οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων μπορούν να επηρεάσουν την χρώση αποδίδοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έλλειψη ορού στο θεραπευτικό μέσο καλλιέργειας (Yang and Hu, 2005; Severino et al., 2000). Στον αντίποδα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με την χρώση μπορούν να ληφθούν στην περίπτωση όπου τα υπο μελέτη κύτταρα δεν εκφράζουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την γαλακτοσιδάση. Στην περίπτωση αυτή δεν παράγεται το ένζυμο και επομένως ένα πιθανώς γηρασμένο κύτταρο δεν θα χρωματιστεί, αποδίδοντας ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα (Lee et al., 2006). Συνοψίζοντας η χρώση SA-β-Gal αποτέλεσε κομβικό σημείο για την μελέτη της κυτταρικής γήρανσης. Μόλαταυτα, η χρώση μπορεί να αποδώσει ψευδή αποτελέσματα και για το λόγο αυτό πριν πραγματοποιηθεί απαιτείται να λαμβάνονται υπόψιν παράμετροι όπως το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, ο χρόνος επώασης με το ενζυμικό υπόστρωμα, να είναι νωπό το υλικό προς χρώση αλλά και η έκφραση του ενζύμου της γαλακτοσιδάσης από τον υπο μελέτη κυτταρικό πληθυσμό.

#### **1.4.2. Sudan black B**

Η χρώση με Sudan Black B (SBB) χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια για την ανίχνευση της λιποφουσκίνης και κατ' επέκταση και των γηρασμένων κυττάρων (Glees P. & Hasan M. 1976; Robles L. J. 1978; Rizou S. V. et., al 2019; Evangelou et., al 2017). Αποτελεί μια εύκολη, γρήγορη και σχετικά αξιόπιστη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα δειγμάτων. Το αντιδραστήριο SBB είναι εξαιρετικά λιπόφιλο παρουσιάζοντας υψηλή συγγένεια με το λιπιδικό μέρος της λιποφουσκίνης. Τα θετικά ως προς την παρουσία λιποφουσκίνης κύτταρα μετά την χρώση αποκτούν μπλέ- μαύρο χρώμα στα κυτταροπλασματικά κοκκία λιποφουσκίνης σε κύτταρα και παγωμένους ιστούς, ενώ σε FFPE ιστούς τα κοκκία αποκτούν καφέ-μαύρο χρώμα παρατηρώντας τα στο οπτικό μικροσκόπιο (Georgakopoulou E. A et., al 2013; Evangelou K., & Gorgoulis V. G. (2017). Βασικό

πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι της χρώσης με SA-β-Gal συνιστά η αναγνώριση των γηρασμένων κυττάρων και σε FFPE ιστούς επιτρέποντας την μελέτη της κυτταρικής γήρανσης σε επίπεδο βασικής και κλινικής έρευνας, διάγνωσης αλλά και θεραπείας. Κατά αναλογία με την τη μέθοδο SA-β-Gal και η χρωση με SBB παρουσιάζει συγκεκριμένα μειονεκτήματα. Το πρώτο μειονέκτημα έγκειται στην δυσκολία παρατήρησης το θετικών για χρώση κυττάρων, δηλαδή των κυτταροπλασματικών κοκκίων (κυανού-μαύρου είτε καφέ χρώματος) λιποφουσκίνης, καθώς τα κοκκία μπορεί να είναι αρκετά μικρά σε μέγεθος και τα κύτταρα που τα φέρουν διασκορπισμένα σε ένα δείγμα ιστού, απαιτώντας σχολαστική παρατήρηση του δείγματος. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί η ιδιαίτερη παρουσία “θορύβου” στο περιβάλλον του δείγματος η οποία προκύπτει από την χρώση δυσκολεύοντας την ταυτοποίηση των πραγματικά θετικών κυττάρων (κοκκίων)- SBB. Χαρακτηριστικό της χρώσης αποτελεί η περίσσεια χρωστικής που παρατηρείται υπό την μορφή καθιζημάτων (Evangelou et al., 2017). Ένα ακόμα μειονέκτημα της μεθόδου συνιστούν οι προσμίξεις στα εμπορικά σκευάσματα SBB οι οποίες είναι ικανές να επηρεάσουν την λιποφιλικότητα του αντιδραστηρίου με αποτέλεσμα στην απόδοση της αντίδρασης σύνδεσης SBB και λιποφουσκίνης αλλά και την μη ειδική σύνδεση με άλλα κυτταρικά υποστρώματα (Pfüller, Franz and Preiß, 1977; Evangelou et al., 2017) .



**Εικόνα 7.** Χρώση με SA-β-gal (A) και Sudan Black B (SBB) (B) στο κυτταρικό σύστημα Saos-2 Tet-on/off p53. Για την χρώση τον πυρήνα χρησιμοποιήθηκε Nuclear Fast Red (NFR) (Georgakopoulou E. A. et., al 2013)

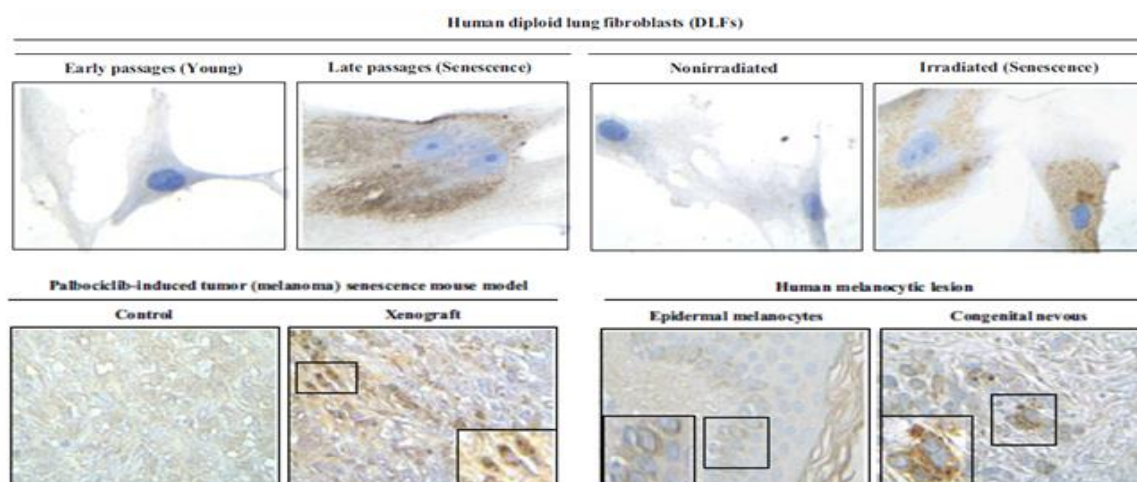
### 1.4.3 Προσδιορισμός αναστολέων του κυτταρικού κύκλου

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.3.2.1 βασικό κοινό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων είναι η γενικά μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Για το λόγο αυτό η συσσώρευση των αναστολέων των κυκλινο-

εξαρτώμενων κινάσεων, p21WAF1/Cip1 (CDKN1A) και p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A) αποτελούν μια ομάδα κλασικών βιοδεικτών και προσδιορισμού της κυτταρικής γήρανσης. Μολαταύτα ακόμη και η αναστολή του κυτταρικού κύκλου δεν αποτελούν πλήρως αξιόπιστους δείκτες καθώς στη βιολογία η διακοπή του κυτταρικού κύκλου δεν συνεπάγεται απαραίτητα και γήρανση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το φαινόμενο ηρεμίας/αδράνειας (“Quiescence”) όπου ο κύκλος καθλώνεται παροδικά. Επομένως, οι αναστολές p16 και p21 αποτελούν δείκτες για τον εντοπισμό των γηρασμένων κυττάρων, αλλά πρέπει να συνδυάζονται και με άλλους δείκτες ώστε να υπάρχει αναμφισβήτητο αληθές συμπέρασμα.

#### 1.4.4. Χρώση με GL13

Η χρώση με το αντιδραστήριο GL13 αποτελεί μια νέα καινοτόμα μέθοδο για τον προσδιορισμό των γηρασμένων κυττάρων προσδιορίζοντας την παρουσία λιποφουσκίνης. Το GL13 αποτελεί ένα λιπόφιλο μόριο, χημικό ανάλογο του SBB το οποίο είναι συζευγμένο με ένα μόριο βιοτίνης και μπορεί να ανιχνεύσει τα γηρασμένα κύτταρα σε κάθε βιολογικό υλικό συμπεριλαμβανομένων κυτταρικών σειρών, ιστών (Evangelou et al., 2017) και βιολογικών υγρών (Rizou et al., 2019). Οι ιστοί δεν απαιτείται να είναι νωποί καθώς το αντιδραστήριο GL13 μπορεί να ανιχνεύσει τα κοκκία λιποφουσκίνης και παγωμένους αλλά και σε FFPE ιστούς.



**Εικόνα 8.** Χρώση με GL13 σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα (DLFs) και τομές δέρματος ανθρώπου και το ποντικού (Evangelou et., al 2017). Η κοκκία λιποφουσκίνης των γηρασμένων κυττάρων έχουν σημειωθεί με το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα.

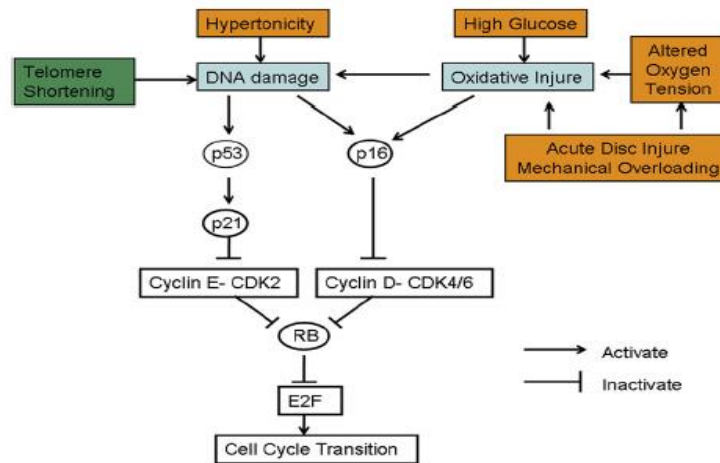
Το καινοτόμο αυτό αντιδραστήριο παρέχει την ειδικότητα του SBB παρακάμπτοντας τα βασικά μειονεκτήματά του. Η χρώση με GL13 συνιστά μια απλή, ευαίσθητη μέθοδο η οποία μπορεί να συνδυαστεί με κλασικές τεχνικές όπως η ανοσοϊστοχημεία/ανοσοκυτταροχημεία, ο ανοσοφθορισμός και η κυτταρομετρία ροής. Το σήμα που παρέχει ανάλογα με την τεχνική που συνδυάζεται είναι ευκρινές,



ειδικό και με πολύ χαμηλό επίπεδο «θορύβου» στο μικροπεριβάλλον του δείγματος καθιστώντας την χρώση ευρέως εφαρμόσιμη (Evangelou et al., 2017. Κλείνοντας, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται με το γήρας έχει αποδειχθεί ότι η γενετική ή φαρμακολογική τους εξάλειψη βελτιώνει την ομοιόσταση των ιστών επέκτεινοντας την διάρκεια ζωής σε ζωικά μοντέλα (Chang et al., 2016). Υπό αυτό το πρίσμα η χρώση με το αντιδραστήριο GL13 μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την εξάλειψη της κυτταρικής γήρανσης και βελτίωσης της ανθρώπινης ζωής.

### **1.5. Μηχανισμοί επαγωγής γήρανσης στον μεσοσπονδύλιο δίσκο**

Έχει αποδειχθεί ότι πολλές αιτίες που προκαλούν κυτταρική γήρανση καθορίζουν την γήρανση των κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου συμπεριλαμβανομένων του DNA damage, τα μηχανικά ερεθίσματα, το οξειδωτικό στρες καθώς και το στρες που επάγεται από την έλλειψη θρεπτικών. Ένα ή περισσότερα από αυτά μπορούν να συμβάλλουν ταυτόχρονα για την γήρανση και την εκφύλιση των κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Patil P. et., al 2018). Η κυτταρική γήρανση διακρίνεται ιστορικά στην αναπαραγωγική γήρανση (RS) που ρυθμίζεται από την οδό p53-p21-RB με ένα τρόπο εξαρτώμενο από την βράγχυση των τελομερών και την γήρανση επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες (SIPS) που ενεργοποιεί το μονοπάτι p16<sup>INK4a</sup>-RB ανεξάρτητα του μήκους των τελομερών. (Ben-Porath I. & Weinberg R.A., 2005). Εκτός από τη βράγχυση των τελομερών, γήρανση μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία στρεσογόνων βλαβών στις οποίες περιλαμβάνονται οι βλάβες στο DNA και το οξειδωτικό στρες. Η ενεργοποίηση των μοριακών μονοπατιών p53-p21-RB και / ή p16<sup>INK4a</sup>-RB εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό στη φύση και την ένταση των ερεθισμάτων, των κυτταρικών τύπου που τα υφίστανται, καθώς και στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Σε αντίθεση με άλλους μαλακούς ιστούς, τα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου βρίσκονται σε ένα μοναδικό μικροπεριβάλλον που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη παροχή θρεπτικών, υποξία, υπερτονικότητα, αυξημένη οξύτητα και ποικίλη μηχανική φόρτιση. Επιπλέον, ερευνητές της εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχουν επεκτείνεται την λίστα των παραγόντων εκφυλισμού του δίσκου με την γήρας συμπεριλαμβάνοντας την υπερβολική μηχανική επιβάρυνση, τους τραυματισμούς του ιστού, το οξειδωτικό στρες, τον διαβήτη, το χρόνιο κάπνισμα, την παχυσαρκία και το γενετικό υπόβαθρο. Αυτοί οι αιτιολογικοί παράγοντες μπορεί να λειτουργήσουν με συντονισμένο τρόπο για να απειλήσει τα κύτταρα δίσκου και να διαταράξουν την ομοιόσταση του δίσκου. Δεδομένου ότι η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου περιλαμβάνει τόσο την ηλικία όσο και ιστικές βλάβες που προκαλούνται από το στρες, τίθεται το ερώτημα πώς το φυσιολογικό γήρας συντονίζεται με όλους τους ανωτέρω παράγοντες και το μικροπεριβάλλον του δίσκου με αποτέλεσμα την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (Wang F. et., al 2016).



**Εικόνα 9.** Ο ρόλος των μονοπατιών ενεργοποίησης της γήρανσης p53-p21-RB και p16-RB στον μεσοσπονδύλιο δίσκο. Τα μονοπάτια μπορούν να ενεργοποιηθούν από διαφορετικά ερεθίσματα όπως η μείωση του μήκους των τελομερών, οι βλάβες στο DNA και το οξειδωτικό στρες προκαλούμενου από διαφορετικούς παράγοντες (Wang F. et., al 2016).

### 1.5.1. Οξειδωτικό στρες

Ένα σημαντικό μέρος των εκφυλιστικών αλλαγών που συμβαίνουν στον δίσκο με την ηλικία πιστεύεται ότι οφείλεται σε οξειδωτικό στρες, το οποίο αποτελεί ένα πολύ γνωστό επαγωγέα του φαινοτύπου της κυτταρικής γήρανσης. Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνεται στον δίσκο με την ηλικία, πιθανώς συμβάλλει στην πρόκληση γήρανσης στον μεσοσπονδύλιο δίσκο. Πράγματι, ανθρώπινα κύτταρα NP που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες, π.χ. υπεροξείδιο του υδρογόνου, γηράσκουν και εμφανίζουν ομοιοστατική ανισορροπία πρωτεογλυκανών. Τα κύτταρα αυτά υπερπαραγωγή τις πρωτεΐνες p53 και p21 και παύουν να πολλαπλασιάζονται (Dimozi A. et., al 2015; Ngo K. et., al 2017). Επιπροσθέτως, ανθρώπινα κύτταρα NP που υποβλήθηκαν σε επώαση με υπεροξείδιο δείχνουν κατασταλμένη έκφραση και κατακερματισμό αγκρεκάνης και κολλαγόνου και αυξημένη έκφραση πολλαπλών προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, IL-8, IL1β, TNFα) και πρωτεασών της εξωκυττάριας μήτρας (MMP-1, 2, 3, 9, 13 και ADAMTS-4, 5). Αντίστοιχα, καλλιέργεια NP κυττάρων σε συνθήκη 20% οξυγόνου, προκάλεσε υπερπαραγωγή ROS, DNA damage, διακοπή του κυτταρικού κύκλου και αυξημένη παραγωγή των καταβολικών παραγόντων ADAMTS 4,5 and MMP 2,3, 14 (Feng C. et., al 2017). Επιπλέον, επώαση κυττάρων δίσκου αρουραίου με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης εμφάνισαν γήρανση μέσω μηχανισμού οφειλόμενου στο οξειδωτικό στρες (Park, J. S. et., al 2014). Συνολικά, όλες οι παραπάνω μελέτες αποδεικνύουν ότι τα κύτταρα του δίσκου μπορούν να επιδείξουν μια φαινοτυπική μετατόπιση προς την κυτταρική γήρανση με ταυτόχρονη διαταραχή της

ομοιόστασης στην εξωκυττάρια θεμέλεια ουσία με την ηλικία ως απάντηση στο συσσωρευμένο οξειδοτικό στρες (Patil P. et., al 2018).

### **1.5.2. Γενοτοξικό στρες**

Οι χρόνιες μη- επιδιορθωμένες βλάβες στο DNA είναι ευρέως γνωστό ότι αποτελούν μια βασική αιτία να οδηγηθεί το κύτταρο στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Αυξημένα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης και πρόωρη απώλεια πρωτεογλυκανών, αντίστοιχη με εκείνη του φυσιολογικού γήρατος, παρατηρήθηκε σε ζωικά μοντέλα προγηρίας με ελλατωματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (Vo N. et., al 2010). Επί πρόσθετα, ενήλικοι ποντικοί όπου εκτέθηκαν χρονικά σε διαφορετικά ήδη γενοτοξικού στρες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία ή ο καπνός του τσιγάρου παρουσίασαν δραματική αύξηση στα κύτταρα του δίσκου του p16<sup>INK4a</sup> και μαζική απώλεια πρωτεογλυκανων (Nasto L. A et., al 2013; Wang D et., al 2012). Επίσης, πρωτογενή κύτταρα απομονωμένα από Ercc1<sup>-Δ</sup> ποντίκια επέδειξαν αυξημένα ποσοστά γήρανσης, μειωμένη ικανότητα σύνθεσης πρωτεογλυκανών και ενισχυμένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν μεταλλοπρωτεϊνάσες. Η υπεροσμωτικότητα είναι ένα ακόμα ερέθισμα που επικρατεί στον ιστό του δίσκου και έχει αναφερθεί ότι προκαλεί δίκλωνες θραύσεις στο DNA και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1 (Mavrogonatos E. & Kletsas D. 2009). NP κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν συνεχώς σε συνθήκη υπεροσμωτικότητας εως 500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O in vivo, παρουσίασαν αλλαγές στην χρωματίνη και βλάβες στο DNA. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις υποστηρίζουν σθεναρά το ρόλο των βλαβών του DNA στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

### **1.5.3. Φλεγμονώδες στρες**

Έχει περιγραφεί εκτενώς η συσχέτιση μεταξύ εκφυλισμού δίσκου και φλεγμονώδους απόκρισης. Έκφραση των TNF υποδοχέων TNFR1 και TNFR2, TACE, ανταγωνιστή υποδοχέα ιντερλευκίνης-1 (IL-1ra) και IL-1R1 έχει παρατηρηθεί στον μεσοσπονδύλιο δίσκο. Επίσης, η έκφραση των TNFα και IL-1β έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται με την ηλικία και ανάλογα με τη σοβαρότητα του εκφυλισμού του δίσκου σε μοντέλα ανθρώπων και ζώων (Patil P. et., al 2018). Μέρος της φλεγμονώδους απόκρισης που παρατηρείται στο δίσκο κατά τη διάρκεια του εκφυλισμού και της γήρανσης μπορεί να οφείλεται στα ανοσοκύτταρα που διηθούνται όπως τα μακροφάγα (Risbud M. V. & Shapiro I. M. 2014). Ωστόσο, τα ίδια τα κύτταρα του δίσκου είναι επίσης ικανά να παράγουν IL-6, IL-1β και TNFα στο πλαίσιο της διαδικασίας εκφυλισμού του ιστού ανεξάρτητα από τα διηθούμενα λεμφοκύτταρα (Hamamoto H. et., al 2012). Επί προσθέτως, σημαντικά υψηλά επίπεδα IL-1β, TNFα, IL-6 και IL-8 εντοπίζονται σε ασθενείς με οσφυαλγία με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς των IL-6 και IL-1β να σχετίζονται με την αυξημένη βαρύτητα της ασθένειας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, τα επίπεδα των φλεγμονωδών

διαμεσολαβητών συσχετίζονται έντονα με την εκφύλιση του δίσκου, υποδεικνύοντας ότι είναι πιθανώς αιτιολογικά της νόσου. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1β και TNFα προάγουν την έκφραση των ADAMTS-4, και -5, και των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1, -2, -3, -4, -13 και -14, μειώνοντας την έκφραση των αναβολικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας της αγκρεκάνης και του κολλαγόνου τύπου II (Patil P. et., al 2018). Η χρόνια έκθεση σε φλεγμονώδεις στρες προκαλεί ή αυξάνει το ποσοστό των γηρασμένων κυττάρων στο δίσκο. Η έκθεση των βοοειδών κυττάρων του δίσκου στον TNFα για 21 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη διάσπαση των αγκρεκανών, την αύξηση της ρύθμισης των γονιδίων των IL-6, MMP-3 και αυξημένη χρώση με SA-βgal (Purmessur D. et., al 2013). Είναι ενδιαφέρον ότι οι εκφυλιστικές αλλαγές ήταν επίμονες σε IVDs ακόμη και μετά από μια περίοδο ανάκαμψης 14 ημερών μετά από έκθεση 7 ημερών στον TNFα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας σε απομονωμένα κύτταρα δίσκου από ποντίκια IL-1ra<sup>-/-</sup>. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην επαγωγή γήρανσης καθώς η IL-1β έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί γήρανση στα αρθρικά χονδροκύτταρα και τους ινοβλάστες. Επιπλέον, τα πρωτεολυτικά θραύσματα κολλαγόνου που δημιουργούνται ως συνέπεια της διέγερσης των κυτοκινών των MMPs και της έκφρασης ADAMTS ήταν ικανά να προκαλέσουν πρόωρη γήρανση σε κύτταρα NP αρουραίου (Feng C. et., al 2016). Αυτό υποδηλώνει ότι η μετάβαση στον φαινότυπο γήρανσης προκύπτει από χρόνια έκθεση σε φλεγμονώδεις περιβάλλον και ότι η προοδευτική βλάβη θα επιδεινωθεί εκτός εάν ο δίσκος εκκαθαριστεί από τα γηρασμένα κύτταρα.

#### **1.5.4. Μηχανικό στρες**

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι είναι μηχανικά ενεργοί και φέρουν συνεχώς φορτίο καθ' όλη τη διάρκεια ζωής. Με την πάροδο του χρόνου, προκαλείται σταδιακή απώλεια των πρωτεογλυκανών του ηκτηοειδούς πυρήνα, οδηγώντας τόσο τον NP όσο και τον AF να δέχονται μη φυσιολογικά μηχανικά ερεθίσματα (Müller-Lutz A. et., al 2015) τα οποία προάγουν εκφυλιστικές αλλαγές στον ιστό του δίσκου (Setton, L. A. & Chen, J. 2006). Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μειωμένη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας, ενισχυμένα φλεγμονώδη και καταβολικά αποτελέσματα. Το κατά πόσον η χρόνια μη φυσιολογική μηχανική φόρτωση μέσω των παραπάνω αλλαγών προκαλεί κυτταρική γήρανση δεν είναι ακόμη κατανοητό, ωστόσο, μια μελέτη ανέφερε ότι τα ανθρώπινα κύτταρα NP που εκτέθηκαν σε υψηλό φορτίο εισήχθησαν σε γήρανση (Feng C. et., al 2018).

#### **1.5.5. Διατροφικό στρες**

Ο ιστός του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι ο μεγαλύτερος μη-αγγειακός ιστός στο σώμα. Η μεταφορά οξυγόνου, γλυκόζης και άλλων θρεπτικών ουσιών από το αίμα στα κύτταρα του δίσκου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάχυση από τα τριχοειδή στο σπονδυλικό οστό που βρίσκεται δίπλα στην τελική πλάκα (Vo N. V.

et., al 2016). Η διαπερατότητα της τελικής πλάκας μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας. Κατά συνέπεια, η ροή των θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα δίσκου μειώνεται. Αυτή η ανεπαρκής θρέψη στον δίσκο θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στην παθοφυσιολογία του εκφυλισμού του δίσκου. Πράγματι, η μειωμένη γλυκόζη και οξυγόνο μειώνει την αναβολική δραστηριότητα των κυττάρων δίσκου στην καλλιέργεια (Bibby S. R. & Urban J. P. 2004; Ishihara H. & Urban J. P. 1999). Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος εκφυλισμού του δίσκου σε ασθενείς με κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με κακή αγγειακή λειτουργία, όπως αθηροσκλήρωση και το κάπνισμα (Patil P. et., al 2018).

Τα συστατικά του ορού είναι κρίσιμοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και πολλοί αυξητικοί παράγοντες έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την απόπτωση σε κύτταρα δίσκου συμπεριλαμβανομένων των IGF -1 και PDGF (Gruber H. E. et., al 2000). Εξίσου σημαντική είναι η παρατήρηση ότι, ο IGF-1 μπορεί να εμποδίσει την γήρανση σε κύτταρα AF επαγόμενη από οξειδωτικό στρες (Gruber H. E. et., al 2008). Ωστόσο, καθώς η τελική πλάκα καθίσταται προοδευτικά αδιαπέραστη από τη ροή των θρεπτικών ουσιών στο δίσκο, τα περιορισμένα θρεπτικά συστατικά μπορούν να ενισχύσουν περαιτέρω την εξέλιξη της γήρανσης των κυττάρων δίσκων που προκαλούνται από άλλους στρεσογόνους παράγοντες. Η έλλειψη ορού σε κύτταρα δίσκου βοοειδών αναστέλλει την πολλαπλασιαστική ικανότητα τους και προάγει τον φαινότυπο της γήρανσης (Johnson, W. E.et., al 2008). Αντιθέτως, η υψηλή συγκέντρωση στον ορό αυξάνει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Κυτταρικές σειρές

Πρωτογενείς κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν ύστερα από απομόνωση κυττάρων NP και AF από μεσοσπονδύλιο δίσκο νεαρών (2 μηνών) και γηρασμένων αρουραίων (22 μηνών) (Harris Pratsinis and Dimitris Kletsas, 2007). Τα κύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσω Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) το οποίο συμπληρώθηκε με το σχήμα αντιβιοτικών πενικιλίνης (100 U/ml), στρεπτομυκίνης (100 U/ml) και 10% με εμβρυϊκό θόβειο ορό (FBS) σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και 37°C. Διάλυμα τρυψίνης/ κιτρικών (0,25% / 0,30% w/v) χρησιμοποιήθηκε για ανακαλλιέργεια των κυττάρων όποτε αυτά καταλάμβαναν μεγαλύτερο ποσοστό του 80% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας. (όλα τα υλικά προμηθεύτηκαν από την Gibco, Life Technologies Europe BV, Thessaloniki, Greece). Διεξήχθησαν πειραματικές διαδικασίες όπου χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω κυτταρικές σειρές, όπου τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες χρησιμοποιώντας 4% (v/v) φορμαλδεΰδη σε διάλυμα PBS για 10 λεπτά και ακολούθως επώαστηκαν με 0.2% Triton X-100/PBS για 10 min.

### 2.2 Δείγματα ιστών

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών από αρουραίους και ανθρώπους τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και εγκλειστηκαν σε παραφίνη. Συγκεκριμένα μεσοσπονδύλιοι δίσκοι απομονώθηκαν από την σπονδυλική στήλη και την ουρά τριών νεαρών (ηλικίας 2 μηνών) και τριών γηρασμένων (ηλικίας 22 μηνών) αρουραίων. Επίσης τμήματα μεσοσπόνδυλιου δίσκου απομονώθηκαν με χρήση βιοψίας από την σπονδυλική στήλη 6 παθολογικών ασθενών και από 6 μη-παθολογικούς δότες. Με χρήση μικροτόμου κόπηκαν τομές παραφίνης 4 μm επί των οποίων διεξήχθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.



**Εικόνα 10.** Ιστοτεμάχιο βιοψίας ανθρώπινου μεσοσπονδύλιου δίσκου. Στην εικόνα απεικονίζεται μέρος του ινώδους δακτυλίου και ένα μικρότερο του πηκτοειδούς πυρήνα.

### **2.3 Επαγωγή γήρανσης σε κυτταρικές σειρές**

Για να επαχθεί πρόωρη κυτταρική γήρανση επαγόμενη από στρεσογόνο ερέθισμα (stress-induced premature senescence (SIPS)) στις πρωτογενείς κυτταρικές σειρές NP και AF που απομονώθηκαν από μεσοσπονδύλιους δίσκους αρουραίων και ανθρώπων χρησιμοποιήθηκε πηγή  $^{60}\text{Co}$  γ-ακτινοβολίας (Gamma Chamber 4000A, Isotope Group, Bhadha Atomic Research Company, Trombay, Bombay, India). Οι κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε βαθμό of 2,5 Gy/λεπτό. Σειριακές ανακαλλειέργειες παραγματοποιήθηκαν εως ότου τα κύτταρα γηράσκουν.

### **2.4 Παρασκευή αντιδραστηρίου GL13**

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου GL13 προστέθηκαν 7,5 ml 100% v/v αιθανόλης σε 40 mg GL13. Το φιαλίδιο σφραγίστηκε με parafilm με σκοπό την αποφυγή διαρροών και επώαστηκε στους 60°C για 120 λεπτά σε υδατόλουτρο ώστε να διαλυτοποιηθεί η ένωση στην αιθανόλη. Για την πλήρη διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση με το χέρι κάθε 30 λεπτά. Με το πέρας της αραιώσης το αντιδραστήριο GL13 αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και σκιερό μέρος.

### **2.5 Ανοσοϊστοχημική χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13**

Η χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 αποτελεί μια παραλλαγή της κλασσικής τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας όπου παρεμβάλλεται η επώαση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο πριν προστεθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Αναλυτικότερα πραγματοποιούνται τα παρακάτω στάδια:

#### **1. Αποπαραφίνωση:**

Το πρώτο στάδιο αποτελεί η αποπαραφίνωση των έγκλειστων ιστών σε παραφίνη. Για να γίνει αυτό τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά σε κλίβανο στους 60 °C. Κατόπιν μετά το λιώσιμο της παραφίνης ακολουθεί η απομάκρυνση της με διαδοχικές πλύσεις σε 2 διαφορετικά διαλύματα ξυλόλης. Στο πρώτο διάλυμα τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά και στο δεύτερο διάλυμα για 10 λεπτά. Με το πέρας της διαδικασίας η παραφίνη έχει απομακρυνθεί πλήρως η παραφίνη από τα δείγματα.

#### **2. Ενυδάτωση**

Ενυδάτωση των δειγμάτων σε υδατικά διαλύματα αιθανόλης με σταδιακή αραιώσης της συγκέντρωσής της. Αρχικά χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά διαλύματα αιθανόλης 100% v/v. Στο πρώτο διάλυμα τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά, ενώ στο δεύτερο για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα επωάζονται σε διάλυμα αιθανόλης 96% v/v για 10 λεπτά. Συνεχίζοντας τη διαδικασία της ενυδάτωσης οι τομές εμβαπτίζονται διαδοχικά σε διάλυμα αιθανόλη 80% v/v για 5 λεπτά, σε

διάλυμα αιθανόλη 80% v/v για 5 λεπτά και τέλος σε διάλυμα αιθανόλης 80% v/v για 5 λεπτά. Το τελευταίο στάδιο της ενυδάτωσης είναι το ξέπλυμα της αιθανόλης από τα δείγματα με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης Tris Buffer Saline (TBS). Σε όλη τη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιείται ένας κύκλος πλύσεων (2 γρήγορες πλύσεις και μια με επώαση 5 λεπτών) με το διάλυμα TBS ύστερα από την προσθήκη οποιουδήποτε αντιδραστηρίου στα δείγματα με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας αντιδραστηρίων επί των τομών.

### 3. Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων

Το επόμενο στάδιο της διαδικασίας αποτελείται από την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων χρησιμοποιώντας διάλυμα κιτρικού οξέος 1x, 10mM pH 6. Το διάλυμα κιτρικών θερμαίνεται σε μηχανήμα steamer για συνολικά 15 λεπτά (5 λεπτά ζέσταμα δ/τος κιτρικών και 10 λεπτά επώαση δειγμάτων). Εν συνεχεία, τα δείγματα που βρίσκονται εντός του διαλύματος κιτρικού οξέος και τοποθετούνται σε σκεύος με παγωμένο νερό βρύσης για 15 λεπτά.

4. Κατόπιν ακολουθεί ένας κύκλος πλύσεων με διάλυμα TBS (2 γρήγορες πλύσεις και μία για 5 λεπτά)

### 5. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης

Κατόπιν πραγματοποιείται αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του ιστού με σκοπό την ειδική οξείδωση του υποστρώματος DAB αποκλειστικά και μόνο από το έζυμο της Υπεροξειδάσης (HRP) που προστίθεται εξωγενώς και όχι από την ενδογενή υπεροξειδάση των κυττάρων του ιστού. Αυτό πραγματοποιείται με την επώαση των τομών με διάλυμα 3% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ dH<sub>2</sub>O για 13 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκη σκότους

### 6. Επώαση δειγμάτων με 50% και 70% v/v αιθανόλη

Το αντιδραστήριο GL13 είναι λιπόφιλο για το λόγω αυτό εάν εφαρμοσθεί απευθείας στα δείγματα τα οποία έχουν υδρόφιλο περιβάλλον δεν θα είναι αποτελεσματικό. Για να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα τα δείγματα επωάζονται διαδοχικά για 5 λεπτά σε 50% v/v και σε 70% v/v διαλύματα αιθανόλης. Έτσι δημιουργείται ένα αλκοολικό περιβάλλον το οποίο θα εξυπηρετήσει την πρόσδεση του αντιδραστηρίου (το οποίο είναι διαλυτό σε αιθανόλη) στα κοκκία λιποφουσκίνης των γηρασμένων κυττάρων.

### 7. Προσθήκη του αντιδραστηρίου GL13

Από το διάλυμα GL13 λαμβάνεται ποσότητα αντιδραστηρίου με τη χρήση σύριγγας επί της οποίας έχει προστεθεί φίλτρο μεγέθους 13mm και με μέγεθος πόρων μεμβράνης 0,22μm). Μόλις τελειώσει η 5 λεπτη επώαση στην 70% v/v αιθανόλη, απομακρύνεται ποσότητα αιθανόλης ώστε στα δείγματα να παραμείνει τόση



ποσότητα ώστε να μην στεγνώσει το δείγμα αλλά ούτε να παραμείνει επί του δείγματος αρκετή ποσότητα ικανή να αραιώσει το αντιδραστήριο μετά την προσθήκη του. Έπειτα προστίθενται σταγόνες του αντιδραστήριου επί των τομών και καλύπτονται με καλυπτρίδες με σκοπό την αποφυγή της εξατμίσσης της αιθανόλης. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί παρατήρηση περίπου ενός λεπτού στο οπτικό μικροσκόπιο.

8. Αφαίρεση της καλυπτρίδας καθώς και της περίσσειας αντιδραστήριου στην περιφέρεια της καλυπτρίδας με χρήση διηθητικού χαρτιού.

9. Διαδοχικές πλύσεις σε δύο διαφορετικά διαλύματα 50% v/v αιθανόλης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση περίσσειας αδέσμευτου αντιδραστήριου.

10. Κύκλος πλύσεων με διάλυμα TBS (δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά).

11. Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται επώαση με διάλυμα 0.3% v/v Triton X/dH<sub>2</sub>O για 3-4 λεπτά με σκοπό την περαιτέρω απομάκρυνση του αδέσμευτου GL13. Κρίσιμη θεωρείται η απομάκρυνση των ιζημάτων του αντιδραστήριου καθώς αυτά συμβάλλουν στην ανάπτυξη θορύβου (background) δυσκολεύοντας την αξιολόγηση του σήματος.

12. Προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος έναντι της βιοτίνης

Κατόπιν πραγματοποιείται η προθήκη του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της βιοτίνης, καθώς το αντιδραστήριο GL13 είναι συζευγμένο με ένα μόριο βιοτίνης. Έτσι έμμεσα το αντιδραστήριο συνδέεται με το αντίσωμα. Το αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1/300 σε διάλυμα TBS με επακόλουθη επώαση γίνεται ολονύκτια στους 4°C.

13. Κύκλος πλύσεων με διάλυμα TBS (δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά).

14. Επώαση των δειγμάτων με δευτερογενές αντίσωμα

Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Primary enhancer (kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, Thermo Fisher Scientific) όπου τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

12. Κύκλος πλύσεων με διάλυμα TBS (2 γρήγορες πλύσεις και μία για 5 λεπτά)

13. Επώαση των δειγμάτων με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase)

Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο HRP Polymer (kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, Thermo Fisher Scientific) όπου τα δείγματα επωάζονται για 13 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκη σκότους.

14. Κύκλος πλύσεων με διάλυμα TBS (2 γρήγορες πλύσεις και μία για 5 λεπτά)

15. Οπτικοποίηση της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται επώαση με το αντιδραστήριο DAB σε αναλογία 1μl DAB chromogen σε 100μl DAB substrate (kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, ThermoFisher Scientific). Με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου παρατηρείται η πορεία της αντίδρασης με προοδευτικό καφέ χρωματισμό λόγω της παρουσίας του ενζύμου υπεροξειδάσης στις θέσεις όπου έχει προσδεθεί το δευτερογενές αντίσωμα επόμενως και το πρωτογενές. Έτσι λοιπόν οι θέσεις όπου εντοπίζεται το προς ανίχνευση αντιγόνο χρωματίζονται καφέ.

16. Κατόπιν τερματίζεται η αντίδραση με επώαση των δειγμάτων με νερό βρύσης.

17. Για την ευκολότερη παρατήρηση του σήματος γίνεται χρώση με αιματοξυλίνη όπου χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων με μπλέ. Η περίσσεια αιματοξυλίνης από τα δείγματα απομακρύνεται με έκπλυση με τρεχούμενο νερό βρύσης.

18. Κάλυψη παρασκευασμάτων με καλυπτρίδες με τη χρήση καλυπτικού υλικού (40% v/v γλυκερόλη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

19. Τέλος τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο Zeiss AxioPan 2 UV/visible (Zeiss, Jena, Germany) σε διαφορετικές μεγεθύνσεις. Κάθε οπτικό πεδίο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων περιελάμβανε περίπου 100 κύτταρα

\* Στην τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας όπου προσδιορίζονται αντιγόνα σε κύτταρα μονιμοποιημένα σε καλυπτρίδες ακολουθείται το παραπάνω πρωτόκολλο ξεκινώντας από το στάδιο της αδρανοποίησης της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Παράλληλα ως διάλυμα ως διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιείται Phosphate Buffered Saline (PBS) αντί TBS.

## **2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU incorporation assay)**

Η Βρωμοδεοξουριδίνη είναι ένα συνθετικό ανάλογο του νουκλεοτιδίου θυμιδίνη. Κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται η ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων στο νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA επομένως και της βρωμοδεοξουριδίνης η οποία προστίθεται εξωγενώς στο μέσο καλλιέργειας και μπορεί να εντοπιστεί με τη χρήση ειδικού αντί αυτού αντισώματος το οποίο φέρει μια φθορίζουσα ομάδα. Έτσι, τα κύτταρα που φέρουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό και ενσωματώνουν την βρωμοδεοξουριδίνη επισημαίνονται και παρατηρούνται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Το ποσοστό των φθορίζοντων πυρήνων καθορίζει και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του υπο μελέτη κυτταρικού πληθυσμού. Αναλυτικότερα ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία στα οποία έχουν προστεθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Στα τρυβλία προστίθεται 2 mL θρεπτικού μέσου (περιλαμβανομένου FBS) ώστε να προκύψουν διάσπαρτες καλλιέργειες.
2. Δύο μέρες αργότερα προστίθεται στις νεοσυντιθέμενες καλλιέργειες βρωμοδεοξουριδίνης, τελικής συγκέντρωσης 50  $\mu$ M. Τα κύτταρα επώάζονται με την βρωμοδεοξουριδίνη για 2 επιπλέον ημέρες με σκοπό την ενσωμάτωση αυτής στους νεοσυντιθέμενους κλώνους DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων.
3. Κατόπιν πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων με τη χρήση 4% (v/v) φορμαλδεΐδης σε PBS για 10 λεπτά
4. Ακολουθούν 2 πλύσεις με 2 mL PBS ανά τρυβλίο και προσθήκη σε αυτά διαλύματος 0,2% (v/v) Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά η οποία έχει ως στόχο την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης.
5. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με 2 mL PBS ανά τρυβλίο και προστίθενται 2 mL ανά τρυβλίο διαλύματος HCl 0,2N σε PBS, για 30 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA.
6. Στο επόμενο βήμα της διαδικασίας, έγιναν 2 πλύσεις με 2 mL ανά τρυβλίο PBS, για 10 λεπτά.
7. Το επόμενο στάδιο περιελάμβανε την κατάληψη των μη ειδικών θέσεων με την προσθήκη 2 mL ανά τρυβλίο 0,5% (w/v) ζελατίνης διαλυτής σε PBS, 3 φορές διαδοχικά με χρόνο επώασης τα 10 λεπτά.
8. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε ολονύχτια επώαση με το αντίσωμα (clone BMC9318, Roche/Sigma, St. Louis, MO, USA) έναντι της βρωμοδεοξουριδίνης σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu$ M σε PBS/ζελατίνη 0,5% (w/v) στους 4°C.
9. Ακολούθησε ένα κύκλος πλύσεων (2 εκπλύσεις με 2 mL ανά τρυβλίο PBS για 10 λεπτά,) και στη συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν για 5 λεπτά με 2,5  $\mu$ g/mL DAPI (διυδροχλωρικό 4,6-διαμιδινο-2-φαινυλυλδολιο).
10. Μετά από δύο τελευταίες πλύσεις με 2 mL ανά τρυβλίο PBS για 10 λεπτά, οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν και σταθεροποιούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση διαλύματος φαινυλεν-διαμίνης 1mg/mL διαλυτής σε 90% (w/v) γλυκερόλη.
11. Οι επισημασμένοι πυρήνες από DAPI φθορίζουν στο μπλέ χρώμα ενώ οι πυρήνες των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται και έχουν δεσμεύσει την δεοξουριδίνη επισημαίνονται με πράσινο.
12. Τέλος τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο Zeiss AxioPlan 2 UV/visible (Zeiss, Jena, Germany) σε μεγέθυνση 20X και 40X. Κάθε οπτικό πεδίο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων περιελάμβανε περίπου 200 κύτταρα

## 2.7 Χρώση για σχετιζόμενη με γήρανση β-γαλακτοσιδάση (SA- β- Gal)

Η χρώση με SA-β-Gal σε κύτταρα και ιστούς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλό του Dimri και των συνεργατών του (Dimri et., al 1995). Πρωτογενή κύτταρα δίσκου NP και AF μονιποιήθηκαν σε καλυπτρίδες. Οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 4% (v/v) φορμαλδεΐδη για 5 λεπτά. Τα κύτταρα πλύθηκαν εκ νέου με PBS και προστέθηκε το διάλυμα αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6.0, χρησιμοποιώντας χρωμογόνο υπόστρωμα (X-gal). Η χρώση γίνεται εμφανής με τον εντοπισμό γαλάζιου ιζήματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 1 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-galactoside, Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride και οι καλυπτρίδες επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C (απουσία CO<sub>2</sub>). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη χρήση μονιμοποιητικού υλικού, κάλυψη των ιστών με καλυπτρίδα και παρατήρηση του σήματος στο οπτικό Zeiss Axiovert 2 UV/visible. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οπτικά πεδία που περιείχαν τουλάχιστον 100 κύτταρα.

## 2.8 Αντισώματα

Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα εξής: anti-biotin [Hyb8] (1:300, ab201341, Abcam), FITC-conjugated anti-BrdU (clone BMC9318, Roche/Sigma, St. Louis, MO, USA)

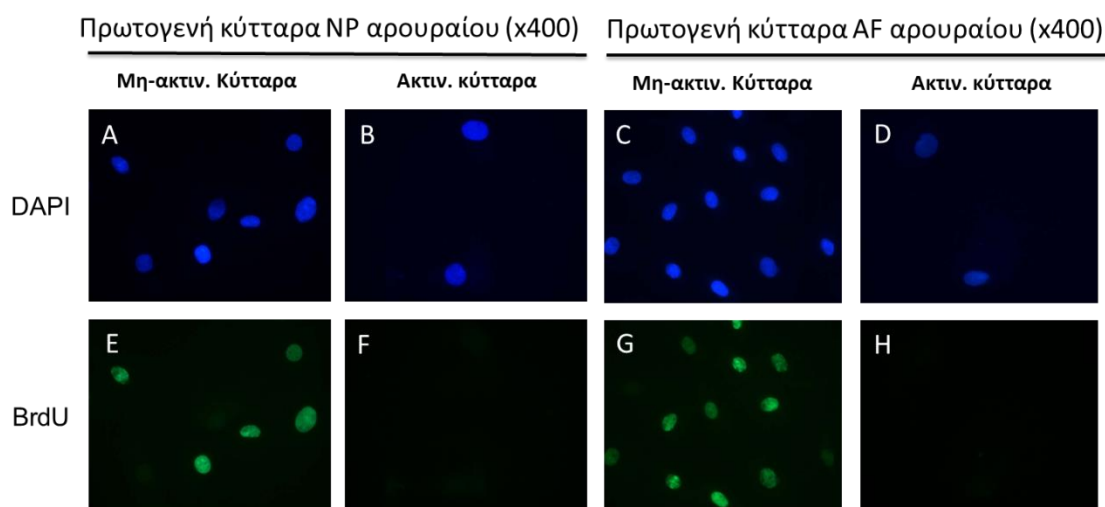
## 2.9 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα στα γραφήματα παρουσιάζονται ως μέση όροι αποτελεσμάτων (±τυπική απόκλιση) από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές με  $p < 0.05$  σύμφωνα με τη δοκιμασία t-Student.

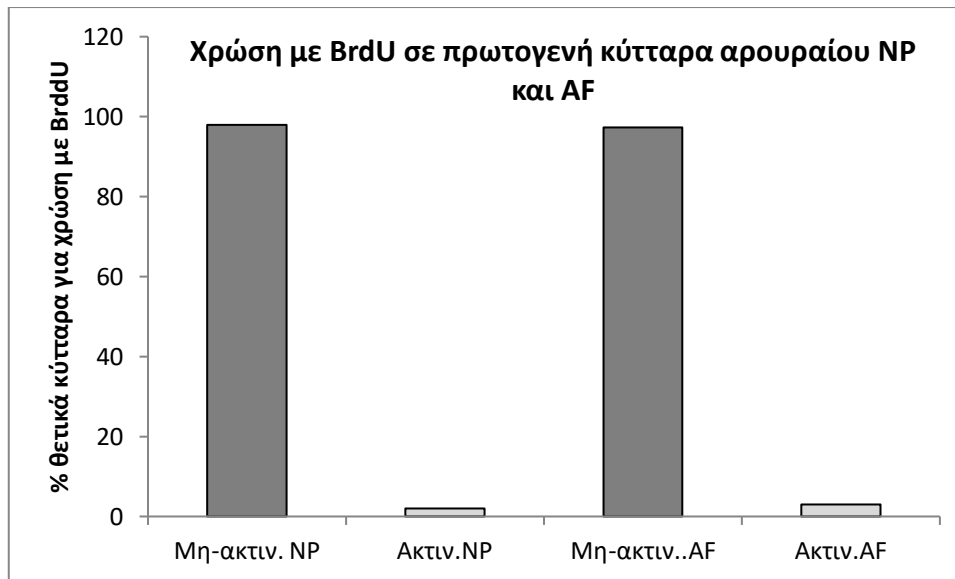
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Προσδιορισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιαστικού δυναμικού με την μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU incorporation assay)

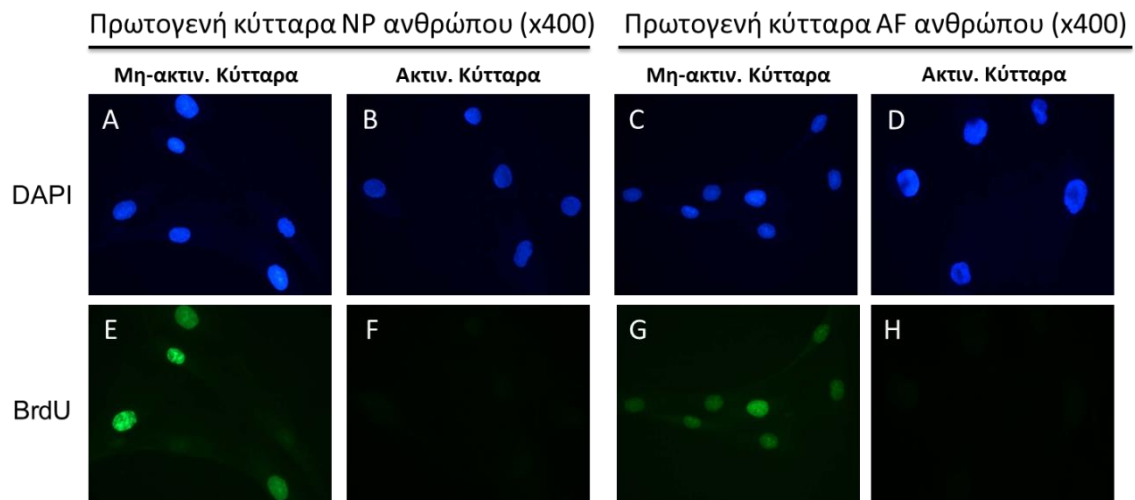
Για να επαχθεί πρόωρη κυτταρική γήρανση επαγόμενη από στρεσογόνο ερέθισμα (stress-induced premature senescence (SIPS)), οι πρωτογενείς κυτταρικές σειρές ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) εκτέθηκαν σε  $\gamma$ -ακτινοβολία. Προκείμενου να ελεγχθεί η αναστολή του κυτταρικού κύκλου η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό της γήρανσης, διεξήχθη ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης του DNA με την μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε DAPI (Εικόνα 11.A-D.), ενώ το νεοσυντιθέμενο DNA είναι σημασμένο με πράσινο φθορίζον χρώμα (Εικόνα 10.E,G). Τα πρωτογενή κύτταρα αρουραίου AF και NP όπου εκτέθηκαν στη  $\gamma$ -ακτινοβολία παρουσίασαν μηδενική σύνθεση DNA (Εικόνα 11.F,H.) σε σχέση με τα μη-ακτινοβολιμένα κύτταρα όπου δεν δέχθηκαν το ερέθισμα (Εικόνα 11.E,G.). Κατά αναλογία και τα πρωτογενή κύτταρα ανθρώπου AF και NP όπου εκτέθηκαν στη  $\gamma$ -ακτινοβολία παρουσίασαν μηδενικό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Εικόνα 12.F,H) σε σχέση με τα μη-ακτινοβολιμένα κύτταρα (Εικόνα 12.E,G.).



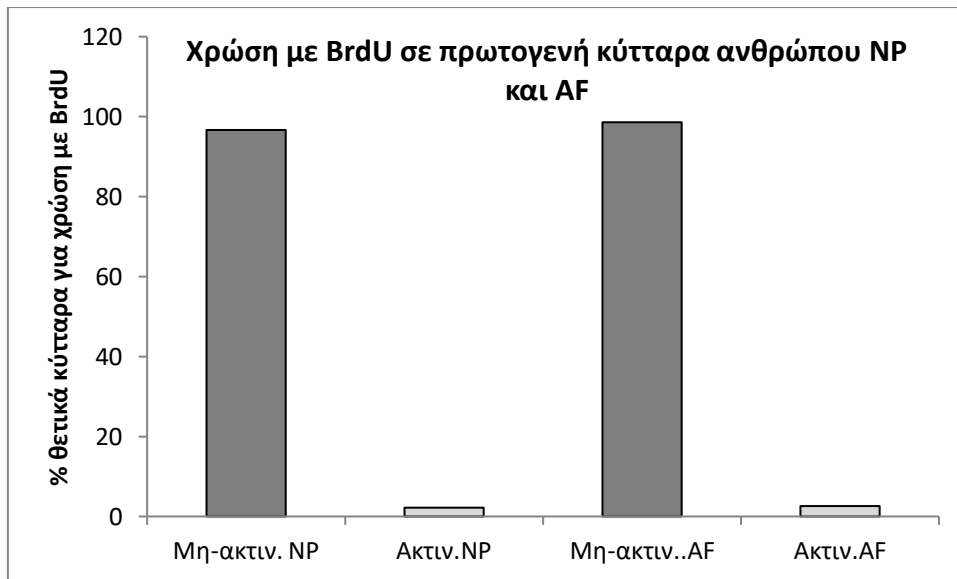
**Εικόνα 11.** Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης σε πρωτογενή ακτινοβολημένα και μη-ακτινοβολημένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) μεσοσπονδύλιου δίκου απομονωμένων από αρουραίου.



**Γράφημα 1.** Ποσοτικός προσδιορισμός του πολλαπλασιαστικού δυναμικού σε ακτινοβολημένα και μη-ακτινοβολημένα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) αρουραίου με την χρώση BrdU (Ακτιν.AF/NP: Ακτινοβολημένα κύτταρα AF/NP, Μη-ακτιν. AF/NP: Μη-ακτινοβολημένα κύτταρα AF/NP).



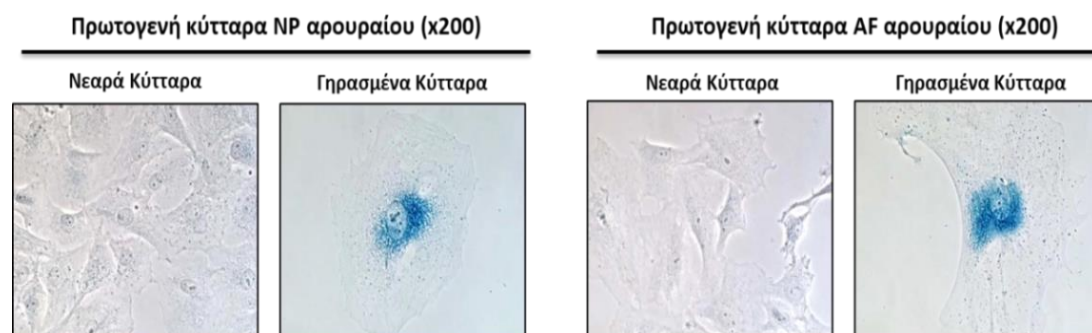
**Εικόνα 12.** Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο ενσωμάτωσης Βρωμοδεοξουριδίνης σε πρωτογενή ακτινοβολημένα και μη-ακτινοβολημένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) μεσοσπονδύλιου δίκου απομονωμένων από άνθρωπο.



**Γράφημα 2.** Ποσοτικός προσδιορισμός του πολλαπλασιαστικού δυναμικού σε ακτινοβολημένα και μη-ακτινοβολημένα κυττάρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) ανθρώπου με την χρώση BrdU (Ακτιν.AF/NP: Ακτινοβολημένα κύτταρα AF/NP, Μη-ακτιν. AF/NP: Μη-ακτινοβολημένα κύτταρα AF/NP).

### 3.2 Προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε ιστό και σε πρωτογενείς σειρές του μεσοσπονδύλιου δίσκου αρουραίου.

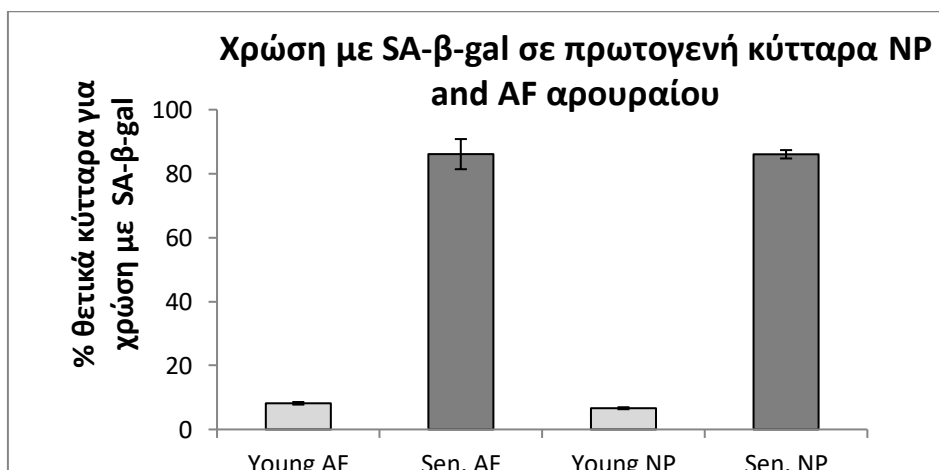
Στην παρούσα μελέτη για την ταυτοποίηση της γήρανσης σε ιστό αλλά και σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές (NP,AF) μεσοσπονδύλιου δίσκου φυσιολογικώς και γηρασμένων αρουραίων χρησιμοποιήθηκε η προσφάτως ανεπτυγμένη χρώση βασιζόμενη στο αντιδραστήριο GL13 καθώς η κλασική ενζυμική μέθοδος SA-β-Gal (β-galactosidase) μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά.



**Εικόνα 13.** Χρώση με SA-β-gal σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από αρουραίο.

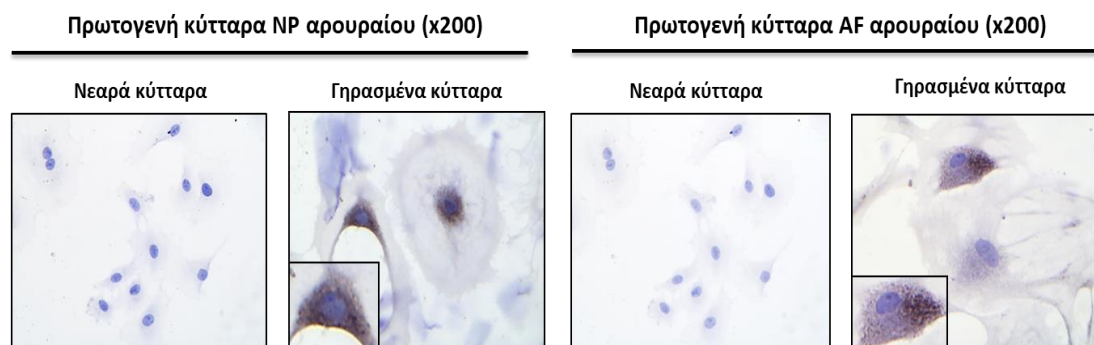
Οι δύο χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε πρωτογενείς σειρές κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και του ινώδους δακτυλίου (AF) απομονωμένων από

μεσοσπινδύλιο δίσκο αρουραίου. Το X-gal όπως και το GL13 ανέπτυξαν τις χαρακτηριστικές τους χρώσεις σημαντικώς αυξημένες στις γηρασμένες κυτταρικές καλλιέργειες σε σχέση με τις νεαρές. Πιο συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τη χρώση με SA-β-Gal (24 h), θετικά ήταν το 86,04 % +/-1,31 (p=0.05) και 86,09% +/- 4,71 (p=0.05) των γηρασμένων κυττάρων NP και AF αντίστοιχα. Αντίθετα, τα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης ήταν αισθητά μειωμένα στα νεαρά κύτταρα, αναλυτικότερα τα νεαρά AF ήταν γηρασμένα σε ποσοστό 8,17 % +/-0,40, (p=0.05) ενώ τα NP σε 6,63% +/- 0,37 (p=0.05).



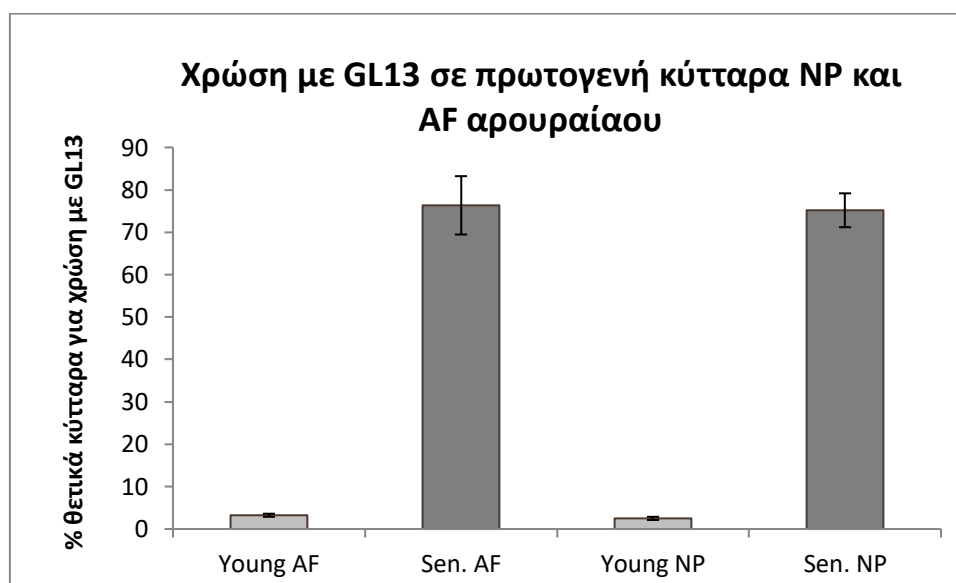
**Γράφημα 3.** Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) αρουραίου με την χρώση SA-β-gal (Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Κατά αντιστοιχία, το ποσοστό των ανιχνεύσιμων γηρασμένων κυττάρων στις νεαρές καλλιέργειες με τη χρώση GL13 ήταν επίσης αρκετά χαμηλά. Τα νεαρά NP παρουσίασαν γήρανση σε ποσοστό 2,50% +/- 0,37 (p=0.05) ενώ τα AF 3,25% +/- 0,36, (p=0.05) αντίθετα, το αντιδραστήριο GL13 απέδωσε τη χαρακτηριστική κοκκώδη σκουρα καφέ χρώση του στο 75,18 % +/-3,99, (p=0.05) των NP 76,34% +/-6, (p=0.05) των AF κυττάρων που είχαν δεχθεί ακτινοβολήση.



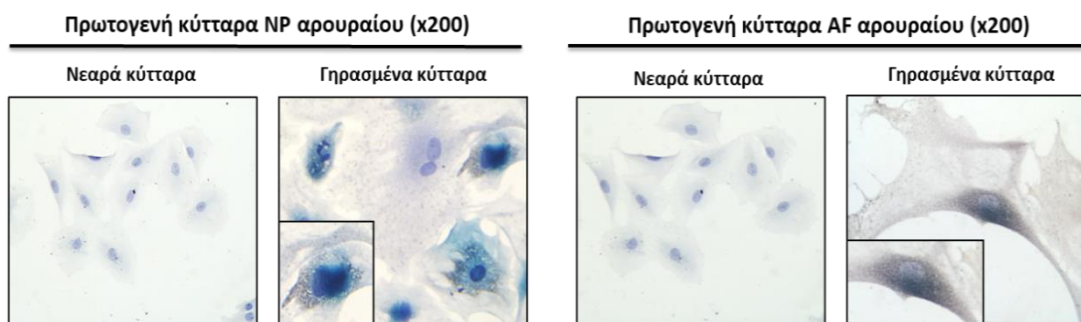


**Εικόνα 14.** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από αρουραίο.

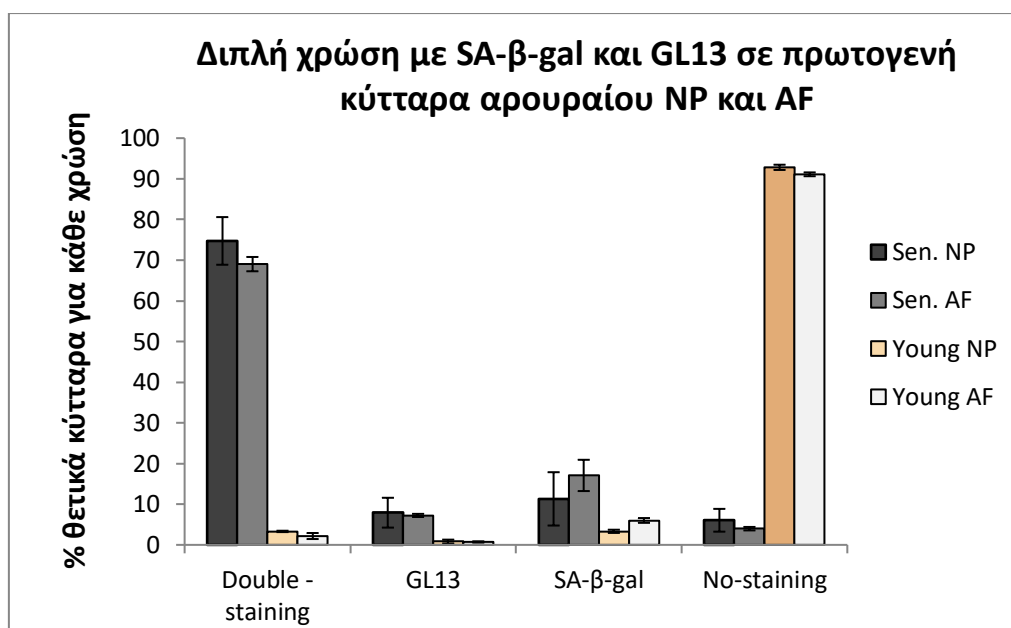


**Γράφημα 4.** Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε νεαρά και γηρασμένα κυττάρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) αρουραίου με την χρώση GL13 (Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Τέλος αξιοσημείωτα είναι τα ποσοστά των κυττάρων που είχαν σημανθεί και με τις δύο τεχνικές. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι το 74,73 %  $\pm$  5,8, ( $p=0.05$ ) και 69,02  $\pm$  1,75 ( $p=0.05$ ) των NP και AF γηρασμένων κυττάρων παρουσίαζαν διπλή χρώση, ενώ μόνον το 3,30  $\pm$  0,16 ( $p=0.05$ ) και 2,17%  $\pm$  0,74 ( $p=0.05$ ) των νεαρών κυττάρων AF και NP αντίστοιχα παρουσίασαν συν-χρώση. Τα κύτταρα όπου παρουσίασαν διπλή χρώση ανέπτυξαν τόσο το καφέ κοκκώδες χαρακτηριστικό σήμα του GL13 προσδιορίζοντας την λιποφουσκίνη, όσο και το χαρακτηριστικό περιπυρηνικό γαλάζιο σήμα από την δράση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Κατά την διπλή χρώση, η χρώση με SA-β-gal εντοπίζεται συνήθως εγγύτερα στον πυρήνα, ενώ εκείνη με το χημικό αντιδραστήριο GL13 παρουσίασε διάχυτο κυτταροπλασματικό σήμα ελαφρώς εκτοπισμένο προς την περιφέρεια του κυτταροπλάσματος. Ως εκ τούτου τα κύτταρα όπου ήταν θετικά και για τις δύο χρώσεις παρουσίασαν ένα χρωματικό συνδυασμό των ανωτέρω χρώσεων αποδίδοντας καφε-πράσινο κοκκώδες περιπυρηνικό σήμα.



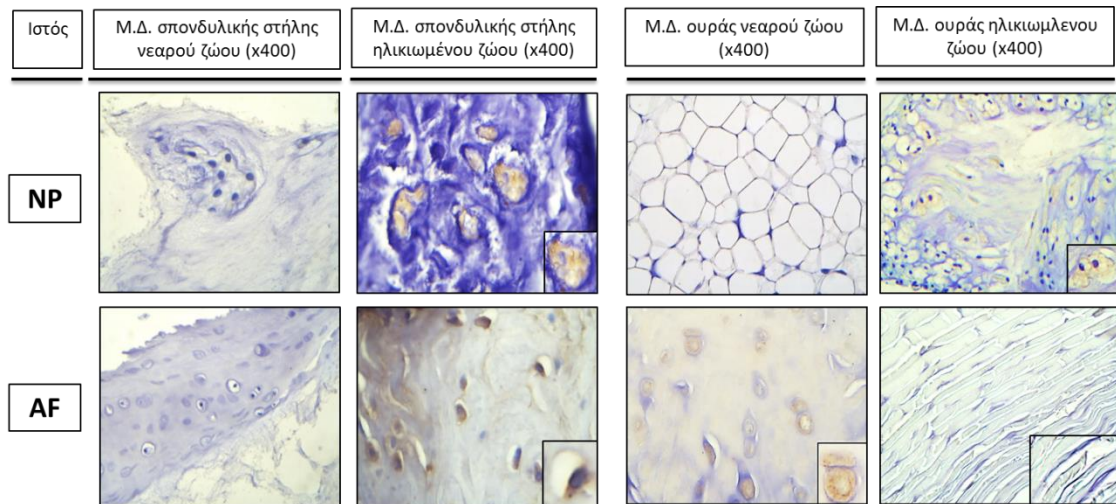
**Εικόνα 15.** Σύν-χρώση με SA-β-gal και το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από αρουραίο.



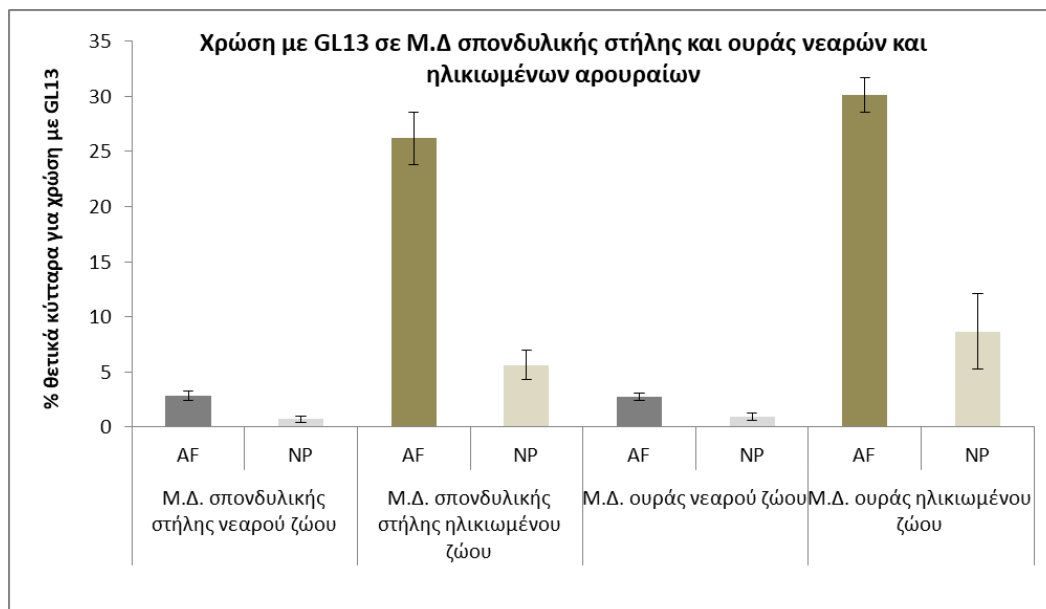
**Γράφημα 5.** Προσδιορισμός επιπέδων γηρασμένων κυττάρων με διπλή χρώση για SA-β-gal και GL13. Double staining: Κύτταρα θετικά ως προς τις δύο χρώσεις, GL13: Κύτταρα θετικά μόνο για τη χρώση με GL13, SA-β-gal: Κύτταρα θετικά μόνο για την χρώση SA-β-gal, No staining: Κύτταρα αρνητικά ως προς τις δύο χρώσεις (Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Το αντιδραστήριο GL13 ανέπτυξε το σκούρο καφέ, κοκκιώδες, περιπυρηνικό αλλά και κυτταροπλασματικό σήμα στους μεσοσπονδύλιους δίσκους οι οποίοι απομονώθηκαν από την σπονδυλική στήλη ηλικιωμένων ζώων. Παρατηρήθηκε ότι το 26,21% +/- 2,38 (p=0.05) των AF κυττάρων ήταν γηρασμένα, ενώ στον ίδιο ιστό τα κύτταρα του NP γήρασαν σε ποσοστό 5,61% +/- 1,34 (p=0.05). Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα γήρανσης παρατηρήθηκαν στους αντίστοιχους ιστούς νεαρών ζώων. Ο ινώδης δακτύλιος παρουσίασε μόλις το 2,85% +/- 0,4 (p=0.05) των κυττάρων του γηρασμένα, ενώ τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα σε ποσοστό 0,7% +/- 0,29 (p=0.05). Η ανοσοϊστοχημική χρώση GL13 διεξήθη και σε μεσοσπονδύλιους δίσκους

απομονωμένους από την ουρά ηλικιωμένων και νεαρών αρουραίων. Τα ηλικιωμένα ζώα εμφάνισαν υψηλά ποσοστά γήρανσης με τα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου να εμφανίζουν τα υψηλότερα (30,13% +/- 1,6 (p=0.05) σε σχέση με τα κύτταρα του πυκτοειδούς πυρήνα (8,67% +/- 3,39 (p=0.05)). Οι δίσκοι που απομονώθηκαν από τις ουρές νεαρών ζώων εμφάνισαν και σημαντικά χαμηλά ποσοστά γήρανσης τόσο στον ινώδη δακτύλιο όσο και στον πυκτοειδή πυρήνα εμφανίζοντας ποσοστά γήρανσης 2,78% +/- 0,33 (p=0.05) και 0,97% +/- 0,36 (p=0.05) αντίστοιχα.



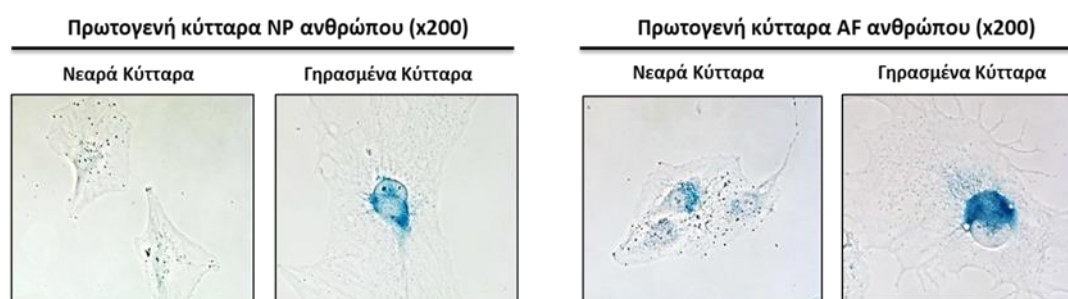
**Εικόνα 16.** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε ιστό ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) μεσοσπονδύλιων δίσκων σπονδυλικής στήλης και ουράς απομονωμένων από νεαρούς και ηλικιωμένους αρουραίους.



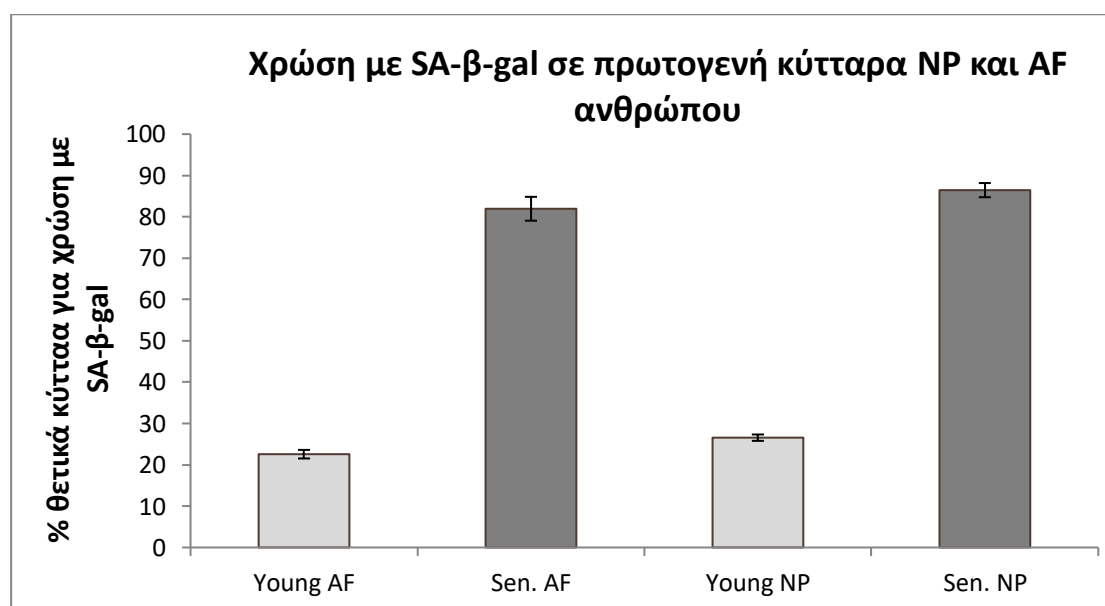
**Γράφημα 6.** Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε ιστούς μεσοσπονδύλιων δίσκων (Μ.Δ) απομονωμένων από σπονδυλική στήλη και ουρά νεαρών και ηλικιωμένων ζώων. Παρουσιάζονται επιμέρους ποσοτικά δεδομένα σε κάθε περίπτωση για τον ινώδη δακτύλιο (AF) και τον πηκτοειδή πυρήνα (NP).

### 3.3 Προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε ιστό και σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές του μεσοσποδνύλιου δίσκου ανθρώπου.

Οι χρώσεις SA-β-gal και GL13 πραγματοποιήθηκαν και σε πρωτογενείς ανθρώπινες κυτταρικές σειρές δίσκου NP και AF αλλά και σε βιοπτικά ιστοτεμάχια παθολογικών και φυσιολογικών μεσοσπονδύλιων δίσκων. Το X-gal όπως και το GL13 ανέπτυξαν τις χαρακτηριστικές τους χρώσεις σημαντικώς αυξημένα στις γηρασμένες κυτταρικές καλλιέργειες σε σχέση με τις νεαρές. Ειδικότερα, σε ότι αφορά τη χρώση με SA-β-Gal (24 h), θετικά ήταν το 86,45 % +/-1,71 (p=0.05) και 81,95 +/- 2,88 (p=0.05) των γηρασμένων κυττάρων NP και AF αντίστοιχα. Αντίθετα, τα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης ήταν αισθητά μειωμένα στα νεαρά κύτταρα, αναλυτικότερα τα νεαρά AF ήταν γηρασμένα σε ποσοστό 22,57% +/-1,03 (p=0.05) ενώ τα NP σε 26,57% +/- 0,76 (p=0.05).



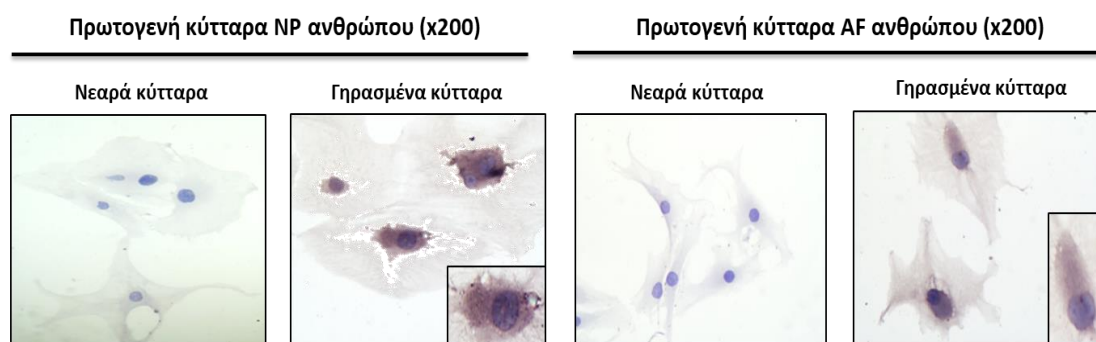
**Εικόνα 17.** Χρώση με SA-β-gal σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από άνθρωπο.



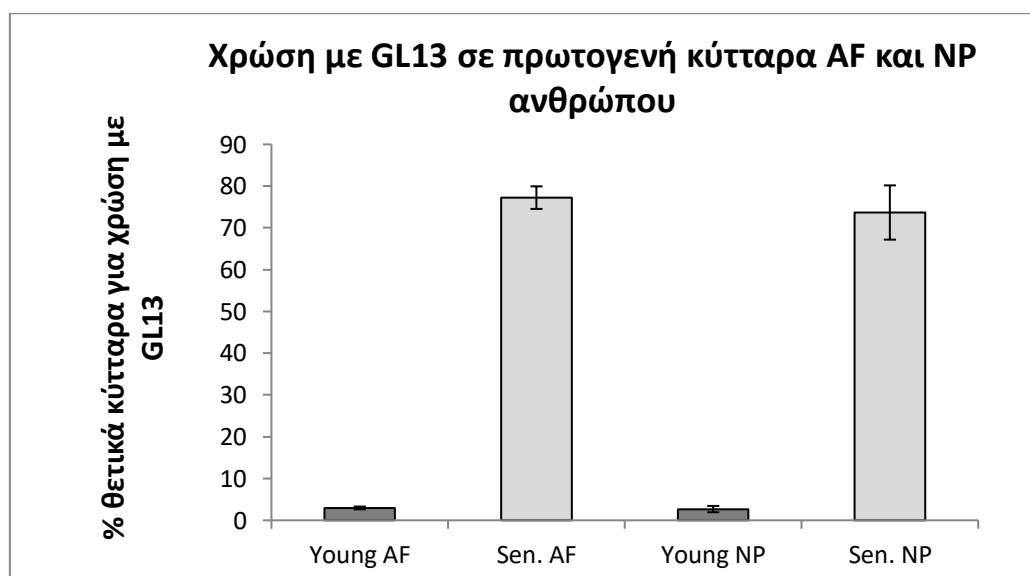
**Γράφημα 7.** Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF)

αρουραίου με την χρώση SA-β-gal (Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Κατά αναλογία, το ποσοστό των ανιχνεύσιμων γηρασμένων κυττάρων στις νεαρές καλλιέργειες με τη χρώση GL13 ήταν σημαντικά χαμηλά. Τα νεαρά NP παρουσίασαν γήρανση σε ποσοστό 2,68% +/- 0,75 (p=0.05) ενώ τα AF 2,96% +/- 0,32, (p=0.05) αντίθετα, το αντιδραστήριο GL13 απέδωσε τη χαρακτηριστική κοκκώδη σκουρα καφέ χρώση του στο 73,68 % +/-6,49, (p=0.05) των NP 77,25% +/-2,70 (p=0.05) των AF κυττάρων που είχαν δεχθεί ακτινοβόληση.

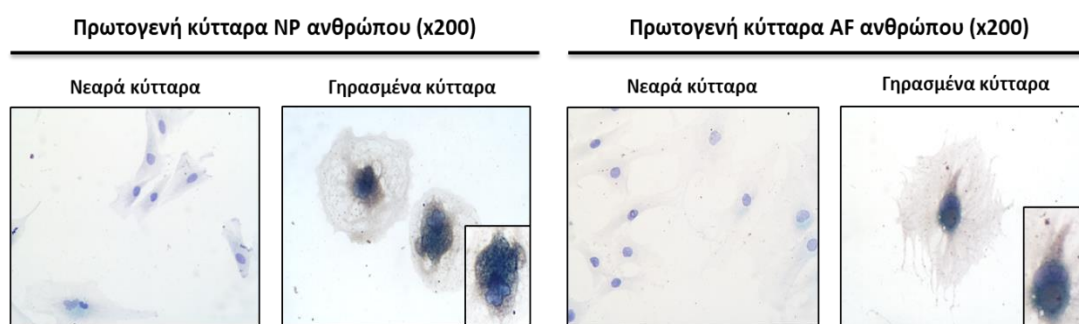


**Εικόνα 18.** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από άνθρωπο.

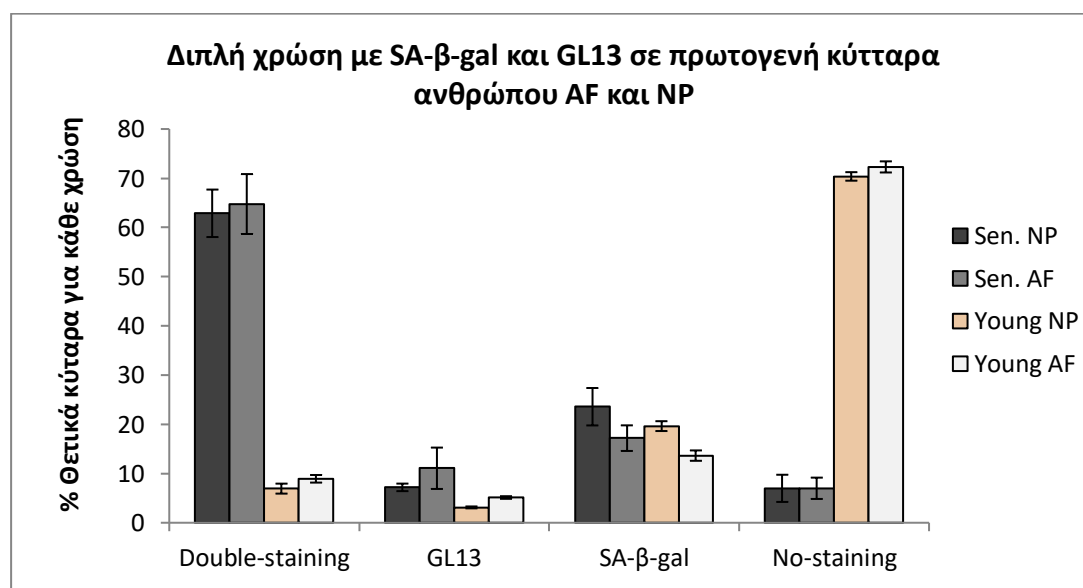


**Γράφημα 8.** Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής γήρανσης σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) αρουραίου με την χρώση GL13 (Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα ποσοστά των κυττάρων που είχαν σημανθεί και με τις δύο τεχνικές ταυτόχρονα. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι το 62,87% +/- 7,1 (p=0.05) και 64,76 +/- 6,08 (p=0.05) των NP και AF γηρασμένων κυττάρων παρουσίαζαν διπλή χρώση, ενώ μόνον το 8,93 +/- 0,77 (p=0.05) και 6,93% +/- 1,01 (p=0.05) των νεαρών κυττάρων AF και NP αντίστοιχα παρουσίασαν συν-χρώση. Τα κύτταρα όπου παρουσίασαν διπλή χρώση ανέπτυξαν τόσο το καφέ κοκκώδες χαρακτηριστικό σήμα του GL13 προσδιορίζοντας την λιποφουσκίνη, όσο και το χαρακτηριστικό περιπυρηνικό γαλάζιο σήμα από την δράση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Κατά την διπλή χρώση, η χρώση με SA-β-gal εντοπίζεται συνήθως εγγύτερα στον πυρήνα, ενώ εκείνη με το χημικό αντιδραστήριο GL13 παρουσίασε διάχυτο κυταροπλασματικό σήμα ελαφρώς εκτοπισμένο προς την περιφέρεια του κυτταροπλάσματος. Ως εκ τούτου τα κύτταρα όπου ήταν θετικά και για τις δύο χρώσεις παρουσίασαν ένα χρωματικό συνδυασμό των ανωτέρω χρώσεων αποδίδοντας καφε-πράσινο κοκκώδες περιπυρηνικό σήμα.



**Εικόνα 19.** Σύν-χρώση με SA-β-gal και το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε πρωτογενή νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ινώδους δακτυλίου (AF) και πηκτοειδούς πυρήνα (NP) απομονωμένων από άνθρωπο.

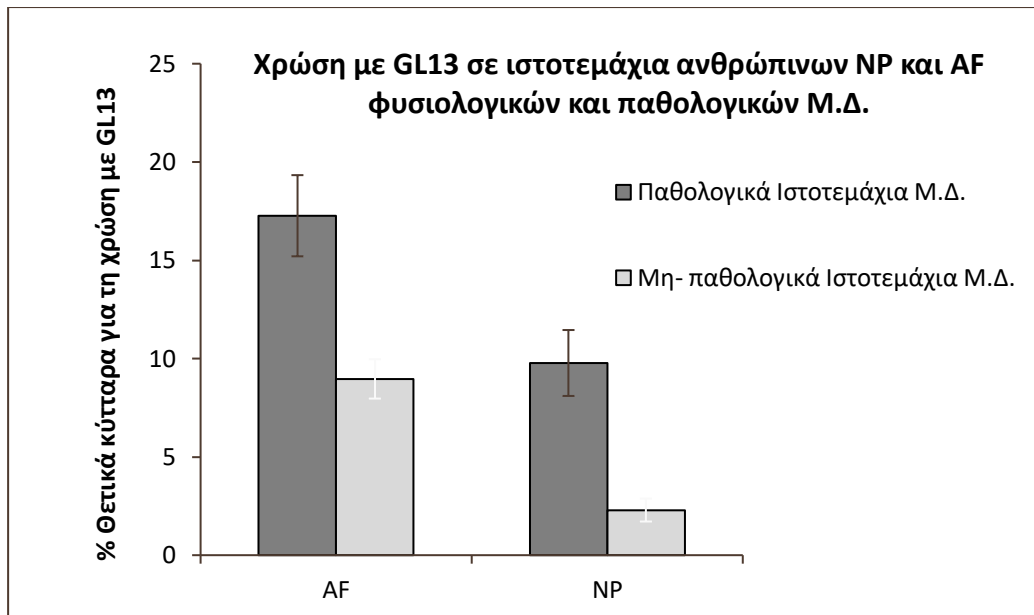


**Γράφημα 9.** Προσδιορισμός επιπέδων γηρασμένων κυττάρων με διπλή χρώση για SA-β-gal και GL13. Double staining: Κύτταρα θετικά ως προς τις δύο χρώσεις, GL13: Κύτταρα θετικά μόνο για τη χρώση με GL13, SA-β-gal: Κύτταρα θετικά μόνο για την χρώση SA-β-gal, No staining: Κύτταρα αρνητικά ως προς τις δύο χρώσεις((Sen.AF/NP: Γηρασμένα κύτταρα AF/NP, Young AF/NP: Νεαρά κύτταρα AF/NP).

Στην παρούσα εργασία, επίσης, μελετήθηκε η κυτταρική γήρανση σε 12 ιστοτεμάχια βιοψιας, 6 εκ των οποίων ήταν παθολογικά ενώ 6 ήταν μη παθολογικά, ανθρώπινων μεσοσπονδύλιων δίσκων προσδιορίζοντας την παρουσία λιποφουσκίνης με το αντιδραστήριο GL13. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν αυξημένη παρουσία γηρασμένων κυττάρων τόσο στα παθολογικά όσο και στα μη παθολογικά δείγματα στα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου και ελαφρώς μειωμένη στα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα. Συγκεκριμένα, στα παθολογικά δείγματα το 17,26% +/- 2,06 (p=0.05) των AF κύτταρων και το 9,77% +/- 1,67 (p=0.05) των NP κυττάρων ανέπτυξαν το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα της χρώσης, ενώ θετικά ως προς την παρουσία γήρανσης ήταν το 8,96% +/- 1 (p=0.05) των AF κύτταρων και το 2,29 +/- 0,58 (p=0.05) των NP κυττάρων των μη- παθολογικών δειγμάτων.



**Εικόνα 20.** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 σε παθολογικά (A) και μη-παθολογικά (B) τμήματα μεσοσπονδύλιων δίσκων απομονωμένων από άνθρωπο.



**Γράφημα 10.** Προσδιορισμός των επιπέδων κυτταρικής γήρανσης σε ιστοτεμάχια πηκτοειδούς πυρήνα (NP) και ινώδους δακτυλίου (AF) ανθρώπινων παθολογικών και μη μεσοσπονδύλιων δίσκων (Μ.Δ.) με χρώση GL13.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν τα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης σε πρωτογενή κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου (NP, AF) ανθρώπου και αρουραίου καθώς και σε ιστό μεσοσπονδύλιου δίσκου αρουραίων και σε ιστοτεμάχια από ανθρώπινο βιοπτικό υλικό. Για πρώτη φορά παρουσιάζονται δεδομένα σχετικά με τα επιπέδα γήρανσης στο συγκεκριμένο ιστό χρησιμοποιώντας το χημικό αντιδραστήριο GL13. Σε κάθε περίπτωση μελετήθηκαν τα επιμέρους ποσοστά γήρανσης στις δύο βασικές δομές του δίσκου, τον ινώδη δακτύλιο (AF) και τον πηκτοειδή πυρήνα (NP).

Η κυτταρική γήρανση συνιστά έναν από τους βασικούς συντελεστές εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου οδηγώντας σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων με την οσφυαλγία να αποτελεί την κορωνίδα αυτών. Δεδομένης της σημαντικότητας του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης στη πρόοδο οσφυαλγίας και ευρύτερα των ηλικιοεξαρτόμενων παθήσεων όπου σχετίζονται με την διαταραχή της ομοιόστασης του μεσοσπονδύλιου δίσκου κρίνεται σημαντικός ο προσδιορισμός των γηρασμένων κυττάρων χρησιμοποιώντας αξιόπιστους βιοδείκτες.

Στη διεθνή βιβλιογραφία το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης στο μεσοσπονδύλιο δίσκο έχει μελετηθεί με τη χρήση της χρώσης SA-β-gal και τον προσδιορισμό των επιπέδων των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p16 και p21. Αξιοσημείωτη όμως είναι η εξαιρετική διακύμανση που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μεταξύ τους αλλά και τα επαυξημένα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης που αποδίδουν. Χρησιμοποιώντας τη χρώση SA-β-gal η Roberts και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν τη γήρανση στα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα από δίσκους ασθενών που υπέφεραν από κοίλη σε ποσοστό 13% (Roberts et., al 2006), ενώ ο Kim και η ερευνητική ομάδα του ανέφεραν κατά μέσο όρο 42% γηρασμένων κυττάρων σε σε τμήματα του πηκτοειδούς πυρήνα δίσκου από ασθενείς που υπέφεραν από κοίλη (Kim et., al 2009). Επιπλέον, σε παρόμοια μελέτη χρησιμοποιώντας την ίδια χρώση (Gruber et. ,al 2007) αναφέρθηκαν επίπεδα γήρανσης της τάξεως 30% στα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου (AF) εκφυλισμένων μεσοσπονδύλιων δίσκων, ένα ποσοστό που ήταν σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το 5% γήρανσης που εντόπισαν στον ινώδη δακτύλιο η Roberts και οι συνεργάτες του. Οι διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού της κυτταρικής γήρανσης, το μέγεθος των δειγμάτων και τα κριτήρια ταυτοποίησης των θετικών για το δείκτη κυττάρων πιθανώς είναι υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών μελετών που πραγματεύονται το συγκεκριμένο φαινόμενο. Παρά τις αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ των μελετών το συνολικό ποσοστό της γήρανσης στα κύτταρα του δίσκου φαίνεται πως συντελεί στην προοδευτική εκφύλιση του ιστού. Επίσης και άλλοι δείκτες της κυτταρικής γήρανσης όπως η ενεργοποίηση των p16INK4a και p53, η βράγχυση του μήκους των τελομερών (Kim et., al 2009; Le

MCL et., al 2007), και η έκφραση caveolin-1 εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα σε μελέτες όπου χρησιμοποιούνται εκφυλισμένοι ανθρώπινοι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι (Heathfield SK et., al 2008)

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα γήρανσης τόσο στις κυτταρικές σειρές όσο και στους μεσοσπονδύλιο δίσκου απομονωμένων από αρουραίους ήταν σημαντικά μειωμένα χρησιμοποιώντας τη χρώση GL13 σε σχέση με εκείνα με τη χρώση SA-β-gal (συγκρίνοντας με την διεθνή βιβλιογραφία). Η μείωση αυτή μπορεί να ερμηνευθεί με βάση την αρχή κάθε μεθόδου. Η χρώση SA-β-gal αποτελεί μια ενζυμική αντίδραση η οποία μπορεί να αποδίδει ψευδή αποτελέσματα στις περιπτώσεις όπου εξαντληθεί το ενζυμικό υποστρώμα X-Gal ή διακοπεί πρόωρα η αντίδραση. Χαρακτηριστικά είναι τα μειωμένα ποσοστά γήρανσης σε πρωτογενή κύτταρα AF και NP αρουραίων τα οποία επώαστηκαν με το υπόστρωμα για 6 ώρες και τα επαυξημένα ποσοστά όταν τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες αποδίδοντας μεγάλο αριθμό ψευδώς θετικών γηρασμένων κυττάρων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Στον αντίποδα, το αντιδραστήριο GL13 αναγνωρίζει την λιποφουσκίνη, η οποία είναι αποτέλεσμα του διαταραγμένου μεταβολισμού του κυττάρου αποδίδοντας απολύτως αληθή θετικά αποτελέσματα ξεπερνώντας τα προβλήματα που μπορεί να υπάρξουν από τη χρήση της χρώσης SA-β-gal. Ο προσδιορισμός της γίνεται ανοσοχημικά, δεν είναι εξαρτώμενος από κάποιο ένζυμο και τον χρόνο. Ως εκ τούτου, η ποσοστιαία διαφορά των γηρασμένων κυττάρων μεταξύ των δύο μεθόδων μπορεί να ερμηνευθεί από τον χρόνο επώασης των κυτταρικών σειρών με το ενζυμικό υπόστρωμα X-gal. Δεδομένου ότι τόσο β-γαλακτοσιδάση όσο και η λιποφουσκίνη συσσωρεύονται εντός των λυσοσωμάτων με την πρόοδο της γήρανσης θα ήταν αναμενόμενο να υπάρχει συνεντοπισμός τους σε κάθε γηρασμένο κύτταρο. Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα της μελέτης στις κυτταρικές σειρές όπου μελετήθηκαν υπήρξαν μεγάλα ποσοστά κύτταρων όπου συν-εντοπίστηκαν οι δύο χρώσεις και κύτταρα όπου είχαν σημειωθεί μόνο για τη μια εκ των δύο χρώσεων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνευθεί με τη χρονική παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης αλλά και την συσσώρευση της λιποφουσκίνης εντός των λυσοσωμάτων. Παρα το ότι, ένα από τα πρώτα γεγονότα που συμβαίνει όταν το κύτταρο γηράσκει είναι η διαταραχή του μεταβολισμού του, η παραγωγή λιποφουσκίνης τόσο εντός όσο και εκτός λυσοσωμάτων φαίνεται να καθυστερεί σε σχέση με τη παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Λαμβάνοντας αυτό υπόψιν, η χρώση SA-β-gal πιθανώς ανγνωρίζει γηρασμένα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο γήρανσης, «early senescense», ενώ το αντιδραστήριο GL13 κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε βαθιά γήρανση, «deep senescense» και έχουν ένα πλήρως διαταραγμένο μεταβολικό προφίλ ικανό να οδηγήσει στην παραγωγή λιποφουσκίνης.

Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν τη τάση να δημιουργούν κυτταρικές ομάδες-συσσωματώματα τα οποία στη διεθνή βιβλιογραφία καλούνται «cell clusters», στους ιστούς μεσοσπονδύλιων δίσκων με κήλη (Kim et., al 2009; Le MCL et., al 2007). Τα

κυτταρικά συσσωματώματα εντοπίζονται κυρίως στον πηκτοειδή πυρήνα και στο εσωτερικό τμήμα του ινώδους δακτυλίου, όπου συμβαίνουν σημαντικές ιστοπαθολογικές αλλαγές (Johnson WE et., al 2001; Sharp CA et.,al 2009). Τα ανθρώπινα παθολογικά ιστοτεμάχια μεσοσπονδύλιων δίσκων όπου χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξαν εκτεταμένη παρουσία κυτταρικών συσσωμάτων αποτελούμενων από γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη-παθολογικά ιστοτεμάχια. Επίσης, στους ιστούς μεσοσπονδύλιων δίσκων απομονωμένων από ηλικιωμένους-φυσιολογικά-αρουραίους παρατηρήθηκαν κυτταρικά συσσωματώματα γηρασμένων κυττάρων στον πηκτοειδή πυρήνα αλλά και το εσωτερικό τμήμα του ινώδους δακτυλίου.

Στο σύνολο των πειραμάτων όπου διεξήχθησαν σε ιστούς και ιστοτεμάχια παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης, προσδιοριζόμενα με βάση το χημικό αντιδραστήριο GL13, στον ινώδη δακτύλιο σε σχέση με τον πηκτοειδή πυρήνα. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνευθεί λαμβάνοντας υπόψη την δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ο ινώδης δακτύλιος είναι το τμήμα του δίσκου όπου έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον και δέχεται τα περισσότερα ερεθίσματα με πρώτο και κύριο την μηχανική πίεση. Το μηχανικό στρες όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.5.4 αποτελεί παράγοντα επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης. Επιπροσθέτως, τα πειράματα με τη χρώση GL13 ανέδειξαν την παρουσία γηρασμένων κυττάρων σε συγκεκριμένες περιοχές του ινώδους δακτυλίου. Ειδικότερα, στους μεσοσπονδύλιους δίσκους που απομονώθηκαν από τις ουρές των ζώων οι περιοχές αυτές πιθανώς είναι εκείνες που δέχονται τα μηχανικά ερεθίσματα κατά την κίνηση της ουράς του ζώου. Κατά αντιστοιχία και στην σπονδυλική στήλη παρουσιάστηκε το ίδιο μοτίβο γήρανσης με τις περιοχές του δίσκου που δέχονται το μεγαλύτερο μηχανικό στρες να παρουσιάζουν γηρασμένα κύτταρα.

Συνοψίζοντας, με βάση τα αποτελέσματα και τις παρατηρήσεις της παρούσας εργασίας, τα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης τόσο στις πρωτογενείς κυτταρικές σειρές όσο και στους ιστούς μεσοσπονδύλιων δίσκων χρησιμοποιώντας το χημικό αντιδραστήριο GL13 είναι αισθητά μειωμένα σε σχέση με εκείνα που παρατίθενται στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης στους ιστούς όπου χρησιμοποιήθηκαν, εντοπίστηκαν κυρίως στο τμήμα του ινώδους δακτυλίου και σε συγκεκριμένες περιοχές του όπου δέχονται τα ισχυρότερα μηχανικά ερεθίσματα. Στα παθολογικά ιστοτεμάχια ανθρώπινου βιοπτικού υλικού παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά γήρανσης σε σχέση με τα μη-παθολογικά, μια παρατήρηση που συνδέει ευθέως το φαινόμενο της γήρανσης των κυττάρων του δίσκου με παθολογικές καταστάσεις. Το σύνολο των αποτελεσμάτων υποστηρίζει την ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων όπου μπορεί να φέρουν λυσοσώματα που δεν συσσωρεύουν λιποφουσκίνη, ειδικά κατά τα πρώτα στάδια της διαδικασίας της γήρανσης, αλλά και κύτταρα αρνητικά ως προς τη παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επομένως κρίνεται ως επιτακτική η ανάγκη χρήσης

και των δύο δεικτών γήρανσης για την πλησιέστερη ποσοστιαία αναγνώριση των γηρασμένων κυττάρων σε ιστούς και κυτταρικές καλλιέργειες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*, 15(8), 978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
2. An, H. S., & Masuda, K. (2006). Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 88 Suppl 2, 88–94. <https://doi.org/10.2106/JBJS.E.01272>
3. Atkins, K., Dasgupta, A., Chen, K. H., Mewburn, J., & Archer, S. L. (2016). The role of Drp1 adaptor proteins MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission: implications for human disease. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(21), 1861–1874. <https://doi.org/10.1042/CS20160030>
4. Battié MC, Videman T, Kaprio J, et al. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J.* 2009;9(1):47-59. doi:10.1016/j.spinee.2008.11.011
5. Battié, M. C., Ortega-Alonso, A., Niemelainen, R., Gill, K., Levalahti, E., Videman, T., & Kaprio, J. (2014). Lumbar spinal stenosis is a highly genetic condition partly mediated by disc degeneration. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(12), 3505–3510. <https://doi.org/10.1002/art.38823>
6. Benavides, S. H., Monserrat, A. J., Fariña, S., & Porta, E. A. (2002). Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Archives of gerontology and geriatrics*, 34(3), 219–231. [https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(01\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(01)00223-0)
7. Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>
8. Bhattacharjee, M., Miot, S., Gorecka, A., Singha, K., Loparic, M., Dickinson, S., Das, A., Bhavesh, N. S., Ray, A. R., Martin, I., & Ghosh, S. (2012). Oriented lamellar silk fibrous scaffolds to drive cartilage matrix orientation: towards annulus fibrosus tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 8(9), 3313–3325. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.023>
9. Bibby, S. R., & Urban, J. P. (2004). Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 13(8), 695–701. <https://doi.org/10.1007/s00586-003-0616-x>
10. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of life-

span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* (New York, N.Y.), 279(5349), 349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>

11. Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free radical biology & medicine*, 33(5), 611–619. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00959-0)

12. Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>

13. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature medicine*, 22(1), 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>

14. Chu, G., Shi, C., Lin, J., Wang, S., Wang, H., Liu, T., Yang, H., & Li, B. (2018). Biomechanics in Annulus Fibrosus Degeneration and Regeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 1078, 409–420. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2_21)

15. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436(7051), 642. <https://doi.org/10.1038/436642a>

16. Colombier, P., Clouet, J., Hamel, O., Lescaudron, L., & Guicheux, J. (2014). The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration. *Joint bone spine*, 81(2), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.07.012>

17. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

18. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

19. d'Adda di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>

20. de Lange T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual review of genetics*, 52, 223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>

21. Debaq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>

22. Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M. F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F. A., Saba-El-Leil, M. K., Meloche, S., Saad, F., Mes-Masson, A. M., & Ferbeyre, G. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes & development*, 27(8), 900–915. <https://doi.org/10.1101/gad.203984.112>
23. Di Mitri, D., Toso, A., Chen, J. J., Sarti, M., Pinton, S., Jost, T. R., D'Antuono, R., Montani, E., Garcia-Escudero, R., Guccini, I., Da Silva-Alvarez, S., Collado, M., Eisenberger, M., Zhang, Z., Catapano, C., Grassi, F., & Alimonti, A. (2014). Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature*, 515(7525), 134–137. <https://doi.org/10.1038/nature13638>
24. Dimozi, A., Mavrogonatou, E., Sklirou, A., & Kletsas, D. (2015). Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *European cells & materials*, 30, 89–103. <https://doi.org/10.22203/ecm.v030a07>
25. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
26. Double, K. L., Dedov, V. N., Fedorow, H., Kettle, E., Halliday, G. M., Garner, B., & Brunk, U. T. (2008). The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(11), 1669–1682. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7581-9>
27. Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., Medina-Echeverz, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., Heikenwalder, M., Wang, X. W., Zender, L., & Greten, T. F. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer cell*, 30(4), 533–547. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003>
28. Erwin WM, Ashman K, O'Donnel P, Inman RD. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(12): 3859-3867
29. Erwin, W. M., & Hood, K. E. (2014). The cellular and molecular biology of the intervertebral disc: A clinician's primer. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, 58(3), 246–257.
30. Erwin, W. M., & Inman, R. D. (2006). Notochord cells regulate intervertebral disc chondrocyte proteoglycan production and cell proliferation. *Spine*, 31(10), 1094–1099. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000216593.97157.dd>
31. Evangelou, K., & Gorgoulis, V. G. (2017). Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells.

Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1534, 111–119. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7_10)

32. Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S. V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., Kastrinakis, N. G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., Serrano, M., Bartek, J., & Gorgoulis, V. G. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging cell*, 16(1), 192–197. <https://doi.org/10.1111/acer.12545>

33. Ezaki, J., Wolfe, L. S., & Kominami, E. (1995). Defect of proteolysis of mitochondrial ATP synthase subunit C in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Gerontology*, 41 Suppl 2, 259–269. <https://doi.org/10.1159/000213748>

34. Feng, C., Yang, M., Zhang, Y., Lan, M., Huang, B., Liu, H., & Zhou, Y. (2018). Cyclic mechanical tension reinforces DNA damage and activates the p53-p21-Rb pathway to induce premature senescence of nucleus pulposus cells. *International journal of molecular medicine*, 41(6), 3316–3326. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3522>

35. Feng, C., Zhang, Y., Yang, M., Lan, M., Liu, H., Huang, B., & Zhou, Y. (2017). Oxygen-Sensing Nox4 Generates Genotoxic ROS to Induce Premature Senescence of Nucleus Pulposus Cells through MAPK and NF-κB Pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 7426458. <https://doi.org/10.1155/2017/7426458>

36. Feng, C., Zhang, Y., Yang, M., Lan, M., Liu, H., Wang, J., Zhou, Y., & Huang, B. (2017). The matrikine N-acetylated proline-glycine-proline induces premature senescence of nucleus pulposus cells via CXCR1-dependent ROS accumulation and DNA damage and reinforces the destructive effect of these cells on homeostasis of intervertebral discs. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(1), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.011>

37. Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal*, 30(8), 1536–1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>

38. Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya-Mendoza, A., Haagenen, E. J., Kokkalis, A., Roumelioti, F. M., Gagos, S., Tzetis, M., Canovas, B., Igea, A., Ahuja, A. K., Zellweger, R., Havaki, S., Kanavakis, E., Kletsas, D., Roninson, I. B., Garbis, S. D., Lopes, M., ... Gorgoulis, V. G. (2016). Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nature cell biology*, 18(7), 777–789. <https://doi.org/10.1038/ncb3378>

39. Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., & Gorgoulis, V. G. (2013). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging*, 5(1), 37–50. <https://doi.org/10.18632/aging.100527>

40. Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., & Gorgoulis, V.



G. (2013). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging*, 5(1), 37–50. <https://doi.org/10.18632/aging.100527>

41. Ghosh P, Brown S. *The biology of the intervertebral disc*. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988

42. Glees, P., & Hasan, M. (1976). Lipofuscin in neuronal aging and diseases. *Normale und pathologische Anatomie*, 32, 1–68.

43. Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current opinion in cell biology*, 22(6), 816–827. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.013>

44. Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., Ingram, J. A., Bethea, S., & Hanley, E. N. (2008). IGF-1 rescues human intervertebral annulus cells from in vitro stress-induced premature senescence. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 26(4), 220–225. <https://doi.org/10.1080/08977190802273814>

45. Gruber, H. E., Norton, H. J., & Hanley, E. N., Jr (2000). Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine*, 25(17), 2153–2157. <https://doi.org/10.1097/00007632-200009010-00002>

46. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G., & Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5868), 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>

47. Hamamoto, H., Miyamoto, H., Doita, M., Takada, T., Nishida, K., & Kurosaka, M. (2012). Capability of nondegenerated and degenerated discs in producing inflammatory agents with or without macrophage interaction. *Spine*, 37(3), 161–167. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31821a874b>

48. HAYFLICK, L., & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

49. Henry, N., Clouet, J., Le Bideau, J., Le Visage, C., & Guicheux, J. (2018). Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems. *Biotechnology advances*, 36(1), 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009>

50. Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current biology* : CB, 27(17), 2652–2660.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>

51. Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., & Grune, T. (2010). Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free radical biology & medicine*, 48(8), 1100–1108. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.030>

52. Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., & Castro, J. P. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox biology*, 11, 482–501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>
53. Inoue H. (1981). Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine*, 6(2), 139–146. <https://doi.org/10.1097/00007632-198103000-00006>
54. Ishihara, H., & Urban, J. P. (1999). Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 17(6), 829–835. <https://doi.org/10.1002/jor.1100170607>
55. Ito, Y., Hoare, M., & Narita, M. (2017). Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends in cell biology*, 27(11), 820–832. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.07.004>
56. Johnson, W. E., Stephan, S., & Roberts, S. (2008). The influence of serum, glucose and oxygen on intervertebral disc cell growth in vitro: implications for degenerative disc disease. *Arthritis research & therapy*, 10(2), R46. <https://doi.org/10.1186/ar2405>
57. Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119, 97–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.008>
58. Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., & Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6255), aaa5612. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>
59. Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nature medicine*, 21(12), 1406–1415. <https://doi.org/10.1038/nm.4001>
60. Komseli, E. S., Pateras, I. S., Krejsgaard, T., Stawiski, K., Rizou, S. V., Polyzos, A., Roumelioti, F. M., Chiourea, M., Mourkioti, I., Papatrouna, E., Zampetidis, C. P., Gumeni, S., Trougakos, I. P., Pefani, D. E., O'Neill, E., Gagos, S., Eliopoulos, A. G., Fendler, W., Chowdhury, D., Bartek, J., ... Gorgoulis, V. G. (2018). A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence. *BMC genomics*, 19(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4375-1>
61. Komseli, E. S., Pateras, I. S., Krejsgaard, T., Stawiski, K., Rizou, S. V., Polyzos, A., Roumelioti, F. M., Chiourea, M., Mourkioti, I., Papatrouna, E., Zampetidis, C. P., Gumeni, S., Trougakos, I. P., Pefani, D. E., O'Neill, E., Gagos, S., Eliopoulos, A. G., Fendler, W., Chowdhury, D., Bartek, J., ... Gorgoulis, V. G. (2018). A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence. *BMC genomics*, 19(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4375-1>

62. Kongsted, A., Kent, P., Axen, I., Downie, A. S., & Dunn, K. M. (2016). What have we learned from ten years of trajectory research in low back pain?. *BMC musculoskeletal disorders*, 17, 220. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1071-2>
63. König, J., Ott, C., Hugo, M., Jung, T., Bulteau, A. L., Grune, T., & Höhn, A. (2017). Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox biology*, 11, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.017>
64. Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews. Cancer*, 9(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>
65. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22), 2463–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
66. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
67. Li, J., Liu, C., Guo, Q., Yang, H., & Li, B. (2014). Regional variations in the cellular, biochemical, and biomechanical characteristics of rabbit annulus fibrosus. *PloS one*, 9(3), e91799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091799>
68. Lin, A. W. et al. (1998) 'Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.12.19.3008
69. Maeda, S., & Kokubun, S. (2000). Changes with age in proteoglycan synthesis in cells cultured in vitro from the inner and outer rabbit annulus fibrosus. Responses to interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist protein. *Spine*, 25(2), 166–169. <https://doi.org/10.1097/00007632-200001150-00005>
70. Maetzel, A., & Li, L. (2002). The economic burden of low back pain: a review of studies published between 1996 and 2001. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 16(1), 23–30. <https://doi.org/10.1053/berh.2001.0204>
71. Maniadakis, N., & Gray, A. (2000). The economic burden of back pain in the UK. *Pain*, 84(1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(99\)00187-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(99)00187-6)
72. Mavrogonatou, E., & Kletsas, D. (2009). High osmolality activates the G1 and G2 cell cycle checkpoints and affects the DNA integrity of nucleus pulposus intervertebral disc cells triggering an enhanced DNA repair response. *DNA repair*, 8(8), 930–943. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.05.005>
73. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>

74. Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
75. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, 15(3), 1101–1111. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>
76. Moreno-García, A., Kun, A., Calero, O., Medina, M., & Calero, M. (2018). An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience*, 12, 464. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00464>
77. Müller-Lutz, A., Schleich, C., Pentang, G., Schmitt, B., Lanzman, R. S., Matuschke, F., Wittsack, H. J., & Miese, F. (2015). Age-dependency of glycosaminoglycan content in lumbar discs: A 3t gagcEST study. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 42(6), 1517–1523. <https://doi.org/10.1002/jmri.24945>
78. Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
79. Nachemson, A., Lewin, T., Maroudas, A., & Freeman, M. A. (1970). In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 41(6), 589–607. <https://doi.org/10.3109/17453677008991550>
80. Nasto, L. A., Wang, D., Robinson, A. R., Clauson, C. L., Ngo, K., Dong, Q., Roughley, P., Epperly, M., Huq, S. M., Pola, E., Sowa, G., Robbins, P. D., Kang, J., Niedernhofer, L. J., & Vo, N. V. (2013). Genotoxic stress accelerates age-associated degenerative changes in intervertebral discs. *Mechanisms of ageing and development*, 134(1-2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.11.002>
81. Nerlich, A. G., Schleicher, E. D., & Boos, N. (1997). 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine*, 22(24), 2781–2795. <https://doi.org/10.1097/00007632-199712150-00001>
82. Newell, N., Little, J. P., Christou, A., Adams, M. A., Adam, C. J., & Masouros, S. D. (2017). Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 69, 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.01.037>
83. Ngo, K., Patil, P., McGowan, S. J., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Kang, J., Sowa, G., & Vo, N. (2017). Senescent intervertebral disc cells exhibit perturbed matrix homeostasis phenotype. *Mechanisms of ageing and development*, 166, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.007>
84. Nyström T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*, 24(7), 1311–1317. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>

85. Park, J. S., Park, J. B., Park, I. J., & Park, E. Y. (2014). Accelerated premature stress-induced senescence of young annulus fibrosus cells of rats by high glucose-induced oxidative stress. *International orthopaedics*, 38(6), 1311–1320. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2296-z>
86. Patil, P., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Lee, J., Sowa, G., & Vo, N. (2018). Cellular senescence in intervertebral disc aging and degeneration. *Current molecular biology reports*, 4(4), 180–190. <https://doi.org/10.1007/s40610-018-0108-8>
87. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging cell*, 15(6), 999–1017. <https://doi.org/10.1111/acer.12518>
88. Purmessur, D., Walter, B. A., Roughley, P. J., Laudier, D. M., Hecht, A. C., & Iatridis, J. (2013). A role for TNF $\alpha$  in intervertebral disc degeneration: a non-recoverable catabolic shift. *Biochemical and biophysical research communications*, 433(1), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.034>
89. Raj P. P. (2008). Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 8(1), 18–44. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x>
90. Risbud, M. V., & Shapiro, I. M. (2014). Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(1), 44–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.160>
91. Rizou, S. V., Evangelou, K., Myrianthopoulos, V., Mourouzis, I., Havaki, S., Athanasiou, A., Vasileiou, P., Margetis, A., Kotsinas, A., Kastrinakis, N. G., Sfrikakis, P., Townsend, P., Mikros, E., Pantos, C., & Gorgoulis, V. G. (2019). A Novel Quantitative Method for the Detection of Lipofuscin, the Main By-Product of Cellular Senescence, in Fluids. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1896, 119–138. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7_12)
92. Roberts, S., Menage, J., Duance, V., Wotton, S., & Ayad, S. (1991). 1991 Volvo Award in basic sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study. *Spine*, 16(9), 1030–1038.
93. Robles L. J. (1978). Accumulation and identification of lipofuscin-like pigment in the neurons of *Bulla gouldiana* (Gastropoda: Opisthobranchia). *Mechanisms of ageing and development*, 7(1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(78\)90052-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(78)90052-0)
94. Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology*, 192(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
95. Rodolfo, C., Campello, S., & Cecconi, F. (2018). Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, 117, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.004>

96. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*, 28(2), 99–114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
97. Satoh, M., Yamasaki, Y., Nagake, Y., Kasahara, J., Hashimoto, M., Nakanishi, N., & Makino, H. (2001). Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney international*, 59(5), 1943–1950. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590051943.x>
98. Setton, L. A., & Chen, J. (2006). Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 88 Suppl 2, 52–57. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00001>
99. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature reviews. Cancer*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
100. Shay, J. W., & Wright, W. E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature reviews. Genetics*, 20(5), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>
101. Smith R. T. (2016). New Understanding of Age-Related Macular Degeneration Through Quantitative Autofluorescence. *JAMA ophthalmology*, 134(7), 824–826. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.1466>
102. Snyder AN, Crane JS. Histology, Lipofuscin. [Updated 2020 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Ja
103. Stranjalis, G., Tsamandouraki, K., Sakas, D. E., & Alamanos, Y. (2004). Low back pain in a representative sample of Greek population: analysis according to personal and socioeconomic characteristics. *Spine*, 29(12), 1355–1361. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000127181.59012.1c>
104. Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Ide, T., Saya, H., & Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature cell biology*, 8(11), 1291–1297. <https://doi.org/10.1038/ncb1491>
105. Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A., and Brunk, U. T. (2010). Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 503–535. doi: 10.1089/ars.2009.2598
106. Urban, J. P., & Roberts, S. (2003). Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis research & therapy*, 5(3), 120–130. <https://doi.org/10.1186/ar629>
107. van Tulder, M. W., Koes, B. W., & Bouter, L. M. (1995). A cost-of-illness study of back pain in The Netherlands. *Pain*, 62(2), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00272-g](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00272-g)

108. Vidal-Donet, J. M., Cárcel-Trullols, J., Casanova, B., Aguado, C., & Knecht, E. (2013). Alterations in ROS activity and lysosomal pH account for distinct patterns of macroautophagy in LINCL and JNCL fibroblasts. *PloS one*, 8(2), e55526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055526>
109. Vlaeyen, J., Maher, C. G., Wiech, K., Van Zundert, J., Meloto, C. B., Diatchenko, L., Battié, M. C., Goossens, M., Koes, B., & Linton, S. J. (2018). Low back pain. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 52. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0052-1>
110. Vo, N. V., Hartman, R. A., Patil, P. R., Risbud, M. V., Kletsas, D., Iatridis, J. C., Hoyland, J. A., Le Maitre, C. L., Sowa, G. A., & Kang, J. D. (2016). Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 34(8), 1289–1306. <https://doi.org/10.1002/jor.23195>
111. Vo, N., Seo, H. Y., Robinson, A., Sowa, G., Bentley, D., Taylor, L., Studer, R., Usas, A., Huard, J., Alber, S., Watkins, S. C., Lee, J., Coehlo, P., Wang, D., Loppini, M., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., & Kang, J. (2010). Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 28(12), 1600–1607. <https://doi.org/10.1002/jor.21153>
112. Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J. A., Abdalla, S., Aboyans, V., Abraham, J., Ackerman, I., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Ali, M. K., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., ... Memish, Z. A. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)*, 380(9859), 2163–2196. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)
113. Walker, B. F., Muller, R., & Grant, W. D. (2003). Low back pain in Australian adults: the economic burden. *Asia-Pacific journal of public health*, 15(2), 79–87. <https://doi.org/10.1177/101053950301500202>
114. WALMSLEY R. (1953). The development and growth of the intervertebral disc. *Edinburgh medical journal*, 60(8), 341–364.
115. Wang, D., Nasto, L. A., Roughley, P., Leme, A. S., Houghton, A. M., Usas, A., Sowa, G., Lee, J., Niedernhofer, L., Shapiro, S., Kang, J., & Vo, N. (2012). Spine degeneration in a murine model of chronic human tobacco smokers. *Osteoarthritis and cartilage*, 20(8), 896–905. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.04.010>
116. Wang, F., Cai, F., Shi, R., Wang, X. H., & Wu, X. T. (2016). Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis and cartilage*, 24(3), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.09.019>
117. Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., &

Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell metabolism*, 23(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>

118. Yu, J., Winlove, P. C., Roberts, S., & Urban, J. P. (2002). Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *Journal of anatomy*, 201(6), 465–475. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00111.x>

119. Medema J. P. (2018). Escape from senescence boosts tumour growth. *Nature*, 553(7686), 37–38. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-08652-0>

120. Roberts S, Evans EH, Kletsas D, Jaffray DC, Eisenstein SM. Senescence in human intervertebral discs. *Eur Spine J* 2006;15(Suppl 3):S312e6.

121. Kim KW, Chung HN, Ha KY, Lee JS, Kim YY. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Spine J* 2009;9(8):658e66.

122. Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, Hanley Jr EN. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32(3):321e7.

123. Le MCL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2007;9(3):R45.

124. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res* 2001;42(3):197e207.

125. Sharp CA, Roberts S, Evans H, Brown SJ. Disc cell clusters in pathological human intervertebral discs are associated with increased stress protein immunostaining. *Eur Spine J* 2009;18(11):1587e94.

126. Heathfield, S. K., Le Maitre, C. L., & Hoyland, J. A. (2008). Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration. *Arthritis research & therapy*, 10(4), R87. <https://doi.org/10.1186/ar2468>

127. Pratsinis, H., & Kletsas, D. (2007). PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 16(11), 1858–1866. <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0408-9>